

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

Atividade tocolítica *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das folhas de
***Varronia dardani* (Taroda) J.S. Miller (Cordiaceae) em roedores**

João Pessoa-PB
2020

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

**Atividade tocolítica *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das folhas de
Varronia dardani (Taroda) J.S. Miller (Cordiaceae) em roedores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

João Pessoa-PB

2020

F475a Figueiredo, Indyra Alencar Duarte.

Atividade tocolítica in vitro e in vivo do extrato etanólico das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Miller (Cordiaceae) em roedores / Indyra Alencar Duarte Figueiredo. - João Pessoa, 2020.

148 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Varronia dardani*. 2. Tocolítico. 3. Útero de rata. 4. RhoA/Rho cinase. 5. Calmodulina. 6. Dismenorreia. I. Cavalcante, Fabiana de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

**Atividade tocolítica *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico das folhas de
Varronia dardani (Taroda) J.S. Miller (Cordiaceae) em roedores**

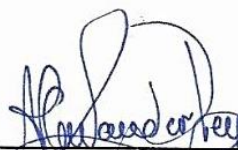
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Aprovada em 18/02/2020

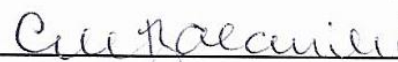
BANCA EXAMINADORA



**Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**



**Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Universidade Federal de Pernambuco)
Examinador externo**



**Profa. Dra. Camille de Moura Balarini
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

Dedicatórias

Dedico este trabalho, aos meus pais, Franciland Duarte Figueiredo e Maria do Socorro Alencar da Silva Figueiredo, por sempre incentivarem minhas escolhas e não medirem esforços para contribuir com o meu crescimento. Sou muito abençoada por tê-los. Essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos, Hugo Alencar Duarte Figueiredo e Hortência Alencar Duarte Figueiredo, por toda cumplicidade e por estarem sempre presentes torcendo por mim.

À minha sobrinha, Helena Alencar Figueiredo de Oliveira, por trazer luz para as nossas vidas.

Aos meus avós, Francisco Fernandes Figueiredo, Maria do Socorro Duarte Figueiredo, Antônio Nino da Silva e Maria Alencar da Silva, por cuidarem de mim e sempre ficarem felizes com minhas conquistas.

Ao meu tio, Antônio Nino da Silva Filho, por ser inspiração e por incentivar e contribuir para minha formação.

Aos meus demais tios e tias, em especial, Bernadete Alencar da Silva e Eva Cristina Alencar da Silva, por todo cuidado e zelo.

Aos meus primos, em especial, Olívia Alencar Ferreira, Maria Isabel Alencar Ferreira, Ludmilla Alencar Fortunato e Deodato Fortunato Júnior, por serem amigos e vibrarem comigo a cada vitória.

Agradecimientos

A Deus, meu porto seguro, por todas as bênçãos concedidas e por ser um refúgio e amparo diante de todas as dificuldades. Agradeço pelo dom da vida e por ter me dado condições de alcançar objetivos pretendidos, guiando meus caminhos e escolhas. Gratidão pela Tua presença em minha vida e por tudo que fizeste e ainda farás.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pelo cuidado e apoio em todos esses anos de convivência. Agradeço por todos os ensinamentos, que auxiliaram no meu crescimento pessoal e profissional, por toda confiança depositada e por sempre me encorajar nos momentos difíceis. Fui/sou muito abençoada em ter uma orientadora tão comprometida e que não mede esforços para ajudar seus alunos.

Aos membros titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley e Profa. Dra. Camille de Moura Balarini, por aceitarem participar e por toda contribuição para o trabalho final.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, um exemplo e inspiração de profissional ética e dedicada, por nunca hesitar em me ajudar e por contribuir com minha formação desde a graduação. Gratidão por todos os ensinamentos e valores repassados.

Ao Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa e seu doutorando Carlos Arthur Gouveia Veloso, por gentilmente cederem o extrato para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante os dois anos de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódico.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação profissional desde a graduação.

Ao Centro de Ciências da Saúde (CCS), ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), pelo apoio físico e institucional.

Ao coordenador do PPgPNSB, Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e ao vice coordenador, Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti, pelo trabalho exercido buscando o crescimento do programa.

À Caroline Manguiera e Nilmar Níncia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, por toda dedicação e paciência em nos atender.

À Dra. Roberta Parentoni e José Crispim Duarte, pelo trabalho em conduzir a Unidade de Produção Animal (UPA), e por serem sempre solícitos para nos ajudar na disponibilização e cuidado com os animais.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado no Biotério.

À Mônica Rodrigues da Silva, um ser humano iluminado, que contagia a todos com sua alegria, sempre com palavras de carinho e prestando trabalhos essenciais ao laboratório.

À Sarah Rebeca Dantas Ferreira, aluna de doutorado, um ser humano cheio de luz, de amor e de boas energias, que me ensinou os primeiros protocolos experimentais desenvolvidos enquanto alunas de Iniciação Científica. Obrigada por estar ao meu lado desde que cheguei ao laboratório, por toda ajuda nos experimentos, nas correções e pela amizade, sempre me ouvindo e apoiando, independente de qualquer coisa.

À Gleice Rayanne da Silva, aluna de mestrado, pela parceria durante esses dois anos juntas, dividindo comigo os momentos difíceis de disciplinas, seleções e experimentos. Tenho muito carinho por você e sou grata por tudo.

À Rayane Fernandes Pessoa, aluna de iniciação científica, por ser uma pessoa proativa, responsável e sempre se dispor a ajudar. Agradeço pela companhia nos inúmeros experimentos, e pela amizade que construímos ao longo de todos esses anos. Foi um orgulho acompanhar sua evolução e torço muito pelo seu sucesso.

Aos demais alunos de Iniciação Científica, João Pedro Moura Lima, Thayna Maria Fernandes de Moura, Alissa Maria de Oliveira Martins e Luís Lucas Ferreira de Lima, por me acompanharem nos experimentos e não medirem esforços para ajudar. Estarei sempre disponível para retribuir no que for preciso.

A toda equipe que fez ou faz parte do Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas”: Alana Cristina Costa, Alissa Maria de Oliveira Martins, Anderson Fellyp Avelino Diniz, Antônio Raphael Cavalcanti, Bárbara Cavalcanti Barros, Brena Freire de Oliveira Claudino, Cleyton Oliveira, Elba dos Santos Ferreira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Francisco Fernandes Lacerda Júnior, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iana Vitória de Souza Oliveira, Iara Luna Leão de Souza, Italo Rossi Martins, João Pedro Moura Lima, Joedna Cavalcante Pereira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Luís Lucas Ferreira de

Lima, Luiz Henrique César Vasconcelos, Manoel Duvirgens, Maria da Conceição Correia Silva, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Paula Benvindo Ferreira, Petruska Pessoa, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Ferreira, Thayna Maria Fernandes de Moura, Thiago Afonso Melo e Thiago Dália pela boa convivência e por toda ajuda nos experimentos e nas correções dos trabalhos.

A Rodrigo Silva de Andrade, uma pessoa incrível e de um coração enorme. Agradeço por tornar meus dias melhores, por me incentivar e cuidar de mim. Tenho muito orgulho do seu esforço e dedicação.

Aos amigos da graduação, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti, Renato Henrique Martins Galdino, Matheus Marley Bezerra Pessoa, Monique Emanuela Frutuoso Xavier Barros e Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva, pela amizade que me concederam. Vocês são excelentes profissionais e me orgulho muito de tê-los como amigos.

À minha turma de mestrado, por tornarem os dias de aulas, provas e seminários mais leves e divertidos, e pelos momentos em que pudemos confraternizar. Torço muito pelo sucesso de cada um.

Ao Conselho Federal de Farmácia, em nome do Prof. João Samuel Meira, pelo apoio financeiro concedido para participação em eventos científicos.

Àqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

Resumo

RESUMO

Tendo em vista que o extrato etanólico obtido das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F) apresentou efeito espasmolítico não seletivo em modelos de músculos lisos tônicos e fásicos, sendo mais potente em útero de rata, decidiu-se caracterizar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* em ratas e *in vivo* em camundongos fêmeas. Para os ensaios *in vitro*, após a eutanásia das ratas, o útero era montado em cubas de banho para órgão isolado e as contrações isométricas eram avaliadas (n = 5). Para os ensaios *in vivo*, eram utilizados camundongos fêmeas (n = 6). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (certidão 3864230519). Observou-se que o VD-EtOH_F relaxou de maneira equipotente o útero de rata pré-contráido tanto com KCl (CE₅₀ = 27,7 ± 3,1 µg/mL) quanto com ocitocina (CE₅₀ = 33,1 ± 0,7 µg/mL), sugerindo que o extrato pode exercer seu efeito tocolítico através de um passo comum entre as duas vias, como os canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav). Para confirmar essa hipótese, foram realizadas curvas cumulativas ao CaCl₂ na ausência (CE₅₀ = 4,7 ± 0,2 x 10⁻⁴ M) e na presença do VD-EtOH_F e observou-se um desvio da curva controle para direita com redução da potência espasmogênica apenas na concentração de 729 µg/mL (CE₅₀ = 7,9 ± 1,8 x 10⁻³ M), indicando que o bloqueio do influxo de Ca²⁺ através dos Cav não é o principal mecanismo tocolítico do extrato. Também foi observado que os canais de potássio, os receptores adrenérgicos-β, a via das ciclo-oxigenases e do óxido nítrico não estão envolvidas no mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH_F. A inibição de vias contráteis também pode ocasionar relaxamento do miométrio. Com isso, avaliou-se a participação da via RhoA/Rho cinase (ROCK) no efeito tocolítico do VD-EtOH_F. Observou-se que na presença de Y-27632, um bloqueador não seletivo de ROCK, a curva controle de relaxamento do extrato foi deslocada para a esquerda, com aumento da potência relaxante em torno de 2 vezes (CE₅₀ = 14,5 ± 2,7 µg/mL), sugerindo que o VD-EtOH_F modula negativamente a via RhoA/ROCK no seu mecanismo tocolítico. A calmodulina desempenha um papel fundamental na sinalização do Ca²⁺ e contração da musculatura lisa. Dessa forma, avaliou-se a participação desta proteína no mecanismo tocolítico do VD-EtOH_F, e foi observado um aumento da potência relaxante do extrato em torno de 17 vezes na presença do calmidazolium, um bloqueador da calmodulina (CE₅₀ = 2,0 ± 0,3 µg/mL), sugerindo que o VD-EtOH_F exerce seu mecanismo tocolítico por modular negativamente a calmodulina. No ensaio de toxicidade aguda, o VD-EtOH_F (2000 mg/kg, v.o.) não induziu sinais de toxicidade nas condições experimentais avaliadas. No protocolo que simula a dismenorreia primária, foi observado que o extrato inibiu as contorções abdominais induzidas por ocitocina apresentando efeito máximo na dose de 1000 mg/kg (E_{max} = 80,2 ± 10,1% e DE₅₀ = 105,5 ± 14,8 mg/kg), sugerindo que o mesmo apresenta atividade tocolítica *in vivo* em camundongos fêmeas. Uma vez que a dismenorreia está relacionada com o aumento da produção de PGF_{2α}, observou-se que o VD-EtOH_F relaxou o útero de rata pré-contráido com PGF_{2α} (CE₅₀ = 15,4 ± 3,5 µg/mL), sugerindo que o extrato pode modular negativamente a via de sinalização deste agonista contrátil. Pode-se concluir que o VD-EtOH_F modula negativamente a via RhoA/ROCK e a calmodulina em útero de ratas, além de apresentar efeito anti-dismenorreico em camundongos fêmeas.

Palavras-chave: *Varronia dardani*, tocolítico, útero de rata, RhoA/Rho cinase, calmodulina, dismenorreia.

Abstract

ABSTRACT

Considering that the ethanolic extract obtained from the leaves of *Varronia dardani* (VD-EtOH_L) had a non-selective spasmolytic effect in models of tonic and phasic smooth muscles, being more potent in rat uterus, it was decided to characterize the tocolytic mechanism of action *in vitro* in female rats and *in vivo* in female mice. For *in vitro* tests, after the euthanasia, the rat uterus was mounted in bath chambers for isolated organ and isometric contractions were evaluated (n = 5). For *in vivo* tests, female mice were used (n = 6). All experimental protocols were approved by Ethics Committee on the Use of Animals of UFPB (certificate 3864230519). It was observed that VD-EtOH_L relaxed the rat uterus pre-contracted both by KCl (EC₅₀ = 27.7 ± 3.1 µg/mL) and by oxytocin (EC₅₀ = 33.1 ± 0.7 µg/mL), suggesting that the extract can exert its tocolytic effect through a common step between the two pathways, such as voltage-gated calcium channels (Cav). To confirm this hypothesis, cumulative curves for CaCl₂ were performed in the absence (EC₅₀ = 4.7 ± 0.2 × 10⁻⁴ M) and in the presence of VD-EtOH_L, and it was observed a shift to the right of the control curve with a reduction in spasmogenic potency only at the concentration of 729 µg/mL (EC₅₀ = 7.9 ± 1.8 × 10⁻³ M), suggesting that the blockade of Ca²⁺ influx through the Cav is not the main tocolytic mechanism of the extract. It was also observed that the potassium channels, β-adrenergic receptors, cyclooxygenase and nitric oxide pathways are not involved in the tocolytic mechanism of VD-EtOH_L. The inhibition of contractile pathways can also cause relaxation of the myometrium. Thus, the participation of the RhoA/Rho kinase (ROCK) pathway in the tocolytic effect of VD-EtOH_L was evaluated. It was observed that in the presence of Y-27632, a non-selective ROCK blocker, the extract relaxation control curve was shifted to the left, with an increase in relaxing potency about 2 times (EC₅₀ = 14.5 ± 2.7 µg/mL), suggesting that VD-EtOH_L negatively modulates the RhoA/ROCK pathway in its tocolytic mechanism. Calmodulin plays a key role in Ca²⁺ signaling and smooth muscle contraction. Thus, the participation of this protein in the tocolytic mechanism of action of VD-EtOH_L was evaluated, and an increase in the relaxing potency of the extract about 17 times was observed in the presence of calmidazolium, a calmodulin blocker (EC₅₀ = 2.0 ± 0.3 µg/mL), suggesting that the VD-EtOH_L exerts its tocolytic mechanism by negatively modulating calmodulin. In the acute toxicity test, VD-EtOH_L (2000 mg/kg, orally.) did not induce signs of toxicity under the experimental conditions evaluated. In the protocol that simulates primary dysmenorrhea, it was observed that the extract inhibited the abdominal contortions induced by oxytocin, with a maximum effect at the dose of 1000 mg/kg (E_{max} = 80.2 ± 10.1% and ED₅₀ = 105.5 ± 14.8 mg/kg), suggesting that it has tocolytic activity *in vivo* in female mice. Since dysmenorrhea is related to increased production of PGF_{2α}, it was observed that the VD-EtOH_L relaxed the rat uterus pre-contracted with PGF_{2α} (EC₅₀ = 15.4 ± 3.5 µg/mL), suggesting that the extract can negatively modulate the signaling pathway of this contractile agonist. It can be concluded that the VD-EtOH_L negatively modulates the RhoA/ROCK pathway and calmodulin in rat uterus, in addition to having an anti-dysmenorrhea effect in female mice.

Keywords: *Varronia dardani*, tocolytic, rat uterus, RhoA/Rho kinase, calmodulin, dysmenorrhea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia do útero humano.....	30
Figura 2 – Morfologia do útero de ratas.....	31
Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa uterina pelo aumento da concentração extracelular de K^+	35
Figura 4 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa uterina pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC- β_1	37
Figura 5 – Síntese dos principais eicosanoides contráteis do útero.	39
Figura 6 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso uterino pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.	41
Figura 7 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.	43
Figura 8 – Distribuição geográfica da espécie <i>Varronia dardani</i>	54
Figura 9 – Inflorescências e folhas de <i>Varronia dardani</i>	54
Figura 10 – Aparelhos utilizados nos experimentos <i>in vitro</i>	62
Figura 11 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em ratas.	73
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em ratas.	78
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 300 nM (S)-(-)-propranolol em ratas.	81
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 μ M de indometacina em ratas.....	84
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença de 10^{-4} M de L-NAME (B) em ratas.	87
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de Y-27632 em ratas.	90

Figura 17 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻⁴ M de calmidazolium em ratas.	93
Figura 18 – Registro original representativo do efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻⁶ M de PGF _{2α} em ratas.	100
Figura 19 – Proposta de mecanismo do ação tocolítica <i>in vitro</i> do VD-EtOH _F em útero de rata.	115

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (○) e por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina (●) em ratas.....	74
Gráfico 2 – Efeito inibitório do VD-EtOH _F frente às contrações cumulativas induzidas por cloreto de cálcio (CaCl ₂) em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺ na ausência (□) e na presença do VD-EtOH _F nas concentrações de 81 (■), 243 (Δ) e 729 (▲) μg/mL, em ratas.	76
Gráfico 3 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 5 mM de CsCl (▽) em ratas.....	79
Gráfico 4 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 300 nM de (S)-(-)-propranolol (◇) em ratas.	82
Gráfico 5 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10 μM de indometacina (□) em ratas.	85
Gráfico 6 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10 ⁻⁴ M de L-NAME (Δ) em ratas.	88
Gráfico 7 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10 ⁻⁴ M de Y-27632 (▽) em ratas.	91
Gráfico 8 – Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10 ⁻⁴ M de calmidazolium (◇) em ratas.	94
Gráfico 9 – Efeito do VD-EtOH _F sobre o número de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas.....	98
Gráfico 10 – Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻⁶ M de PGF _{2α} (●) em ratas.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do VD-EtOH _F (2000 mg/kg) na evolução ponderal dos camundongos fêmeas.	96
Tabela 2 – Efeito do VD-EtOH _F (2000 mg/kg) no consumo de água e ração dos camundongos fêmeas.	96
Tabela 3 – Efeito do VD-EtOH _F (2000 mg/kg) sobre o peso relativo de órgãos dos camundongos fêmeas.	96

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de cálcio
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
CE₅₀	concentração de uma droga que promove 50% de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma droga que inibe 50% do efeito de um agonista
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
COX	ciclo-oxigenase
CPI-17	peptídeo inibidor de fosfatase ativada por PKC de 17 kDa
CsCl	cloreto de cério
DAG	diacilglicerol
DE₅₀	dose de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo
DL₅₀	dose de uma droga que mata 50% dos animais testados
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FP	receptor da prostaglandina F _{2α}
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou G ₁₃

G_{q/11}	proteína G _q ou G ₁₁
G_s	proteína G _s
G_{αq/11}	subunidade α da proteína G _{q/11}
G_{αs}	subunidade α da proteína G _s
GDI	inibidor da dissociação do GDP
GDP	difosfato de guanosina
GEF	fator de troca de nucleotídeo de guanina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
L-NAME	cloridrato de <i>N</i> _ω -nitro-L-arginina metil éster
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NCX	trocador sódio/cálcio
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do NO
OCI	ocitocina
OT	receptor da ocitocina
PA	ácido fosfatídico
PC	fosfatidilcolina
PLCβ₁	fosfolipase C β ₁
PLD	fosfolipase D
PGE₂	prostaglandina E ₂

PGF_{2α}	prostaglandina F ₂ alfa
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLA₂	fosfolipase A ₂
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
Propan	(S)-(-)-propranolol
RhoA	proteína G monomérica da família Rho do tipo A
ROCK	proteína cinase associada à Rho
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
VD-EtOH_f	extrato etanólico bruto obtido das folhas de <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Miller
ZIPK	proteína cinase de interação zíper

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	26
2 Fundamentação teórica	29
2.1 Morfologia uterina.....	30
2.2 Contração e relaxamento do músculo liso uterino.....	32
2.3 Dismenorreia	44
2.4 Tratamento da dismenorreia primária	47
2.5 Produtos naturais e plantas medicinais	50
2.6 Família Cordiaceae	51
2.7 Gênero <i>Varronia</i>	52
2.8 <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Miller	53
3 Objetivos	56
3.1 Geral.....	57
3.2 Específicos	57
4 Material e métodos	58
4.1 Material.....	59
4.1.1 Material botânico	59
4.1.2 Droga-teste.....	59
4.1.3 Animais.....	59
4.1.5 Soluções nutritivas	61
4.1.6 Aparelhos	61
4.2 Métodos.....	62
4.2.1 Preparação das soluções-mãe do extrato para os ensaios farmacológicos.....	62
4.2.2 Avaliação do mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH _F	63
4.2.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata.....	63
4.2.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	64
4.2.2.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	64
4.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	64

4.2.2.3.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	64
4.2.2.4 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata	65
4.2.2.4.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol.....	65
4.2.2.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	66
4.2.2.5.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina	66
4.2.2.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do VD-EtOH _F em útero isolado de rata	66
4.2.2.6.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME	66
4.2.2.7 Avaliação da participação da via da RhoA/Rho cinase no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	67
4.2.2.7.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632.....	67
4.2.2.8 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	68
4.2.2.8.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium.....	68
4.2.2.9 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do VD-EtOH _F em camundongos fêmeas.....	68
4.2.2.10 Avaliação do efeito tocolítico <i>in vivo</i> do VD-EtOH _F no modelo de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas	69
4.2.2.11 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por PGF _{2α} em útero isolado de rata.....	70
4.2.3 Análise estatística	70
5 Resultados	71
5.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em rata.....	72
5.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	75

5.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	75
5.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	77
5.3.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	77
5.4 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata	80
5.4.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol.....	80
5.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por VD-EtOH _F em útero isolado de rata.....	83
5.5.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina	83
5.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do VD-EtOH _F em útero isolado de rata	86
5.6.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME.....	86
5.7 Avaliação da participação da via da RhoA/Rho cinase no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH _F em útero isolado de rata	89
5.7.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632.....	89
5.8 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH _F em útero isolado de rata	92
5.8.1 Efeito do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium.....	92
5.9 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do VD-EtOH _F em camundongos fêmeas.....	95
5.10 Avaliação do efeito tocolítico <i>in vivo</i> do VD-EtOH _F no modelo de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas.....	97
5.11 Efeito tocolítico <i>in vitro</i> do VD-EtOH _F sobre as contrações tônicas induzidas por PGF _{2α} em útero isolado de rata	99
6 Discussão	102
7 Conclusões	116

Referências118
Anexos145

1 Introdução

Caracterizado como o distúrbio ginecológico mais comum em mulheres jovens, a dismenorreia, também conhecida como cólica menstrual, ocasiona contrações dolorosas na região pélvica, ocorrendo imediatamente antes ou durante a menstruação (OSAYANDE; MEHULIC, 2014). Geralmente, a dismenorreia é acompanhada de outros sintomas, como sudorese, dores de cabeça, náusea, vômito e diarreia (SHRESTHA et al., 2017).

Esta desordem é considerada um problema de saúde pública, uma vez que pode ter efeitos adversos na qualidade de vida e no estado mental das mulheres acometidas. Uma combinação de fatores, incluindo a formação e liberação excessiva de prostaglandinas pelo endométrio uterino durante a menstruação, especialmente as prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$, é uma hipótese que foi confirmada devido à sua relação direta com o aumento da dor durante a menstruação, ocasionado pelas contrações uterinas frequentes e desrítmicas (LEE et al., 2016; YOUSEFI et al., 2019).

Tendo em vista a etiologia da dismenorreia, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são considerados a primeira linha de tratamento farmacológico, seguidos também dos anticoncepcionais e antiespasmódicos (WONG et al., 2009; MARJORIBANKS et al., 2010; PROCTOR; FARQUHAR, 2016). Embora uma série de evidências apoie a eficácia desses medicamentos, eles também possuem vários efeitos colaterais e restrições, os quais limitam a utilização dos tratamentos convencionais (SEO; LEE; JO, 2019), impulsionando, portanto, o uso de fitoterápicos como possíveis alternativas para o tratamento da dismenorreia (HSU; YANG; YANG, 2006; JENABI; FEREIDOONY, 2015).

O uso de plantas para tratar e prevenir doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Nos dias atuais, as plantas medicinais continuam a desempenhar um papel importante como fontes de agentes terapêuticos, originando medicamentos fitoterápicos ou substâncias ativas isoladas que podem ser utilizadas como medicamentos ou como protótipos para a síntese de novos fármacos (CASANOVA; COSTA, 2017).

Nesse contexto, destaca-se a família Cordiaceae, em especial, o gênero *Varronia*, para o qual já foi relatada atividade vasorrelaxante (JAMKHANDE et al., 2013) e espasmolítica em duodeno de coelho e íleo de cobaia (FENG et al., 1962) para o extrato de *Varronia globosa*, em íleo de cobaia para o de *V. spinescens* (TORTORIELLO et al., 1995) e atividade tocolítica em rata (FENG et al., 1964) para

o extrato de *V. brownie*, bem como utilização etnomedicinal do infuso das folhas de *V. globosa* para o tratamento da dismenorreia (ABRANTES; AGRA, 2004; OZA; KULKARNI, 2017).

Em estudos fitoquímicos realizados com o extrato etanólico das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F) foi possível isolar duas chalconas, a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (pinostrobina chalcona) e 2',6'-dihidroxi-4,4'-dimetoxichalcona (gimnogrameno) (VELOSO et al., 2020a), além de cinco flavanonas, a 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobina), a 5-hidroxi-7,4'- dimetoxiflavanona (sakuranetina-4'-metil éter), a 5,7-dihidroxiflavanona (pinocembrina), a 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (isosakuranetina) e a 4',5,7-trihidroxiflavanona (narigenina) (DE OLIVEIRA, 2016; TRIGUEIRO, 2019; VELOSO et al., 2020a).

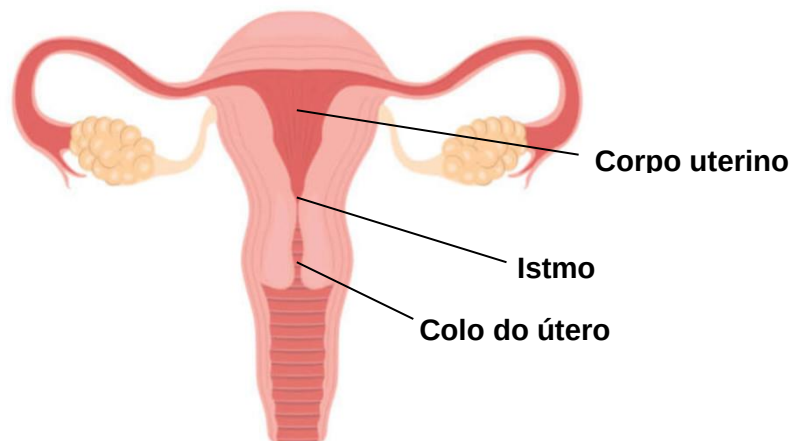
Seguindo o critério taxonômico, e baseado no fato de que o VD-EtOH_F apresenta atividade espasmolítica não seletiva em aorta e traqueia de rato, íleo de cobaia e útero de rata, sendo mais potente neste último órgão (VELOSO et al., 2020a), objetivou-se investigar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* em ratas e o efeito no modelo *in vivo* de dismenorreia primária em camundongos fêmeas deste extrato. Dessa forma, objetivando propiciar subsídios científicos na busca de produtos derivados de plantas para uso na terapêutica da dismenorreia.

2 Fundamentação teórica

2.1 Morfologia uterina

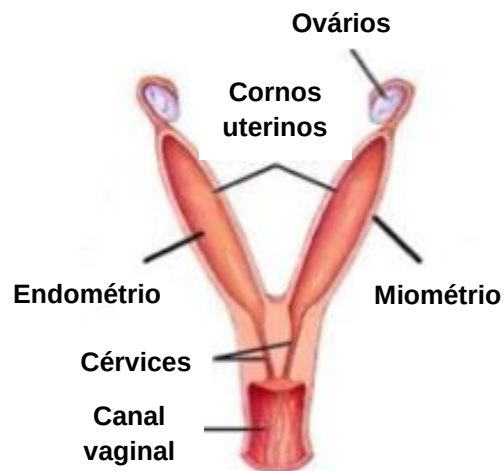
A aparência anatômica do útero varia entre espécies. Nas mulheres, este órgão, em formato de pêra invertida, é dividido morfológicamente em colo do útero, istmo e corpo uterino (Figura 1), e é composto por três camadas distintas: uma externa, que inclui um revestimento seroso de tecido conjuntivo, chamado de perimétrio; uma intermediária, o miométrio, considerado o maior componente da estrutura uterina, constituído por camadas de músculo liso entrelaçadas no tecido conjuntivo; e uma interna, o endométrio, composta por glândulas e vasos sanguíneos, cuja espessura varia durante o ciclo menstrual. Correndo ao longo e entre esses feixes e camadas musculares estão os vasos sanguíneos e nervos uterinos (SOUZA et al., 2017; MYERS; ELAD, 2017).

Figura 1 – Morfologia do útero humano.



Fonte: biologianet.com/anatomia-fisiologia-animal/útero. Acesso em: 25 nov. 2019.

Já nos roedores, o útero é bicornado e tem a forma de Y, constituído por um par de cornos uterinos independentes entre si, que se estendem em direção à vagina e se fundem parcialmente no corpo uterino. As tubas e os ovários estão localizados nas suas extremidades craniais (Figura 2). Caudalmente, esses cornos são rodeados por musculatura, formando um pequeno corpo uterino, e logo inferiormente encontra-se a cérvix uterina (MARTINS et al., 2011; WRAY; PRENDERGAST, 2019).

Figura 2 – Morfologia do útero de ratas.

Fonte: Adaptado de professor.ucg.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4400/material/Reprodutor%20A.pdf.

O útero das ratas também é composto por três camadas, o perimétrio, miométrio e endométrio, sendo o miométrio constituído por duas camadas de músculo liso distintas, uma longitudinal exterior e uma circular interna com origem, estrutura, função e padrões de contração diferentes (AGUILAR; MITCHELL, 2010; ABBAS; MONAGHAN; CAMPBELL, 2016). Ao contrário dos roedores, nas mulheres, essas duas camadas são altamente entrelaçadas e a separação das camadas musculares lisas circulares e longitudinais não é tão evidente devido à presença de interconexões. Embora a estrutura do útero varie consideravelmente entre as espécies, seus conteúdos celulares e componentes do tecido são bastante semelhantes (WRAY; PRENDERGAST, 2019).

O ciclo uterino nas mulheres, também chamado de ciclo menstrual, é caracterizado pelas mudanças ocorridas no endométrio durante o ciclo ovariano, em consequência da ação dos hormônios estradiol e progesterona. Cada ciclo uterino apresenta três fases distintas: a fase menstrual, quando ocorre descamação do endométrio e ruptura dos vasos sanguíneos, constituindo o fluxo menstrual; a fase proliferativa, que se caracteriza pelo aumento da espessura tecidual do endométrio; e a fase secretora, quando a parede uterina interna atinge sua espessura máxima, preparando o útero para a recepção do embrião (GORE, 2008; MICHALAKIS; SEGARS, 2010).

