

**EFEITO DO DIIDROCLORETO DE 2,2'-AZOBIS (2-METILPROPIONAMIDINA) SOBRE MÚSCULO LISO DE TRAQUÉIA DE RATO**

(THE EFFECTS OF 2,2-AZOBIS (2-AMIDINOPROPANE) DIHYDROCHLORIDE ON TRACHEAL SMOOTH MUSCLE)

Maria Diana Moreira Gomes<sup>1</sup>, Dieniffer Peixoto Neves<sup>1</sup>, Karilane Maria Silvino Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Carolina Cardoso Teixeira<sup>1</sup>, Felipe Crescêncio Lima<sup>1</sup>, José Henrique Leal Cardoso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará

**ABSTRACT**

The effects of 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), an inducer agent of free radicals (peroxyl radical) formation, on the rat tracheal smooth muscle. The experiments were performed on tracheal ring preparations maintained in aerated modified Tyrode solution, in pH 7,4 at 37 °C. The force developed by the tracheal smooth muscle was measured by the isometric force transducer connected to a computerized system. On contractions induced by acetylcholine (10 µM), AAPH presented a biphasic effect: contraction potentiation at low concentration on intact and denuded epithelium preparations ( $CE_{50} = 0,8776 \pm 0,415$  mM and  $CE_{50} = 0,3338 \pm 0,343$  mM, respectively); and contraction inhibition at high concentration on intact and denuded epithelium preparations ( $CE_{50} = 81,5562 \pm 4,284$  mM and  $CE_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM, respectively). On electromechanic coupling, AAPH inhibited contractions induced by KCl (60 mM) on intact and denuded epithelium preparations ( $CE_{50} = 57,4037 \pm 4,652$  mM and  $CE_{50} = 32,9650 \pm 2,652$  mM, respectively). In conclusion, AAPH presented a concentration-dependent biphasic effect (potentiation and inhibition) on pharmacomechanic coupling while it was able to only inhibit the electromechanic coupling. In conclusion, AAPH presented a concentration-dependent biphasic effect (potentiation and inhibition) on pharmacomechanic coupling while it was able to only inhibit the electromechanic coupling. Comparing the present data with those available in literature for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, we can suggest that these observed effects are not specific for AAPH, but they are derived from the free radicals induced by AAPH.

**KEYWORDS:** Excitation-contraction coupling, 2,2' -azobis (2- amidinopropane) dihydrochloride; smooth muscle, free radicals, peroxyl radical and trachea.

**INTRODUÇÃO**

As doenças respiratórias têm um grande impacto na população mundial, quer seja por sua morbidade, mortalidade ou pelos custos envolvidos em seu tratamento. A maioria das doenças respiratórias crônicas ocorre em todas as faixas etárias e representam uma carga substancial, tanto para o indivíduo como para a sociedade (ANDRADE-JUNIOR *et al.*, 2005; CIENVEWICKI *et al.*, 2008). Aliado a esse fato, evidências substanciais indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel central na gênese de doenças respiratórias como a asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), lesão pulmonar aguda, fibrose pulmonar e câncer de pulmão. Logo, o estresse oxidativo tornou-se umas das áreas mais interessantes de pesquisa

biomédica em todo o mundo (HENRICKS & NIJKAMP, 2001; MACNEE, 2007).

Estudos demonstram que as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) são capazes de aumentar a expressão de TNF- $\alpha$  que, por sua vez, promove o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como como IL-6 e IL-1 $\beta$ , além do próprio NF- $\kappa$ B (TSUSHIMA *et al.*, 2009). Assim, as EROs estão entre os inúmeros mediadores liberados em processos inflamatórios das vias aéreas, ocasionando alterações na contração e relaxamento do músculo liso traqueal (RAHMAN e MACNEE, 2000; HENRICKS e NIJKAMP, 2001). Na inflamação brônquica das vias aéreas, as células inflamatórias por meio da liberação de inúmeros mediadores, tais como histamina, leucotrienos, EROs e citocinas promovem alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico e tônus das vias aéreas, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso traqueal (KUMAR *et al.*, 2001; HOLGATE *et al.*, 2000). Adicionalmente, a peroxidação lipídica

\*Autor correspondência: [lealcard@gmail.com](mailto:lealcard@gmail.com)  
Resumo em Português disponível no Suplemento

ocasionada pelo estresse oxidativo produz transtornos no metabolismo das células do músculo liso, incluindo aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ , alteração no transporte iônico, alteração na permeabilidade da membrana e sua destruição (RECKMAGE *et al.*, 1989).

