

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS

PAULA BENVINDO FERREIRA

**A ação tocolítica do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E.
Fries envolve a modulação positiva dos canais de potássio em
útero isolado de rata**

João Pessoa - PB

2014

PAULA BENVINDO FERREIRA

A ação tocolítica do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries envolve a modulação positiva dos canais de potássio em útero isolado de rata

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 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. Bagnólia Araújo da Silva

COORIENTADORA: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

João Pessoa - PB

2014

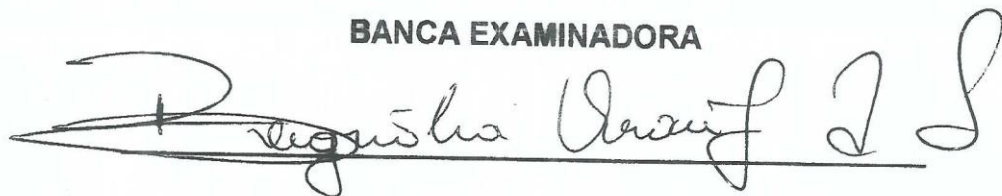
PAULA BENVINDO FERREIRA

**A ação tocolítica do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E.
Fries envolve a modulação positiva dos canais de potássio em
útero isolado de rata**

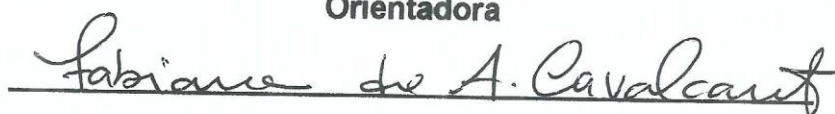
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal
da Paraíba como parte dos
requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA

Aprovada em 01/12/2014

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Orientadora



Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
Coorientadora

Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna

DEDICATÓRIAS

À Ana Cristina Benvindo e Sousa Ferreira e Almir da Costa Ferreira, por todo o esforço para me proporcionar uma boa educação, pelo apoio nas minhas decisões, pela educação e princípios e pelo lar sempre cheio de alegria. Obrigada por serem a minha referência em tudo nessa vida, meus exemplos e minha fortaleza. Todas as minhas conquistas sempre serão dedicadas a vocês.

Aos meus amados irmãos Pablo Benvindo Ferreira e Sávio Benvindo Ferreira. A vida nos reapproximou fisicamente, para que pudéssemos nos ajudar e aumentar ainda mais o nosso amor. Obrigado por todo o carinho e cuidado que tiveram comigo desde sempre. Essa conquista também é dedicada a vocês.

Por sempre acreditarem nos meus sonhos, a vocês eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu porto seguro. Por nunca me deixar pensar em desistir, dar-me sempre coragem para enfrentar todos os problemas que aparecem na minha vida e, principalmente, por ter feito meus caminhos coincidirem com o de todos abaixo. Sem tua força, ó Pai, não sou nada.

A minha orientadora Bagnólia Araújo da Silva por inicialmente ter aceitado o desafio da minha orientação, mesmo sem me conhecer, pelos incansáveis ensinamentos, pelo exemplo de mestre incontestável que me motiva todos os dias. Por fazer meus olhos “brilharem” ao assistir uma aula, de uma maneira única. Pela oportunidade de estar aprendendo e reaprendendo sempre.

A minha coorientadora Fabiana Cavalcante, pelo apoio incondicional para a execução desse trabalho. Por tirar todas as minhas dúvidas da maneira mais suave possível, por me orientar sobre a melhor maneira para conduzir as situações adversas, por se dividir em mil e, mesmo assim, ainda conseguir ajudar com tanta competência.

Aos Professores Doutores Josean Fachine Tavares e Marcelo Sobral da Silva, e ao Doutor Vicente Carlos de Oliveira Costa por cederem o óleo essencial para a realização desse trabalho.

Aos professores Robson Cavalcante Veras, Bárbara Viviana de Oliveira Santos e Darlene Camati Persuhn por aceitarem fazer parte dessa importante etapa da minha formação, mesmo com o curto prazo a que lhes foi proposto.

À Iara Luna pelas primeiras orientações no “novo” laboratório e à Maria da Conceição pelo acompanhamento nos primeiros experimentos e por sempre estar disponível para sanar qualquer dúvida.

À Joedna Cavalcante e Renata Sampaio pela ajuda mais que fundamental, principalmente, na conclusão dessa etapa, por sempre me acalmarem e por todo o encorajamento. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por nunca me deixarem sozinha.