Já o ciclo estral, ciclo reprodutivo que ocorre nas ratas, tem duração de 4 a 5 dias e geralmente ocorre no início da puberdade, em torno do 32º dia de idade. Este ciclo é dividido em quatro fases, nas quais os ovários, útero e vagina apresentam morfologia característica em cada estágio (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007; DIXON et al., 2014). A fase do proestro, que dura aproximadamente 12 horas, é caracterizada pelo predomínio de células epiteliais nucleadas. O estro, com duração de 24 horas, corresponde ao período em que a fêmea é receptiva ao macho, havendo o predomínio de células queratinizadas anucleadas. Se não houver concepção, a fase que se segue é a do metaestro, que dura de 24 a 48 horas, caracterizada pela proporção equivalente de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos. Já na fase diestro, que dura 24 horas, há uma predominância de leucócitos, células epiteliais e muco, renovando o ciclo reprodutivo (MAEDA et al., 2000; MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; VILELA; SANTOS-JUNIOR; SILVA, 2007).

As alterações estruturais observadas no epitélio vaginal de ratas durante o ciclo estral são induzidas por estrogênio e progesterona. Durante o proestro, o nível de estrogênio aumenta e os folículos ovarianos crescem rapidamente (MAEDA et al., 2000). A ovulação ocorre durante o estro, entre 10 e 12h após o aumento do hormônio luteinizante. Na ausência de acasalamento no momento da ovulação, os corpos lúteos são transitoriamente funcionais e secretam uma pequena quantidade de progesterona. No entanto, em fêmeas acasaladas, 90% dos óvulos são fertilizados pelos espermatozoides após a ovulação e a vida lútea se estende por toda a primeira metade da gravidez (PACCOLA et al., 2013; ARITONANG et al., 2017).

2.2 Contração e relaxamento do músculo liso uterino

A função miometrial de contração e relaxamento do músculo liso uterino pode ser de vital importância em processos fisiológicos, como o ciclo menstrual, transporte de espermatozoides e embriões, implantação e parturição (AN et al., 2013). Durante a gravidez, o útero permanece quiescente e sofre hiperplasia e hipertrofia para fornecer um ambiente adequado para o crescimento fetal, reduzindo a atividade contrátil, porém, à medida que se aproxima do parto, são geradas contrações sincronizadas e coordenadas para auxiliar na expulsão do feto (YOUNG, 2007;

SARKER et al., 2018). Na ausência de gravidez, a contratilidade uterina facilita a expulsão dos tecidos endometriais na menstruação (KUNZ; LEYENDECKER, 2002). Dessa forma, disfunções na contratilidade uterina são uma das principais causas de uma variedade de distúrbios obstétricos e ginecológicos, como aborto espontâneo, parto prematuro, hemorragia pós-parto, adenomiose e dismenorreia (QU et al., 2019).

As contrações uterinas dependem da atividade contrátil individual dos elementos celulares, os miócitos uterinos. Estas células são relativamente pequenas e densamente compactadas com miofilamentos e corpos densos associados que ocupam de 80 a 90% do volume celular e constituem a maquinaria contrátil (AGUILAR; MITCHELL, 2010). Como em todo tecido muscular, as proteínas predominantes expressas na musculatura lisa uterina são miosina e actina, sendo esta última, seis vezes mais predominante (WORD et al., 1993). No interior da célula, os filamentos de actina e miosina são entrelaçados com filamentos intermediários não contráteis, que também adicionam estabilidade e integridade à célula (KAJULURI; LI; MORGAN, 2019).

A miosina do músculo liso, também chamada de filamento grosso, é uma proteína hexamérica com duas cadeias pesadas, cada uma associada a duas cadeias leves. A actina, ou filamento fino, é uma proteína monomérica globular. Nas células em repouso, 80% da actina é polimerizada em filamentos. Estes deslizam ao longo dos filamentos grossos de miosina para encurtar a célula durante uma contração (CARSTEN; MILLER, 2013; KAJULURI; LI; MORGAN, 2019).

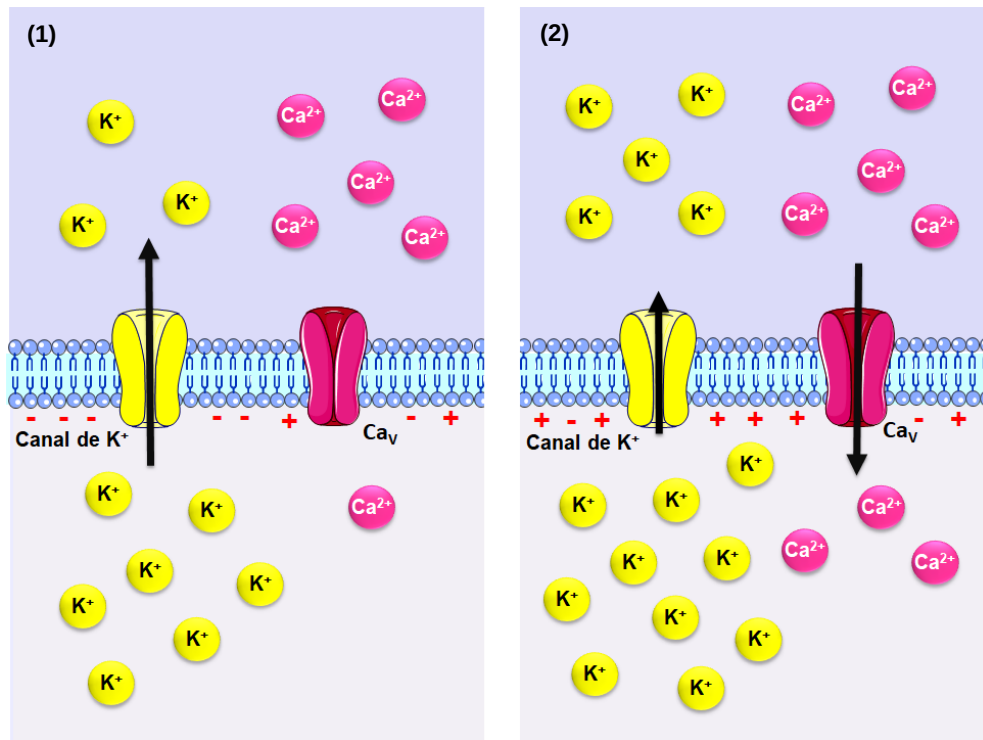
Na atividade contrátil da célula muscular lisa uterina, o encurtamento muscular ocorre quando os filamentos finos exercem tensão ao longo da direção longitudinal da célula (AGUILAR; MITCHELL, 2010). Para que isso ocorra, é necessária uma força para mover os filamentos de actina, que provém da fosforilação dos resíduos de serina da cadeia leve da miosina (MLC), mobilizando assim as pontes cruzadas e fazendo com que o filamento fino de actina deslize ao longo do filamento grosso de miosina, gerando uma força que é transmitida em direção ao centro da célula (IKEBE; HARTSHORNE; ELZINGA, 1987; KAMM; STULL, 2001). Essa reação de fosforilação pode ser mediada pela cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que é, predominantemente, regulada pelas concentrações citosólicas de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), sendo este, o principal estímulo desencadeante da

contração da musculatura lisa (BURSZTYN et al., 2007; WRAY; PRENDERGAST, 2019).

A elevação da $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer em decorrência ao influxo deste íon através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) presentes na membrana plasmática e/ou através da liberação dos estoques intracelulares de cálcio no retículo sarcoplasmático (RS). Ambas as formas ativam vias bioquímicas que levam à formação de pontes cruzadas e ao desenvolvimento da força contrátil, caracterizando o acoplamento excitação-contração (PEHLIVANOĞLU; BAYRAK; DOĞAN, 2013). Este acoplamento é normalmente classificado como mecanismo eletromecânico (Figura 3) e farmacomecânico (Figura 4) de contração (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

O potencial de repouso de um miócito uterino é representado pela diferença de voltagem entre o meio intracelular e extracelular, com valores típicos variando de -40 a -80 mV. O músculo liso uterino é um órgão miogênico, isto é, se contrai espontaneamente, e estas contrações ocorrem como resultado direto da geração de potenciais de ação nestas células (WRAY; PRENDERGAST, 2019). Dessa forma, as células musculares lisas atingem o limiar de excitação ao tornarem-se suficientemente despolarizadas, como por exemplo, através do aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$), acumulando cargas positivas no interior da célula que estimulam a ativação dos Cav e a elevação da $[Ca^{2+}]_c$, caracterizando o acoplamento eletromecânico de contração (Figura 3) (WRAY et al., 2015).

Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa uterina pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (2) um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração.

Fonte: Autor, 2020.

O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ pode também ser ocasionado pela ligação de um agonista ao seu receptor acoplado à proteína G (GPCR) durante o acoplamento farmacomecânico (Figura 4) (KOLI et al., 2019). As proteínas de ligação ao trifosfato de guanossina (GTP) heterotriméricas (proteínas G) medeiam uma sinalização intracelular acoplando-se a esta classe de receptores de membrana plasmática, estimulados por ligantes, que possuem sete domínios transmembranares (CONKLIN; BOURNE, 1993). As proteínas G compreendem três subunidades (α , β e γ), e no estado inativo, a subunidade G_α se acopla ao dímero $G_{\beta\gamma}$. A ativação do receptor pelo ligante estimula a troca de GDP (difosfato de guanossina) por GTP na subunidade G_α , e esta, se dissocia do complexo $G_{\beta\gamma}$, ambos sendo capazes de influenciar a atividade de moléculas efetoras nas células. As subunidades da

proteína G são classificadas em subfamílias que se acoplam a diferentes efetores (SANBORN, 2007; LADDS et al., 2009).

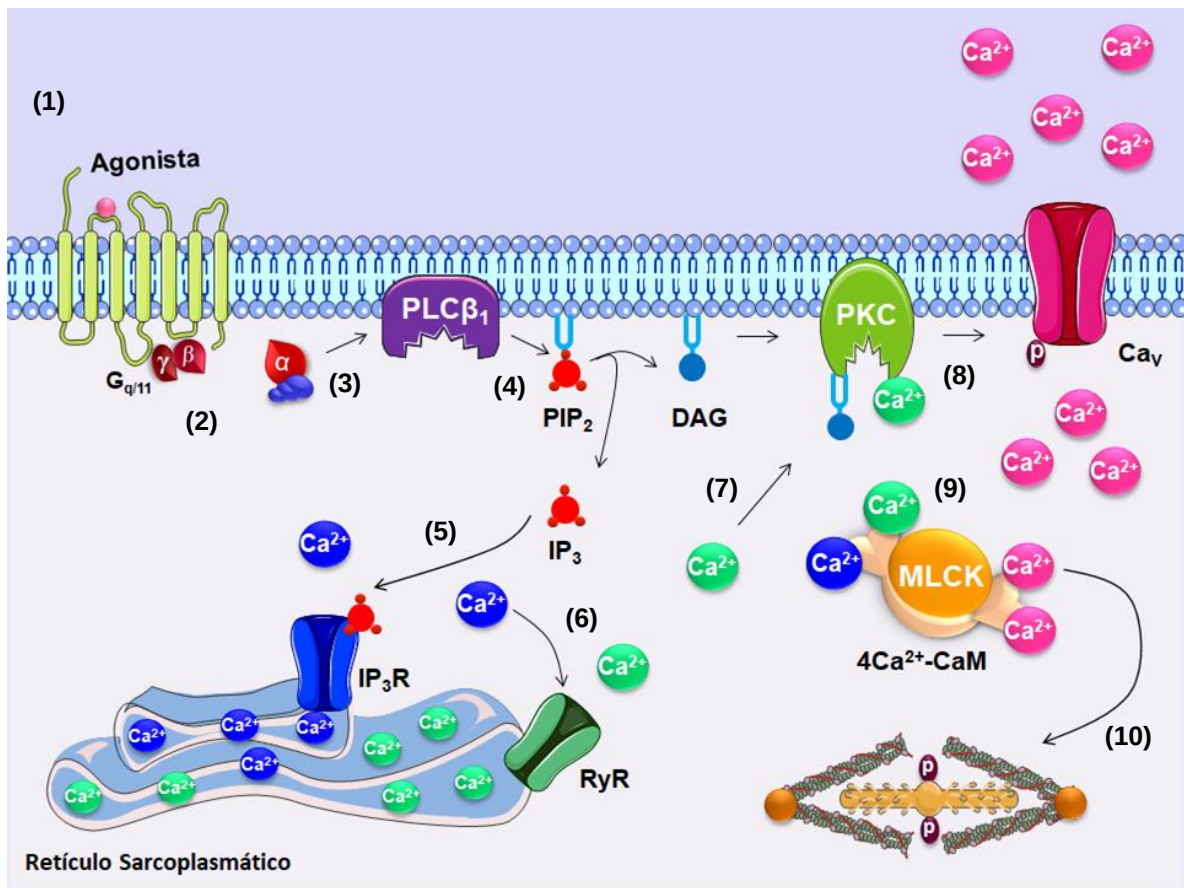
Agonistas como a ocitocina são potentes estimuladores das contrações miométricas e desempenham um papel importante no início do trabalho de parto (KIM et al., 2019b), atuando sobre seus receptores OT, acoplados à proteína $G_{q/11}$. Após ativação desta proteína, a subunidade G_α ligada ao GTP ativa a fosfolipase C β_1 (PLC β_1), a qual regula a hidrólise do 4,5-bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP₂) em diacilglicerol (DAG) e em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP₃). Este último, por sua vez, controla a mobilização de Ca^{2+} no RS, uma organela citoplasmática que estoca Ca^{2+} em todas as células de músculo liso (OTAIBI, 2014; ARROWSMITH, 2020). O aumento de IP₃ na célula ativa os receptores de IP₃ (IP₃R) presentes membrana do RS, resultando no aumento da $[Ca^{2+}]_c$ (MITCHELL et al., 2013). Este receptor é encontrado em três diferentes isoformas nas células miométriais, sendo a do tipo II mais abundante (MORGAN; SMEDT; GILLESPIE, 1996).

Além disso, outro mecanismo de liberação de cálcio é mediado por receptores de rianodina (RyR), também presentes na membrana do RS. Estes, são canais de liberação de Ca^{2+} ativados por este próprio íon, modulando um processo chamado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR) (WRAY; SHMYGOL, 2007). A família dos RyR compreende três principais subtipos, sendo o tipo III predominantemente expresso no miométrio (MIRONNEAU et al., 2002), embora os tipos I e II também tenham sido detectados (LYNN et al., 1995; MARTIN et al., 1999). A isoforma tipo II dos receptores de rianodina é regulada em excesso no útero grávido, sugerindo possível envolvimento do CICR na regulação da contratilidade uterina no trabalho de parto (MORGAN; DUNLOP; GILLESPIE, 1997).

Dessa forma, o Ca^{2+} irá promover a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde será ativada pelo DAG, permitindo que esta fosforile proteínas-alvo específicas, como os Cav, ocasionando influxo deste íon (BERRIDGE, 2012). Além disso, foi proposto que a ativação de OT também pode ocasionar uma despolarização na célula e ativação destes canais (MIRONNEAU, 1976; ARROWSMITH, 2020). O consequente aumento da $[Ca^{2+}]_c$ ativa uma proteína citosólica dependente de Ca^{2+} , a calmodulina (CaM), que se liga à quatro íons Ca^{2+} formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM, resultando em alterações conformacionais que permitem modular as atividades e funções de um grande número de enzimas, incluindo a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (WORD, 1995). Esta enzima,

por sua vez, irá fosforilar o resíduo de serina na MLC, permitindo a interação entre os filamentos de actina e mosina, ocasionando a contração do miométrio (Figura 4) (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

Figura 4 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa uterina pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $PLC\beta_1$; (4) A $PLC\beta_1$ cliva o fosfolípido de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (5) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; (6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR, fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (9) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ - CaM e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC, esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2020.

As prostaglandinas (PGs), membros dos eicosanoides, também desempenham papéis importantes no amadurecimento cervical e na contratilidade miometrial, sugerindo que a inibição da síntese ou da ação das PGs pode ser usada para prevenir ou retardar partos prematuros (ARULKUMARAN et al., 2012). As prostaglandinas são lipídios bioativos que exercem uma função autócrina ou parácrina, acoplando-se a GPCRs para ativar a sinalização intracelular e a transcrição de genes. Por muitos anos, as prostaglandinas foram reconhecidas como moléculas-chave na biologia reprodutiva, regulando a ovulação, a fisiologia e proliferação de glândulas endometriais e a menstruação. Também já foi determinado um papel das PGs em patologias do trato reprodutivo, incluindo carcinomas, endometriose, menorrágia e dismenorreia (SALES; JABBOUR, 2003).

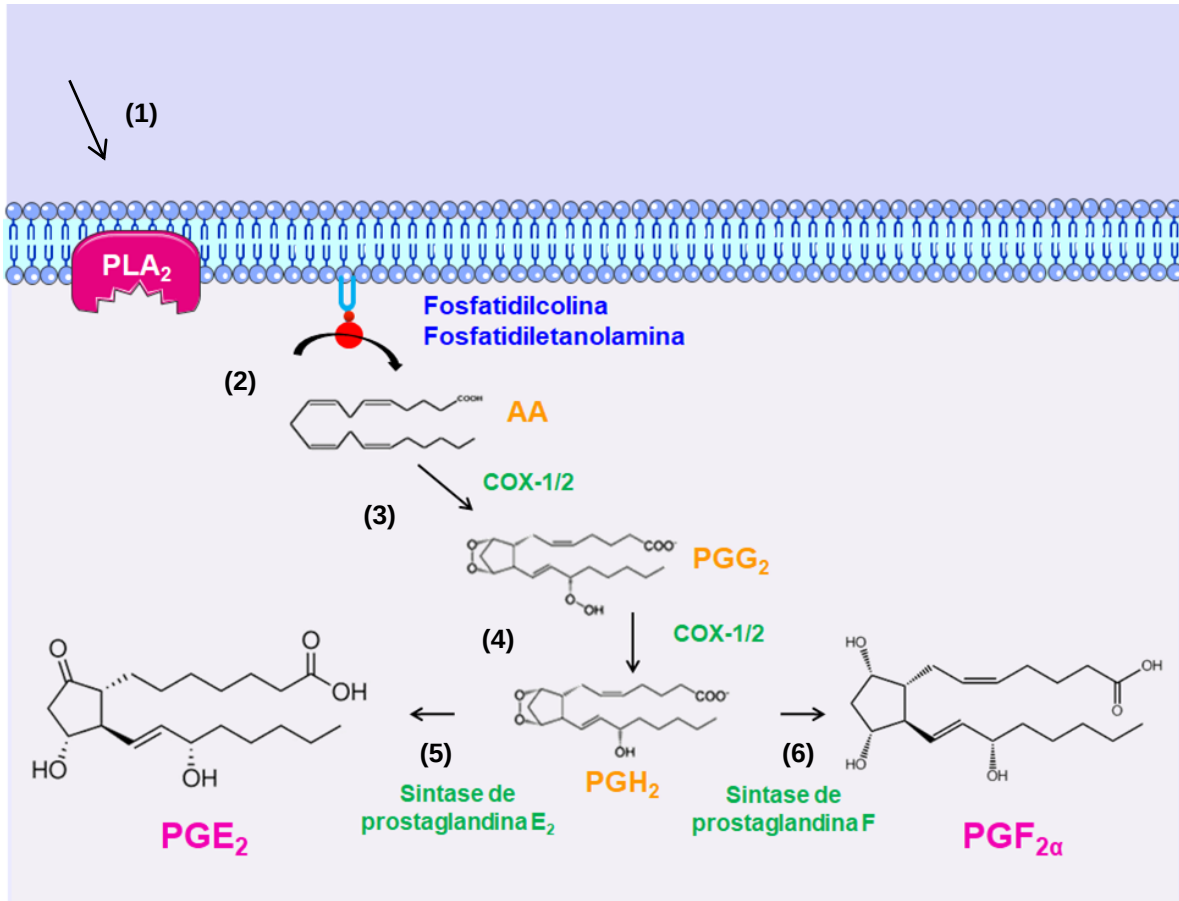
Na síntese das prostaglandinas (Figura 5), estímulos como o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ ativa a fosfolipase A₂ (PLA₂) (TEASLEY; JEONG; KIM, 2019), e esta irá clivar fosfolipídios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) liberando o ácido araquidônico (AA), substrato para as enzimas ciclo-oxigenases (COXs) 1 e 2 (SMYTH; GROOSER; FITZGERALD, 2012; BERRIDGE, 2012). A COX-2 é uma enzima altamente induzível, e no miométrio humano, esta enzima é regulada positivamente no final da gravidez e no trabalho de parto (SLATER et al., 1999; ERKINHEIMO et al., 2000; PHILLIPS et al., 2011), como também em distúrbios ginecológicos como a dismenorreia (SALES; JABBOUR, 2003), enquanto a COX-1 é expressa constitutivamente (PHILLIPS et al., 2011).

As enzimas COXs irão converter o AA em endoperóxidos de prostaglandinas, como a prostaglandina G₂ (PGG₂). Em seguida, esta será reduzida à prostaglandina H₂ (PGH₂), que sofre ação da sintase de prostaglandina E₂ gerando a PGE₂, bem como da sintase de prostaglandina F_{2α}, formando a PGF_{2α} (Figura 5). Ambas irão atuar em seus receptores EP₁ ou EP₃ e FP, respectivamente, acoplados à proteína G_{q/11}, desencadeando a contração da musculatura lisa uterina (BLESSON; SAHLIN, 2014; SMITH, 2018).

A contração da musculatura lisa depende do estado de fosforilação da MLC, que é regulada principalmente pelo complexo 4Ca²⁺-CaM. No entanto, a $[Ca^{2+}]_c$ nem sempre é paralela à quantidade de MLC fosforilada e/ou ao grau de ativação contrátil (AGUILAR; MITCHELL, 2010). Um aumento determinado na $[Ca^{2+}]_c$ resultará em uma força de contração maior que o esperado, em um fenômeno fisiológico conhecido como “sensibilização ao Ca²⁺”, responsável pela manutenção

do componente tônico das contrações miométriais (SOMLYO; SOMLYO, 1998; WOODCOCK; TAYLOR; THORNTON, 2004). Este mecanismo envolve uma proteína G monomérica da família Rho do tipo A, a RhoA, e seu sistema efetor, a proteína cinase associada à RhoA, a ROCK (AKTAS et al., 2019).

Figura 5 – Síntese dos principais eicosanoides contráteis do útero.



(1) Um estímulo ativa a PLA₂; (2) PLA₂ cliva fosfolípidos de membrana liberando o AA; (3) o AA é metabolizado pelas COXs-1/2 produzindo PGG₂; (4) PGG₂ é metabolizada pelas COXs-1/2 produzindo PGH₂; (5) PGH₂ é metabolizada pela sintase de PGE₂ produzindo PGE₂; (6) PGH₂ é metabolizada pela sintase de PGF_{2α} produzindo PGF_{2α}.

Fonte: Autor, 2020.

No miométrio, após a estimulação de agonistas como a ocitocina ou PGF_{2α}, a RhoA é ativada principalmente pela subunidade α das proteínas G_{12/13} (Figura 6), que por sua vez, desencadeia a ativação dos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) (AGUILAR et al., 2011; HUDSON; HEESOM; BERNAL, 2011). Em seu estado inativado, a RhoA está ligada ao inibidor da dissociação do GDP, chamado GDI. Este, contém uma bolsa hidrofóbica envolvendo uma porção da RhoA

que impede sua associação com os GEFs (FUKUMOTO et al., 1990; HANCOCK; HALL, 1993), também diminuindo a atividade GTPásica da RhoA (READ et al., 2000). Dessa forma, a RhoA se dissocia do GDI e interage com os GEFs, que auxiliam a troca de GDP por GTP nesta proteína (CHEN et al., 2019).

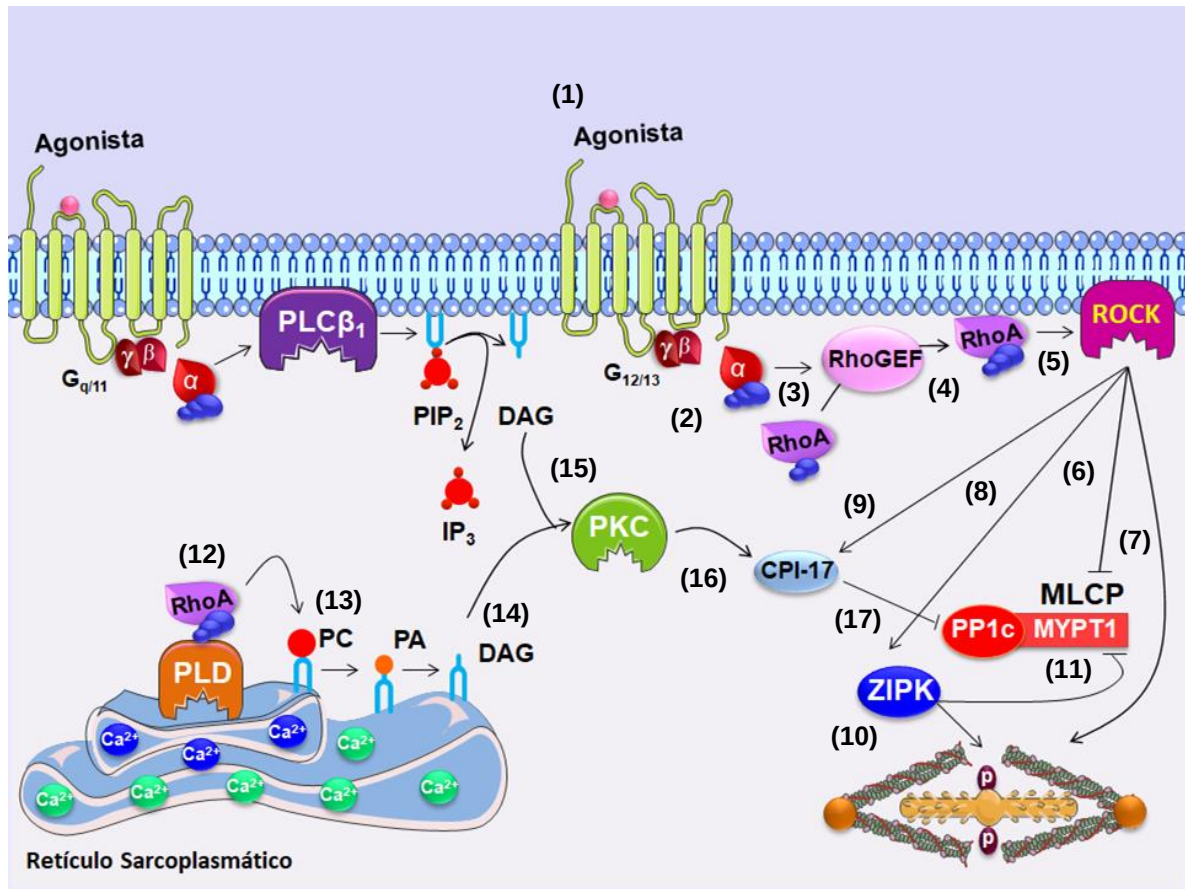
A RhoA-GTP ativa a sua respectiva proteína cinase, a ROCK, uma serina/treonina cinase (LEUNG et al., 1996; MATSUI et al., 1996), e esta ativação parece envolver uma trans-autofosforilação e dimerização (CHEN et al., 2002). No miométrio humano e de rata já foram identificadas a expressão de duas isoformas, a ROCK-1 e ROCK-2 (SOMLYO; SOMLYO, 2003; LARTEY; BERNAL, 2009).

Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC para manutenção da contração (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), através da fosforilação direta da subunidade de ligação à miosina (MYPT1), causando a sua dissociação e impedindo-a de expor seu sítio catalítico (PP1c), tornando-a inativa (LARTEY; BERNAL, 2009). A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , a proteína cinase de interação zíper (ZIPK), que pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto, seu alvo principal é a subunidade MYPT1, a qual é fosforilada inibindo a ação da MLCP (HAGERTY et al., 2007).

A RhoA-GTP também estimula a fosfolipase D (PLD), uma enzima específica para fosfatidilcolina (PC), liberando o ácido fosfatídico (PA), que através da ação da enzima fosfo-hidrolase é desfosforilado a DAG levando a ativação sustentada da PKC (BERRIDGE, 2012). Esta enzima também pode inibir a atividade da MLCP, através do peptídeo inibidor de fosfatase ativada por PKC de 17 kDa (CPI-17), também substrato da ROCK (Figura 6) (ARROWSMITH et al., 2014).

Como a ROCK também ativa o CPI-17 (KOYAMA et al., 2000), isso indica que essas vias convergem para aumentar a sensibilidade ao Ca^{2+} no aparelho contrátil (SHMYGOL et al., 2006). Dessa forma, estudos demonstraram que o bloqueio da via de sinalização da RhoA/ROCK poderia abolir a “sensibilização ao cálcio” no miométrio, sugerindo a importância deste mecanismo para manter e aumentar a atividade contrátil uterina (WOODCOCK; TAYLOR; THORNTON, 2004; KUPITTAYANANT; BURDYGA; WRAY, 2001).

Figura 6 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso uterino pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{12/13}$ trocam GDP por GTP nas suas subunidades α (não mostrado da figura), tornando-se ativas; (3) A subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP ativa o RhoGEF; (4) O RhoGEF faz com que a RhoA troque GDP por GTP, sendo translocada para a membrana; (5) A RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase ROCK; A ROCK possui vários alvos: (6) Inibe a MLCP; (7) Fosforila a MLC; (8) Ativa a ZIPK; (9) Ativa a CPI-17; (10) A ZIPK fosforila diretamente a MLC; (11) A ZIPK fosforila a MLCP, inibindo-a; (12) A RhoA-GTP ligado estimula a PLD; (13) A PLD cliva o lípido de membrana PC em PA; (14) O PA é desfosforilado a DAG pela ação da enzima fosfo-hidrolase; (15) O DAG ativa a PKC, de maneira sustentada; (16) A PKC fosforila a CPI-17, ativando-a; (17) A CPI-17 inibe a ação da MLCP. Todos esses mecanismos favorecem o estado fosforilado a MLC e sua interação com os filamentos de actina, mantendo o músculo liso contraído. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2020.