Nesse sentido, resolvemos estudar o dicloridrato de 2,2-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), um azocomposto usado na literatura científica para mimetizar o estado de estresse oxidativo e, dessa forma, estudar os efeitos dos radicais livres nos tecidos. Quando o AAPH entra em contato com solução aquosa, produz um nitrogênio molecular ( $N_2$ ) e dois radicais de carbono ( $R^\cdot$ ), que reagem rapidamente com moléculas de oxigênio para produzir radical peroxy ( $ROO^\cdot$ ) (PELUSO *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do AAPH sobre a contratilidade do músculo liso traqueal, que poderá constituir-se em um passo relevante para a elucidação do mecanismo de ação de radicais e sua associação à patologias das vias aéreas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Sais, fármacos e soluções

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas são de grau de pureza analítica obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany), Reagem (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Wako Chemicals (USA). As concentrações foram expressas em milimol/litro (mM) ou micromol/litro ( $\mu M$ ). O cloridrato de acetilcolina (Ach) e AAPH foram adquiridos da Sigma Chemical Corporation (USA). A solução nutritiva de Tyrode modificada (TM) teve a seguinte composição expressa em mM: NaCl=136; KCl=5,0;  $MgCl_2$ =0,98;  $NaH_2PO_4$ =0,36;  $NaHCO_3$ =11,9;  $CaCl_2$ =2,0 e Glicose=5,5. A solução nutritiva foi mantida constantemente aerada por borbulhamento de ar, à temperatura de 37° C e o pH ajustado para 7,4.

### Animais

Neste estudo os animais utilizados foram ratos (*Ratus norvegicus*), adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 300 gramas, mantidos com acesso a água e ração, "Ad libitum", provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). O manuseio dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais CEUA-UECE, sob protocolo número 06379067-0.

### Preparação tecidual e mensuração da atividade contrátil

Os animais foram sacrificados em câmara de  $CO_2$ . Em seguida foi realizada a abertura da face ventral do pescoço por uma incisão longitudinal da pele e afastamento das glândulas e dos músculos para a exposição e a remoção da traquéia, que foi seccionada em segmentos transversos circulares de 4 - 5 mm de comprimento. Os tecidos foram montados em câmaras de superfusão preenchidas com solução de TM. A preparação teve uma extremidade conectada a um transdutor de força do tipo "strain gage" (Grass Instruments, modelo FT.03, Quincy, Mass, EUA), e a outra extremidade a uma base fixa. As respostas musculares mecânicas foram transformadas pelo transdutor em sinal elétrico. O transdutor foi conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), e este à entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada num computador IBM Pentium, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ versão 1.65 (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para análise posterior. Após a montagem da preparação, os segmentos isolados de traquéia foram submetidos a uma tensão de estabilização de 1 grama e mantida por um período de 1 hora. Ao final da estabilização, considerar-se-á que a preparação atingiu o tônus basal de repouso.

### Protocolos experimentais

Com o objetivo de verificar a viabilidade e integridade do tecido traqueal, em todos os protocolos experimentais foi provocadas contrações subseqüentes por 60 mM de potássio ( $K^+$ ). Após verificar a viabilidade do tecido, todos os protocolos experimentais foram iniciados com a administração, por duas vezes e de forma não cumulativa, de Ach (10  $\mu M$ ), indutora de contração, cuja amplitude foi aproximadamente de 70 a 80% da contração máxima (contração submaximal), que foi usada como padrão de contração controle. Ao final de cada protocolo realizamos 5 lavagens com TM em intervalo de 10 minutos, finalizando com uma contração com Ach (10  $\mu M$ ) para verificar a recuperação do tecido. Para elucidação do papel modulatório do epitélio, utilizamos protocolos sem a preservação deste.

### Protocolo 1: Estudo do efeito do AAPH sobre a contração induzida pela Ach, com e sem a preservação do epitélio.

Esse protocolo foi utilizado com o objetivo de estudar o efeito do AAPH sobre o acoplamento farmacomecânico. Após as contrações utilizadas como controle, expusemos a preparação de maneira não cumulativa a uma dada concentração de AAPH (0,01 - 200 mM) e, após

aproximadamente 5 minutos nessa dada concentração, adicionamos a Ach (10  $\mu$ M) ao banho.

### **Protocolo 2: Estudo do efeito do AAPH sobre a contração induzida pela K<sup>+</sup>, com e sem a preservação do epitélio.**

Esse protocolo foi utilizado a fim de a investigar o efeito do AAPH (0,01 – 200 mM) sobre a contração produzida por K<sup>+</sup>. Essa contração foi induzida por uma concentração de 60 mM de K<sup>+</sup>, cuja amplitude foi aproximadamente 60 a 80% (contração submaximal) da contração máxima promovida pelo K<sup>+</sup>. Nesses experimentos em que 60 mM de K<sup>+</sup> foi utilizado, realizaram-se como controle inicial as duas contrações submaximais na ausência do AAPH.

### **Análise estatística**

Os resultados dos dados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n), onde n representa o número de experimentos e E.P.M. é o erro padrão da média. Os gráficos foram produzidos utilizando o software Sigma Plot 8.0. Foi utilizado o software Sigma Stat 3.0 para a análise estatística, onde foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% (p<0,05). Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t pareado ou não pareado; para mais de dois grupos experimentais, ANOVA seguido de técnica de contraste (testes paramétricos ou não paramétricos), conforme apropriado, respeitando-se as hipóteses de normalidade da distribuição e de homocedasticidade. As EC<sub>50</sub> foram calculadas por interpolação semilogarítmica e fit sigmoide, por meio do software Sigma Stat 3.0, sendo consideradas neste trabalho como a concentração da substância que é capaz de produzir 50% do efeito máximo (estimulatório).