Para que ocorra o relaxamento da musculatura lisa uterina, é necessária uma diminuição da $[Ca^{2+}]_c$, promovendo a dissociação deste íon com a calmodulina e redução da ativação da MLCK (OTAIBI, 2014). Isso pode ocorrer tanto por meio do mecanismo eletromecânico, induzindo a repolarização ou a hiperpolarização da membrana, como pelo mecanismo farmacomecânico, a partir da ativação de

receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

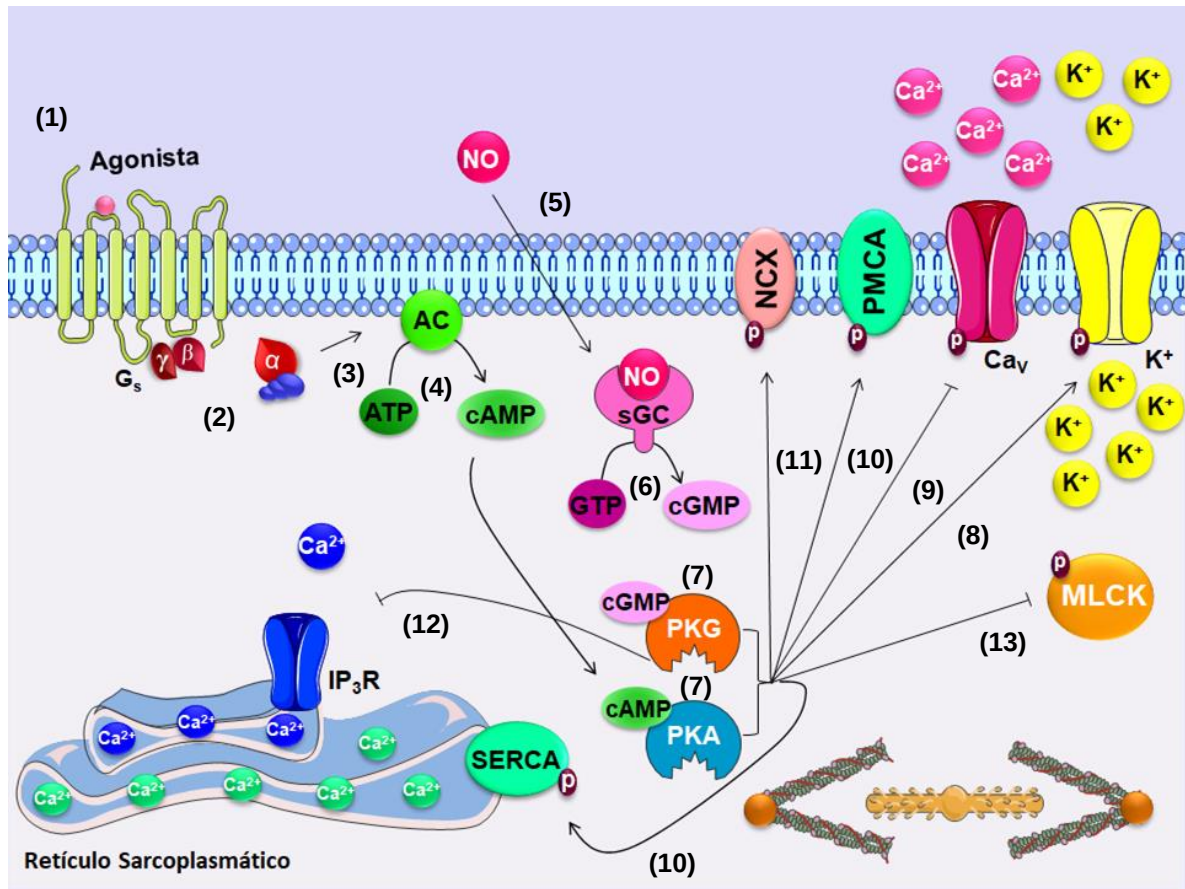
O acoplamento eletromecânico de relaxamento do músculo liso é caracterizado pela abertura de canais de K^+ , que regulam o potencial de repouso da membrana e a excitabilidade celular, uma vez que o aumento da condutância ao K^+ gera uma repolarização/hiperpolarização de membrana. A célula hiperpolarizada bloqueia os canais Ca_v , diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$ (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

As proteínas G heterotriméricas também medeiam um importante mecanismo de relaxamento uterino (Figura 7), através do acoplamento farmacomecânico. Nesse caso, a isoforma predominante é a G_s , cuja subunidade G_α ligada ao GTP causa um aumento da atividade da ciclase de adenilil (AC), que converte o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O aumento de cAMP ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA), que fosforila diversos alvos ocasionando a diminuição $[Ca^{2+}]_c$ (PRICE; BERNAL, 2001; WOOLDRIDGE et al., 2004; BERNAL, 2007; SANBORN, 2007; MITCHELL et al., 2013).

Dentre estes alvos, pode-se citar a ativação dos canais de K^+ , que resulta na hiperpolarização da membrana e inibição dos Ca_v , além de inibição direta destes canais; aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), promovendo a extrusão e o estoque de Ca^{2+} , respectivamente; ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), aumentando a extrusão de Ca^{2+} ; inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -CaM, causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada, além de fosforilação da subunidade MYPT1 da MLCP, tornando-a insensível aos efeitos inibitórios da ROCK. Essa via pode ser estimulada por agonistas adrenérgicos- β endógenos e exógenos para culminar no relaxamento uterino (PRICE; BERNAL, 2001; WOOLDRIDGE et al., 2004; BERNAL, 2007; SANBORN, 2007; MITCHELL et al., 2013).

Uma via que também pode levar ao relaxamento, caracterizado pelo acoplamento farmacomecânico, é a geração de óxido nítrico (NO). No trato genital feminino, o NO é produzido pelo endométrio, miométrio e placenta, podendo estar implicado na fisiologia da menstruação (TELFER et al., 1995) e na quiescência uterina durante a gravidez (IZUMI; YALLAMPALLI; GARFIELD, 1993).

Figura 7 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado tanto dos nervos como das células epiteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_i$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso.

Fonte: Autor, 2020.

O NO é um gás lipossolúvel produzido por uma família de enzimas chamadas sintase de óxido nítrico (NOS), que catalizam a reação de oxidação da L-arginina (L-Arg) em L-citrulina e NO. Existem três isoformas da NOS, a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). A nNOS é encontrada principalmente nas células neuronais, enquanto a eNOS está localizada no endotélio e é essencial para

a vasodilatação e controle da pressão arterial. Apenas essas duas isoformas são constitutivas e produzem quantidades nanomolares de NO por curtos períodos de tempo, de maneira dependente de Ca^{2+} -calmodulina (MODZELEWSKA et al., 2019; LEIPER, 2019; CINELLI et al., 2019). Desta forma, o NO na musculatura lisa uterina irá ativar a ciclase de guanilil solúvel (sCG), que por sua vez vai clivar e ciclar o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), e este irá ativar a cinase dependente de cGMP (PKG), estimulando-a a fosforilar os alvos semelhantes aos da PKA, com adição da inibição do IP_3R , culminando no relaxamento uterino (Figura 7) (ZHAO et al., 2015).

2.3 Dismenorreia

Também conhecida como cólica menstrual, a dismenorreia, caracterizada por dor na região inferior do abdômen que pode se estender para a região lombar ou pernas, é o distúrbio ginecológico mais comum em mulheres em idade reprodutiva (BURNETT; LEMYRE, 2017). De acordo com a apresentação clínica, esta disordem uterina pode ser classificada em dismenorreia primária ou secundária (DE SANCTIS et al., 2017).

A dismenorreia primária refere-se às contrações dolorosas pélvicas que ocorrem antes ou durante o período menstrual, na ausência de condições patológicas identificáveis (FOX et al., 2019), com duração de 8 a 72 horas, sendo mais intensas durante o primeiro ou segundo dia da menstruação (HUANG; LIU, 2014).

Já quando a dor menstrual está associada a uma anormalidade pélvica subjacente, como endometriose, doença inflamatória pélvica, dispositivos intrauterinos, ciclos irregulares, cistos ovarianos, adenomiose, miomas ou pólipos uterinos, aderências intrauterinas ou estenose cervical, ela é definida como dismenorreia secundária (PROCTOR; FARQUHAR, 2006), se apresentando mais comum entre as mulheres a partir de 40 anos, embora ocorra ocasionalmente em adolescentes, onde a endometriose é mais comum (SMITH, 2018).

Podendo iniciar durante ou dentro de três anos após a menarca (SAMY et al., 2019), a dismenorreia primária acomete de 70 a 90% das adolescentes e mulheres jovens (DE SANCTIS et al., 2015; SUBASINGHE et al., 2016). Assim, a Organização

Mundial da Saúde caracterizou a dismenorreia como a causa mais importante de dor pélvica crônica (LATTHE et al., 2006).

Ocasionalmente, as cólicas uterinas são acompanhadas de náusea, vômito, fadiga, dor de cabeça, sensibilidade mamária, inchaço anal e diarreia (GRANDI et al., 2012). Além disso, a dor durante a menstruação também está relacionada a uma ampla gama de sintomas psiquiátricos, principalmente depressão, ansiedade e estresse psicossocial (KIM et al., 2019a).

Sendo assim, a morbidade por dismenorreia representa uma carga substancial de saúde pública, enquadrando-se como uma das principais causas de absenteísmo na escola e no trabalho (DE SANCTIS et al., 2016), sendo responsável por uma diminuição significativa da qualidade de vida por mais de 50% das mulheres em idade reprodutiva, devido à dor incapacitante (IACOVIDES; AVIDON; BAKER, 2015).

No estudo realizado por De Sanctis et al. (2016) foi evidenciado que 57,8% das adolescentes faltaram à escola e 21,5% às atividades sociais. O absenteísmo escolar ocorreu principalmente devido à falta de concentração nas aulas (79,4%) e concentração na dor menstrual (19,7%). Em outro estudo realizado no Brasil por Pitangui et al. (2013) também foi relatado o efeito negativo da dismenorreia nas atividades escolares diárias das adolescentes, uma vez que este distúrbio apresentou uma prevalência de 73% contribuindo para 31% do absenteísmo.

Além disso, estima-se que a cada período menstrual, aproximadamente 10 a 15% das mulheres dismenorreicas não conseguem trabalhar por 1 a 3 dias (HABIBI et al., 2015). Os efeitos negativos desta desordem se estendem além da mulher individual para sociedade, resultando anualmente em uma importante perda de produtividade (BERNARDI et al., 2017). Dessa forma, as consequências da dismenorreia podem causar um alto impacto na vida destas mulheres, podendo afetar as atividades sociais e recreativas, o desempenho acadêmico e profissional (IACOVIDES; AVIDON; BAKER, 2015; ARMOUR et al., 2019), além da saúde mental, gerando transtornos do humor (SAHIN et al., 2018) e distúrbios do sono (WOOSLEY; LICHSTEIN, 2014).

Alguns estudos mostraram que vários fatores de risco podem estar associados aos episódios mais graves da dismenorreia primária, incluindo fatores biológicos, como idade precoce da menarca, fluxo menstrual intenso e histórico familiar (ZEGEYE; MEGABIAW; MULU, 2009; COELHO et al., 2014); fatores

psicológicos, como estresse, ansiedade e depressão (DORN, 2009); fatores sociais, incluindo um nível mais baixo de apoio social (FARAMARZI; SALMALIAN, 2014) e fatores de estilo de vida, como o tabagismo, consumo de álcool, dietas irregulares e obesidade (JU; JONES; MISHRA, 2013; JU; JONES; MISHRA, 2016).

Durante uma menstruação normal, as contrações uterinas ocorrem com uma pressão em torno de 50 a 80 mmHg, com duração de 15 a 30 segundos, e são comuns para auxiliar na expulsão do sangue e na liberação dos tecidos endometriais. Essas contrações geralmente ocorrem com uma frequência de 1 a 4 vezes num período de 10 minutos (SMITH, 2018). Já nas mulheres com dismenorreia, o tônus do miométrio basal e a amplitude das contrações aumentam, se apresentando em alta frequência, com mais de 4 a 5 vezes por minuto, e resultam em pressões intrauterinas em torno de 150 a 180 mmHg (KHAN; STEWART, 2019).

As dores da dismenorreia primária estão associadas às contrações uterinas frequentes e não rítmicas, e a etiologia do início e da progressão desta desordem tem sido proposta como associada ao aumento dos níveis de prostaglandinas liberadas pelo endométrio durante a menstruação (PAN et al., 2014). Uma vez iniciada a menstruação, a apoptose das células endometriais fornece substrato aumentado para o processo de síntese de PGs, quando a PLA₂ converte os fosfolipídios das membranas celulares em ácido araquidônico. A expressão elevada da enzima COX-2 no quadro de dismenorreia, leva ao aumento principalmente de PGE₂ e PGF_{2α} (SUN et al., 2017; SMITH, 2018).

Os dois tipos de PGs estão implicados na patogênese da dismenorreia primária, no entanto, a PGE₂ pode estimular a contração ou relaxamento uterino (LUNDSTRÖM, 1977), dependendo do subtipo de receptor que irá ativar (BREYER et al., 2001), porém, esta prostaglandina exibe propriedades indutoras adicionais da dor (BLEY et al., 1998). Já a PGF_{2α} sempre causa potente constrição dos vasos sanguíneos uterinos e do miométrio, exibindo uma particular importância na etiologia deste distúrbio (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011).

Indiretamente, por promover maior contratilidade uterina, a PGF_{2α} aumenta a pressão uterina, podendo induzir hipóxia, isquemia local e sensibilização dos nervos periféricos por ativarem nociceptores, levando à percepção da dor (DAWOOD, 2006). A hipótese de que a PGF_{2α} é central na patogênese da dismenorreia é confirmada pela observação de que esta é encontrada em altas concentrações no

fluido menstrual de mulheres dismenorreicas em comparação às aquelas com menstruação livre de dor (DAWOOD; KHAN-DAWOOD, 2007).

Além disso, fatores etiológicos adicionais podem incluir outras substâncias que regulam a coordenação da contratilidade miometrial, como a vasopressina e a ocitocina (LIEDMAN et al., 2008), uma vez que também já foram relatados níveis plasmáticos aumentados em mulheres com dismenorreia (MECHSNER et al., 2010). Estes peptídeos podem, possivelmente, contribuir também para a vasoconstrição em pacientes com dismenorreia (AKERLUND, 1993). Foi demonstrado que a expressão dos receptores de ocitocina (OT) foi positivamente correlacionada com a gravidade da dismenorreia (AKERLUND, 2006; GUO et al., 2013) e, além de causar hiperatividade uterina, a ativação de receptores OT também pode resultar na regulação positiva da PLA₂ e da COX-2, levando ao excesso de produção de PGs (GUO et al., 2013), principalmente, da PGF_{2α} pelas células endometriais (WILSON; LIGGINS; WHITTAKER, 1988; BURNS et al., 2001; ARROWSMITH, 2020).

2.4 Tratamento da dismenorreia primária

Individualizado para gravidade dos sintomas de cada paciente, o tratamento da dismenorreia primária tem o objetivo de proporcionar alívio adequado da dor, que no mínimo, deve ser suficiente para permitir que a mulher realize a maioria das suas atividades habituais. O plano de cuidado de cada paciente inclui tratamentos alternativos e/ou farmacológicos (KHAN; STEWART, 2019).

Tratamentos não farmacológicos se mostraram eficazes para promoção do alívio da dor, e destes, a opção de primeira linha para a dismenorreia primária é a terapia pelo calor, utilizando toalhas ou bolsas aquecidas, que promove uma inibição das atividades dos nervos simpáticos, aumentando o fluxo sanguíneo uterino e removendo substâncias causadoras de dor, como as prostaglandinas, melhorando a oxigenação tecidual e reduzindo a probabilidade de isquemia (HOSONO et al., 2010; JO; LEE, 2018).

Além disso, outros métodos alternativos e complementares também são utilizados, incluindo estimulação elétrica transcutânea de nervos (LEE et al., 2015), ioga (SUTAR et al., 2016), acupuntura (ARMOUR et al., 2017), massagem de aromaterapia (SUT; KAHYAOGLU-SUT, 2017) e exercícios físicos (CARROQUINO-GARCIA et al., 2019). O aumento do consumo de frutas e verduras como fonte de

vitaminas e minerais, bem como peixes e laticínios, também mostram associações positivas na redução da dor menstrual (BAJALAN; ALIMORADI; MOAFI, 2019), incluindo a suplementação com vitaminas do complexo B, D e E (HOSSEINLOU et al., 2014; MOINI et al., 2016; SADEGHI et al., 2018), ácidos graxos (PREGO-DOMINGUEZ; HADRYA; TAKKOUCHE, 2016) e magnésio (PARAZZINI; DI MARTINO; PELLEGRINO, 2017).

Embora existam várias opções terapêuticas alternativas para a dismenorreia primária, o tratamento medicamentoso permanece como o de primeira linha, por se mostrar mais confiável e eficaz (MITALL, 2019). Uma vez que uma das principais causas da dor ocasionada pelas cólicas menstruais seja devido ao aumento da concentração de prostaglandinas responsáveis pela contração e isquemia uterina (DAWOOD, 2006), destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), considerados a principal escolha de tratamento desta desordem (MARJORIBANKS et al., 2010), incluindo diclofenaco, naproxeno, cetoprofeno, meclofenamato, ácido mefenâmico e ibuprofeno, que irão atuar inibindo a COX de forma não seletiva, reduzindo a formação das PGs (HAREL, 2012).

Apesar de os AINEs serem eficazes na maioria dos casos de dismenorreia primária, sua utilização em longo prazo pode ocasionar efeitos adversos envolvendo distúrbios gastrintestinais e efeitos tóxicos renais e hepáticos (SIMON, 2013). Um inibidor seletivo da COX-2, celecoxibe, único aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento da dismenorreia primária em mulheres maiores de 18 anos, também é considerado para aquelas que apresentem histórico de úlcera péptica ou outros distúrbios gastrintestinais que podem ser agravados com o uso de AINEs não seletivos, uma vez que foi evidenciado que o celecoxibe forneceu alívio da dor menstrual dentro de 1 h após a administração. Porém, deve ser usado com cautela devido aos efeitos adversos cardiovasculares (HAREL, 2004; DANIELS, 2009; HAREL, 2012).

A dismenorreia também responde favoravelmente à inibição da ovulação, através da ação dos contraceptivos orais, que inibem também o crescimento do tecido endometrial, reduzindo assim o volume sanguíneo menstrual e a secreção de prostaglandinas (WONG et al., 2009; BURNETT; LEMYRE, 2017). Porém, efeitos adversos são relatados, como retenção de água, náusea e endometriose, diminuindo então a adesão ao tratamento (HARADA et al., 2008; SUN et al., 2016).

Outra classe de medicamentos utilizada na clínica para o tratamento da dismenorreia são os antiespasmódicos, como o butilbrometo de escopolamina, que promovem relaxamento da musculatura lisa uterina por antagonizar os receptores muscarínicos, atenuando a dor promovida pela dismenorreia (OSLER, 1979; KOROLKOVAS; FRANÇA, 2015). Apesar de os dados serem escassos, alguns estudos avaliaram a eficácia desses agentes tocolíticos no alívio sintomático da dismenorreia primária, como o conduzido por Langrick et al. (1989), que mostrou uma eficácia superior tanto para o antiespasmódico (mebeverina) quanto para o AINE (ácido mefenâmico) frente ao placebo para redução da intensidade das cólicas uterinas, indicando que os antiespasmódicos exercem efeito positivo sobre esta desordem.

Outro estudo com 200 mulheres acometidas com dismenorreia primária comparou a eficácia da associação entre um AINE (aceclofenaco) e um antiespasmódico (dotaverina) em relação ao AINE isoladamente, indicando uma equivalência das formulações no alívio da dor menstrual após 8 horas. Entretanto, a associação apresentou maior porcentagem de alívio da dor entre 4 e 8 horas, após a administração, além de fornecer resultados superiores na auto avaliação de dor pela paciente (PAREEK et al., 2010).

Ademais, uma avaliação com 82 pacientes brasileiras demonstrou a eficácia e a tolerabilidade comparativa da associação de antiespasmódicos, como a papaverina e extrato fluido de *Atropa belladonna* com dipirona sódica (Atroveran®) em relação ao butilbrometo de escopolamina com dipirona sódica (Buscopan®). Os dados demonstraram equivalência desses medicamentos nas variáveis avaliadas, com tendência a melhor resposta ao uso do butilbrometo de escopolamina associado à dipirona. Entretanto, algumas dúvidas ainda persistem quanto à eficácia desses compostos no tratamento da dismenorreia (KAARI et al., 2016).

Além disso, diversas plantas medicinais são relatadas na literatura por contribuir para o alívio dos sintomas da dismenorreia primária através de suas ações antiespasmódicas, podendo ser uma alternativa adequada aos medicamentos convencionais, principalmente nos casos em que estes são contraindicados ou não são bem tolerados (PELLOW; NIENHUIS, 2018). Dentre estas, pode-se citar *Anethum graveolens* (GHARIBN; MARD; FARBOUD, 2005; HEIDARIFAR et al., 2014), *Thymus vulgaris* (PRASANTH et al., 2014), *Melissa officinalis* (SHAKERI; SAHEBKAR; JAVADI, 2016), *Mentha piperita* (HESHMATI et al., 2016), *Valeriana*

officinalis (NANDHINI et al., 2018), *Matricaria chamomilla* (SHARIFI et al., 2014; SADRAEI et al., 2020), entre outras (PELLOW; NIENHUIS, 2018).

2.5 Produtos naturais e plantas medicinais

Os produtos naturais são uma fonte essencial de medicamentos originários da flora e fauna biodiversa do mundo. Em decorrência disto, estes produtos representaram mais da metade do total de fármacos disponibilizados para uso terapêutico entre os anos de 1981 e 2014. Destes, 6% são inalterados, 26% são derivados e 32% imitam um produto natural e/ou contêm um farmacóforo deste (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os benefícios dos produtos naturais como pontos de partida para a descoberta de medicamentos podem ser explicados pela relevância biológica de suas estruturas. Estas substâncias naturais incorporam novidades estruturais e complexidades que geram diferentes atividades biológicas, muitas vezes levando à descoberta de novos alvos ou mecanismos de ação (YAO et al., 2017).

Além disso, a diversidade química é também o resultado de milhões de anos de evolução, que modificaram as vias biosintéticas de formação destes produtos naturais em resposta a vários estresses bióticos e abióticos causados por eventos naturais, como mudanças ambientais, ou não naturais, como produtos químicos ou radiações. Essas moléculas de estruturas químicas diversas são produzidas por diversas fontes naturais, incluindo micro-organismos, animais e plantas (BERNARDINI et al., 2018).

Os produtos derivados de plantas também são conhecidos como metabólitos secundários, que são os produtos finais da expressão gênica, geralmente não essenciais para a reprodução, crescimento ou desenvolvimento da planta, produzidos como resultado da adaptação ao ambiente ou como possível mecanismo de defesa contra predadores (COLEGATE; MOLYNEUX, 2007). Ao longo da história, as plantas têm sido uma fonte rica de compostos naturais acessíveis, que possuem complexidade estrutural e exibem um amplo espectro de bioatividade (SECA; PINTO, 2018).

As plantas consideradas medicinais são utilizadas desde a antiguidade pelas populações de todo o mundo no tratamento e cura de enfermidades. Esta prática

tem ressurgido com maior força através da fitoterapia que proporciona outra opção medicamentosa atualmente aceita e bastante acessível em vários países (VERRI; MOURA; DE MOURA, 2018).

O conhecimento empírico sobre as plantas medicinais no decorrer da história da humanidade, se mostra eficaz no que se refere aos cuidados imediatos à saúde (FLOR; BARBOSA, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial dependem das práticas tradicionais com relação à atenção primária à saúde, e desses, 85% faz uso de alguma espécie de planta ou preparações tendo como base os vegetais (BRASIL, 2006).

Desse modo, a busca por alternativas terapêuticas, como as plantas medicinais, torna-se, muitas vezes, o principal e único recurso natural disponível e acessível para algumas comunidades e grupos étnicos (BARBOSA et al., 2010; WANDERLEY et al., 2015). Entretanto, geralmente a população faz o uso de preparações à base de plantas medicinais de forma empírica, não levando em consideração as formas de preparação, armazenamento e métodos de extração adequados, afetando assim a eficácia e a segurança terapêutica (SANTOS et al., 2016). Portanto, nesse contexto, fazem-se necessários mais estudos a respeito das plantas medicinais.

2.6 Família Cordiaceae

Tradicionalmente, a família Cordiaceae era considerada uma subfamília de Boraginaceae (MILLER; GOTTSCHLING, 2007). No entanto, estudos filogenéticos apoiados por dados moleculares, concentrando-se principalmente na subclasse Asteridae, demonstraram que Boraginaceae é um grupo parafilético (OLMSTEAD et al., 1993; GOTTSCHLING et al., 2001). Assim, as subfamílias de Boraginaceae foram elevadas ao nível de família e então, o Angiosperm Phylogeny Group reconheceu a ordem Boraginales como sendo composta por oito famílias: Codonaceae, Wellstediaceae, Hydrophyllaceae, Namaceae, Heliotropiaceae, Ehretiaceae, Boraginaceae e Cordiaceae (APG, 2016; BWG, 2016).

Cordiaceae é um grupo monofilético e cosmopolita, suportado por dados moleculares e apomorfias, como a presença de endocarpo indiviso, quatro lobos de estigma e cotilédones plicados, características exclusivas da família dentro das

Boraginales (GOTTSCHLING et al., 2005; MILLER; GOTTSCHLING, 2007; GASPARINO; BARROS, 2009; BWG, 2016).

Compreendendo cerca de 400 espécies, a família Cordiaceae está distribuída mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (BWG, 2016), dentro de três gêneros: *Coldenia* L., *Cordia* L. e *Varronia* P. Browne, dos quais, apenas os dois últimos são considerados nativos no Brasil, com ocorrência de 70 espécies neste país (MILLER; GOTTSCHLING, 2007; GASPARINO; BARROS, 2009).

2.7 Gênero *Varronia*

O gênero *Varronia* inclui aproximadamente 125 espécies, distribuídas ao longo das regiões subtropicais e temperadas do mundo, com centros de diversidade localizados no México, nos Andes tropicais e no Brasil (MILLER; GOTTSCHLING, 2007). Morfologicamente, as espécies deste gênero são subarbustos ou arbustos multi-ramificados, com margens foliares serrilhadas e três tipos de inflorescências: capitado, espichar ou cimosa (SILVA; MELO, 2019).

Varronia foi descrita como um subgênero de *Cordia*, no entanto, houve uma segregação, corroborando para que *Varronia* seja um grupo monofilético distinto, reconhecida em nível genérico (MILLER; GOTTSCHLING, 2007). A diversidade morfológica entre os gêneros tem suscitado muita discussão e *Varronia* tem sido proposto como gênero que engloba várias espécies antes pertencentes à *Cordia* (TÖLKE et al., 2013). Ambos os gêneros são separados pela morfologia polínica, uma vez que, *Cordia* possui grãos de pólen 3-colporados, colpos longos e endoaberturas alongadas, exina espinhosa a espículo-verrugosa e *Varronia* apresenta grãos de pólen 3-porados, poros com opérculos, exina reticulada, homorreticulada a heterorreticulada (GASPARINO; BARROS, 2009).

Os registros da literatura apontam que existem cerca de 30 espécies do gênero no Brasil, das quais, mais da metade são endêmicas, podendo ocorrer em diferentes habitats como nos principais domínios fitogeográficos do país, incluindo Cerrado e Caatinga (FLORA DO BRASIL, 2020). No nordeste brasileiro, seis espécies do gênero *Varronia* são endêmicas: *Varronia harleyi* (Taroda) J.S. Miller, *V. leucocephala* (Moricand) J.S. Miller, *V. leucomalloides* (Taroda) J.S. Miller, *V. mayoi* (Taroda) M.Stapf, *V. tarodaea* J.S. Miller, *V. mariana* E.C.O. Chagas & Costa-Lima e

Varronia dardani (Taroda) J.S. Miller (MELO; VIEIRA, 2015; CHAGAS; COSTA-LIMA, 2018).

Estudos fitoquímicos evidenciaram diferentes classes de metabólitos isolados de algumas espécies de *Varronia*, como naftoquinonas, terpenoides, lignanas e compostos fenólicos, principalmente flavonoides (GOMES, 2010; DINIZ et al., 2015; MATIAS et al., 2016; VELOSO et al., 2020a).

Algumas espécies deste gênero possuem uso etnomedicinal para o tratamento de dor de cabeça, inflamações, reumatismo, tumores, úlceras, distúrbios respiratórios e digestivos (OZA; KULKARNI, 2017). O infuso das folhas das espécies *Varronia globosa* e *V. leucocephala* já foram relatados para o alívio da dismenorreia (AGRA, 1996; ABRANTES; AGRA, 2004; OZA; KULKARNI, 2017).

Além disso, algumas atividades farmacológicas já foram comprovadas, a citar, atividade antioxidante (DAVID et al., 2007) para o extrato de *Varronia globosa*; atividade antimicrobiana (PINHO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2012; NIZIO et al., 2015) para o óleo essencial e anti-inflamatória (MEDEIROS et al., 2007), anti-ulcerogênica e analgésica (ROLDÃO et al., 2008) para o extrato de *V. curassavica* e atividade antinociceptiva e anti-inflamatória para o extrato de *V. multispicata* (LOPES et al., 2019). Também já foram relatadas atividade vasorrelaxante (JAMKHANDI et al., 2013) e espasmolítica em duodeno de coelho e íleo de cobaia para o extrato de *V. globosa* (FENG et al., 1962), em íleo de cobaia para o de *V. spinescens* (TORTORIELLO et al., 1995) e atividade tocolítica em rata (FENG et al., 1964) para o extrato de *Varronia brownei*.

2.8 *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Miller

Com ocorrência apenas na região Nordeste do Brasil (Figura 8), em vegetação de Caatinga, esta espécie, basônimo *Cordia dardani*, é encontrada nos Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba (MELO et al., 2012; FLORA DO BRASIL, 2020).

A espécie *Varronia dardani* é caracterizada morfológicamente (Figura 9) pelas inflorescências espiciformes associadas à lâmina foliar ovada, discolor, de base levemente cordada ou, ainda, pelo cálice rufescente e fruto piriforme quase inteiramente recoberto pelo cálice (MELO; ANDRADE, 2007).

Estudos fitoquímicos com extratos hidroalcoólicos das raízes, galhos e folhas de *Varronia dardani*, mostraram a presença de taninos flabobênicos, flavononois, catequinas, flavanonas e quinonas em sua composição. A análise cromatográfica do óleo essencial desta espécie, possibilitou a identificação de compostos como o d-limoneno; 1,8-cineol, linalol, 2E,6E-acetil-farnesol, δ -cadineno, timol, carvacrol, γ -cadineno, p-cymene e o δ -cadinol (DUARTE, 2015; VELOSO et al., 2020b).

Figura 8 – Distribuição geográfica da espécie *Varronia dardani*.



Fonte: STAPF, 2015.

Figura 9 – Inflorescências e folhas de *Varronia dardani*.



Fonte: Flora do Brasil, 2020.

Além disso, estudos realizados por De Oliveira (2016), resultaram no isolamento de duas naftoquinonas, a cordiaquinona A e cordiaquinona B, a partir do

extrato diclorometânico das raízes de *V. dardani*. Ademais, da fase diclorometano do extrato hidroalcoólico das folhas, foi possível isolar duas chalconas, a 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (pinostrobina chalcona) e 2',6'-dihidroxi-4,4'-dimetoxichalcona (gimnogrameno) (VELOSO et al., 2020a), além de cinco flavanonas, a 5-hidroxi-7-metoxiflavanona (pinostrobina), a 5-hidroxi-7,4'- dimetoxiflavanona (sakuranetina-4'-metil éter), a 5,7-dihidroxiflavanona (pinocembrina), a 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (isosakuranetina) e a 4',5,7-trihidroxiflavanona (narigenina) (DE OLIVEIRA, 2016; TRIGUEIRO, 2019; VELOSO et al., 2020a).

Existem poucos estudos na literatura relacionados às atividades biológicas para a espécie *Varronia dardani*. Porém, para o óleo essencial desta espécie, pode-se citar uma atividade larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* (DUARTE, 2015) e atividade antimicrobiana frente à *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (DE OLIVEIRA, 2016), *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus salivarius* (VELOSO et al., 2020b). Já para o extrato hidroalcoólico das folhas de *V. dardani*, pode-se citar atividade antifúngica contra o *Fusarium solani* (DUARTE, 2015) e antimicrobiana contra *Streptococcus salivarius* (VELOSO, 2018).