## **RESULTADOS**

### **Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

O AAPH produziu efeito bifásico sobre as contrações submaximais induzidas por Ach nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam com a preservação do epitélio (Figura 1). Nas concentrações entre 0,01 - 60 mM o AAPH potencializou a contração produzida por Ach, de maneira dose-dependente, que foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle. Seu efeito potencializador foi

máximo na concentração de 10 mM (1,2019  $\pm$  0,152 g), onde apresentou uma amplitude de contração 60,36% maior quando comparada com seu controle (0,7295  $\pm$  0,066 g). A EC<sub>50</sub> do seu efeito potencializador, ou seja, levando em consideração as concentrações que evocaram potencialização da contração de Ach, foi igual a 0,8776  $\pm$  0,4150 mM (Tabela 1).

O AAPH apresentou também efeito inibidor, diminuindo as amplitudes de contrações nas concentrações de 100 e 200 mM, que foi significativo em relação ao controle. Na concentração 200 mM, o AAPH foi capaz de inibir quase totalmente a contração induzida por Ach, reduzindo para valores insignificantes (0,0120  $\pm$  0,005 g). A EC<sub>50</sub> do seu efeito inibidor, ou seja, levando em consideração as concentrações que evocaram inibição, foi igual a 81,5562  $\pm$  4,284 mM (Tabela 2).

Como o epitélio é importante modulador nas contrações do músculo liso traqueal induzido por neurotransmissores e autacóides (GOLDIE *et al.*, 1990), realizou-se comparação do efeito do AAPH sobre a contração induzida pela Ach em preparações sem a preservação do epitélio (Figura 2). O AAPH também promoveu a potencialização da contração colinérgica em preparação traqueal sem a preservação do epitélio, porém somente na concentração de 1 mM a contração (1,1433  $\pm$  0,148 g) foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle.

Embora não seja estatisticamente significativa, a concentração que provocou maior potencialização da contração foi de 10 mM (1,1223  $\pm$  0,252 g). A potencialização produzida por AAPH nas concentrações de 1 e 10 mM correspondem, respectivamente, a uma contração 19,26% e 19,98% maior do que a contração do controle. A EC<sub>50</sub> do seu efeito potencializador foi igual a 0,3388  $\pm$  0,343 mM (Tabela 1).

Além disso, o AAPH apresentou, também efeito inibidor, diminuindo as amplitudes de contrações nas concentrações 60, 100 e 200 mM, que foi estatisticamente significativa quando comparada com o controle. Na concentração de 200 mM, o AAPH foi capaz de reverter quase totalmente a contração induzida por Ach, reduzindo para valores insignificantes (0,0012  $\pm$  0,016 g). A EC<sub>50</sub> do seu efeito inibidor foi igual a 57,7786  $\pm$  8,607 mM (Tabela 2).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela acetilcolina em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Ao compararmos o efeito potencializador do AAPH sobre a contração submaximal de Ach entre preparações com e sem a preservação do epitélio, observamos diferenças estatisticamente significantes nas concentrações 3, 10, 30 e 60 mM (Figura 3). Enquanto nas preparações traqueais em que o epitélio foi preservado a maior potencialização da contração de Ach ocorreu na concentração de 10 mM ( $1,2019 \pm 0,152$  g), nas preparações em que o epitélio não foi preservado, a concentração de AAPH que evocou maior potencialização foi 1 mM ( $1,1433 \pm 0,148$  g).

Nas preparações traqueais com epitélio, o AAPH (30 mM) provocou potencialização da contração de Ach ( $1,1368 \pm 0,152$  g), que foi estatisticamente significante quando comparada com seu controle ( $0,7295 \pm 0,066$  g). Por outro lado, nas preparações em que o epitélio não foi preservado, o AAPH (30 mM) não induziu potencialização da contração de Ach ( $0,9283 \pm 0,254$  g), apresentando média de contração próxima do seu controle ( $1,0035 \pm 0,167$  g). Quando comparamos as  $EC_{50}$  do efeito potencializador das preparações com a preservação do epitélio ( $0,8776 \pm 0,415$  mM) e sem a preservação do epitélio ( $0,3388 \pm 0,343$  mM), não obteve-se diferenças significativas.

Nas preparações traqueais em que o epitélio foi preservado, o efeito inibidor do AAPH foi observado nas concentrações de 100 e 200 mM, sendo estatisticamente significante somente na concentração de 100 mM, quando comparada com preparações onde não houve a preservação do epitélio. Por outro lado, nas preparações sem epitélio, o efeito inibidor do AAPH sobre a contração submaximal de Ach foi observado nas concentrações 60, 100 e 200 mM (Figura 2).

Na concentração de 60 mM, em preparações em que o epitélio foi preservado, o AAPH evocou potencialização da contração de Ach ( $0,9230 \pm 0,127$  g), quando comparada com o controle ( $0,7295 \pm 0,066$  g). Enquanto em preparações sem a preservação do epitélio, 60 mM de AAPH evocou inibição da contração de Ach ( $0,6168 \pm 0,196$  g), quando comparada com o controle ( $1,0035 \pm 0,167$  g). Quando comparamos o efeito do AAPH na concentração de 60 mM entre as preparações com e sem a preservação do epitélio, observamos que são diferentes estatisticamente entre si. Quando comparamos as  $EC_{50}$  do efeito inibidor das preparações com a preservação do epitélio ( $81,5562 \pm 4,284$  mM) e sem a preservação do epitélio ( $57,7786 \pm 8,607$ ), observamos que são estatisticamente diferentes entre si (Tabela 2).

### **Efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

Verificou-se o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico em preparações traqueais com preservação do epitélio (Figura 4). O AAPH inibiu as contrações submaximais evocada por concentração submaximal de  $K^+$  (60 mM) nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam com o epitélio preservado. Esse efeito relaxante foi estatisticamente significante nas concentrações 10, 30, 60, 100 e 200 mM quando comparado com o controle. Seu efeito inibitório foi máximo na concentração 200 mM e apresentou  $EC_{50}$  igual a  $57,4037 \pm 4,652$  mM (Tabela 3).

Verificou-se também o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico em preparações traqueais sem a preservação do epitélio (Figura 5) O AAPH inibiu as contrações submaximais evocada por concentração submaximal de  $K^+$  (60 mM) nos experimentos em que os anéis de traquéia estavam sem a preservação do epitélio. Esse efeito relaxante foi estatisticamente significante nas concentrações 30, 60, 100 e 200 mM quando comparado com o controle. Seu efeito relaxante foi máximo na concentração 200 mM e apresentou  $EC_{50}$  igual a  $32,9650 \pm 2,652$  mM (Tabela 3).

### **Comparação entre o efeito do AAPH sobre a contração induzida pela concentração submaximal de potássio em preparações traqueais com e sem a preservação do epitélio**

O AAPH inibiu as contrações induzidas por potássio em ambas as preparações (Figura 6). Ao compararmos o efeito inibidor do AAPH sobre a contração eletromecânica entre preparações com e sem epitélio, observamos diferenças estatisticamente significantes nas concentrações 3, 30 e 60 mM, quando comparadas entre si.

Enquanto nas preparações com a preservação do epitélio o efeito inibidor do AAPH foi significante na concentração a partir de 10 mM, naquelas sem a preservação do epitélio, a significância ocorreu a partir da concentração de 30 mM.

Apresentou  $EC_{50}$  igual a  $57,4037 \pm 4,652$  mM e  $EC_{50}$  igual a  $32,9650 \pm 2,652$  mM respectivamente nas preparações com e sem a preservação do epitélio, que foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Apesar de o AAPH, no que concerne a contratilidade, já ter sido estudado em músculo liso intestinal, como em íleo de cobaio e jejuno de coelho (PELUSO *et al.*, 2002), a literatura não documenta estudos dessa substância em músculo liso traqueal. Portanto, o presente estudo se constitui em uma contribuição à literatura que é original e, adicionalmente, relevante. Essa relevância advém do fato de o AAPH ser um agente modelo para indução da formação dos radicais livres (PELUSO *et al.*, 2002), como também pelo fato de no acoplamento excitação-contração do músculo liso traqueal apresentar alterações peculiares ocasionadas em decorrências de doenças respiratórias que, por sua vez, estão relacionadas com o aumento na produção de radicais livres (JANSEN, 2006).

De um modo geral, o AAPH apresentou a característica interessante de ser um agente bloqueador de contrações induzidas por Ach e K<sup>+</sup>, bem como foi capaz de induzir potencialização da contração induzida por Ach, fato este que não foi observado sobre a contração evocada por K<sup>+</sup> (Figuras 1, 2, 4 e 5).

A camada epitelial que reveste a traquéia é capaz de sintetizar uma ampla variedade de substâncias biologicamente ativas, dentre elas os prostanóides (FOLKERTS e NIJKAMP, 1998). A síntese dos prostanóides, a partir da metabolização do ácido araquidônico por radicais livres, pode exercer diversos efeitos biológicos sobre a musculatura lisa, podendo variar de uma poderosa contração até um completo relaxamento, dependendo da espécie e do tecido animal (JANSEN, 2000). Vale a pena ressaltar que a importância do epitélio na responsividade da via aérea é notória quando se avalia as repercussões provocadas pelo dano epitelial, uma consequência da inflamação das vias aéreas, que tem íntima participação com o aumento da produção dos radicais livres. Estudos *in vitro*, têm demonstrado que a lesão epitelial ocasiona aumento da responsividade brônquica a diversos agentes farmacológicos (BOSKABADY e TEYMOORY, 2003).

Para elucidar a importância da participação do epitélio, realizamos experimentos em que o epitélio não foi preservado. Nossos resultados demonstraram que, de um modo geral, o epitélio modulou o efeito do AAPH sobre a contração farmacomecânica e eletromecânica do músculo liso traqueal (Figuras 3 e 6). Portanto, nossos dados sugerem que o epitélio modula de forma significativa o efeito do AAPH sobre o músculo liso traqueal de ratos, especialmente no acoplamento farmacomecânico (Figura 3).

Sobre o acoplamento farmacomecânico o AAPH apresentou duplo efeito em anéis de traquéia com e sem a preservação do epitélio: 1) em baixas concentrações foi capaz de potencializar as contrações induzidas por Ach, 2) em concentrações maiores foi capaz de reverter totalmente as contrações induzidas por Ach (Figuras 1 e 2). Sobre o acoplamento eletromecânico o AAPH também apresentou efeito inibidor em anéis de traquéia com e sem a preservação do epitélio, porém não apresentou efeito potencializador (Figura 4).