Isto posto, uma vez que espécies do gênero *Varronia* já apresentaram atividade espasmolítica (FENG et al., 1962; FENG et al., 1964; TORTORIELLO et al., 1995) e possuem uso etnomedicinal na forma de infuso das folhas para o tratamento da dismenorreia (AGRA, 1996; ABRANTES; AGRA, 2004; OZA; KULKARNI, 2017), associado ao fato de que o extrato etanólico obtido das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F) apresentou atividade espasmolítica em diversos modelos experimentais de músculos lisos tônicos e fásicos, exibindo maior potência relaxante em útero de rata (VELOSO et al., 2020a), este trabalho investigou o mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH_F *in vitro* em ratas e o seu efeito *in vivo* no modelo de dismenorreia primária em camundongos fêmeas.

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* e o efeito no modelo *in vivo* de dismenorrea primária do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F) em roedores.

3.2 Específicos

- Caracterizar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F avaliando, em nível funcional, a participação da(os):
 - Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem
 - Canais de K⁺
 - Receptores adrenérgicos-β
 - Via das ciclo-oxigenases
 - Via do óxido nítrico (NO)
 - RhoA/Rho cinase
 - Calmodulina
- Avaliar a toxicidade aguda oral do VD-EtOH_F em camundongos fêmeas;
- Investigar o efeito tocolítico *in vivo* do VD-EtOH_F no modelo de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas.

4 Material e métodos

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

O material vegetal foi coletado em janeiro de 2016 no município de Serra Branca - PB. Sua identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. José Iranildo de Melo do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob o código JPB-29509. A utilização da espécie em questão, foi cadastrada na base de dados do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen-Brasil) sob o protocolo A0E7358.

4.1.2 Droga-teste

Para a realização desta pesquisa foi utilizado o extrato etanólico bruto obtidos das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F), cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB.

Inicialmente, para a obtenção do VD-EtOH_F, as folhas de *Varronia dardani* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho mecânico, obtendo-se 1,3 kg do pó da planta. Em seguida, o pó foi submetido à maceração com etanol (EtOH) 95%, em macerador de aço inoxidável, sendo esse processo repetido por três vezes durante 72 horas cada, obtendo-se a solução extrativa. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente, obtendo-se 141,6 g do extrato etanólico bruto, com 10,9% de rendimento.

4.1.3 Animais

Eram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens e camundongos (*Mus musculus*) fêmeas pesando $198,6 \pm 2,7$ g e $35,1 \pm 0,4$ g, respectivamente,

provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Nuvilab®) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão 3864230519) da UFPB (Anexo 1).

4.1.4 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de magnésio di-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a glicose, o cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil).

O Cremophor®, o cloridrato de *N*_w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), o cloreto de cério (CsCl), a indometacina e o calmidazolium foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O dietilestilbestrol, o (S)-(-)-propranolol, o N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil) ciclohexano carboxamida (Y-27632) e a prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), foram adquiridos da Cayman Chemical Company (EUA). A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil).

Estas substâncias, exceto o Cremophor®, foram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C. Todas eram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o dietilestilbestrol, o (S)-(-)-propranolol, o Y-27632, o calmidazolium e a PGF_{2α}, que foram dissolvidos em álcool etílico absoluto para obtenção da solução-estoque. Caso necessário, essas soluções-estoque eram diluídas para obtenção de concentrações apropriadas para cada protocolo experimental.

A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi obtida da White Martins (Brasil).

4.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados eram utilizadas soluções nutritivas específicas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH, 1N), todas gaseificadas com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 32 °C, cujas composições estão descritas abaixo:

Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997) (mM): NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl₂ (2,1), CaCl₂ (2,2), glicose (5,6), NaHCO₃ (6,0).

Composição da solução de Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺ (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997) (mM): NaCl (154,0), MgCl₂ (2,1), glicose (5,6), NaHCO₃ (6,0).

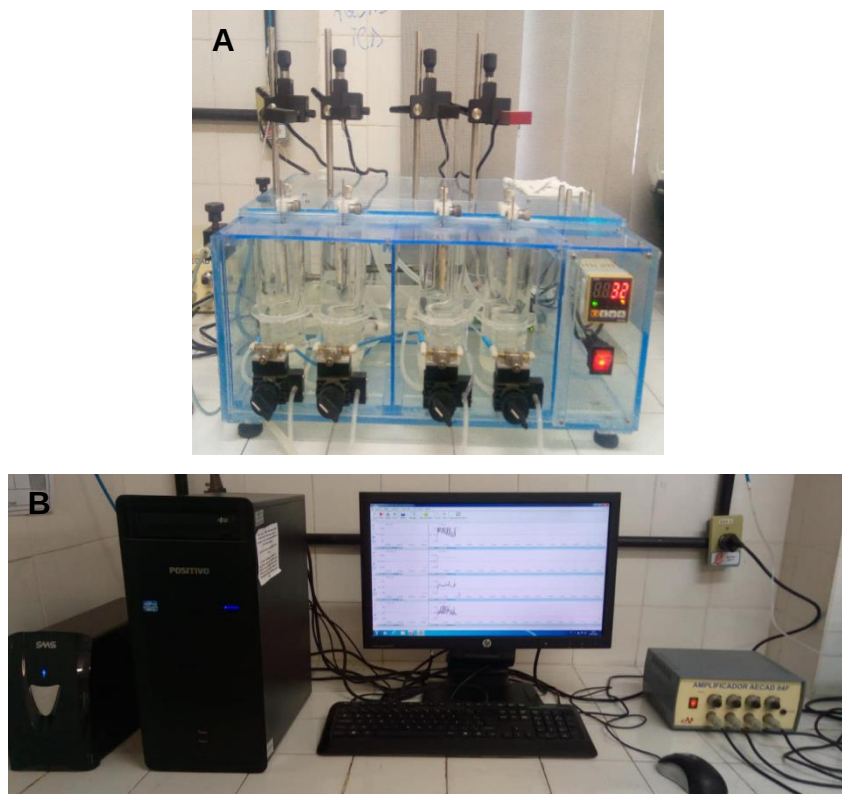
4.1.6 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplados a cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). A temperatura das cubas (32 °C) era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil, ou POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

Para registrar as contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise (Figura 10). O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

Figura 10 – Aparelhos utilizados nos experimentos *in vitro*.

A) Sistema de banho para órgãos isolados, composto por cubas de vidro, transdutores isométricos e bomba termostática; B) amplificador e sistema de aquisição digital.

Fonte: Autor, 2020.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das soluções-mãe do extrato para os ensaios farmacológicos

O extrato era solubilizado em Cremophor® (3% v/v) e diluído em água destilada para obtenção das soluções-estoque de 10 mg/mL (*in vitro*) e 50 mg/mL (*in vivo*), que eram estocadas a uma temperatura de -8 °C. A concentração final do Cremophor® na cuba nunca excedeu 0,01%, e nesta concentração, o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações e doses do VD-EtOH_F eram utilizadas em múltiplos de 3 ou 2, sendo a concentração máxima de 729 µg/mL e a dose máxima de 2000 mg/kg. Era realizada uma curva dose-resposta completa testando concentrações menores

para verificar os efeitos mínimo e máximo ($E_{\max}$) do extrato, quando o efeito da concentração submáxima e máxima era superior a 50 e 70%, respectivamente.

4.2.2 Avaliação do mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH_F

4.2.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea para sincronização hormonal do estro. Decorrido este tempo, as ratas eram eutanasiadas por anestesia (i.p.) com cetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, seguido por método complementar de decapitação com o auxílio de uma guilhotina. A cavidade abdominal era aberta com um corte longitudinal, o útero retirado e limpo de todo o tecido conectivo e adiposo. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva de Locke Ringer, aquecidas a 32 °C e gaseificados com carbogênio.

Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneciam em repouso por 40 minutos, tempo necessário para estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997). Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 60 mM de KCl para verificação da funcionalidade do órgão. Durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por 60 mM de KCl ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina, o VD-EtOH_F era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl ou por ocitocina. A potência e a eficácia relaxante do VD-EtOH_F foram calculadas e avaliadas comparando-se os valores da concentração do extrato que promovia 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) e do $E_{\max}$, respectivamente.

Após o relaxamento máximo produzido pelo VD-EtOH_F, o tempo de reversão era observado.

4.2.2.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺

O órgão era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização do órgão, a solução de Locke Ringer era substituída pela solução Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺ por um período de 30 minutos, em seguida era adicionado 60 mM de KCl causando uma despolarização de membrana. Após 10 minutos, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl₂ (10⁻⁵-10⁻¹ M). As contrações eram registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumado de um quimógrafo. Após a obtenção da curva-controle, o VD-EtOH_F (em várias concentrações) era incubado e, na presença deste, era obtida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl₂ (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do VD-EtOH_F com aquela obtida pela amplitude média da curva-controle na ausência do extrato. Os valores de E_{max} e da CE₅₀ (concentração do CaCl₂ que promove 50% do seu efeito máximo) do CaCl₂ foram obtidas na ausência (controle) e na presença do extrato.

4.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.3.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

O órgão era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade deste. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10⁻² UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não

seletivo dos canais de potássio (LATORRE et al., 1989), e após 20 min, na presença do bloqueador, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa.

O relaxamento produzido por VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de E_{max} e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do bloqueador.

4.2.2.4 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.4.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 300 nM de (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos- β , e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o VD-EtOH_F de maneira cumulativa (SHI et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de E_{max} e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do antagonista.

4.2.2.5 Avaliação do envolvimento da via das ciclo-oxigenases no efeito tocolítico promovido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.5.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado à cuba 10 μ M de indometacina, um inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases, e após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o VD-EtOH_F de maneira cumulativa (SHI et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de $E_{\max}$ e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.2.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.6.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado à cuba 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de sintase do óxido nítrico (NOS) (YALLAMPALLI; GARFIELD; BYAM-

SMITH, 1993). Após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o VD-EtOH_F era adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de $E_{\max}$ e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.2.7 Avaliação da participação da via da RhoA/Rho cinase no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.7.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10^{-4} M de Y-27632, um inibidor não seletivo da ROCK (TAHARA et al., 2002), e após 10 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o VD-EtOH_F de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de $E_{\max}$ e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.2.8 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH_F em útero isolado de rata

4.2.2.8.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o VD-EtOH_F de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10^{-4} M de calmidazolium, um inibidor da calmodulina, e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o VD-EtOH_F de maneira cumulativa (FERNANDEZ; CANTABRANA; HIDALGO, 1992; JOVANOVIĆ; GRBOVIĆ; TULIĆ; 1994).

O relaxamento produzido pelo VD-EtOH_F foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de $E_{\max}$ e de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a eficácia e a potência tocolítica do extrato foram comparadas na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.2.9 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do VD-EtOH_F em camundongos fêmeas

Após a administração do VD-EtOH_F (2000 mg/kg), uma série de parâmetros comportamentais eram observados durante as 4 primeiras horas (Anexo 2), por exemplo: hiperatividade, agressividade, tremores, convulsão, piloereção, sedação, ataxia, catatonia, analgesia, perda do reflexo corneal e auricular, dispneia, ambulação, escalagem, contorções abdominais, hemorragia, automutilação e vômitos (Adaptado de Almeida et al., 1999).

Para avaliação da toxicidade aguda, seguiu-se a metodologia descrita pelo Guia nº 423/2001 da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) (OECD, 2001). Eram utilizadas 3 fêmeas em duas etapas, que após

jejum de 4 horas, eram tratadas com VD-EtOH_F (dose única de 2000 mg/kg) por via oral (v.o.) ou salina 0,9% + Cremophor® (controle, v.o.). Os animais eram avaliados durante 14 dias com a finalidade de verificar se houve alguma morte e assim estimar a dose do extrato que mata 50% dos animais testados (DL₅₀). A evolução ponderal dos animais também foi avaliada no 1º dia antes do tratamento, no 7º e 14º dia após o tratamento, juntamente com o controle do consumo de água e ração. No 14º dia os animais eram eutanasiados e tinham o coração, pulmão, estômago, baço, rins e fígado pesados.

4.2.2.10 Avaliação do efeito tocolítico *in vivo* do VD-EtOH_F no modelo de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas

Os camundongos fêmeas eram tratados, via intraperitoneal (i.p.), com o dietilestilbestrol (1 mg/kg/dia) durante 3 dias, exceto o grupo controle negativo, que era tratado com 10 mL/kg de solução salina mais Cremophor®. No 4º dia, os animais eram divididos em grupos de 6 animais e receberam por v.o. os seguintes tratamentos: 10 mL/kg de solução salina mais Cremophor®, ou 50 mg/kg de ibuprofeno ou diferentes doses do VD-EtOH_F (125; 250, 500 ou 1000 mg/kg). Após 30 minutos da última administração, todos os grupos (exceto o controle negativo) eram submetidos à administração via i.p. com 50 UI/mL de ocitocina. O número de contorções, que consiste principalmente de contrações da parede abdominal e rotação pélvica seguida de alongamentos dos membros posteriores, era registrado durante 30 minutos após a administração de ocitocina (LI et al., 2019). Os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical e os tecidos uterinos coletados para posterior análise.

Os resultados foram expressos como o número de contorções. Os valores do efeito máximo (E_{max}) e da DE₅₀ (dose do extrato que produz 50% de seu efeito máximo) foram expressos como a percentagem da média e o erro padrão da média (e.p.m.) dos seus valores individuais.

4.2.2.11 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por PGF_{2α} em útero isolado de rata

O útero era montado como descrito no item 4.2.2.1. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 60 mM de KCl para verificação da funcionalidade do órgão. Durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por 10^{-6} M de PGF_{2α}, o VD-EtOH_F era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por PGF_{2α}. A potência e a eficácia relaxante do VD-EtOH_F foram calculadas e avaliadas comparando-se os valores da CE₅₀ e do E_{max}, respectivamente.

Após o relaxamento máximo produzido pelo VD-EtOH_F, o tempo de reversão era observado.

4.2.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Os valores de CE₅₀ foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

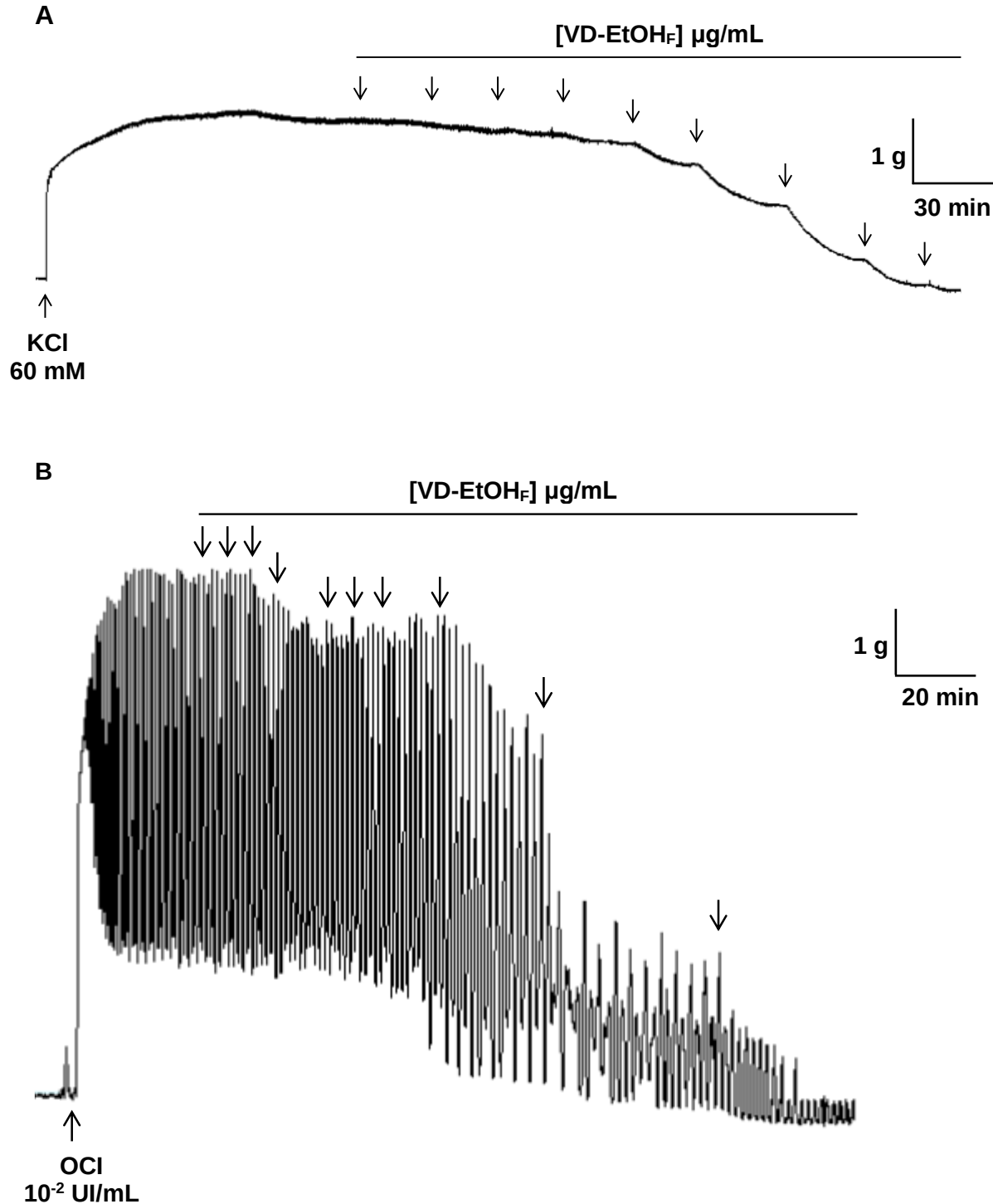
5 Resultados

5.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em rata

O VD-EtOH_F (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente o útero de rata pré-contráido com 60 mM de KCl ($E_{\max} = 101,3 \pm 1,9\%$ e $CE_{50} = 27,7 \pm 3,1$ µg/mL) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7$ µg/mL) (Figura 11 e Gráfico 1).

O tempo médio para que o VD-EtOH_F alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 4 horas. A responsividade do útero ao KCl e à ocitocina foi restaurada em $36,4 \pm 6,9$, e $96,0 \pm 1,0\%$, respectivamente, em 2 horas após a retirada do VD-EtOH_F da cuba.

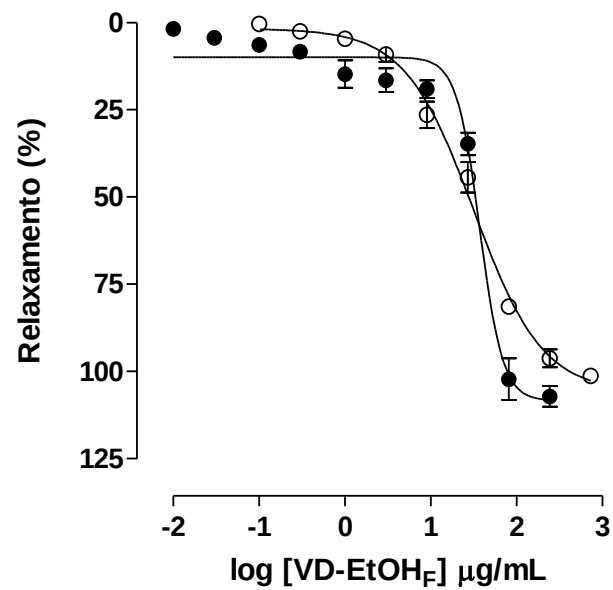
Figura 11 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 10⁻² UI/mL de ocitocina (**B**) em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,1-729 µg/mL (**A**), 0,01-243 µg/mL (**B**). KCl = cloreto de potássio; OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 1 – Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (○) e por 10⁻² UI/mL de ocitocina (●) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2020.

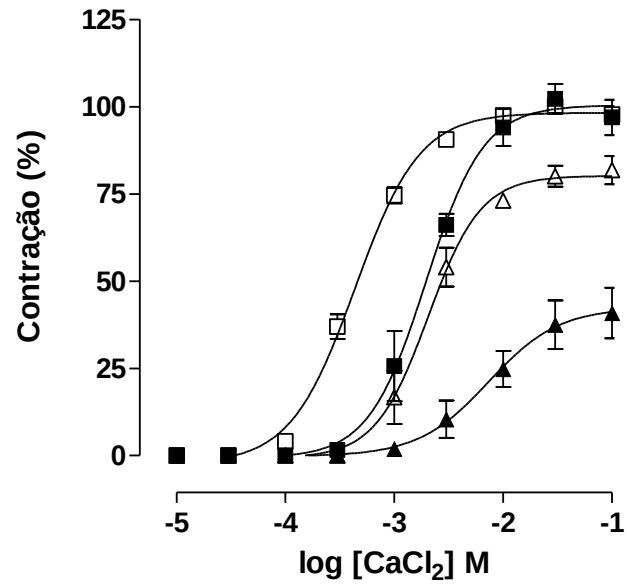
5.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.2.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺

A curva cumulativa controle ao CaCl₂ na presença do VD-EtOH_F (81, 243 e 729 µg/mL, n = 5) foi inibida apenas nas concentrações de 243 e 729 µg/mL, sendo desviada para direita de maneira paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para 81,4 ± 3,0 e 40,9 ± 7,3%, respectivamente.

Houve alteração da potência apenas na concentração de 729 µg/mL. Os valores de CE₅₀ do CaCl₂ passaram de 4,7 ± 0,2 x 10⁻⁴ M no controle para 7,9 ± 1,8 x 10⁻³ M (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Efeito inibitório do VD-EtOH_F frente às contrações cumulativas induzidas por cloreto de cálcio (CaCl₂) em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ na ausência (□) e na presença do VD-EtOH_F nas concentrações de 81 (■), 243 (Δ) e 729 (▲) µg/mL, em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

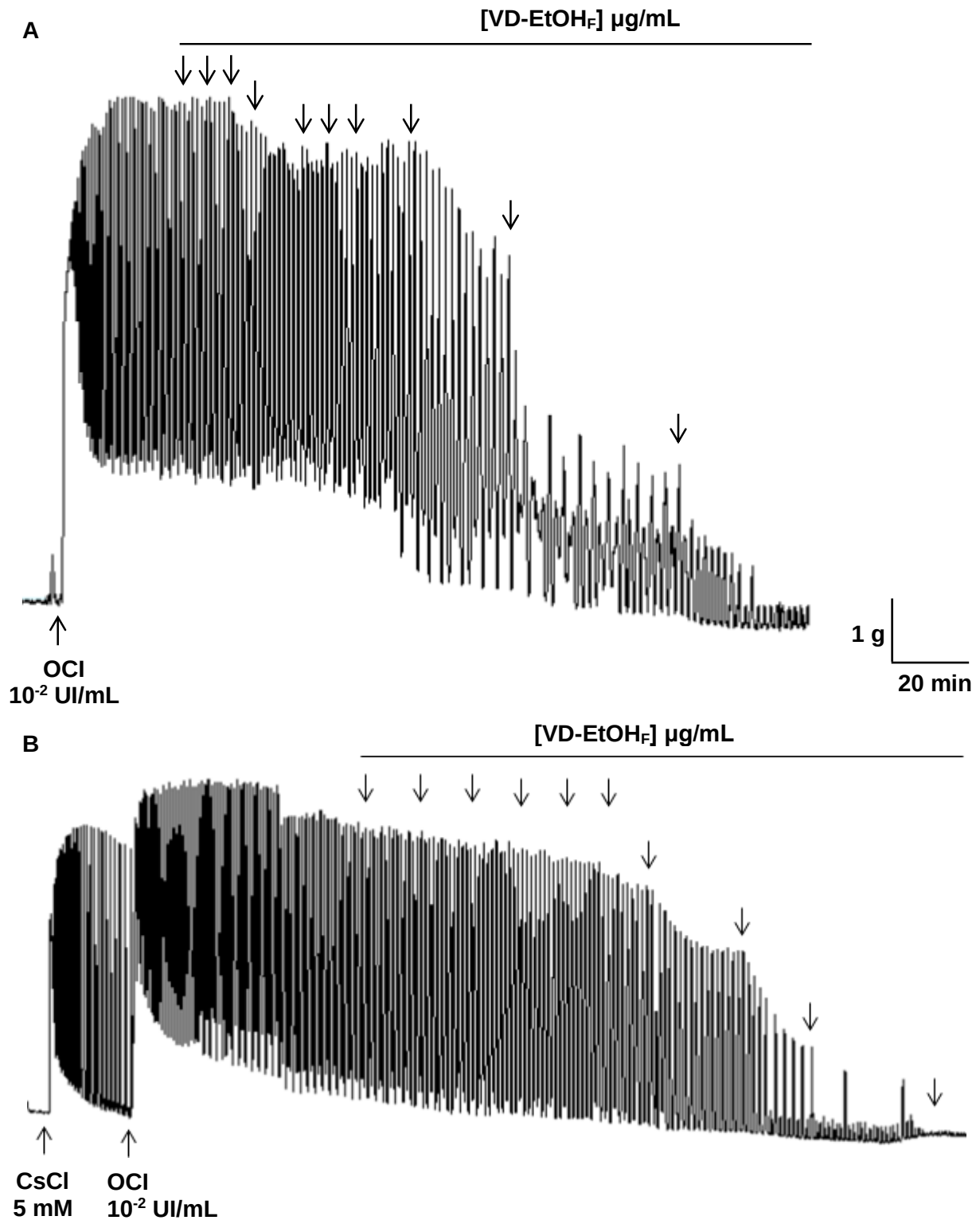
Fonte: Autor, 2020.

5.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.3.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) não foi deslocada na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ($E_{\max} = 105,3 \pm 2,2\%$ e $CE_{50} = 29,3 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$, n = 5) (Figura 12 e Gráfico 3).

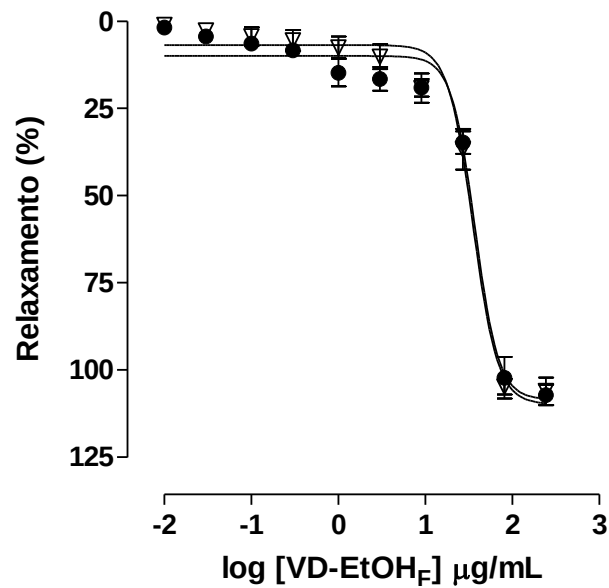
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL. OCI = ocitocina, CsCl = cloreto de cézio.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 3 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 5 mM de CsCl (▽) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

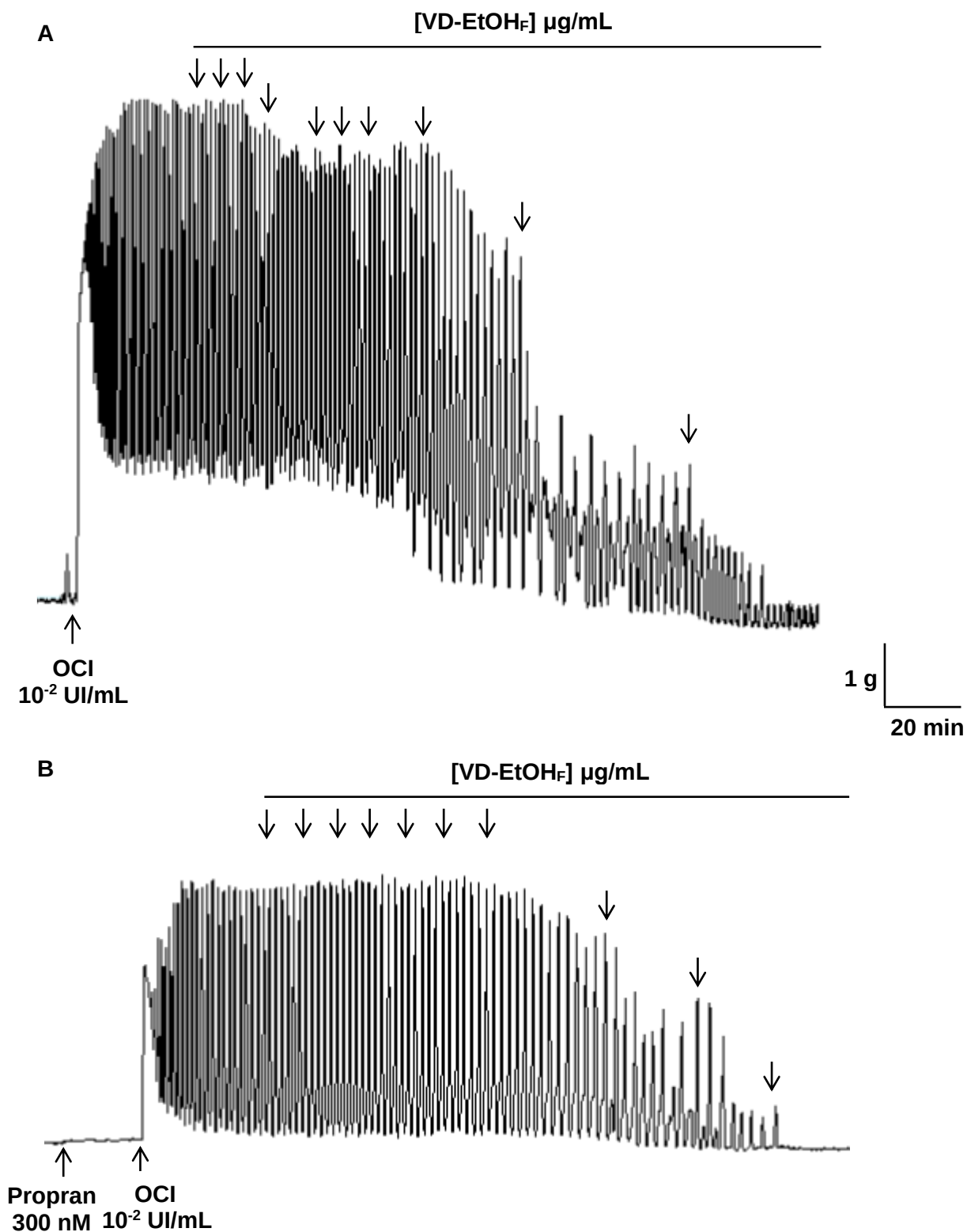
Fonte: Autor, 2020.

5.4 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.4.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7$ µg/mL) não foi deslocada na presença de 300 nM de (S)-(-)-propranolol ($E_{\max} = 112,0 \pm 3,5\%$ e $CE_{50} = 34,2 \pm 3,5$ µg/mL, n = 5), um antagonista dos receptores adrenérgicos- β (Figura 13 e Gráfico 4).