O efeito potencializador sobre a contração colinérgica, em baixas concentrações do AAPH, é um dado novo na literatura, não tendo sido observado no único trabalho realizado com esse reagente em músculo liso intestinal (PELUSO *et al.*, 2002). É bem aceito na literatura científica que a ativação da via da enzima rho-cinase por agonistas como a Ach, pode promover o aumento da fosforilação da enzima cinase da cadeia leve de miosina, resultando em manutenção ou aumento da contração no músculo liso (FERNANDES *et al.*, 2006). É documentado na literatura científica que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi capaz de induzir contração em músculo liso traqueal de cobaias por ativação da via da rho-cinase (KATSUYUKI *et al.*, 2006), o que corrobora com os resultados do presente trabalho. Portanto, é razoável lançar a hipótese de que o efeito potencializador da contração colinérgica induzido por AAPH tenha participação do aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca<sup>2+</sup>.

Nas preparações em que o epitélio não foi preservado, o efeito potencializador na contração colinérgica induzida pelo AAPH não foi relevante quando comparado com o controle (figura 3). Esse efeito pode ser explicado por meio de várias hipóteses. Como a desepitelização já aumenta a amplitude de contração, levando-as para valores próximos do limite fisiológico de contração máxima do músculo, uma hipótese que se mostra atrativa é que a grande redução da potencialização se deva a saturação contrátil nas preparações sem a preservação do epitélio. Quando comparamos as EC<sub>50</sub> do efeito potencializador do AAPH nas preparações em que o epitélio foi preservado (EC<sub>50</sub>= 0,8776 ± 0,415 mM) com aquelas em que o epitélio não foi preservado (EC<sub>50</sub>= 0,3388 ± 0,343 mM), percebemos que não houve diferença estatisticamente significativa em ambas.

Em relação ao efeito inibitório do AAPH sobre a contração pela Ach, nossos dados são similares aos da literatura, uma vez que estudos sobre o efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também demonstraram efeito inibidor sobre a contração colinérgica em músculo liso traqueal de coelhos (PRASAD e

GUPTA, 1992) e em caninos (JANSEN *et al.*, 2000).

O presente estudo não objetivou elucidar o mecanismo de ação da atividade inibidora do AAPH. Contudo, algumas conclusões relacionadas a esse mecanismo podem ser apresentadas. O bloqueio à contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup> torna pouco provável a ocorrência de muitos mecanismos de ação, tais como: i) atuação em canais de K<sup>+</sup> da membrana citoplasmática do músculo liso; ii) alteração do potencial transmembrana (KNOT *et al.*, 1996).

É pouco provável que a atividade anti-espasmódica seja resultante da hiperpolarização da membrana citoplasmática (HERMSMEYER *et al.*, 1998) que é consequente a alterações da condutância da membrana citoplasmática do músculo liso a íons, inclusive ao K<sup>+</sup> (ativação de canais de potássio). Essa pequena probabilidade de hiperpolarização resulta da grande ativação dos canais de K<sup>+</sup> da retificação retardada a uma [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> de 60 mM.

Nessa situação essa retificação realiza algo similar a um clampeamento de voltagem transmembrana no potencial do equilíbrio K<sup>+</sup> ditado pela [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> de 60 mM, ou seja, aproximadamente -20 mV. Medidas do laboratório de Eletrofisiologia do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da UECE, disponíveis na literatura, têm documentação de que à concentração extra-celular de K<sup>+</sup> de 60 mM,

o potencial de repouso em vários tipos de músculo liso (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2004), inclusive o traqueal, se situa em torno de -20 mV.

Assim, os dados desse estudo sugerem que o efeito inibidor do AAPH se origina de uma ou várias atuações em etapas da cascata de reações do acoplamento excitação-contração e/ou da contração propriamente dita que são posteriores às etapas comuns ao acoplamento fármaco e eletromecânico (REMBOLD, 1996).

Esses dados nos sugerem que o efeito do AAPH sobre o acoplamento eletromecânico e farmacomecânico ocorre via receptores de membrana citoplasmática para neurotransmissores e autocóides. Esse dado é reforçado por estudos anteriormente realizados, onde se afirma que o epitélio modula a contratilidade do músculo liso traqueal por meio da liberação de neurotransmissores e autocóides (GOLDIE *et al.*, 1990; HAY *et al.*, 1993; DEVALIA *et al.*, 1997).

## CONCLUSÕES

Desse modo, a comparação dos dados do presente trabalho com os disponíveis na literatura científica para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerem que os efeitos aqui observados não são específicos para a substância AAPH, mas sim originários dos RL por ela produzidos.

**TABELA 1.** Efeito potencializador do AAPH (EC<sub>50</sub>) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 0,01 a 10 mM

Protocolo / Efeito	EC <sub>50</sub>	p
AAPH sobre a contração de Ach com preservação do EPT (n=10) (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 mM)	[0,8776 ± 0,415] mM	< 0,05
AAPH sobre a contração de Ach sem preservação do EPT (n=9) (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, e 1 mM)	[0,3388 ± 0,343] mM	ns

NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. da concentração em mM; p = nível de significância da diferença em relação ao controle (ausência de AAPH); ns = não significante.

**TABELA 2.** Efeito inibidor do AAPH (EC<sub>50</sub>) sobre a contração submaximal de acetilcolina na faixa de concentração entre 1 a 200 mM

Protocolo / Efeito	EC <sub>50</sub>	p
AAPH sobre a contração de Ach com preservação do EPT (n=10) (10, 30, 60, 100 e 200 mM)	[81,5562 ± 4,284] mM	< 0,0001
AAPH sobre a contração de Ach sem preservação do EPT (n=9) (1, 3, 10, 30, 60, 100 e 200 mM)	[57,7786 ± 8,607] mM	< 0,0001

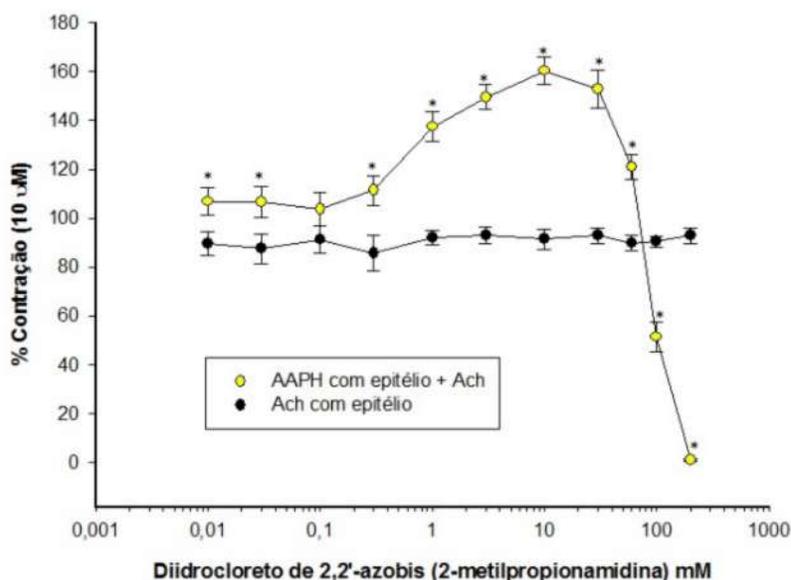
NOTA: Os valores representam a média ± E. P. M. da concentração em mM e p = nível de significância da diferença em relação ao controle (ausência de AAPH).

**TABELA 3.** Efeito do AAPH ( $EC_{50}$ ) sobre a contração de potássio na faixa de concentração entre 0,01 a 200 mM

Protocolo / Efeito	$EC_{50}$	p
AAPH sobre a contração de $K^+$ com preservação do EPT (n=7)	$[57,4037 \pm 4,652 \text{ mM}]$	< 0,001
AAPH sobre a contração de $K^+$ sem preservação do EPT (n=9)	$[32,9650 \pm 2,652 \text{ mM}]$	< 0,001

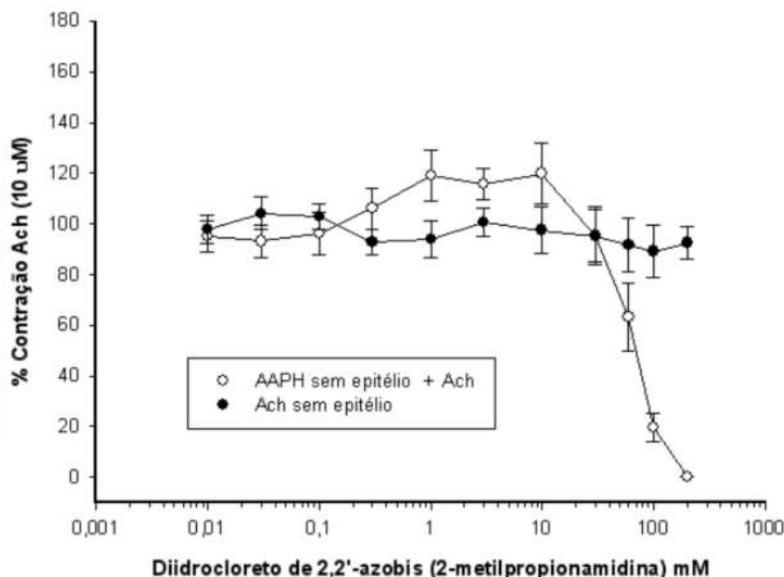
NOTA: Os valores representam a média  $\pm$  E. P. M. da concentração em mM e p = nível de significância da diferença em relação ao controle (ausência de AAPH).