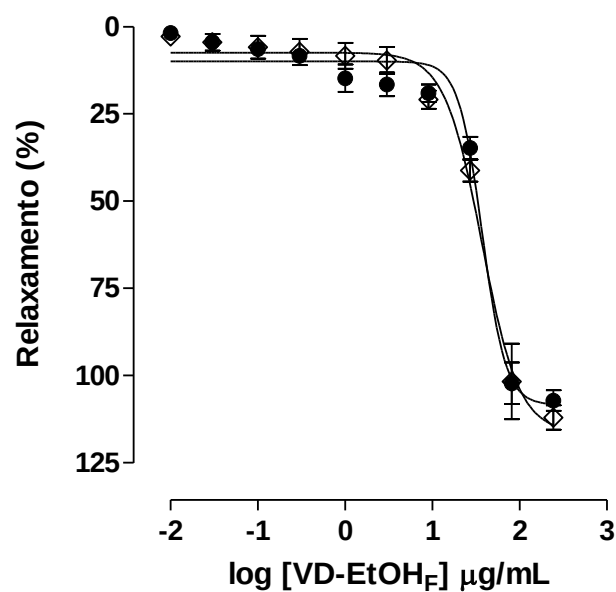
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 300 nM (S)-(-)-propranolol em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL. OCI = ocitocina, propran = (S)-(-)-propranolol.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 4 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 300 nM de (S)-(-)-propranolol (◇) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

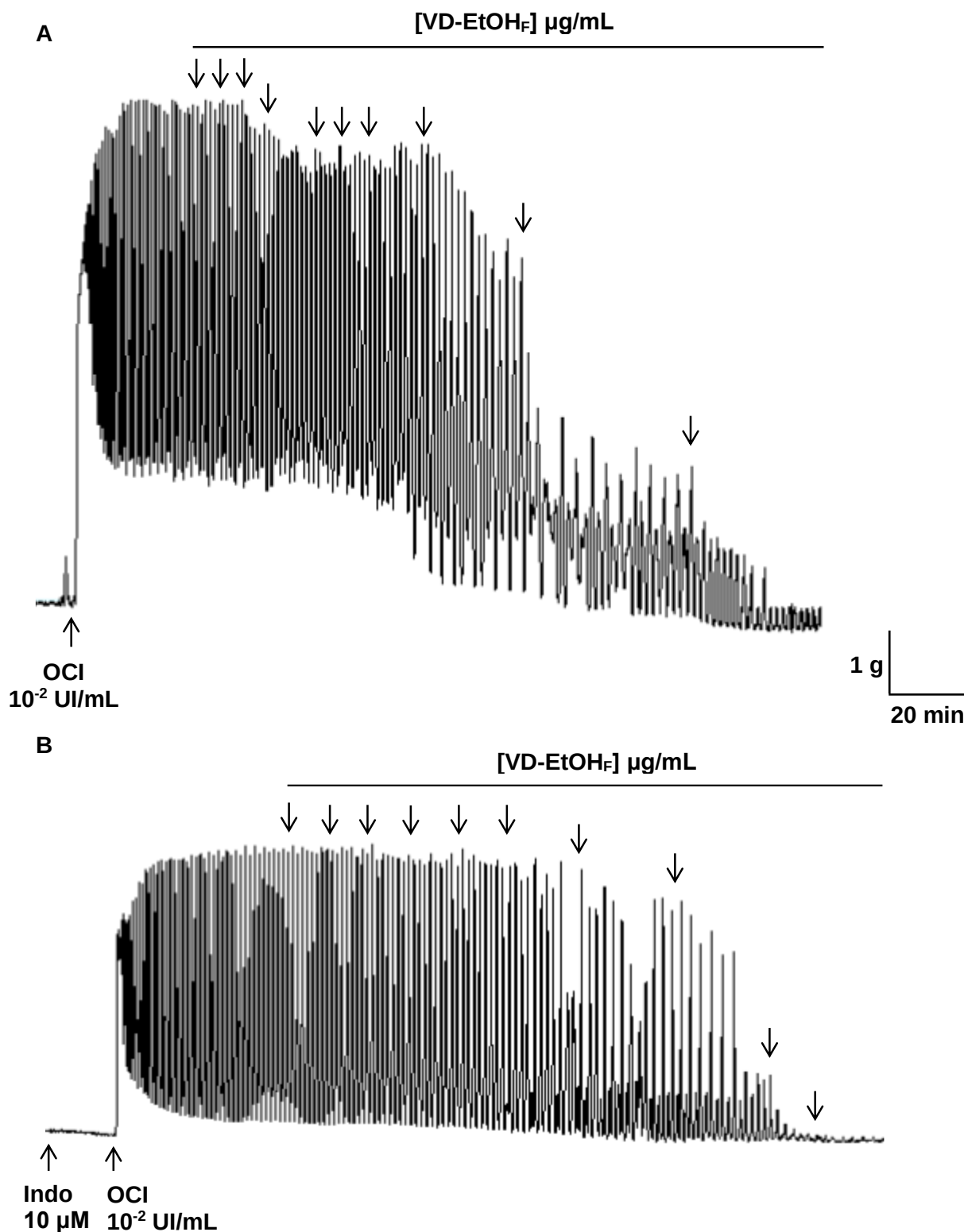
Fonte: Autor, 2020.

5.5 Avaliação do envolvimento da via das ciclo-oxigenases no efeito tocolítico promovido por VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.5.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) não foi deslocada na presença de 10 µM de indometacina, um inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases ($E_{\max} = 102,0 \pm 1,0\%$ e $CE_{50} = 25,4 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$, n = 5) (Figura 14 e Gráfico 5).

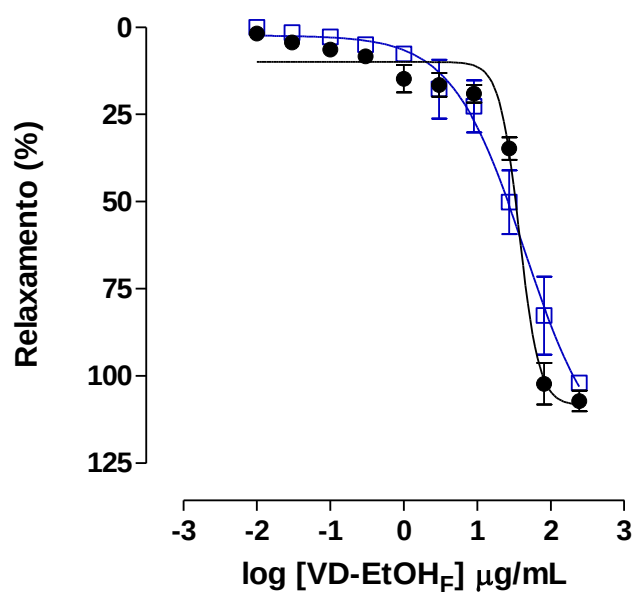
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 µM de indometacina em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL. OCI = ocitocina, Indo = indometacina.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10 µM de indometacina (□) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

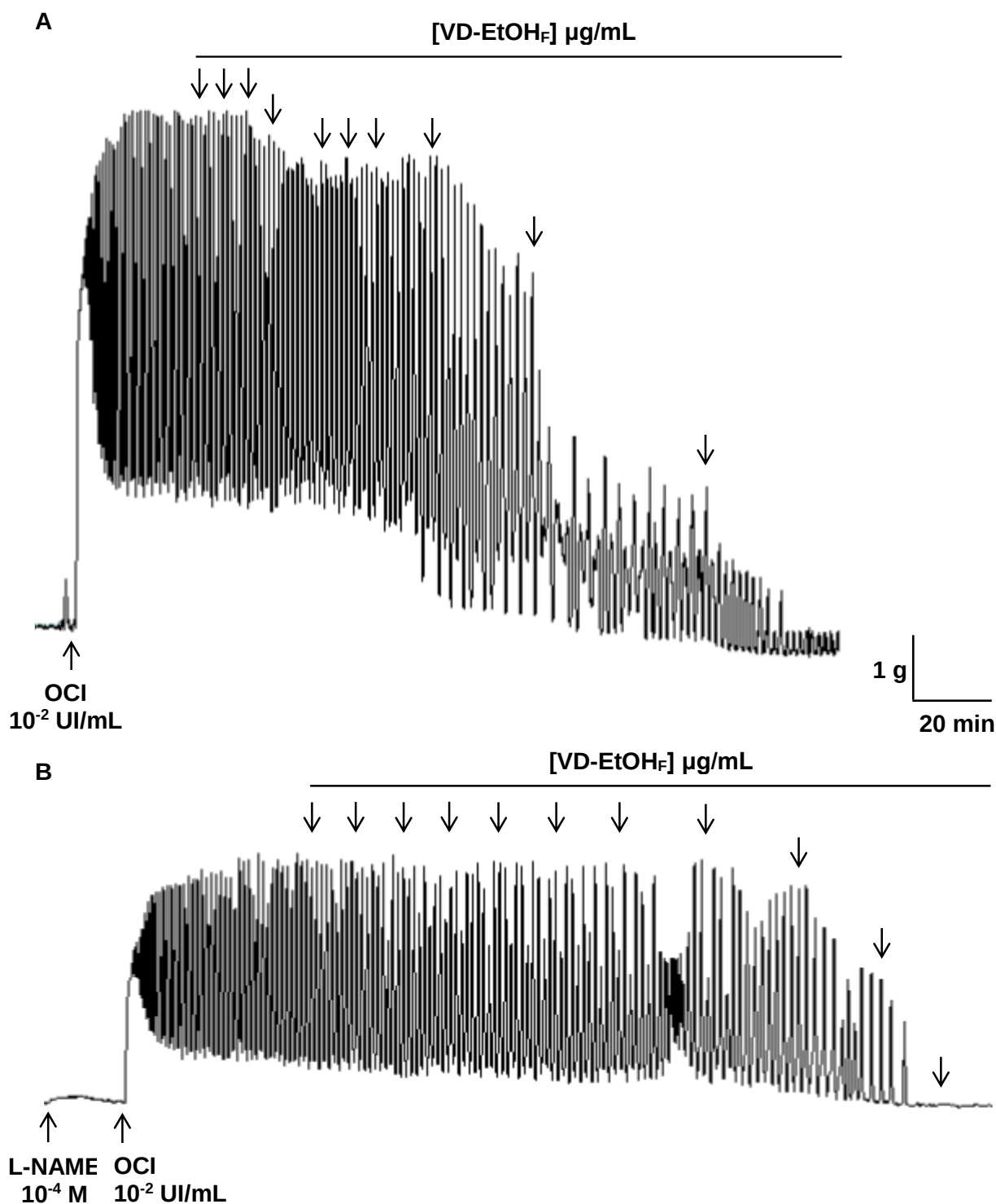
Fonte: Autor, 2020.

5.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico do VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.6.1 Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($CE_{50} = 33,1 \pm 0,7$ µg/mL) não foi deslocada na presença de 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS ($CE_{50} = 49,7 \pm 9,5$ µg/mL, n = 5). O E_{max} foi atingido na concentração de 243 e 729 µg/mL, na ausência ($E_{max} = 107,2 \pm 3,0\%$) e na presença ($E_{max} = 97,7 \pm 3,4\%$) do inibidor, respectivamente (Figura 15 e Gráfico 6).

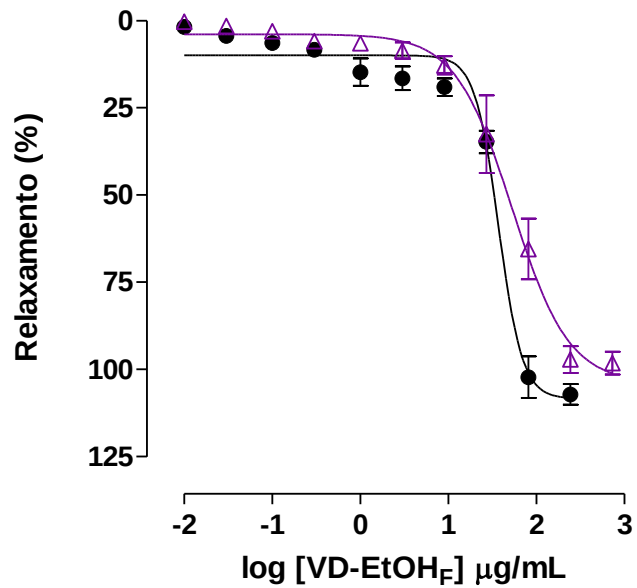
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença de 10⁻⁴ M de L-NAME (B) em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL (A), 0,01-729 µg/mL (B). OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 6 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10⁻⁴ M de L-NAME (△) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

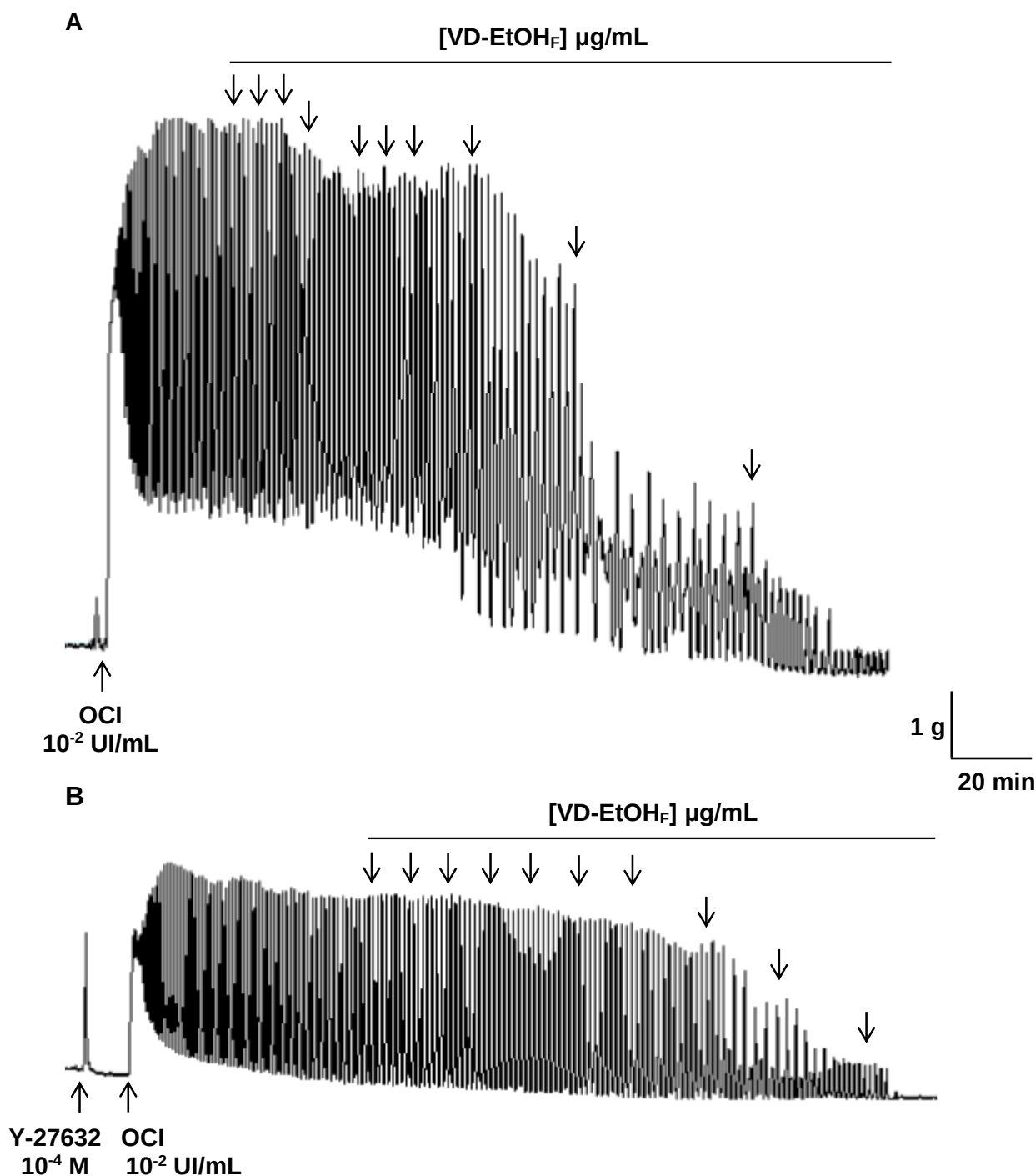
Fonte: Autor, 2020.

5.7 Avaliação da participação da via da RhoA/Rho cinase no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.7.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7$ µg/mL) foi deslocada para a esquerda na presença de 10^{-4} M de Y-27632, um inibidor de Rho cinase, com aumento da potência relaxante em 2,3 vezes ($CE_{50} = 14,5 \pm 2,7$ µg/mL), entretanto sem alteração de sua eficácia ($E_{\max} = 113,5 \pm 6,0\%$) (Figura 16 e Gráfico 7).

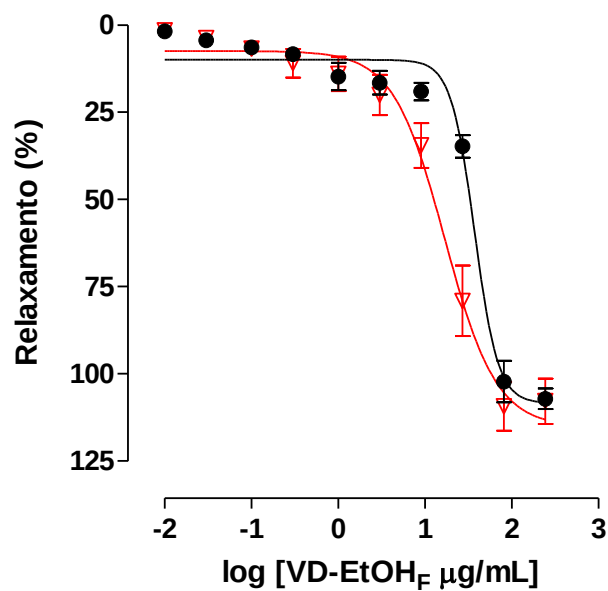
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10⁻⁴ M de Y-27632 em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL, OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 7 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10⁻⁴ M de Y-27632 (▽) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

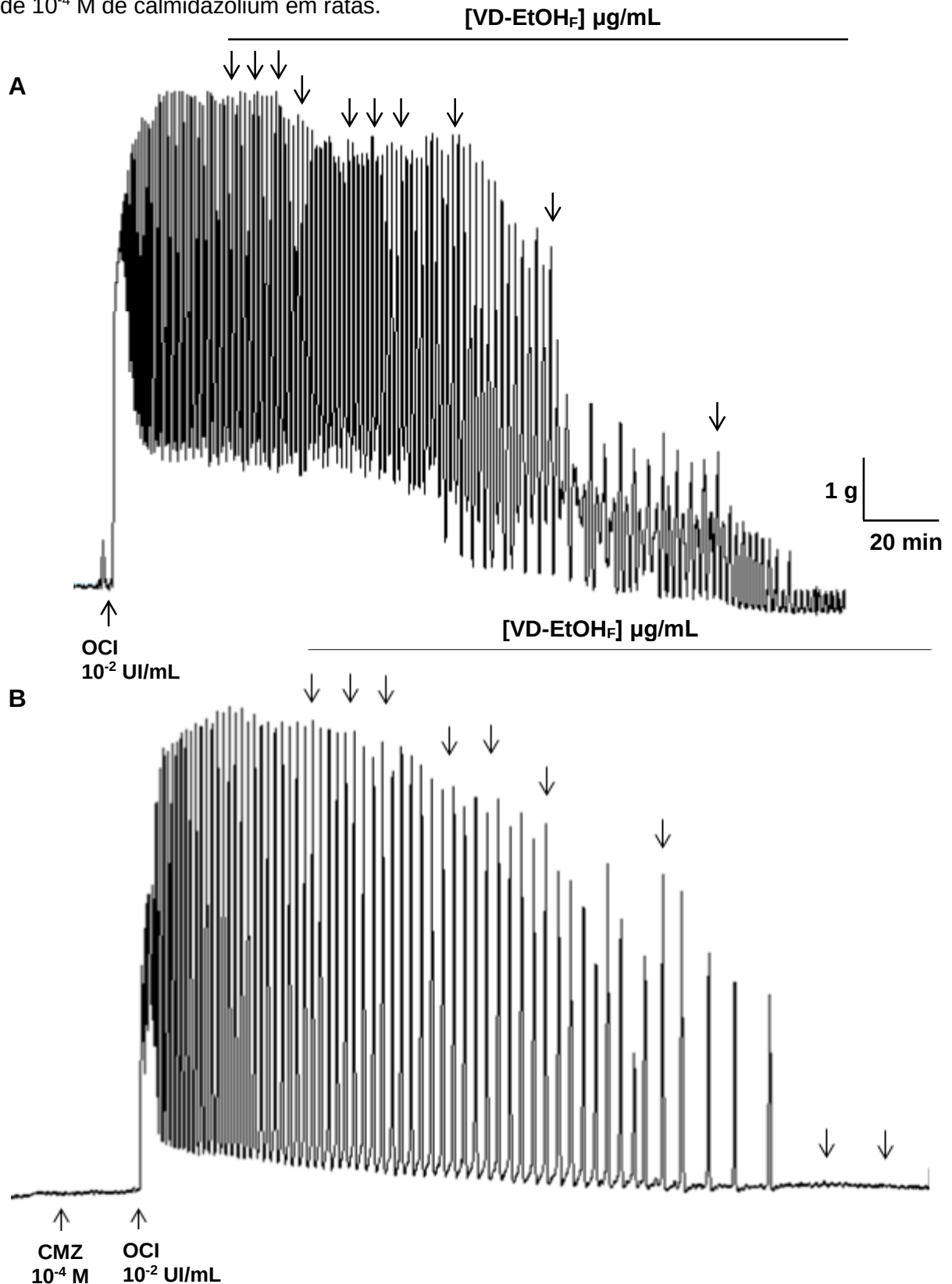
Fonte: Autor, 2020.

5.8 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido pelo VD-EtOH_F em útero isolado de rata

5.8.1 Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium

A curva controle de relaxamento (0,01-243 µg/mL, n = 5) do VD-EtOH_F ($E_{\max} = 107,2 \pm 3,0\%$ e $CE_{50} = 33,1 \pm 0,7$ µg/mL) foi deslocada para a esquerda na presença de 10^{-4} M de calmidazolium, um inibidor de calmodulina ($CE_{50} = 2,0 \pm 0,3$ µg/mL, n = 5), com aumento da potência relaxante em cerca de 17 vezes, entretanto sem alteração da eficácia ($E_{\max} = 110,8 \pm 4,8\%$), atingindo seu $E_{\max}$ na concentração de 81 µg/mL (Figura 17 e Gráfico 8).

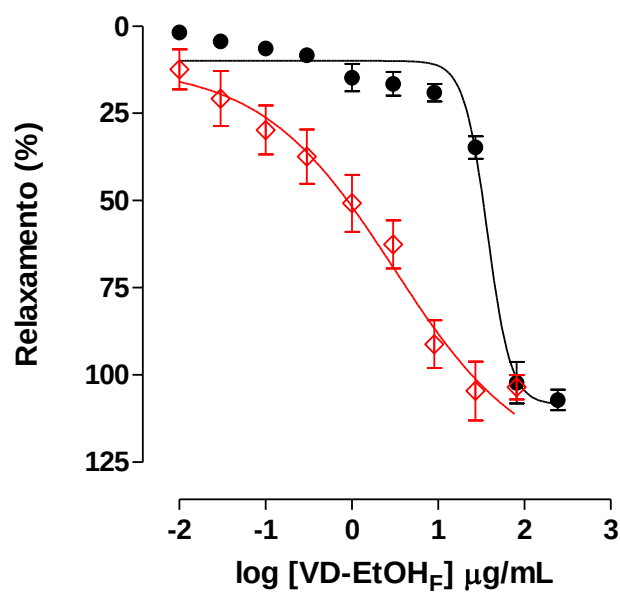
Figura 17 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10⁻⁴ M de calmidazolium em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 µg/mL (A), 0,01-81 µg/mL (B). OCI = ocitocina, CMZ = calmidazolium.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 8 – Efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 10⁻⁴ M de calmidazolium (◊) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2020.

5.9 Triagem farmacológica comportamental e avaliação da toxicidade aguda do VD-EtOH_F em camundongos fêmeas

Após a administração oral do VD-EtOH_F na dose de 2000 mg/kg, não foram observadas alterações comportamentais dos camundongos fêmeas (n = 6) nas condições experimentais avaliadas durante as 4 horas de observação.

Também foi evidenciado que durante o período de observação de 14 dias, não houve morte de animais. Com relação à evolução ponderal (Tabela 1), analisada no 1º dia antes do tratamento, no 7º e 14º dia após o tratamento, não houve alteração na massa corporal tanto nos animais do grupo controle negativo ($34,3 \pm 1,0$; $36,7 \pm 0,7$ e $37,3 \pm 1,0$ g) como nos animais tratados com o VD-EtOH_F ($32,0 \pm 1,3$; $34,2 \pm 1,5$ e $35,0 \pm 1,4$ g).

Semelhantemente, foi observado que não houve alteração na ingestão de água e o consumo de ração (Tabela 2) do grupo que recebeu o VD-EtOH_F na dose de 2000 mg/kg ($15,9 \pm 1,1$ mL e $14,9 \pm 1,2$ g, respectivamente), quando comparado ao grupo controle ($18,5 \pm 1,6$ mL e $14,4 \pm 1,4$ g, respectivamente).

O peso relativo de órgãos como o coração, pulmão, estômago, baço, rins e fígado também não mostraram diferença para os animais tratados com VD-EtOH_F quando comparados com o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 1 – Efeito do VD-EtOH_F (2000 mg/kg) na evolução ponderal dos camundongos fêmeas.

Grupo	Massa corporal (g)		
	Dia 0	Dia 7	Dia 14
Controle	34,3 ± 1,0	36,7 ± 0,7	37,3 ± 1,0
VD-EtOH_F	32,0 ± 1,3	34,2 ± 1,5	35,0 ± 1,4

Dados representados como média ± e.p.m. (n = 6). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 2 – Efeito do VD-EtOH_F (2000 mg/kg) no consumo de água e ração dos camundongos fêmeas.

Grupo	Consumo	
	Água (mL)	Ração (g)
Controle	18,5 ± 1,6	14,4 ± 1,4
VD-EtOH_F	15,9 ± 1,1	14,9 ± 1,2

Dados representados como média ± e.p.m. (n = 6). Teste *t*.

Fonte: Autor, 2020.

Tabela 3 – Efeito do VD-EtOH_F (2000 mg/kg) sobre o peso relativo de órgãos dos camundongos fêmeas.

	Peso relativo (g)	
	Controle	VD EtOH _F
Coração	0,005 ± 0,0003	0,005 ± 0,0004
Pulmão	0,008 ± 0,0008	0,007 ± 0,0003
Estômago	0,019 ± 0,003	0,018 ± 0,002
Baço	0,006 ± 0,0005	0,006 ± 0,0004
Rins	0,010 ± 0,0007	0,010 ± 0,0002
Fígado	0,050 ± 0,003	0,050 ± 0,003

Dados representados como média ± e.p.m. (n = 6). Teste *t*.

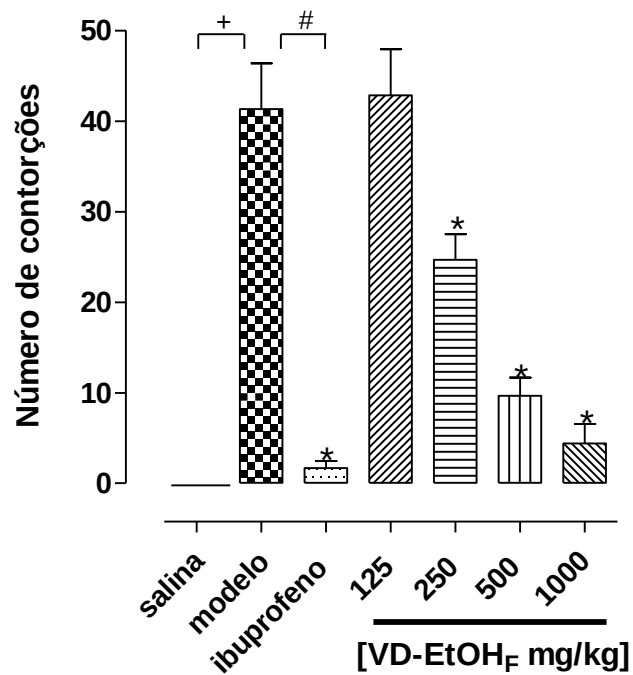
Fonte: Autor, 2020.

5.10 Avaliação do efeito tocolítico *in vivo* do VD-EtOH_F no modelo de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas

O grupo modelo, que recebeu uma injeção i.p. de ocitocina (50 UI/mL), apresentou um aumento das contorções abdominais (100%) em relação ao grupo controle negativo. Já o fármaco padrão, ibuprofeno, administrado por v.o. na dose de 50 mg/kg, inibiu as contorções apresentando $E_{\max} = 96,0 \pm 2,0\%$ em relação ao grupo modelo.

O VD-EtOH_F administrado por v.o. nas doses de 125; 250; 500 e 1000 mg/kg inibiu de maneira dependente de dose as contorções uterinas induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas, apresentando $E_{\max} = 80,2 \pm 10,1\%$ na dose de 1000 mg/kg e $DE_{50} = 105,5 \pm 14,8$ mg/kg (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Efeito do VD-EtOH_F sobre o número de contorções abdominais induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 6).
⁺p < 0,05 (salina vs modelo), [#]p < 0,05 (modelo vs ibuprofeno) e ^{*}p < 0,05 (modelo vs VD-EtOH_F).

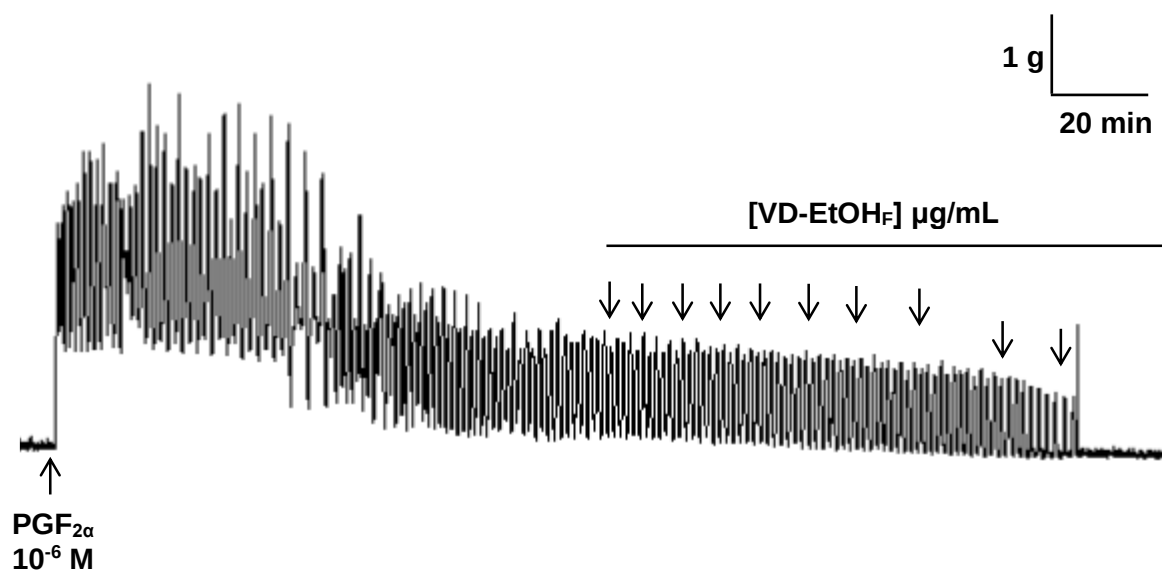
Fonte: Autor, 2020.

5.11 Efeito tocolítico *in vitro* do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por PGF_{2α} em útero isolado de rata

O VD-EtOH_F (0,01-243 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contraído com 10⁻⁶ M de PGF_{2α} (E_{max} = 100,4 ± 7,2% e CE₅₀ = 15,4 ± 3,5 µg/mL) (Figura 18 e Gráfico 10).