**FIGURA 1**



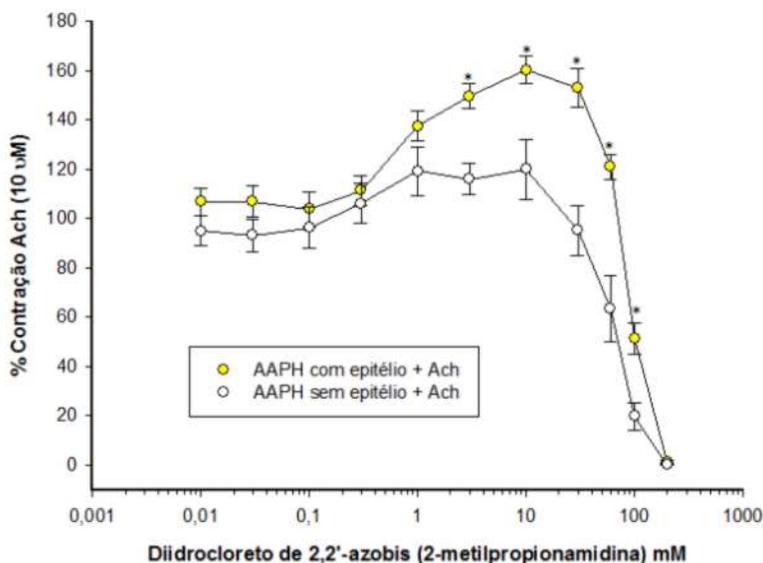
**Figura 1.** Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com preservação do epitélio. Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por Ach. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (n=10). \* p<0,05 em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%.  $EC_{50} = 0,8776 \pm 0,415 \text{ mM}$  (efeito potencializador) e  $EC_{50} = 81,5562 \pm 4,284 \text{ mM}$  (efeito inibidor).

**FIGURA 2**



**Figura 2. Efeito do AAPH sobre a amplitude de contração induzida pela Ach em músculo liso de traqueal sem preservação do epitélio.** Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por Ach. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=9$ ). \*  $p<0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%.  $EC_{50} = 0,3388 \pm 0,343$  mM (efeito potencializador) e  $EC_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM (efeito inibidor)

**FIGURA 3**



**Figura 3. Comparação entre o efeito AAPH sobre a contração induzida pela Ach em músculo liso traqueal com ( $n=10$ ) e sem a preservação do epitélio ( $n=9$ ).** Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM. \*  $p<0,05$  em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). As  $EC_{50}$  foram determinadas por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. Seu efeito potencializador nas preparações com e sem a preservação do epitélio apresentou  $EC_{50} = 0,8776 \pm 0,415$  mM e  $EC_{50} = 0,3388 \pm 0,343$  mM, respectivamente. Seu efeito inibidor nas preparações com e sem a preservação do epitélio apresentou  $EC_{50} = 81,5562 \pm 4,284$  mM e  $EC_{50} = 57,7786 \pm 8,607$  mM, respectivamente.

FIGURA 4

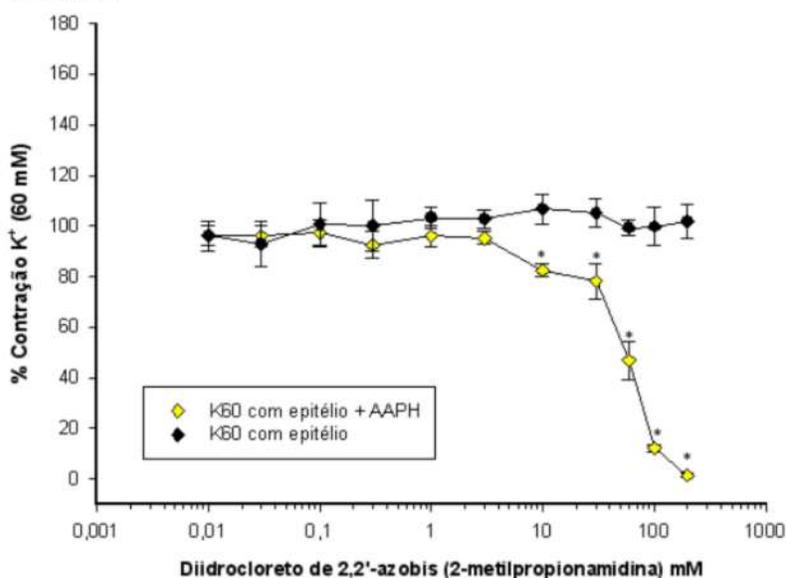


Figura 4. Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso traqueal com a preservação do epitélio. Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por K<sup>+</sup>. Os resultados estão expressos em média ± EPM (n=7). \* p<0,05 em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A EC<sub>50</sub> foi determinada por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. EC<sub>50</sub>=57,4037 ± 4,652 mM nas preparações com a preservação do epitélio.

FIGURA 5

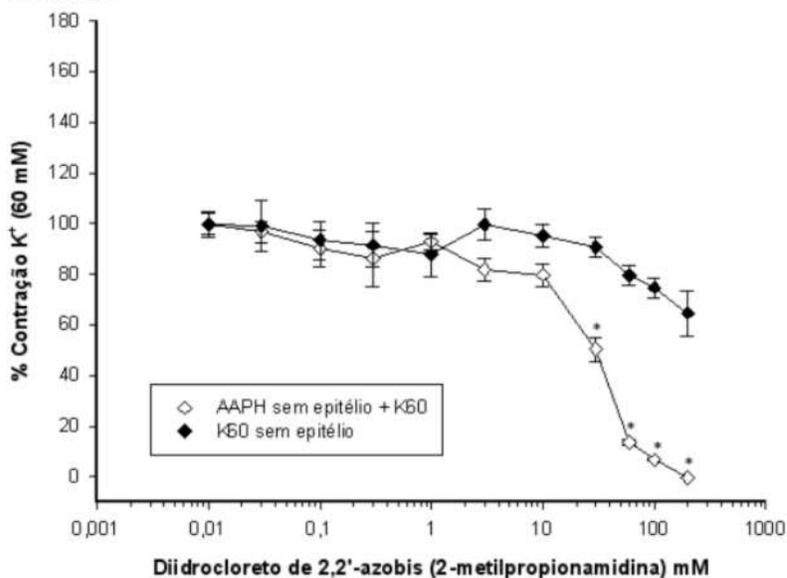


Figura 5. Efeito inibitório do AAPH sobre a contração induzida pelo potássio em músculo liso de traqueal sem a preservação do epitélio. Gráfico representativo do efeito do AAPH sobre a contração evocada por K<sup>+</sup>. Os resultados estão expressos em média ± EPM (n=9). \* p<0,05 em relação ao controle (Two Way ANOVA e Kruskal-Wallis). A EC<sub>50</sub> foi determinada por interpolação logarítmica com intervalo de confiança 95%. EC<sub>50</sub>= 32,9650 ± 2,652 mM nas preparações com a preservação do epitélio.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, JR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J. Bras. Pneumol.* 31: 60-68, 2005.
- BOSKABADY, M.; TEYMOORY S. The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig trachea to -adrenergic agonist and antagonist. *Med Sci Monit.* 9(9): 336-342, 2003.
- CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S.R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 122(3): 456-68, 2008.
- COELHO-DE-SOUZA, A.N. Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso. Fortaleza, 1997. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.
- DELANTY, N.; DICHTER, M. A. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol. Scand.* 98: 145-153, 1998.
- FERNANDES, L., D'APRILE, A SELF, G., MCGUIRE, M., SEW, T., HENRY, P., GOLDIE, R. A Rho-kinase inhibitor, Y-27632, reduces cholinergic contraction but not neurotransmitter release. *European Journal of Pharmacology* (550) 155-161, 2006.
- FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P. Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends in Pharmacological Sciences.* 19 (8): 334-341, 1998.
- GOLDIE, R.G.; FERNANDES, L.B.; FARMER, S.G.; HAY, D.W. Airway epithelium-derived inhibitory factor. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:67 – 70, 1990.
- HAY, D. W.; HENRY, P. J.; GOLDIE, R.G. Endothelin and the respiratory system. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 29 – 32, 1993.
- HENRICKS, P. A. J.; NIJKAMP, F. P. Reactive Oxygen Species as Mediators in Asthma. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 14 (6): 409-420, 2001.
- HERMSMEYER, K.; STUREK, M.; RUSCH, N. J. Calcium channel modulation by dihydropyridines in vascular smooth muscle. *Ann. NY Acad Sci.* 522: 25 – 31, 1998.
- HOLGATE, S. T.; LORDAN, J.; DJUKANOVIC, R. Pathophysiology and clinical aspects of respiratory allergies with reference to asthma. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 40 (1): 168-176, 2000.
- JANSSEN, L. J.; KILLIAN, K. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. *Respir Res.* 29:123-127, 2006
- JANSSEN, L. J.; NETHERTON, S. J.; WALTERS, D. K. Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and superoxide-induced relaxations in canine trachealis. *J Appl Physiol.* 88: 745-752, 2000.
- KUMAR, R. K.; ABBAS, A. K., FAUSTO, N. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacology & Therapeutics.* 91: 93-104, 2001
- KATSUYUKI, K.; KUME, H.; ITO, S.; OGUMA, T.; SHIRAKI, A.; KONDP, M.; ITO, Y.; SHIMOKATA, K. Direct effects of hydrogen peroxide on airway muscle tone: Roles of Ca<sup>2+</sup> influx and Rho-kinase. *European Journal of Pharmacology.* 556: 151-146, 2006.
- KNOT, H.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M.T. Calcium channels and potassium channels. In BARANY, M. *Biochemistry of smooth muscle contraction.* Academic Press. 16: 203 - 219, 1996.
- MACNEE, W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 28(3):479-513, 2007.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antiespasmotic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a miogenic activity. *Fundamental and Clinic pharmacology.* 18: 539-546, 2004.
- PELUSO, I.; CAMPOLONGO, P.; VALERI, P.; ROMANELLI, L.; PALMERY, M. Intestinal motility disorder induced by free radicals: A new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacological Reserach* 46(6): 533-538, 2002.
- PRASAD, K.; GUPTA, J. B. Relaxant effect of oxygen free radicals on rabbit tracheal smooth muscle. *Pulm. Pharmacol. Ther* 15, 375-384, 2002
- RAHMAN I.; MACNEE W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radical Biology and Medicine.* 28 (9): 436-445, 2000.
- RECKMAGE R. O.; GLENDE E. A.; RAHMANI I.; MORRISON D.; DONALDSON K.; MACNEE W.; DOLAK J. A. WALLER R. L. Mechanism of Carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology and Thrrapeutics.* 43: 139-154, 1989.
- REMBOLD, C. Eletromechanical and Pharmacological coupling. In: BARANY, M. *Biochemistry of smooth muscle contraction.* New York. 227-239, 1996.
- TSUSHIMA, K.; KING, L.S.; AGGARWAL, N.R.; DE GORORDO, A.; D'ALESSIO, F.R.; KUBO, K. Acute lung injury review. *Intern Med.*, v. 48, n. 9, p. 621-630, 2009.