O tempo médio para que o VD-EtOH_F alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2 horas. A responsividade do útero à PGF_{2α} foi restaurada em até 2 horas após a retirada do VD-EtOH_F da cuba.

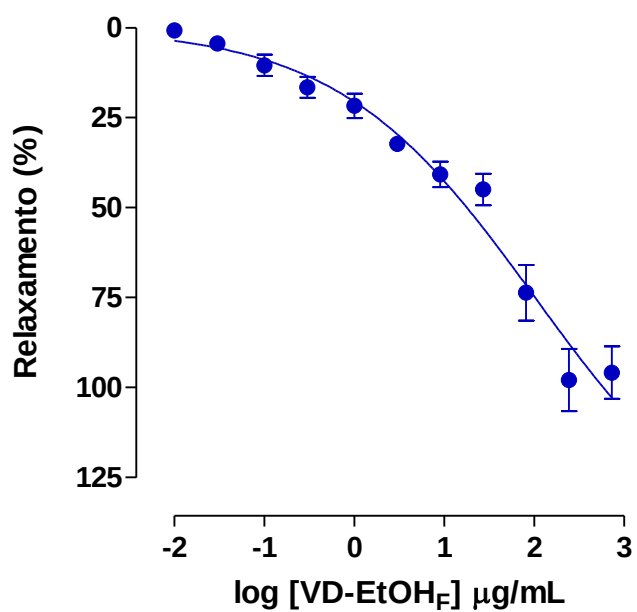
Figura 18 – Registro original representativo do efeito tocolítico do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻⁶ M de PGF_{2α} em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do VD-EtOH_F nas concentrações de 0,01-243 μg/mL. PGF_{2α} = prostaglandina F_{2α}.

Fonte: Autor, 2020.

Gráfico 10 – Efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻⁶ M de PGF_{2α} (●) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2020.

6 Discussão

Neste estudo, analisou-se o mecanismo de ação tocolítica do extrato etanólico obtido das folhas de *Varronia dardani* (VD-EtOH_F) em modelos experimentais *in vitro* em ratas e *in vivo* em camundongos fêmeas. Dessa forma, foi evidenciado que o VD-EtOH_F exerce seu efeito tocolítico *in vitro* através da inibição da via RhoA/ROCK e da calmodulina. Além disso, foi determinado que este extrato apresenta atividade anti-dismenorreica por inibir as contorções abdominais induzidas por ocitocina, em um modelo que simula a dismenorreia primária.

Baseado no critério taxonômico, uma vez que o extrato etanólico da espécie *Varronia globosa* já demonstrou atividade vasorrelaxante (JAMKHANDE et al., 2013) e espasmolítica em duodeno de coelho e íleo de cobaia (FENG et al., 1962), o metanólico de *Varronia spinescens* em íleo de cobaia (TORTORIELLO et al., 1995) e o etanólico de *Varronia brownei* apresentou atividade tocolítica em rata (FENG et al., 1964), foi realizada uma triagem farmacológica preliminar para avaliar o efeito espasmolítico do VD-EtOH_F em diversos modelos experimentais de músculos lisos tônicos e fásicos (VELOSO et al., 2020a).

Sendo assim, foi demonstrado que esse extrato apresenta atividade espasmolítica não seletiva em aorta e traqueia de rato, íleo de cobaia e útero de rata. Porém, o VD-EtOH_F apresentou uma maior potência espasmolítica por inibir as contrações fásicas induzidas por ocitocina e por carbacol (CCh) em útero de ratas, de maneira equipotente, sugerindo que, em nível funcional, o extrato não atua exercendo seu mecanismo tocolítico antagonizando os receptores farmacológicos, OT e M₃, respectivamente (VELOSO et al., 2020a). Então, surgiu o interesse em prosseguir o estudo do possível mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH_F.

Na constituição química de algumas espécies do gênero *Varronia*, em especial para a espécie *V. dardani*, destaca-se a presença de flavonoides, principalmente os que possuem a estrutura do tipo flavanonas (VELOSO et al., 2020a). Destas, a pinocembrina, a narigenina (ACHAR et al., 2000) e a sakuranetina (ROJAS et al., 1996) foram relatadas por possuírem atividade tocolítica em ratas. Além disso, a pinocembrina também já exibiu atividade antinociceptiva em um protocolo de contorções abdominais em camundongos (DÉCIGA-CAMPOS; MATA; RIVERO-CRUZ, 2017). Desta forma, podem ser estes metabólitos secundários, os responsáveis pela atividade tocolítica *in vitro* e *in vivo* apresentada pelo VD-EtOH_F.

O aumento da [Ca²⁺]_c, a formação do complexo 4Ca²⁺-CaM com consequente ativação da MLCK e a geração das pontes cruzadas, determinam os dois tipos de

contração do músculo liso, as contrações fásicas ou tônicas. Os mecanismos que induzem uma contração fásica, incluindo as que ocorrem no miométrio, resultam de um aumento transitório da $[Ca^{2+}]_c$, principalmente, advindo do retículo sarcoplasmático. Já durante a contração tônica, o pico inicial da $[Ca^{2+}]_c$ diminui, porém, mantém um nível inferior sustentado, predominantemente, pelo cálcio proveniente do meio extracelular, que entra na célula através dos Ca_v (SAVINEAU; MARTHAN, 1997; PHILLIPPE; SAUNDERS; BASA, 1997; BYTAUTIENE et al., 2003).

Como os mecanismos que induzem uma contração fásica são diferentes em relação aos que mantêm a contração tônica, e tendo em vista que o VD-EtOH_F apresentou atividade espasmolítica frente às contrações fásicas (VELOSO et al., 2020a), resolveu-se avaliar o efeito tocolítico *in vitro* deste extrato sobre o componente tônico de uma contração induzida tanto por um agente eletromecânico, o KCl, como por um agente de acoplamento eletro e farmacomecânico, a ocitocina (ARROWSMITH; WRAY, 2014; WRAY et al., 2015).

A ocitocina é um nonapeptídeo sintetizado pelos neurônios magnocelulares localizados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo e secretada para a circulação pelos terminais hipofisários e nervosos posteriores em resposta a vários estímulos (UVNÄS-MOBERG et al., 2019). Este hormônio também é sintetizado pelos tecidos periféricos, incluindo o útero, corpo lúteo e placenta (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

O mecanismo da ocitocina desempenha um papel fundamental no trabalho de parto, sendo este hormônio, um dos medicamentos mais utilizados em obstetrícia, que promove contrações uterinas para indução e aumento do trabalho de parto, além de ter um papel importante na ejeção do leite durante a lactação. A expressão do receptor de ocitocina (OT) no miométrio humano é fortemente regulada durante a gravidez e seus níveis demonstraram um pico no início do trabalho de parto e caem acentuadamente no período pós-parto, quando o útero se torna refrativo ao OT (TOM; ASSINDER, 2010; YULIA; JOHNSON, 2014).

Diante disso, foi observado que o VD-EtOH_F relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente o útero de rata pré-contraído tanto com KCl ($CE_{50} = 27,7 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$) quanto com ocitocina ($CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que o extrato pode exercer seu efeito tocolítico através de uma inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , uma vez que um dos passos comuns da sinalização

de ambos os agentes contráteis é a ativação destes canais (ARROWSMITH, 2020) (Gráfico 1).

Os Cav do tipo 1 e 2 foram identificados no miométrio uterino por estudos eletrofisiológicos, farmacológicos e moleculares (COLLINS et al., 2000). Eles são responsáveis pela maior parte da corrente de cálcio observada no miométrio humano, e são caracterizados como proteínas complexas compostas por cinco subunidades distintas (α_1 , α_2 , β , δ e γ) codificadas por múltiplos genes (GÁSPÁR; HAJAGOS-TÓTH, 2013). A família dos Cav inclui os Cav1 (também conhecido como tipo L), sensíveis à di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, que ainda se subdivide em Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4, sendo a corrente interna predominante no miométrio a do Cav1.2 (WRAY et al., 2015; BANCIU et al., 2018). Também já é descrito que o miométrio expressa Cav2 (LEE; AHN; LEE, 2009), entretanto, os Cav1 são os mais estudados e os que possuem função mais importante no influxo de cálcio, favorecendo o processo de contração uterina (WRAY et al., 2015).

Dessa forma, foram construídas curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} , na ausência e na presença de diferentes concentrações do VD-EtOH_F. O fundamento deste método tem como base que a adição do KCl na preparação aumenta o número de Cav ativados e, como consequência, maior influxo de Ca^{2+} devido a uma relação entre a despolarização gerada, a condutância iônica e a amplitude de contração. Dessa forma, como todo o Ca^{2+} foi retirado do meio (nominalmente), a contração ocorre quase que exclusivamente pelo influxo Ca^{2+} , através dos Cav, proveniente do meio extracelular com a adição do CaCl_2 (REMBOLD, 1996; REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

O VD-EtOH_F desviou a curva controle do CaCl_2 ($\text{CE}_{50} = 4,7 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ M) de forma paralela com redução do efeito máximo, nas concentrações de 243 ($\text{E}_{\text{max}} = 81,4 \pm 3,0\%$) e 729 ($\text{E}_{\text{max}} = 40,9 \pm 7,3\%$), e da potência espasmogênica apenas nesta última concentração ($\text{CE}_{50} = 7,9 \pm 1,8 \times 10^{-3}$ M) indicando que provavelmente o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Cav não seja o principal mecanismo tocolítico do extrato (Gráfico 2). Já isolado do VD-EtOH_F, o flavonoide sakuranetina (VELOSO et al., 2020a) também apresentou seu efeito tocolítico por inibir as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante, sugerindo que este pode ser o responsável pelo efeito tocolítico desse extrato (ROJAS et al., 1996).

Sabendo que substâncias ativadoras de canais de K^+ relaxam a musculatura lisa, uma vez que ocasionam uma hiperpolarização da membrana pelo aumento do efluxo deste íon, e consequente bloqueio indireto dos Ca_v (QUAST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992), decidiu-se investigar a participação desses canais no mecanismo de ação relaxante do VD-EtOH_F.

A principal corrente de efluxo que flui através da membrana plasmática do miométrio é através dos canais de K^+ , dos quais uma ampla faixa está presente, incluindo os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v), canais de K^+ ativados pelo cálcio de grande (BK_{Ca}) e pequena (SK_{Ca}) condutância e os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}). Esses canais mantêm o potencial de repouso e são responsáveis pela repolarização da membrana e, assim, diminuem a probabilidade de abertura dos Ca_v . Dessa forma, a ativação dos canais de K^+ é geralmente associada à quiescência uterina e como tal, eles podem formar alvos para tocolíse (WRAY et al., 2015; WRAY; PRENDERGAST, 2019).

Com base nisto, avaliou-se o efeito do VD-EtOH_F sobre as contrações induzidas por ocitocina na presença de CsCl, um bloqueador não seletivo de canais de K^+ (LATORRE et al., 1989), e foi observado que a curva controle do relaxamento do VD-EtOH_F ($CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu g/mL$) não foi deslocada na presença deste bloqueador ($CE_{50} = 29,3 \pm 2,7 \mu g/mL$), sugerindo que o VD-EtOH_F não exerce seu mecanismo de ação tocolítica por uma modulação positiva dos canais de K^+ (Gráfico 3).

É relatado que o aumento nos níveis de cAMP ativam a PKA, que por sua vez, fosforila muitos tipos de substratos que culminam na redução da $[Ca^{2+}]_c$ e, finalmente, redução da interação entre os filamentos de actina e miosina, levando ao relaxamento do músculo liso (BERNAL, 2007). Essa via de sinalização pode ser desencadeada através da ativação de receptores adrenérgicos- β , e destes, os subtipos β_2 e β_3 foram implicados no relaxamento do miométrio, porém o subtipo β_2 é considerado o mais predominante na musculatura uterina (LIU; NWOSU; RICE, 1998; BARDOU et al., 2000; ROUGET et al., 2005; CLOUSE et al., 2007).

Durante a gravidez, a transdução adrenérgica- β é aumentada pela progesterona, que predomina durante esse período. A progesterona regula diferentes componentes dessa via, aumentando a transcrição e expressão dos receptores adrenérgicos- β_2 (VIVAT et al., 1992) e regulando positivamente a proteína G_{as} (ELWARDY-MÉRÉZAK et al., 1994), resultando em um maior

acoplamento e ativação desses receptores e seu efector, a ciclase de adenilil (COHEN-TANNOUDJI et al., 1991). Com base nisso, os agonistas adrenérgicos- β , como a ritodrina e a terbutalina, são utilizados como agentes tocolíticos, para prevenir ou inibir o trabalho de parto prematuro (HANLEY et al., 2019).

À vista disso, foi observado que não houve diferença na potência relaxante do VD-EtOH_F na ausência ($CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) e na presença ($CE_{50} = 34,2 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$) de um antagonista de receptores adrenérgicos- β , o (S)-(-)-propranolol, que apresenta uma maior seletividade pelo subtipo β_2 em relação aos demais receptores adrenérgicos- β (BAKER, 2005), sugerindo que o extrato não modula positivamente estes receptores para promover seu efeito tocolítico (Gráfico 4).

As prostaglandinas, mediadores lipídicos inflamatórios formados a partir do metabolismo do AA por ação das COXs, também desempenham funções importantes na contratilidade miometrial, exercendo um papel central no início e na manutenção do trabalho de parto (BAKKER et al., 2017). As duas prostaglandinas mais envolvidas nas contrações uterinas incluem a PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, que atuam em seus receptores EP_1 ou EP_3 e FP, respectivamente, acoplados à proteína $G_{q/11}$ (BLESSON; SAHLIN, 2014; SMITH, 2018). A inibição da formação destes mediadores através da ação dos AINEs, como a indometacina, que atuam pela inibição não seletiva das enzimas COXs, ocasionam o relaxamento da musculatura lisa uterina (HAMMERS; SANCHEZ-RAMOS; KAUNITZ, 2015).

Isto posto, com base nos resultados obtidos, foi descartada a participação da via das COXs no mecanismo de ação tocolítica do VD-EtOH_F (Gráfico 5), uma vez que a curva controle de relaxamento do extrato ($CE_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) não foi deslocada na presença da indometacina ($CE_{50} = 25,4 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que o extrato não reduz a formação de prostaglandinas contráteis através da modulação negativa das COXs para exercer seu efeito relaxante.

Outra via que pode levar ao relaxamento do músculo liso uterino é a do óxido nítrico. Este é sintetizado por um processo de oxidação de aminoácidos catalizado pela sintase do NO (NOS) (MODZELEWSKA et al., 2019). Os efeitos do NO são mediados pela ativação da sCG e subsequente produção de cGMP, resultando no relaxamento do músculo liso (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). A existência dessa via de sinalização já foi demonstrada no útero de ratas (IZUMI;

YALLAMPALLI; GARFIELD, 1993; YALLAMPALLI et al., 1994) e de humanos (BUHIMSCHI et al., 1995).

O NO é regulado positivamente durante a gravidez, inibindo a contratilidade uterina e mantendo a quiescência nesta fase (CONRAD et al., 1993; IZUMI; YALLAMPALLI; GARFIELD, 1993; YALLAMPALLI et al., 1994). O NO também auxilia na implantação do embrião e na prevenção de distúrbios ginecológicos como a dismenorreia (NORMAN, 1996). Sendo assim, substâncias que modulem positivamente a via do NO-sCG-cGMP, poderiam contribuir para a manutenção da quiescência uterina.

Na investigação da participação da via do NO no efeito tocolítico do VD-EtOH_F, foi observado que a curva controle de relaxamento do extrato (CE₅₀ = 33,1 ± 0,7 µg/mL) não foi deslocada na presença de L-NAME (CE₅₀ = 49,7 ± 9,5 µg/mL), um inibidor competitivo não seletivo da NOS (MUNGLUE et al., 2012). Uma vez que não houve redução da potência relaxante do extrato na presença do inibidor, descartou-se a hipótese de modulação positiva da NOS no mecanismo tocolítico do VD-EtOH_F (Gráfico 6).

Como descrito anteriormente, a contração nos tecidos musculares lisos é regulada por duas enzimas principais: a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), dependente de cálcio-calmodulina, que fosforila a cadeia leve da miosina (MLC) para gerar a contração; e uma proteína trimérica, a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que induz um estado de relaxamento através da desfosforilação da MLC (SOMLYO; SOMLYO, 2003; WORD, 1995).

Portanto, a fosforilação da MLC e a força de contração no útero humano durante o trabalho de parto é determinada pelo equilíbrio entre a MLCK e MLCP (LARTEY; BERNAL, 2009). Sabe-se que a ativação de RhoA e sua cinase associada (ROCK) desempenha um papel fundamental na regulação da contração do músculo liso através da modulação negativa da MLCP e positiva da MLC, mesmo com baixos níveis da [Ca²⁺]_c, num mecanismo conhecido como “sensibilização ao Ca²⁺” (WETTSCHURECK; OFFERMANN, 2002).

Foi demonstrado que os níveis de expressão de ROCK são significativamente altos no útero de ratas não grávidas, mas que diminuem no estágio inicial da gravidez e aumentam acentuadamente no início do trabalho de parto (DOMOKOS et al., 2017). Além disso, estudos demonstraram que quanto maior a expressão gênica e protéica de ROCK1, ROCK2 e RhoA, maior o grau de severidade da dismenorreia

(WANG et al., 2013; JIANG et al., 2018). Dessa forma, a inibição desta via para ocasionar o relaxamento uterino pode ser um alvo possível para uma terapia tocolítica.

Alguns autores já relataram que o Y-27632, um inibidor específico e não seletivo da família ROCK (ROCK I e II), que exerce essa atividade competindo com o ATP pela ligação no sítio catalítico da ROCK (TAHARA et al., 2002; ISHIZAKI et al., 2000), inibe a contração induzida por KCl ou por ocitocina sem afetar a mobilização intracelular de Ca^{2+} induzida por estes agentes contráteis nas células miométriais. Esses resultados sugerem que a atenuação da via RhoA/Rho-cinase pode levar à inibição da contração miométrial, principalmente pela redução do mecanismo de “sensibilização ao Ca^{2+} ” do aparelho contrátil (KUPITTAYANANT; BURDYGA; WRAY, 2001; TAHARA et al., 2002; WOODCOCK; TAYLOR; THORNTON, 2004).

Baseado nisto, foi avaliado se o VD-EtOH_F estaria inibindo a via da RhoA/ROCK para exercer seu efeito tocolítico. Os resultados demonstraram que a curva controle de relaxamento do extrato ($\text{CE}_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) foi deslocada para esquerda na presença do Y-27632 ($\text{CE}_{50} = 14,5 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$), com aumento na potência tocolítica em 2,3 vezes, sugerindo que o VD-EtOH_F modula negativamente a via RhoA/ROCK no seu mecanismo tocolítico (Gráfico 7). Isso também pode ser justificado pelo fato de que o VD-EtOH_F se mostrou mais potente em relaxar o útero de rata pré-contraído com ocitocina em relação à inibição da contração fásica induzida por ocitocina (VELOSO et al., 2020a), uma vez que a via da RhoA/ROCK está envolvida na manutenção do componente tônico da contração do músculo liso uterino (SOMLYO; SOMLYO, 1998; WOODCOCK; TAYLOR; THORNTON, 2004).

Apesar da via RhoA/ROCK ser considerada como um mecanismo independente de Ca^{2+} (TAHARA et al., 2002), um estudo demonstrou que a ativação dessas proteínas induzida por agentes contráteis em células musculares lisas da aorta de coelho, também pode ser dependente de Ca^{2+} , uma vez que a redução dos níveis da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induzida pela remoção extracelular ou pela inibição do influxo deste íon através de um bloqueador de Cav, gerou uma diminuição tanto na força de contração, como também nos níveis de ativação da RhoA, demonstrado pela expressão da RhoA ligada ao GTP por *Western blotting* (SAKURADA et al., 2003).

Além disso, nesse estudo também foi evidenciado um possível envolvimento da calmodulina na ativação da RhoA, visto que a expressão da forma ativada desta

proteína foi reduzida na presença de um inibidor da CaM (SAKURADA et al., 2003). Diante desta premissa, levantou-se a hipótese de que o VD-EtOH_F poderia exercer seu mecanismo tocolítico por uma inibição da calmodulina.

Estruturalmente, a calmodulina consiste em dois domínios globulares que ligam um total de 4 íons Ca^{2+} por molécula. Esta ligação gera alterações conformacionais que expõem resíduos hidrofóbicos usados para interagir com uma ampla gama de proteínas celulares, desempenhando um papel fundamental na sinalização do Ca^{2+} e contração da musculatura lisa (CHIN; MEANS, 2000; MEANS, 2000; TIDOW; NISSEN, 2013). O estudo realizado por Poyser (1985) fornece evidências de que a calmodulina também está envolvida nos processos bioquímicos que levam ao aumento na secreção de prostaglandinas contráteis no útero da cobaia, em resposta ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, uma vez que o complexo Ca^{2+} -CaM ativa a PLA_2 e, assim, promove a liberação do ácido araquidônico (LEAVER; POYSER, 1981; NING; POYSER, 1984).

Além de modificar diretamente a função de muitas proteínas, como a MLCK (BURSZTYN et al., 2007), a CaM também pode ativar outras cinases dependentes de Ca^{2+} -CaM, como a CaMKII, uma serina-treonina cinase. Esta é uma grande holoenzima composta por 12 a 14 subunidades individuais de proteína cinase (BHATTACHARYYA et al., 2016), que nos mamíferos, é descrita possuindo as subunidades α , β , δ e γ , sendo as duas últimas as mais expressas em células musculares lisas (ZHOU; IKEBE, 1994; SADDOK; GINNAN; SINGER, 2017).

Na presença de Ca^{2+} , uma molécula de CaM pode se ligar a cada monômero de CaMKII no domínio regulador, ocasionando alterações conformacionais que liberam um domínio autoinibitório adjacente expondo a fenda catalítica. Uma vez que a CaM está ligada à CaMKII, esta cinase pode autofosforilar um domínio vizinho e, assim, remover a dependência da ligação à CaM, mantendo sua atividade mesmo após a dissociação do complexo Ca^{2+} -CaM (SCHWORER et al., 1988; CHAO et al., 2011; JOHNSON et al., 2019).

Com base nisso, observou-se um aumento da potência relaxante do VD-EtOH_F em torno de 17 vezes na presença do calmidazolium ($\text{CE}_{50} = 2,0 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$), um inibidor de calmodulina (FERNANDEZ; CANTABRANA; HIDALGO, 1992; JOVANOVIĆ; GRBOVIĆ; TULIĆ; 1994), quando comparado com a curva controle de relaxamento do extrato ($\text{CE}_{50} = 33,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$). Portanto, sugere-se que o VD-EtOH_F pode exercer seu mecanismo tocolítico por modular

negativamente a calmodulina (Gráfico 8). Uma vez que foi demonstrado que o VD-EtOH_F não modula negativamente a via das ciclo-oxigenases, pode-se sugerir que a inibição da calmodulina culmine na redução da ativação da PLA₂ e, assim, na redução da liberação do AA e formação dos prostanoídes contráteis.

O estudo realizado por Sakurada et al. (2003), que demonstrou uma ativação de RhoA/ROCK dependente de Ca²⁺, também determinou que um inibidor específico de CamKII reduziu a contração e a expressão da RhoA-GTP promovida pelo KCl, sugerindo assim que o acoplamento Ca²⁺-CaM ativa a CaMKII, que por sua vez, ativa a ROCK.

Dessa forma, visto que a potência relaxante do VD-EtOH_F foi aproximadamente 17 vezes maior frente ao inibidor de calmodulina (CE₅₀ = 2,0 ± 0,3 µg/mL), quando comparado ao inibidor da ROCK (CE₅₀ = 14,5 ± 2,7 µg/mL), sugere-se que, provavelmente, o VD-EtOH_F exerce seu mecanismo tocolítico *in vitro* em ratas, majoritariamente, pela ação inibitória na calmodulina e por modular negativamente a via da RhoA/ROCK de maneira indireta.

A espécie *Varronia dardani* não possui relatos de uso popular, porém, para as espécies *V. globosa* e *V. leucocephala*, há relatos de que o infuso das folhas é utilizado no tratamento da dismenorreia (AGRA, 1996; ABRANTES; AGRA, 2004; OZA; KULKARNI, 2017). De acordo com isso, após ser demonstrado o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F, levantou-se a hipótese de que esse extrato poderia inibir as contrações uterinas *in vivo*, em um modelo que mimetiza a dismenorreia primária em camundongos fêmeas.

Inicialmente, com o intuito de fornecer segurança na utilização do extrato no protocolo *in vivo* de indução da dismenorreia primária, realizou-se a avaliação da toxicidade aguda oral do VD-EtOH_F em camundongos fêmeas. Os ensaios de toxicidade pré-clínica aguda são utilizados para avaliar o potencial de toxicidade ou letalidade produzido por um produto-teste quando este é administrado em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, com observação dos animais por 14 dias após a sua administração (ANVISA, 2013).

Para que os resultados sejam considerados pelas agências regulatórias dos países, é essencial que estes testes sejam conduzidos seguindo protocolos internacionalmente aceitos. Para isso, podem ser utilizados métodos alternativos para a estimativa da DL₅₀, como os preconizados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-*

operation and Development-OECD), uma vez que estes são sugeridos pelo Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica essencial para o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

No presente estudo, seguiu-se o Guia nº 423 da OECD (OECD, 2001), que apresenta boa reprodutibilidade, utilizam poucos animais, atende aos requisitos da experimentação e aos princípios do bem estar animal, e é capaz de classificar a toxicidade e estimar a DL_{50} da substância de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (*Globally Harmonised System - GHS*). Sendo assim, a toxicidade oral aguda foi avaliada conforme o Guia OECD-423 (OECD, 2001), que determina as doses a serem utilizadas no estudo (5, 50, 300 ou 2000 mg/kg) e o número de animais por dose, sendo três camundongos fêmeas (Anexo 3).

A dose inicial selecionada para o estudo foi de 2000 mg/kg v.o. ($n = 3$), já que ainda não havia nenhum relato de toxicidade para o extrato. Dessa forma, durante as primeiras 4 horas do teste, diversos parâmetros comportamentais foram avaliados (Anexo 2), entretanto, não foi observada nenhuma alteração, descartando algum efeito tóxico do VD-EtOH_F sobre o Sistema Nervoso Central e Autônomo. No decorrer dos 14 dias de observação, não houve morte de nenhum animal, e como preconizado no Guia 423/2001 da OECD, o método foi repetido ($n = 3$) e, mais uma vez, não foi observado sinais comportamentais de toxicidade ou morte dos animais tratados, estimando assim uma DL_{50} igual ou superior a 5000 mg/kg, sendo enquadrada na categoria 5 da GHS (Anexo 3), sugerindo uma baixa toxicidade aguda oral do extrato.

A evolução ponderal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal. Esses efeitos podem se manifestar também através da alteração nos consumos hídrico e alimentar, na alteração comportamental ou na alteração da massa relativa dos órgãos (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Ao analisar o peso dos animais no dia zero antes do tratamento, no 7º e 14º dia após o tratamento (Tabela 1), não foi observada alteração ponderal tanto nos animais controle negativo, como nos animais tratados com o VD-EtOH_F na dose de 2000 mg/kg. A ingestão de água e de ração foi avaliada diariamente durante o tratamento agudo com o extrato (Tabela 2), e não foi observado nenhuma alteração no consumo. O peso de órgãos como o coração, pulmão, estômago, baço, rins e

fígado também não mostraram diferença para animais tratados com VD-EtOH_F em relação aos animais controle (Tabela 3). Com isso, estes resultados fornecem segurança na utilização do extrato no próximo protocolo experimental *in vivo* desenvolvido neste trabalho.

Estudos de toxicidade aguda oral também já foram realizados para outra espécie, a *Varronia globosa*, onde foi determinado que a administração do extrato etanólico do caule e das folhas desta espécie na dose de 2000 mg/kg, em camundongos machos e fêmeas, não provocou sinais de alterações comportamentais ou mortes. No entanto, promoveu aumento no consumo de água e ração, além de ter induzido alterações discretas nos pesos relativos do coração e rins quando comparados com o grupo controle, porém, sugerindo ainda uma baixa toxicidade aguda oral (REIS, 2014; DANTAS, 2015).

Substâncias capazes de exercer uma ação tocolítica são promissoras para o tratamento de distúrbios uterinos associados à desregulação da contração do músculo liso, como a dismenorreia primária, que é caracterizada por contrações uterinas dolorosas e representa uma das causas mais comuns de dor pélvica, gerando um impacto negativo na qualidade de vida de mulheres jovens (BERNARDINI et al., 2017; LI et al., 2019).

O modelo de contrações uterinas *in vivo* induzidas por ocitocina em camundongos fêmeas tratados com estrogênio é reconhecido como um protocolo experimental frequentemente usado no estudo da dismenorreia primária (HUA et al., 2008; JESUÍNO et al., 2019; LI et al., 2019). O prévio tratamento com o hormônio é realizado com a finalidade de aumentar o número de receptores de ocitocina (OT) e assim, exacerbar a resposta a esse agente contrátil. Como a dor abdominal aguda intensa é o principal sintoma clínico da dismenorreia, a resposta da contração é considerada o principal indicador e o número destas contrações abdominais é utilizado para avaliar o modelo experimental e os efeitos do produto-teste (YANG et al., 2015).

Sendo assim, após o tratamento com o dietilestilbestrol (i.p.) por três dias consecutivos, os camundongos fêmeas receberam diferentes doses do VD-EtOH_F (v.o.) no quarto dia, seguido da indução das contrações abdominais com a ocitocina (i.p.). Dessa forma, foi avaliado o número de contrações por um período de 30 minutos, e observado que o extrato inibiu estas contrações apresentando efeito máximo na dose de 1000 mg/kg ($E_{\max} = 80,2 \pm 10,1\%$ e $DE_{50} = 105,5 \pm 14,8$ mg/kg),

sugerindo que o VD-EtOH_F apresenta atividade tocolítica *in vivo* em camundongos fêmeas (Gráfico 9).

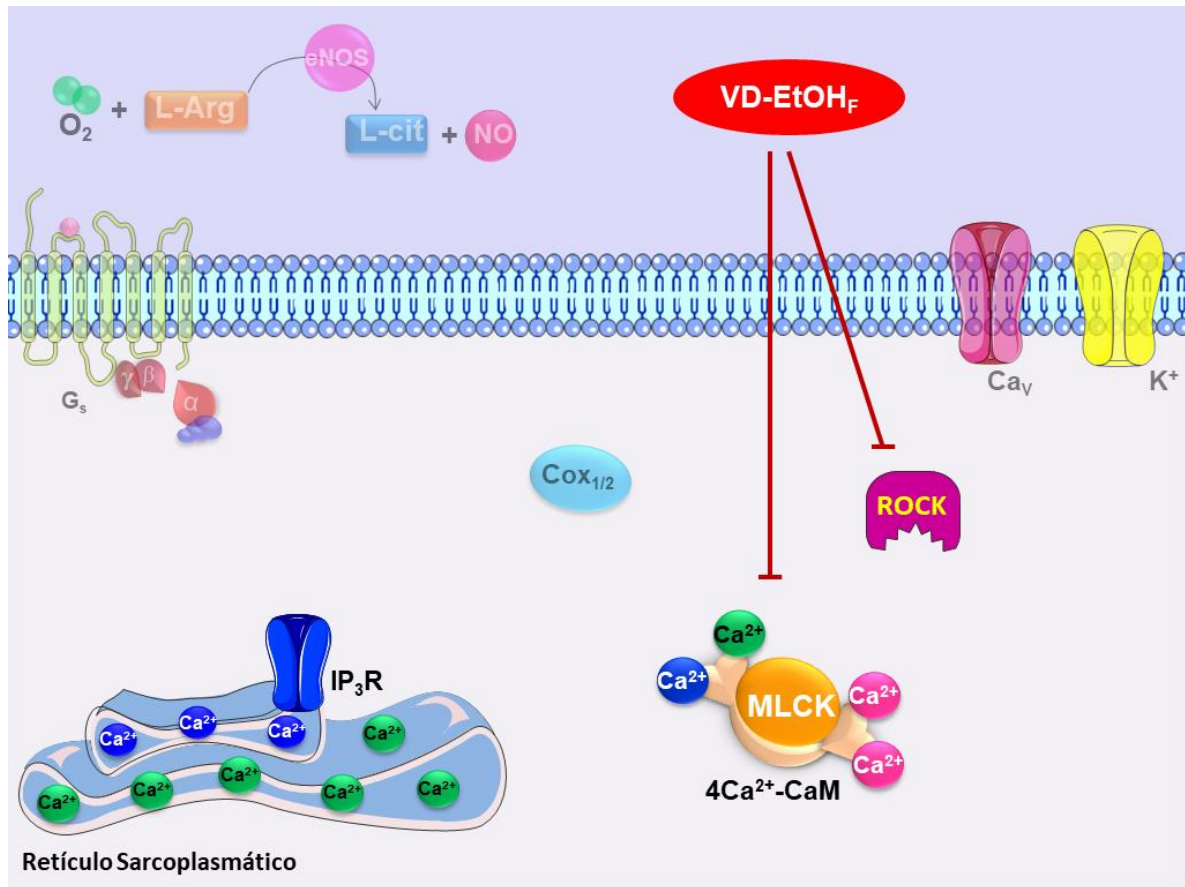
De acordo com as evidências de que quanto maior a expressão gênica e protéica de ROCK1, ROCK2 e RhoA, maior o grau de severidade da dismenorreia (WANG et al., 2013; JIANG et al., 2018), associado ao fato de que a ativação da PLA₂ para formação de prostaglandinas contráteis depende do complexo Ca²⁺-CaM (LEAVER; POYSER, 1981; NING; POYSER, 1984), sugere-se, com base nos resultados obtidos, que a inibição da RhoA/ROCK e da calmodulina promovida pelo VD-EtOH_F, pode estar envolvida no efeito anti-dismenorreico observado para o extrato. Como contraprova do observado no experimento *in vivo*, avaliou-se o efeito do VD-EtOH_F no útero de rata pré-contráído com PGF_{2α}.

A patogenia da dismenorreia está relacionada com o aumento da produção de PGF_{2α}, que ocasiona contração dos vasos sanguíneos uterinos e do miométrio (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011). Além disso, é relatado que a sinalização da ocitocina está envolvida na liberação de PGF_{2α} das células endometriais (WILSON; LIGGINS; WHITTAKER, 1988; BURNS et al., 2001; ARROWSMITH, 2020), como também demonstrado pelo estudo realizado por Yang et al. (2015), uma vez que as contorções abdominais induzidas por ocitocina no modelo de dismenorreia primária aumentou a expressão da COX-2, o que favorece a produção destas prostaglandinas contráteis.

Sendo assim, observou-se que o VD-EtOH_F relaxou o útero de rata pré-contráído com PGF_{2α} (CE₅₀ = 15,4 ± 3,5 µg/mL), sugerindo que o extrato pode modular negativamente a via de sinalização da PGF_{2α}, sendo este um provável mecanismo do extrato para exercer seu efeito anti-dismenorreico (Gráfico 10).

Diante da importância da descoberta de novas substâncias, de origem natural, com propriedades tocolíticas, este trabalho descreve o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* e *in vivo*, do extrato etanólico das folhas de *Varronia dardani*, que atua modulando negativamente a via RhoA/ROCK e a calmodulina *in vitro* em ratas (Figura 19), além de apresentar efeito anti-dismenorreico em camundongos fêmeas.

Figura 19 – Proposta do mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F em útero de rata.



O mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F em rata promove a modulação negativa da via ROCK e da calmodulina.

Fonte: Autor, 2020.

7 Conclusões

Na caracterização do mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F em ratas, descartou-se a participação de/da: canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, canais de K⁺, receptores adrenérgicos- β , via das ciclo-oxigenases e via do NO.

E concluiu-se que a ação tocolítica *in vitro* do VD-EtOH_F envolve a modulação negativa da via da RhoA/ROCK e da calmodulina. Além disso, o extrato apresenta atividade tocolítica *in vivo*, podendo ser uma droga promissora no tratamento da dismenorreia primária.

Referências

ABBAS, K.; MONAGHAN, S. D.; CAMPBELL, I. Uterine physiology. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 17, n. 7, p. 346-348, 2016.

ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 85, n. 1, p. 7-12, 2004.

ACHAR, S. L.; RAO, G. P.; SRINIVASAN, K. K. Isolation and synthesis of 2-phenyl benzopyranones and comparative evaluation of their smooth muscle relaxant activity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, n. 5, p. 393, 2000.

AGRA, M. F. Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil. **João Pessoa, Editora União**, 1996.

AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.

AGUILAR, H. N.; TRACEY, C. N.; TSANG, S. C. F.; MCGINNIS, J. M.; MITCHELL, B. F. Phos-tag-based analysis of myosin regulatory light chain phosphorylation in human uterine myocytes. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20903, 2011.

AKERLUND, M. Targeting the oxytocin receptor to relax the myometrium. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 10, n. 3, p. 423-427, 2006.

AKERLUND, M. The role of oxytocin and vasopressin in the initiation of preterm and term labour as well as primary dysmenorrhoea. **Regulatory Peptides**, v. 45, n. 1-2, p. 187, 1993.

AKTAS, S.; UN, I.; BARLAS, I. O.; OZTURK, A. B.; KARAGUL, M. I. Evaluation of the Rho A/Rho-kinase pathway in the uterus of the rat model of polycystic ovary syndrome. **Reproductive Biology**, v. 19, n. 1, p. 45-54, 2019.

ALMEIDA, R. N.; FACÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no SNC e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

AN, B. S.; AHN, H. J.; KANG, H. S.; JUNG, E. M.; YANG, H.; HONG, E. J.; JEUNG, E. B. Effects of estrogen and estrogenic compounds, 4-tert-octylphenol, and bisphenol A on the uterine contraction and contraction-associated proteins in rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 375, n. 1-2, p. 27-34, 2013.

ANVISA. Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Brasília: Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF**, 2013.

APG (The Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

ARITONANG, T. R.; RAHAYU, S.; SIRAIT, L. I.; KARO, M. B.; SIMANJUNTAK, T. P.; NATZIR, R.; SINRANG, A. W.; MASSI, M. N.; HATTA, M.; KAMELIA, E. The role of FSH, LH, estradiol and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)**, v. 35, n.1, p. 92-100, 2017.

ARMOUR, M.; DAHLEN, H. G.; ZHU, X.; FARQUHAR, C.; SMITH, C. A. The role of treatment timing and mode of stimulation in the treatment of primary dysmenorrhea with acupuncture: An exploratory randomised controlled trial. **PloS One**, v. 12, n. 7, p. e0180177, 2017.

ARMOUR, M.; PARRY, K.; MANOHAR, N.; HOLMES, K.; FERFOLJA, T.; CURRY, C.; MACMILLAN, F.; SMITH, C. A. The Prevalence and Academic Impact of Dysmenorrhea in 21,573 Young Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Women's Health**, v. 8, n. 28, p. 1161-1171, 2019.

ARROWSMITH, S. Oxytocin and vasopressin signalling and myometrial contraction. **Current Opinion in Physiology**, v. 13, p. 62-70, 2020.

ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 356-369, 2014.

ARULKUMARAN, S.; KANDOLA, M. K.; HOFFMAN, B.; HANYALOGLU, A. C.; JOHNSON, M. R.; BENNETT, P. R. The roles of prostaglandin EP 1 and 3 receptors in the control of human myometrial contractility. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 2, p. 489-498, 2012.

BAJALAN, Z.; ALIMORADI, Z.; MOAFI, F. Nutrition as a Potential Factor of Primary Dysmenorrhea: A Systematic Review of Observational Studies. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 84, n. 3, p. 209-224, 2019.

BAKER, J. G. The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 3, p. 317-322, 2005.

BAKKER, R.; PIERCE, S.; MYERS, D. The role of prostaglandins E₁ and E₂, dinoprostone, and misoprostol in cervical ripening and the induction of labor: a mechanistic approach. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 296, n. 2, p. 167-179, 2017.

BANCIU, A.; BANCIU, D.; MUSTACIOSU, C.; RADU, M.; CRETOIU, D.; XIAO, J.; CRETOIU, S. M.; SUCIU, N.; RADU, B. Beta-estradiol regulates voltage-gated calcium channels and estrogen receptors in telocytes from human myometrium. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1413, 2018.

BARBOSA, C. K. R.; COSTA, J. P. R.; BOMFIN, F. P. G.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Qualidade microbiológica de plantas medicinais cultivadas e comercializadas em Montes Claros, MG. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 77-81, 2010.

BARDOU, M.; LOUSTALOT, C.; CORTIJO, J.; SIMON, B.; NALINE, E.; DUMAS, M.; SAGOT, P. Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible β 3-adrenoceptor in human near-term myometrium. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 8, p. 1960-1966, 2000.

BERNAL, A. L. The regulation of uterine relaxation. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, v. 18, n. 3, p. 340-347, 2007.

BERNARDI, M.; LAZZERI, L.; PERELLI, F.; REIS, F. M.; PETRAGLIA, F. Dysmenorrhea and related disorders. **Faculty of 1000 Research**, v. 6, p. 1645, 2017.

BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; LAGHEZZA MASCI, V.; OVIDI, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.

BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, p. 1-130, 2012.

BHATTACHARYYA, M.; STRATTON, M. M.; GOING, C. C.; MCSPADDEN, E. D.; HUANG, Y.; SUSA, A. C.; GEE, C. L. Molecular mechanism of activation-triggered subunit exchange in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. **Elife**, v. 5, p. e13405, 2016.

BLESSON, C. S.; SAHLIN, L. Prostaglandin E and F receptors in the uterus. **Receptors & Clinical Investigation**, v. 1, p. e115, 2014.

BLEY, K. R.; HUNTER, J. C.; EGLEN, R. M.; SMITH, J. A. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 141-147, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2006. 60p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 20 de dezembro de 2019.

BREYER, R. M.; BAGDASSARIAN, C. K.; MYERS, S. A.; BREYER, M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 661-690, 2001.

BUHIMSCHI, I.; YALLAMPALLI, C.; DONG, Y. L.; GARFIELD, R. E. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, n. 5, p. 1577-1584, 1995.

- BULBUL, A.; YAGCI, A.; ALTUNBAS, K.; SEVIMLI, A.; CELIK, H. A.; KARADENIZ, A.; AKDAG, E. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1156-1168, 2007.
- BURNETT, M.; LEMYRE, M. No. 345-primary dysmenorrhea consensus guideline. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 39, n. 7, p. 585-595, 2017.
- BURNS, P. D.; MENDES JR, J. O.; YEMM, R. S.; CLAY, C. M.; NELSON, S. E.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F_{2α} synthesis: role of G_i proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1150-1155, 2001.
- BURSZTYN, L.; EYTAN, O.; JAFFA, A. J.; ELAD, D. Modeling myometrial smooth muscle contraction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1101, n. 1, p. 110-138, 2007.
- BWG (Boraginales Working Group). Familial classification of the Boraginales. **Taxon** v. 65, p. 502–522, 2016.
- BYTAUTIENE, E.; VEDERNIKOV, Y. P.; SAADE, G. R.; ROMERO, R.; GARFIELD, R. E. Effect of histamine on phasic and tonic contractions of isolated uterine tissue from pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 3, p. 774-778, 2003.
- CARROQUINO-GARCIA, P.; JIMÉNEZ-REJANO, J. J.; MEDRANO-SANCHEZ, E.; CASA-ALMEIDA, M.; DIAZ-MOHEDO, E.; SUAREZ-SERRANO, C. Therapeutic Exercise in the Treatment of Primary Dysmenorrhea: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Physical Therapy**, v. 99, n. 10, p. 1371-1380, 2019.
- CARSTEN, M. E.; MILLER, J. D. (Ed.). **Uterine Function: Molecular and Cellular Aspects**. Springer Science & Business Media, 2013.
- CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.
- CHAGAS, E. C. O.; COSTA-LIMA, J. L. A New Species of *Varronia* (Cordiaceae, Boraginales) from Northeastern Brazil. **Systematic Botany**, v. 43, n. 4, p. 1026-1029, 2018.
- CHAO, L. H.; STRATTON, M. M.; LEE, I. H.; ROSENBERG, O. S.; LEVITZ, J.; MANDELL, D. J.; KORTEEMME, T.; GROVES, J. T.; SCHULMAN, H. KURIYAN, J. A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II holoenzyme. **Cell**, v. 146, n. 5, p. 732-745, 2011.
- CHEN, C. J.; XIAO, P.; CHEN, Y.; FANG, R. Selenium Deficiency Affects Uterine Smooth Muscle Contraction Through Regulation of the RhoA/ROCK Signalling Pathway in Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 192, n. 2, p. 1-10, 2019.

CHEN, X. Q.; TAN, I.; NG, C. H.; HALL, C.; LIM, L.; LEUNG, T. 728 Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin 729 homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. **Journal of Biology**, v. 730, p. 12680-12688, 2002.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 322-328, 2000.

CINELLI, M. A.; DO, H. T.; MILEY, G. P.; SILVERMAN, R. B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2019.

CLOUSE, A. K.; RIEDEL, E.; HIEBLE, J. P.; WESTFALL, T. D. The effects and selectivity of β -adrenoceptor agonists in rat myometrium and urinary bladder. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, n. 1-3, p. 184-189, 2007.

COELHO, L. S. C.; BRITO, L. M. O.; CHEIN, M. B. D. C.; MASCARENHAS, T. S.; COSTA, J. P. L.; NOGUEIRA, A. A.; POLI-NETO, O. B. Prevalence and conditions associated with chronic pelvic pain in women from São Luís, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 9, p. 818-825, 2014.

COHEN-TANNOUDJI, J.; VIVAT, V.; HEILMANN, J.; LEGRAND, C.; MALTIER, J. P. Regulation by progesterone of the high-affinity state of myometrial β -adrenergic receptor and of adenylate cyclase activity in the pregnant rat. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 137-145, 1991.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Ed.). **Bioactive Natural Products: detection, isolation, and structural determination**. CRC press, p. 421-437, 2007.

COLLINS, P. L.; MOORE, J. J.; LUNDGREN, D. W.; CHOUBINEH, E.; CHANG, S. M.; CHANG, A. S. Gestational changes in uterine L-type calcium channel function and expression in guinea pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1262-1270, 2000.

CONKLIN, B. R.; BOURNE, H. R. Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors, and effectors. **Cell**, v. 73, n. 4, p. 631-641, 1993.

CONRAD, K. P.; JOFFE, G. M.; KRUSZYNA, H.; KRUSZYNA, R.; ROCHELLE, L. G.; SMITH, R. P.; MOSHER, M. D. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 6, p. 566-571, 1993.

DANIELS, S.; ROBBINS, J.; WEST, C. R.; NEMETH, M. A. Celecoxib in the treatment of primary dysmenorrhea: results from two randomized, double-blind, active-and placebo-controlled, crossover studies. **Clinical Therapeutics**, v. 31, n. 6, p. 1192-1208, 2009.

DANTAS, C. A. G. **Investigação fitoquímica e avaliação do potencial tóxico e anti-inflamatório de *Varronia globosa* Jacq.(BORAGINACEAE)**. 2015. Trabalho

de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DAVID, J. M.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

DAWOOD, M. Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. **Obstetrics & Gynecology**, v. 108, n. 2, p. 428-441, 2006.

DAWOOD, M. Y.; KHAN-DAWOOD, F. S. Clinical efficacy and differential inhibition of menstrual fluid prostaglandin F_{2α} in a randomized, double-blind, crossover treatment with placebo, acetaminophen, and ibuprofen in primary dysmenorrhea. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 196, n. 1, p. 35, 2007.

DE FREITAS ROLDÃO, E.; WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.

DE OLIVEIRA, F. A. G **Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró- RN, 2016.

DE SANCTIS, V.; SOLIMAN, A. T.; ELSEDFY, H.; SOLIMAN, N. A.; SOLIMAN, R.; EL KHOLY, M.; Dysmenorrhea in adolescents and young adults: a review in different country. **Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis**, v. 87, n. 3, p. 233-246, 2017.

DE SANCTIS, V.; SOLIMAN, A. T.; ELSEDFY, H.; SOLIMAN, N. A.; SOLIMAN, R.; EL KHOLY, M. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: a review in different country. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 87, n. 3, p. 233-246, 2016.

DE SANCTIS, V.; SOLIMAN, A.; BERNASCONI, S.; BIANCHIN, L.; BONA, G.; BOZZOLA, M.; DE SANCTIS, C.; TONINI, G.; RIGON, F.; PERISSINOTTO, E.; Primary dysmenorrhea in adolescents: prevalence, impact and recent knowledge. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 512-520, 2015.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; MATA, R.; RIVERO-CRUZ, I. Antinociceptive pharmacological profile of *Dysphania graveolens* in mouse. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 933-938, 2017.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; TORRES, M. C. M.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. An uncommon naphthaquinoid and a new lignan derivative from

the roots of *Cordia leucocephala* Moric. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, 2015.

DIXON, D.; ALISON R.; BACH, U.; COLMAN, K.; FOLEY, G. L.; HARLEMAN, J. H.; HAWORTH, R.; HEBERT, R.; HEUSER, A.; LONG, G.; MIRSKY, M.; REGAN, K.; ESCH, E. V.; WESTWOOD, F. R.; VIDAL, J.; YOSHIDA, M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. **Jornal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 3–4, p. 1S-107S, 2014.

DOMOKOS, D.; DUCZA, E.; FALKAY, G.; GÁSPÁR, R. Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats: their roles in uterine contractions and onset of labour. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 439-451, 2017.

DORN, L. D.; NEGRIF, S.; HUANG, B.; PABST, S.; HILLMAN, J.; BRAVERMAN, P.; SUSMAN, E. J. Menstrual symptoms in adolescent girls: association with smoking, depressive symptoms, and anxiety. **Journal of Adolescent Health**, v. 44, n. 3, p. 237-243, 2009.

DUARTE, B. A. M. **Estudo químico e biológico do óleo essencial da *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró- RN, 2015.

ELWARDY-MEREZAK, J.; MALTIER, J. P.; COHEN-TANNOUDJI, J.; LECRIVAIN, J. L.; VIVAT, V.; LEGRAND, C. Pregnancy-related modifications of rat myometrial G_s proteins: ADP ribosylation, immunoreactivity and gene expression studies. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 23-37, 1994.

ERKINHEIMO, T. L.; SAUKKONEN, K.; NARKO, K.; JALKANEN, J.; YLIKORKALA, O.; RISTIMÄKI, A. Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3468-3475, 2000.

FARAMARZI, M.; SALMALIAN, H. Association of psychologic and nonpsychologic factors with primary dysmenorrhea. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 8, 2014.

FENG, P. C.; HAYNES, L. J.; MAGNUS, K. E.; PLIMMER, J. R.; SHERRATT, H. S. A. Pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 14, n. 1, p. 556-561, 1962.

FENG, P. C.; HAYNES, L. J.; MAGNUS, K. E.; PLIMMER, J. R. Further pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 115-117, 1964.

FERNANDEZ, A. I.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. A. Mediators involved in the rat uterus contraction in calcium-free solution. **General Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 291-296, 1992.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá, PA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 4, p. 757-768, 2015.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. *Varronia*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 17 jan. 2020.

FOX, M. C.; KLIPPING, C.; NGUYEN, A. M.; FRENKL, T. L.; CRUZ, S. M.; WANG, Y.; KORVER, T. A phase 2b multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of vaginal rings containing norgestrel acetate or etonogestrel and 17 β -estradiol in the treatment of women with primary dysmenorrhea. **Contraception**, v. 99, n. 2, p. 125-130, 2019.

FUKUMOTO, Y.; KAIBUCHI, K.; HORI, Y.; FUJIOKA, H.; ARAKI, S.; UEDA, T.; TAKAI, Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. **Oncogene**, v. 5, n. 9, p. 1321-1328, 1990.

GÁSPÁR, R.; HAJAGOS-TÓTH, J. Calcium channel blockers as tocolytics: principles of their actions, adverse effects and therapeutic combinations. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 6, p. 689-699, 2013.

GASPARINO, E. C.; BARROS, M. A. V. C. Palynotaxonomy of Cordiaceae (Boraginales) from São Paulo state. **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, n. 1, p. 33-55, 2009.

GHARIBN, A. M.; MARD, S. A.; FARBOUD, Y. Effect of *Anethum graveolens* fruit extract on rat uterus contractions. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 4, p. 263-270, 2005.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Research**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GOMES, P. A. **Óleo essencial da erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.) de áreas nativas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos do Goytacazes, 2010.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S.C. Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: **Editora da UFRGS**, 2006.

GORE, A. C. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. **Frontiers Neuroendocrinology**, v. 29, n. 3, p. 358-374, 2008.

GOTTSCHLING, M.; HILGER, H. H.; WOLF, M.; DIANE, N. Secondary structure of the ITS1 transcript and its application in a reconstruction of the phylogeny of Boraginales. **Plant Biology**, v. 3, n. 6, p. 629-636, 2001.

GOTTSCHLING, M.; MILLER, J. S.; WEIGEND, M.; HILGER, H. H. Congruence of a phylogeny of Cordiaceae (Boraginales) inferred from ITS1 sequence data with morphology, ecology, and biogeography. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 92, n. 3, p. 425-437, 2005.

GRANDI, G.; FERRARI, S.; XHOLLI, A.; CANNOLETTA, M.; PALMA, F.; ROMANI, C.; VOLPE, A.; CAGNACCI, A. Prevalence of menstrual pain in young women: what is dysmenorrhea?. **Journal of Pain Research**, v. 5, p. 169, 2012.

GUO, S. W.; MAO, X.; MA, Q.; LIU, X. Dysmenorrhea and its severity are associated with increased uterine contractility and overexpression of oxytocin receptor (OTR) in women with symptomatic adenomyosis. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 1, p. 231-240, 2013.

HABIBI, N.; HUANG, M. S. L.; GAN, W. Y.; ZULIDA, R.; SAFAVI, S. M. Prevalence of primary dysmenorrhea and factors associated with its intensity among undergraduate students: a cross-sectional study. **Pain Management Nursing**, v. 16, n. 6, p. 855-861, 2015.

HAGERTY, L.; WEITZEL, D. H.; CHAMBERS, J.; FORTNER, C. N.; BRUSH, M. H.; LOISELLE, D.; HAYSTEAD, T. A. ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4884-4893, 2007.

HAMMERS, A. L.; SANCHEZ-RAMOS, L.; KAUNITZ, A. M. Antenatal exposure to indomethacin increases the risk of severe intraventricular hemorrhage, necrotizing enterocolitis, and periventricular leukomalacia: a systematic review with metaanalysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 4, p. 505. e1-505. e13, 2015.

HANCOCK, J. F.; HALL, A. A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1915-1921, 1993.

HANLEY, M.; SAYRES, L.; REIFF, E. S.; WOOD, A.; GROTEGUT, C. A.; KULLER, J. A. Tocolysis: A Review of the Literature. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 74, n. 1, p. 50-55, 2019.

HARADA, T.; MOMOEDA, M.; TAKETANI, Y.; HOSHIAI, H.; TERAOKA, N. Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1583-1588, 2008.

HAREL, Z. Cyclooxygenase-2 specific inhibitors in the treatment of dysmenorrhea. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 17, n. 2, p. 75-79, 2004.

HAREL, Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: an update on pharmacological treatments and management strategies. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 13, n. 15, p. 2157-2170, 2012.

HEIDARIFAR, R.; MEHRAN, N.; HEIDARI, A.; KOOHBOR, M.; MANSOURABAD, M. K. Effect of Dill (*Anethum graveolens*) on the severity of primary dysmenorrhea in compared with mefenamic acid: A randomized, double-blind trial. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 326, 2014.

HESHMATI, A.; DOLATIAN, M.; MOJAB, F.; NIKKHAH, S.; MAHMOODI, Z. The effect of peppermint (*Mentha piperita*) capsules on the severity of primary dysmenorrhea. **Journal of Herbal Medicine**, v. 6, n. 3, p. 137-141, 2016.

HOSONO, T.; TAKASHIMA, Y.; MORITA, Y.; NISHIMURA, Y.; SUGITA, Y.; ISAMI, C.; SAKAMOTO, I.; TAGAMI, K.; HIDAKA, Y.; SUZUKI, A. Effects of a heat-and steam-generating sheet on relieving symptoms of primary dysmenorrhea in young women. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 36, n. 4, p. 818-824, 2010.

HOSSEINLOU, A.; ALINEJAD, V.; ALINEJAD, M.; AGHAKHANI, N. Effects of Fish Oil Capsules and Vitamin B1 Tablets on Duration and Severity of Dysmenorrhea in Students of High School in Urmia-Iran. **Global Journal of Health Science**, v. 6, n. 7, p. 124, 2014.

HSU, C. S.; YANG, J. K.; YANG, L. L. Effect of "Dang-Qui-Shao-Yao-San" a Chinese medicinal prescription for dysmenorrhea on uterus contractility in vitro. **Phytomedicine**, v. 13, n. 1-2, p. 94-100, 2006.

HUA, Y. Q.; DUAN, J. A.; ZHU, Q.; WANG, Q. J. Study on method of oxytocin induced *in vitro* dysmenorrhea model in mouse. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 24, n. 4, p. 489, 2008.

HUANG, Q.; LIU, L. Wet needling of myofascial trigger points in abdominal muscles for treatment of primary dysmenorrhoea. **Acupuncture in Medicine**, v. 32, n. 4, p. 346-349, 2014.

HUDSON, CI. A.; HEESOM, K. J.; BERNAL, A. L. Phasic contractions of isolated human myometrium are associated with Rho-kinase (ROCK)-dependent phosphorylation of myosin phosphatase-targeting subunit (MYPT1). **Molecular Human Reproduction**, v. 18, n. 5, p. 265-279, 2011.

IACOVIDES, S.; AVIDON, I.; BAKER, F. C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 762-778, 2015.

IKEBE, M.; HARTSHORNE, D. J.; ELZINGA, M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9569-9573, 1987.

ISHIZAKI, T.; UEHATA, M.; TAMECHIKA, I.; KEEL, J.; NONOMURA, K.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 5, p. 976-983, 2000.

IZUMI, H.; YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E. Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 5, p. 1327-1337, 1993.

JAMKHANDE, P. G.; BARDE, S. R.; PATWEKAR, S. L.; TIDKE, P. S. Plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Cordia dichotoma* (Indian cherry): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 12, p. 1009-1012, 2013.

JENABI, E.; FEREIDOONY, B. Effect of *Achillea millefolium* on relief of primary dysmenorrhea: a double-blind randomized clinical trial. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 28, n. 5, p. 402-404, 2015.

JESUÍNO, F. W. R.; REIS, J. P.; WHITAKER, J. C. P.; CAMPOS, A.; PASTOR, M. V. D.; CECHINEL FILHO, V.; QUINTÃO, N. L. M. Effect of *Synadenium grantii* and its isolated compound on dysmenorrhea behavior model in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 613-620, 2019.

JIANG, C.; GONG, W.; CHEN, R.; KE, H.; QU, X.; YANG, W.; CHENG, Z. RhoA/ROCK/ARHGAP26 signaling in the eutopic and ectopic endometrium is involved in clinical characteristics of adenomyosis. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 12, p. 5019-5029, 2018.

JO, J.; LEE, S. H. Heat therapy for primary dysmenorrhea: A systematic review and meta-analysis of its effects on pain relief and quality of life. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16252, 2018.

JOHNSON, C. N.; PATTANAYEK, R.; POTET, F.; REBBECK, R. T.; BLACKWELL, D. J.; NIKOLAIENKO, R.; ZIMA, A. V. The CaMKII inhibitor KN93-calmodulin interaction and implications for calmodulin tuning of Nav1. 5 and RyR2 function. **Cell Calcium**, v. 82, p. 102063, 2019.

JOVANOVIĆ, A.; GRBOVIĆ, L.; TULIĆ, I. L-Arginine induces relaxation of human uterine artery with both intact and denuded endothelium. **European Journal of Pharmacology**, v. 256, n. 1, p. 103-107, 1994.

JU, H.; JONES, M.; MISHRA, G. D. Smoking and trajectories of dysmenorrhoea among young Australian women. **Tobacco Control**, v. 25, n. 2, p. 195-202, 2016.

JU, H.; JONES, M.; MISHRA, G. The prevalence and risk factors of dysmenorrhea. **Epidemiologic Reviews**, v. 36, n. 1, p. 104-113, 2013.

KAARI, C.; LOPES, C. M.; HIME, L. F.; BRANDÃO, D. Avaliação clínica da eficácia e segurança da associação de papaverina, dipirona sódica e extrato fluido de *Atropa beladonna* comparado com a associação de dipirona sódica e brometo de N-butilscopolamina no tratamento de cólicas menstruais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 63, n. 8, p. 418-26, 2006.

KAJULURI, L. P.; LI, Y.; MORGAN, K. G. The uterine myocyte, contractile machinery and proteins of the myometrium and their relationship to the dynamic nature of myometrial function. **Current Opinion in Physiology**, v. 13, p. 14-19, 2019.

KAMM, K. E.; STULL, J. T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4527-4530, 2001.

KHAN, Z.; STEWART, E. A. Benign uterine diseases. In: **Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology**, p. 643-661, 2019.

KIM, J.; BAE, J. H.; KU, B.; YIM, M. H.; ANG, L.; KIM, H.; JEON, Y. J. A comparative study of the radial pulse between primary dysmenorrhea patients and healthy subjects during the menstrual phase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019a.

KIM, S. H.; RIAPOSOVA, L.; AHMED, H.; POHL, O.; CHOLLET, A.; GOTTELAND, J. P.; TERZIDOU, V. Oxytocin Receptor Antagonists, Atosiban and Nolasiban, Inhibit Prostaglandin F_{2α}-induced Contractions and Inflammatory Responses in Human Myometrium. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5792, 2019b.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In Bárány, M. (Ed.) **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 203-219, 1996.

KOLI, S.; PRAKASH, A.; CHOUDHURY, S.; MANDIL, R.; GARG, S. K. Calcium Channels, Rho-Kinase, Protein Kinase-C, and Phospholipase-C Pathways Mediate Mercury Chloride-Induced Myometrial Contractions in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 187, n. 2, p. 418-424, 2019.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. D. A. C. Dicionário Terapêutico Guanabara. In: **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 21º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

KOYAMA, M.; ITO, M.; FENG, J. H.; SEKO, T.; YAMAWAKI, K.; ISAKA, N.; NAKANO, T. Inhibition of myosin phosphatase through CPI-17 phosphorylated by Rho-kinase and protein kinase N. In: **Circulation**, v. 102, n. 18, p. 320, 2000.

KUNZ, G.; LEYENDECKER, G. Uterine peristaltic activity during the menstrual cycle: characterization, regulation, function and dysfunction. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 4, p. 5-9, 2002.

KUPITTAYANANT, S.; BURDYGA, T.; WRAY, S. The effects of inhibiting Rho-associated kinase with Y-27632 on force and intracellular calcium in human myometrium. **Pflügers Archiv**, v. 443, n. 1, p. 112-114, 2001.

LADDS, G.; ZERVOU, S.; VATISH, M.; THORNTON, S.; DAVEY, J. Regulators of G protein signalling proteins in the human myometrium. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1-3, p. 23-28, 2009.

LANGRICK, A. F.; GUNN, A. D.; LIVESEY, H.; WHITEHEAD, A. M. A double-blind placebo-controlled crossover study of mebeverine and mefenamic acid in the treatment of primary dysmenorrhoea. **The British Journal of Clinical Practice**, v. 43, n. 9, p. 317-321, 1989.

LARTEY, J.; BERNAL, A. L. RHO protein regulation of contraction in the human uterus. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 407-424, 2009.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LATTHE, P.; LATTHE, M.; SAY, L.; GÜLMEZOGLU, M.; KHAN, K. S. WHO systematic review of prevalence of chronic pelvic pain: a neglected reproductive health morbidity. **BMC Public Health**, v. 6, n. 1, p. 177, 2006.

LEAVER, H. A.; POYSER, N. L. Distribution of arachidonic acid and other fatty acids in the lipids of guinea-pig uterus and plasma in relation to uterine prostaglandin synthesis. **Reproduction**, v. 61, n. 2, p. 325-333, 1981.

LEE, B.; HONG, S. H.; KIM, K.; KANG, W. C.; NO, J. H.; LEE, J. R.; KIM, Y. B. Efficacy of the device combining high-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation and thermotherapy for relieving primary dysmenorrhea: a randomized, single-blind, placebo-controlled trial. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 194, p. 58-63, 2015.

LEE, H.; CHOI, T. Y.; MYUNG, C. S.; LEE, J. A.; LEE, M. S. Herbal medicine (Shaofu Zhuyu decoction) for treating primary dysmenorrhea: a systematic review of randomized clinical trials. **Maturitas**, v. 86, p. 64-73, 2016.

LEE, S. E.; AHN, D. S.; LEE, Y. H. Role of T-type Ca^{2+} channels in the spontaneous phasic contraction of pregnant rat uterine smooth muscle. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 241-249, 2009.

LEIPER, J. Nitric Oxide. In: **Textbook of Vascular Medicine**. Springer, Cham, p. 117-126, 2019.

LEUNG, T.; CHEN, X. Q.; MANSER, E.; LIM, L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 10, p. 5313-5327, 1996.

LI, M.; BI, J.; LV, B.; ZHENG, W.; WANG, Z.; XIAO, W.; SUN, Y.; LI, E. An experimental study of the anti-dysmenorrhea effect of Chinese herbal medicines used in Jin Gui Yao Lue. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 245, p. 112181, 2019.

LIEDMAN, R.; HANSSON, S. R.; HOWE, D.; IGIDBASHIAN, S.; RUSSELL, R. J.; ÅKERLUND, M. Endometrial expression of vasopressin, oxytocin and their receptors in patients with primary dysmenorrhoea and healthy volunteers at ovulation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 137, n. 2, p. 189-192, 2008.

LIU, Y. L.; NWOSU, U. C.; RICE, P. J. Relaxation of isolated human myometrial muscle by β_2 -adrenergic receptors but not β_1 -adrenergic receptors. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 179, n. 4, p. 895-898, 1998.

- LOPES, K.; OLIVEIRA, J., SOUSA-JÚNIOR, F. J., SANTOS, T. D. F., ANDRADE, D., ANDRADE, S. L., PEREIRA, W. L.; GOMES, P. W. P.; MONTEIRO, M. C.; SILVA, C. Y. Y.; SILVA, M. N.; MAIA, C. F.; FONTES-JUNIOR, E. A. Chemical composition, toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory activity of dry aqueous extract of *Varronia multispicata* (Cham.) Borhidi (Cordiaceae) leaves. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1376, 2019.
- LUNDSTRÖM, V. The Myometrial Response to Intra-Uterine Administration of PGF_{2α} and PGE₂ in Dysmenorrheic Women. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 56, n. 3, p. 167-172, 1977.
- LYNN, S.; MORGAN, J. M.; LAMB, H. K.; MEISSNER, G.; GILLESPIE, J. I. Isolation and partial cloning of ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channel protein isoforms from human myometrial smooth muscle. **FEBS Letters**, v. 372, n. 1, p. 6-12, 1995.
- MAEDA, K. I.; OHKURA, S.; TSUKAMURA, H. MAEDA, K.; OKHURA, S.; TSUKAMURA, H. Physiology of reproduction: estrous cycle, identification of the estrous cycle. **The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat. Academic Press, San Diego**, p. 152-155, 2000.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the strous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.
- MARJORIBANKS, J.; PROCTOR, M.; FARQUHAR, C.; DERKS, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhea. **Cochrane Database of Systemic Reviews**, v. 1, p. CD001751, 2010.
- MARTIN, C.; HYVELIN, J. M.; CHAPMAN, K. E.; MARTHAN, R.; ASHLEY, R. H.; SAVINEAU, J. P. Pregnant rat myometrial cells show heterogeneous ryanodine-and caffeine-sensitive calcium stores. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 2, p. C243-C252, 1999.
- MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 326-332, 2011.
- MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; MEDEIROS, C. R.; SANTOS, F. A. V.; BITU, V. C. N.; SOUZA, C. E. S.; FIGUEREDO, F. G.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Potentiation of antibiotic activity of aminoglycosides by natural products from *Cordia verbenacea* DC. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p. 111-116, 2016.
- MATSUI, T.; AMANO, M.; YAMAMOTO, T.; CHIHARA, K.; NAKAFUKU, M.; ITO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2208-2216, 1996.

MEANS, A. R. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 4-13, 2000.

MECHSNER, S.; GRUM, B.; GERICKE, C.; LODDENKEMPER, C.; DUDENHAUSEN, J. W.; EBERT, A. D. Possible roles of oxytocin receptor and vasopressin-1 α receptor in the pathomechanism of dysperistalsis and dysmenorrhea in patients with adenomyosis uteri. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 7, p. 2541-2546, 2010.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.

MELO, J. I. M.; ANDRADE, W. M. Boraginaceae s. l. A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, Bahia – Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 369-378, 2007.

MELO, J. I. M.; VIEIRA, D. D. A new species of *Varronia* (Cordiaceae) and a checklist of Boraginales for the State of Sergipe, Brazil. **Phytotaxa**, v. 231, n. 2, p. 145-155, 2015.

MELO, J.I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 109-120, 2012.

MICHALAKIS, K. G.; SEGARS, J. H. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 1949-1957, 2010.

MILLER, J. S.; GOTTSCHLING, M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): resurrection of the genus *Varronia* P. Br. **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 163-169, 2007.

MIRONNEAU, J. Effects of oxytocin on ionic currents underlying rhythmic activity and contraction in uterine smooth muscle. **Pflügers Archiv**, v. 363, n. 2, p. 113-118, 1976.

MIRONNEAU, J.; MACREZ, N.; MOREL, J. L.; SORRENTINO, V.; MIRONNEAU, C. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. **The Journal of Physiology**, v. 538, n. 3, p. 707-716, 2002.

MITTAL, R. Medical management of Dysmenorrhea. **International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology**, v. 5, n. 1, p. 5-8, 2019.

MITCHELL, B. F.; AGUILAR, H. N.; MOSHER, A.; WOOD, S.; SLATER, D. M. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. **Facts, Views & Vision in Obgyn**, v. 5, n. 1, p. 72, 2013.

MODZELEWSKA, B.; JÓŻWIK, M.; JÓŻWIK, M.; TYLICKA, M.; KLESZCZEWSKI, T. The effects of extended nitric oxide release on responses of the human non-pregnant myometrium to endothelin-1 or vasopressin. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 5, p. 892-898, 2019.

MOINI, A.; EBRAHIMI, T.; SHIRZAD, N.; HOSSEINI, R.; RADFAR, M.; BANDARIAN, F.; HEMMATABADI, M. The effect of vitamin D on primary dysmenorrhea with vitamin D deficiency: a randomized double-blind controlled clinical trial. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 6, p. 502-505, 2016.

MONCADA, S. R.; PALMER, M. G.; HIGGS, E. A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORGAN, J. M.; DUNLOP, W.; GILLESPIE, J. I. Differential expression of ryanodine receptor RyR2 mRNA in the non-pregnant and pregnant human myometrium. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 3, p. 777-783, 1997.

MORGAN, J. M.; SMEDT, H.; GILLESPIE, J. I. Identification of three isoforms of the InsP₃ receptor in human myometrial smooth muscle. **Pflügers Archiv**, v. 431, n. 5, p. 697-705, 1996.

MUNGLUE, P.; EUMKEP, G.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S. The effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and L-citrulline on rat uterine contractility. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 4, p. 437-448, 2012.

MYERS, K. M.; ELAD, D. Biomechanics of the human uterus. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 9, n. 5, p. e1388, 2017.

NANDHINI, SUNDARESAN; NARAYANAN, K. B.; ILANGO, KALIAPPAN. *Valeriana officinalis*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 1, p. 36-41, 2018.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NING, A. C. W. S.; POYSER, N. L. Further studies on the control of arachidonic acid turnover in guinea-pig endometrium in relation to prostaglandin production. **Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine**, v. 16, n. 3, p. 285-302, 1984.

NIZIO, D.A.C.; BRITO, F.A.; SAMPAIO, T.S.; MELO, J.O.; SILVA, F.L.S.; GAGLIARDI, P.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ANJOS, C.S.; ALVES, P.B.; WISNIEWSKI-JUNIOR, A.; BLANK, A.F. Chemical diversity of native populations of

Varronia curassavica Jacq. and antifungal activity against *Lasiodiplodia theobromae*. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 437-448, 2015.

NORMAN, J. Nitric oxide and the myometrium. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 70, n. 2, p. 91-100, 1996.

OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **OECD guideline for testing of chemicals** nº 423, 2001.

OLMSTEAD, R. G.; BREMER, B.; SCOTT, K. M.; PALMER, J. D. A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequences. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 80, p. 700-722, 1993.

OSAYANDE, A. S.; MEHULIC, S. Diagnosis and initial management of dysmenorrhea. **American Family Physician**, v. 89, n. 5, p. 341-346, 2014.

OSLER, M. Standard treatment of dysmenorrhea with special reference to treatment with spasmolytics and hormones. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 58, n. S87, p. 69-72, 1979.

OTAIBI, M. A. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. **Calcium Signaling**, v. 1, n. 2, p. 101-119, 2014.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 755-789, 2017.

PACCOLA, C. C.; RESENDE, C. G.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S. M.; CIPRIANO, I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 677-683, 2018.

PAN, J. C.; TSAI, Y. T.; LAI, J. N.; FANG, R. C.; YEH, C. H. The traditional Chinese medicine prescription pattern of patients with primary dysmenorrhea in Taiwan: a large-scale cross sectional survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 314-319, 2014.

PARAZZINI, F.; DI MARTINO, M.; PELLEGRINO, P. Magnesium in the gynecological practice: a literature review. **Magnesium Research**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2017.

PAREEK, A.; CHANDURKAR, N. B.; PATIL, R. T.; AGRAWAL, S. N.; UDAY, R. B.; TAMBE, S. G. Efficacy and safety of aceclofenac and drotaverine fixed-dose combination in the treatment of primary dysmenorrhoea: a double-blind, double-dummy, randomized comparative study with aceclofenac. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 152, n. 1, p. 86-90, 2010.

PEHLIVANOĞLU, B.; BAYRAK, S.; DOĞAN, M. A close look at the contraction and relaxation of the myometrium; the role of calcium. **Journal of the Turkish German Gynecological Association**, v. 14, n. 4, p. 230, 2013.

PELLOW, J.; NIENHUIS, C. Medicinal plants for primary dysmenorrhoea: A systematic review. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 37, p. 13-26, 2018.

PHILLIPPE, M.; SAUNDERS, T.; BASA, A. Intracellular mechanisms underlying prostaglandin F_{2α}-stimulated phasic myometrial contractions. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 4, p. E665-E673, 1997.

PHILLIPS, R. J.; AL-ZAMIL, H.; HUNT, L. P.; FORTIER, M. A.; BERNAL, A. L. Genes for prostaglandin synthesis, transport and inactivation are differentially expressed in human uterine tissues, and the prostaglandin F synthase AKR1B1 is induced in myometrial cells by inflammatory cytokines. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2011.

PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; SOBRINHO, E.M.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva-baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

PITANGUI, A. C. R.; GOMES, M. R. D. A.; LIMA, A. S.; SCHWINGEL, P. A.; ALBUQUERQUE, A. P. D. S.; DE ARAÚJO, R. C. Menstruation disturbances: prevalence, characteristics, and effects on the activities of daily living among adolescent girls from Brazil. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 26, n. 3, p. 148-152, 2013.

POYSER, N. L. Effect of trifluoperazine, a calmodulin antagonist, on prostaglandin output from the guinea-pig uterus. **Reproduction**, v. 73, n. 1, p. 295-303, 1985.

PRASANTH, R. V.; RAVI, V. K.; VARSHA, P. V.; SATYAM, S. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. **Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, p. 164, 2014.

PREGO-DOMINGUEZ, J.; HADRYA, F.; TAKKOUCHE, B. Polyunsaturated fatty acids and chronic pain: a systematic review and meta-analysis. **Pain Physician**, v. 19, n. 8, p. 521-535, 2016.

PRICE, S. A.; BERNAL, A. L. Uterine quiescence: the role of cyclic AMP. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 265-272, 2001.

PROCTOR, M.; FARQUHAR, C. Diagnosis and management of dysmenorrhoea. **British Medical Journal**, v. 332, n. 7550, p. 1134-1138, 2006.

PROCTOR, M.; FARQUHAR, C. Drugs for Dysmenorrhea. In: **Gynecological Drug Therapy**. CRC Press, p. 35-46, 2016.

QU, M.; LU, P.; BEVELL, K.; FOGARTY, K.; LIFSHITZ, L.; SHI, F.; ZHUGE, R. Smooth muscle cell-specific TMEM16A deletion does not alter Ca²⁺ signaling, uterine contraction, gestation length or litter size in mice. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 2, p. 318-327, 2019.

QUAST, U.; COOK, N. S. *In vitro* and *in vivo* comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 250, n. 1, p. 261-271, 1989.

READ, P. W.; LIU, X.; LONGENECKER, K.; DIPIERRO, C. G.; WALKER, L. A.; SOMLYO, A. V.; NAKAMOTO, R. K. Human RhoA/RhoGDI complex expressed in yeast: GTP exchange is sufficient for translocation of RhoA to liposomes. **Protein Science**, v. 9, n. 2, p. 376-386, 2000.

REIS, M. M. L. **Avaliação fitoquímica e potencial farmacológico do extrato etanólico bruto do caule de *Varronia globosa* (BORAGINACEAE)**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 227-239, 1996.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life sciences**, v. 67, n. 3, p. 251-259, 2000.

RODRIGUES, F.F.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; RODRIGUES, F.F.G.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.X.; CABRAL, M.E.S.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Composição química, atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Pharmacognosy**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 2012.

ROJAS, A.; CRUZ, S.; PONCE-MONTER, H.; MATA, R. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. **Planta Medica**, v. 62, n. 2, p.154-159, 1996.

ROLDÃO, E. F.; WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.

ROUGET, C.; BARDOU, M.; BREUILLER-FOUCHÉ, M.; LOUSTALOT, C.; QI, H.; NALINE, E.; LEROY, M. J. β_3 -Adrenoceptor is the predominant β -adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1644-1650, 2005.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. **Physiology**, v. 26, n. 3, p. 156-170, 2011.

SADDOUK, F. Z.; GINNAN, R.; SINGER, H. A. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle. In: **Advances in Pharmacology**. Academic Press, p. 171-202, 2017.

SADEGHI, N.; PAKNEZHAD, F.; NOOSHABADI, M. R.; KAVIANPOUR, M.; RAD, S. J.; HAGHIGHIAN, H. K. Vitamin E and fish oil, separately or in combination, on treatment of primary dysmenorrhea: a double-blind, randomized clinical trial. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 9, p. 804-808, 2018.

SADRAEI, H.; SAJJADI, S. E.; ASGHARI, G.; KHALILI, M. Effect of *Matricaria chamomilla* hydro-alcoholic and flavonoids rich extracts on rat isolated uterus. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 9, n. 1, 2020.

SAHIN, N.; KASAP, B.; KIRLI, U.; YENICERI, N.; TOPAL, Y. Assessment of anxiety-depression levels and perceptions of quality of life in adolescents with dysmenorrhea. **Reproductive Health**, v. 15, n. 1, p. 13, 2018.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y. Ca^{2+} -dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. **Circulation Research**, v. 93, n. 6, p. 548-556, 2003.

SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 126, n. 5, p. 559, 2003.

SAMY, A.; ZAKI, S. S.; METWALLY, A. A.; MAHMOUD, D. S. E.; ELZAHABY, I. M.; AMIN, A. H.; EISSA, A. I.; ABBAS, A. M.; HUSSEIN, A. H.; TALAAT, B.; ALI, A. S. The Effect of Zumba Exercise on Reducing Menstrual Pain in Young Women with Primary Dysmenorrhea: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 32, n. 5, p. 541-545, 2019.

SANBORN, B. M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press**, p. 305-314, 2007.

SANTOS, S. L. F.; SILVA ALVES, H. H.; BARROS, K. B. N. T.; PESSOA, C. V. USO de plantas medicinais nos serviços do Sistema Único de Saúde: uma revisão narrativa. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 5, n. 3, p. 63-80, 2016.

SARKER, M. A. K.; AKI, S.; YOSHIOKA, K.; KUNO, K.; OKAMOTO, Y.; ISHIMARU, K.; TAKUWA, Y. Class II PI3Ks α and β Are Required for Rho-Dependent Uterine Smooth Muscle Contraction and Parturition in Mice. **Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 235-248, 2018.

SAVINEAU, J. P.; MARTHAN, R. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 289-299, 1997.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. **Arzneimittel Forschung – Drug Research**, v. 33, p. 1268-1272, 1983.

SCHWORER, C. M.; COLBRAN, R. J.; KEEFER, J. R.; SODERLING, T. R. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin-binding domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 27, p. 13486-13489, 1988.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 263, 2018.

SEO, J.; LEE, D.; JO, H. G. Dangguijagyag-san for primary dysmenorrhea: A protocol for systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine**, v. 98, n. 50, p. e18345, 2019.

SHAKERI, A.; SAHEBKAR, A.; JAVADI, B. *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 204-228, 2016.

SHARIFI, F.; SIMBAR, M.; MOJAB, F.; MAJD, H. A. Comparison of the effects of *Matricaria chamomila* (Chamomile) extract and mefenamic acid on the intensity of premenstrual syndrome. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 20, n. 1, p. 81-88, 2014.

SHI, Y.; WU, D.; SUN, Z.; YANG, J.; CHAI, H.; TANG, L.; GUO, Y. Analgesic and uterine relaxant effects of isoliquiritigenin, a flavone from *Glycyrrhiza glabra*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1410-1417, 2012.

SHMYGOL, A.; GULLAM, J.; BLANKS, A.; THORNTON, S. Multiple mechanisms involved in oxytocin-induced modulation of myometrial contractility. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 7, p. 827-832, 2006.

SHRESTHA, D. B.; THAPA, S.; SINGH, R.; KHATIWADA, R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, A.; GURUNG, A. Presenting complaints in Gynecology Outpatient Department (OPD) and Prevalence and Assessment of Dysmenorrhea. **Medical Journal of Shree Birendra Hospital**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2017.

SILVA, T. S.; MELO, J. I. M. New synonym, new combination and typifications in *Varronia* (Cordiaceae, Boraginales). **Phytotaxa**, v. 411, n. 4, p. 293-300, 2019.

SIMON, L. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their risk: a story still in development. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, n. 3, 2013.

SLATER, D. M.; DENNES, W. J.; CAMPA, J. S.; POSTON, L.; BENNETT, P. R. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and-2 in human myometrium throughout pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 9, p. 880-884, 1999.

SMITH, R. P. The Role of Prostaglandins in Dysmenorrhea and Menorrhagia. In: **Dysmenorrhea and Menorrhagia**. Springer, Cham, p. 75-88, 2018.

SMYTH, E. M.; GROOSER, T.; FITZGERALD, G. A. Autacoides derivados dos lípidios: eicosanoides e fator ativador plaquetário. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER,

B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12º ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, 2012.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 164, n. 4, p. 437-448, 1998.

SOUZA, R. G.; TSENG, H.; GAGE, J. A.; MANI, A.; DESAI, P.; LEONARD, F.; LIAO, A.; LONGO, M. REFUERZO, J. S.; GODIN, B. Magnetically bioprinted human myometrial 3d cell rings as a model for uterine contractility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1-10, 2017.

STAPP, M. N. S. 2015. *Varronia*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105435>>. Acesso em: 17 nov. 2019.

SUBASINGHE, A. K.; HAPPO, L.; JAYASINGHE, Y. L.; GARLAND, S. M.; GORELIK, A.; WARK, J. D. Prevalence and severity of dysmenorrhoea, and management options reported by young Australian women. **Australian Family Physician**, v. 45, n. 11, p. 829-834, 2016.

SUN, L.; LIU, L. N.; LI, J. C.; LV, Y. Z.; ZONG, S. B.; ZHOU, J.; WANG, Z. Z.; KOU, J. P.; XIAO, W. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl inhibits oxytocin-induced uterine contraction *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 107-114, 2017.

SUN, L.; LIU, L.; ZONG, S.; WANG, Z.; ZHOU, J.; XU, Z.; DING, G.; XIAO, W.; KOU, J. Traditional Chinese medicine *Guizhi Fuling* capsule used for therapy of dysmenorrhea via attenuating uterus contraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 273-279, 2016.

SUT, N.; KAHYAOGU-SUT, H. Effect of aromatherapy massage on pain in primary dysmenorrhea: A meta-analysis. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 27, p. 5-10, 2017.

SUTAR, R.; YADAV, S.; DESAI, G. Yoga intervention and functional pain syndromes: a selective review. **International Review of Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 316-322, 2016.

TAHARA, M.; MORISHIGE, K. I.; SAWADA, K.; IKEBUCHI, Y.; KAWAGISHI, R.; TASAKA, K.; MURATA, Y. RhoA/Rho-Kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. **Endocrinology**, v. 143, p. 920-929, 2002.

TEASLEY, H. E.; JEONG, M. P.; KIM, T. H. A calcium-dependent phospholipase A₂ (cPLA₂) expression is regulated by MIG-6 during endometrial tumorigenesis.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 511, n. 1, p. 129-134, 2019.

TELFER, J. F.; LYALL, F.; NORMAN, J. E.; CAMERON, I. T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1995.

TIDOW, H.; NISSEN, P. Structural diversity of calmodulin binding to its target sites. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 21, p. 5551-5565, 2013.

TÖLKE, E. E. A. D.; MELO, J. I. M.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; LACCHIA, A. P. S. Leaf anatomy with emphasis on separation of two species of *Varronia* P.Br. (Cordiaceae) of the Brazilian semi-arid region. Springer. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 189-201, 2013.

TORTORIELLO, J.; MECKES-FISCHER, M.; VILLARREAL, M. L.; BERLIN, B.; BERLIN, E. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the Highland of Chiapas. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 57-66, 1995.

TOM, N.; ASSINDER, S. J. Oxytocin in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 2, p. 202-205, 2010.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 4, p. 797-806, 2000.

TRIGUEIRO, N. D. **Metabólitos secundários isolados de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. MILL**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

UVNÄS-MOBERG, K.; EKSTRÖM-BERGSTRÖM, A.; BERG, M.; BUCKLEY, S.; PAJALIC, Z.; HADJIGEORGIOU, E.; KOTŁOWSKA, A.; LENGELER, L.; KIELBRATOWSKA, B.; LEON-LARIOS, F.; MAGISTRETTI, C. M.; DOWNE, S.; LINDSTRÖM, B.; MAGISTRETTI, C. M. Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth—a systematic review with implications for uterine contractions and central actions of oxytocin. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 19, n. 1, p. 285, 2019.

VELOSO, C. A. G. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J. S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial**. 2018. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

VELOSO, C. A. G.; FIGUEIREDO, I. A. D.; SILVA, G. R.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; CAVALCANTE, F. A.; COSTA, V. C. O. Flavonoids from *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract. **Natural Product Research**, v. 34, p. 1-5, 2020a.

VELOSO, C. A. G.; SOUZA, P. H. S.; NÓBREGA, F. P.; DE MEDEIROS, A. C. D.; FECHINE, I. M.; DE MELO, J. I. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; OLIVEIRA COSTA, V. C. Composição química do óleo essencial de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill e sua atividade antibiofilme. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 12887-12898, 2020b.

VERRI, A. M.; MOURA, A. A.; DE MOURA, V. M. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais providos de plantas medicinais. **Revista Uningá Review**, v. 30, n. 1, p. 55-61, 2018.

VILELA M. G; SANTOS-JUNIOR J. L. S; SILVA J. G. C. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. **Femina**, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

VIVAT, V.; COHEN-TANNOUDJI, J.; REVELLI, J. P.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J. P.; MALTIER, J. P.; LEGRAND, C. Progesterone transcriptionally regulates the beta 2-adrenergic receptor gene in pregnant rat myometrium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 7975-7978, 1992.

WANDERLEY, L. S. M.; SILVA, L. V. L. A.; CEZAR, L. M.; DIAS, F. O. C.; GALDINO, P. K. S.; ARAÚJO, I. M. Uso de plantas medicinais por indivíduos da comunidade do Valentina-PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 13, n. 2, p. 99-105, 2015.

WANG, S.; DUAN, H.; ZHANG, Y.; LIU, J. J. Expression of RhoA and Rho kinase in junctional zone of human adenomyosis and its relationship with dysmenorrheal. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 48, n. 12, p. 911-915, 2013.

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 10, p. 629-638, 2002.

WILSON, T.; LIGGINS, G. C.; WHITTAKER, D. J. Oxytocin stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandin F_{2α} from human decidual cells. **Prostaglandins**, v. 35, n. 5, p. 771-780, 1988.

WONG, C. L.; FARQUHAR, C.; ROBERTS, H.; PROCTOR, M. Oral contraceptive pill as treatment for primary dysmenorrhoea. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1-50, 2009.

WOODCOCK, N. A.; TAYLOR, C. W.; THORNTON, S. Effect of an oxytocin receptor antagonist and rho kinase inhibitor on the [Ca²⁺]_i sensitivity of human myometrium. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 1, p. 222-228, 2004.

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

WOOLDRIDGE, A. A.; MACDONALD, J. A.; ERDODI, F.; MA, C.; BORMAN, M. A.; HARTSHORNE, D. J.; HAYSTEAD, T. A. J. Smooth muscle phosphatase is regulated *in vivo* by exclusion of phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by

phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34496-34504, 2004.

WOOSLEY, J.; LICHSTEIN, K. L. Dysmenorrhea, the menstrual cycle, and sleep. **Behavioral Medicine**, v. 40, n. 1, p. 14-21, 2014.

WORD, R. A. Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. In: **Seminars in Perinatology**. WB Saunders, v. 19, n. 1, p. 3-14, 1995.

WORD, R. A.; STULL, J. T.; CASEY, M. L.; KAMM, K. E. Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 29-37, 1993.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, D.; NOBLE, K.; BORYSOVA, L.; ARROWSMITH, S. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. **Acta Physiologica**, v. 213, 417-431, 2015.

WRAY, S.; PRENDERGAST, C. The Myometrium: From Excitation to Contractions and Labour. In: **Smooth Muscle Spontaneous Activity**, v. 1124, p. 233-263, 2019.

WRAY, S.; SHMYGOL, A. Role of the calcium store in uterine contractility. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, v. 18, n. 3, p. 315-320, 2007.

YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E.; BYAM-SMITH, M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. **Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 1899-1902, 1993.

YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H.; BYAM-SMITH, M.; GARFIELD, R. E. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, n. 1, p. 175-185, 1994.

YANG, L.; CAO, Z.; YU, B.; CHAI, C. An *in vivo* mouse model of primary dysmenorrhea. **Experimental Animals**, p. 14-0111, 2015.

YAO, H.; LIU, J.; XU, S.; ZHU, Z.; XU, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 121-140, 2017.

YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1101, n. 1, p. 72-84, 2007.

YOUSEFI, M.; KAVIANPOUR, M.; HESAMI, S.; RASHIDI NOOSHABADI, M.; KHADEM HAGHIGHIAN, H. Effect of alpha-lipoic acid at the combination with mefenamic acid in girls with primary dysmenorrhea: randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Gynecological Endocrinology**, p. 1-5, 2019.

YULIA, A.; JOHNSON, M. R. Myometrial oxytocin receptor expression and intracellular pathways. **Minerva Ginecologica**, v. 66, n. 3, p. 267-280, 2014.

ZEGEYE, D. T.; MEGABIAW, B.; MULU, A. Age at menarche and the menstrual pattern of secondary school adolescents in northwest Ethiopia. **BMC Women's Health**, v. 9, n. 1, p. 29, 2009.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZHOU, Z. L.; IKEBE, M. New isoforms of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle. **Biochemical Journal**, v. 299, n. 2, p. 489-495, 1994.

Anexos

Anexo 1 – Cópia da certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do mecanismo de ação tocolítica de *Varronia dardani* (Boraginaceae): ensaios in vitro e in vivo em roedores", protocolada sob o CEUA nº 3864230519 (ID 000687), sob a responsabilidade de **Fabiana de Andrade Cavalcante e equipe; Indyra Alencar Duarte Figueiredo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 07/06/2019.

We certify that the proposal "Investigation the tocolytic action mechanism of the *Varronia dardani* (Boraginaceae): in vitro and in vivo assays in rodents", utilizing 96 Heterogenics rats (96 females), 94 Heterogenics mice (94 females), protocol number CEUA 3864230519 (ID 000687), under the responsibility of **Fabiana de Andrade Cavalcante and team; Indyra Alencar Duarte Figueiredo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 06/07/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 05/2019 a 07/2021

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **96**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **150 a 250 g**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **8 a 10 semanas**

N: **94**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas**

João Pessoa, 21 de julho de 2019

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 2 – Ficha de avaliação da atividade comportamental de VD-EtOH_F na dose de 2000 mg/kg (v.o.) (ALMEIDA, 1999).

SNC ESTIMULANTE	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Hiperatividade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsão					
Piloereção					
SNC DEPRESSOR	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Sedação					
Ataxia					
Catatonía					
Analgesia					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
Dispneia					
SN AUTONÔMICO	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Diarreia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tônus muscular					
Força pra agarrar					

OUTROS COMPORTAMENTOS	30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Ambulação					
Escalar					
Contorções abdominais					
Hemorragia					
Automutilação					
Vômito					
MORTE					

(0) Sem efeito (-) Efeito diminuído (+) Efeito aumentado

Anexo 3 – Fluxograma de realização do teste de toxicidade aguda com uma dose inicial de 2000 mg/kg.