À Italo Rossi pela ajuda desde a confecção do projeto e durante todas as etapas desse processo. Obrigada pelas orientações de extrema valia a

qualquer hora sem reclamar. Todas foram de extrema importância para o meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os membros do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, os “relaxados”: Aline de Freitas Brito, Ana Caroline de Lima Silva, Barbara Cavalcanti, Cibelle Melo, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iara Leão Luna de Souza, Indyra Figueiredo, Italo Rossi Roseno Martins, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Kimã Barbosa Meira, Luiz Henrique César Vasconcelos, Maria da Conceição Correia Silva, Millena de Melo Medeiros, Renata de Souza Sampaio e Sarah Rebeca Dantas Ferreira pela ajuda, boa convivência, sermões, elogios e pelo apoio característico do grupo.

A todos os colegas das turmas de Mestrado e Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), com quem convivi durante as disciplinas. Em especial, a Danilo Lemos, Diego Igor, Diogo Vilar, Luciano Leite, Mateus Feitosa, Tatiana Mota, Tatyane Kélvia, Viviane Mendes, Priscila Maciel e Rayssa Marques.

A minha irmã Siluana Benvindo, minhas tias maravilhosas e primos do coração, por sempre compartilharem das minhas alegrias e torcerem por mim.

Aos eternos farmacêuticos fantásticos Handerson Silva, Maria dos Remédios e Paôlla Policarpo pelo companheirismo dos cinco anos de graduação, por sempre compartilhar nossas conquistas e pelo incentivo constante.

As minhas amigas do coração: Aline Brito, Ana Caroline e Renata Sampaio. Sem perceber, a vida sempre nos aproxima dos “nossos”. Obrigada pela alegria e apoio com que levamos todas as situações dessa vida de pós-graduando. Minhas queridas meu coração tem uma área gigante ocupada por vocês. Nossos inesquecíveis momentos é que sempre me dão força e me fazem acreditar que eu nunca estou sozinha, que eu sempre tenho família, independente de onde eu esteja. Amo vocês.

Aos membros dos “legais sem futuro”: Ana Caroline, Danilo Lemos, Sávio Benvindo e Tassiana Dantas. Obrigada por me acolherem nesse grupo e pelos ótimos momentos que compartilhamos até aqui. Os “Sem futuro” agora “Com futuro” ainda terão muitas histórias pra contar, seja, aqui na Paraíba, nos Estados Unidos ou em qualquer lugar. Amo vocês!

Em todas as etapas pelas quais passei, sempre encontrei anjos no meu caminho. Aqui para a Paraíba, Deus fez com que o meu caminho cruzasse com o de Elaine Figueiredo e Virgínia Prado. Minhas loiras lindas, obrigada pelo companheirismo, pelos inúmeros momentos felizes que passamos juntas, pelo apoio que sempre damos umas para as outras. Nossa história só está no começo...

Amizade é e sempre será amizade, mesmo que a distância separe... As minhas amigas piauienses de toda uma vida: Arielle Sampaio, Ely Bacelar, Irnaelle Viana, Isabela Paz, Isabelle Viana, Ivanielle Viana e Larissa Gonçalves. Obrigada por todo o carinho e companheirismo que sempre tiveram comigo, por suportar a saudade e a minha ausência nos momentos mais atribulados e por sempre torcerem pela minha felicidade.

A José Crispim Duarte, pela forma que conduz o Biotério “Prof. Thomas George”, pelo auxílio técnico ao Laboratório de Farmacologia Funcional, sempre que solicitado.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado no Biotério e pela prestatividade em separar os animais quase que diariamente.

À Mônica R. da Silva, pelo seu trabalho na limpeza, por toda a alegria que transmite e contagia a todos. Muito obrigada pelos diálogos confortantes logo no início do dia, por sempre estar torcendo pelo sucesso dos nossos experimentos.

À Sra. Luzinete, pelo trabalho na limpeza de material e equipamentos úteis à rotina do laboratório.

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

À Universidade Federal do Piauí, instituição que me formou como profissional de Farmácia e responsável pelo meu aperfeiçoamento profissional.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a produção dessa Dissertação de Mestrado.

RESUMO

RESUMO

A espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, conhecida popularmente como “pinha-brava”, “bananinha” e “pereiro”, é utilizada tradicionalmente como digestiva. Das folhas dessa espécie foi extraído o óleo essencial (RL-OE), que, em estudos anteriores, apresentou atividade tocolítica frente às contrações fásicas induzidas por carbacol (CCh) ou ocitocina em útero isolado de rata. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o mecanismo de ação tocolítica do RL-OE, por meio de metodologias funcionais. Como os mecanismos para indução da contração fásica são diferentes dos que mantém a tônica, decidiu-se verificar se o RL-OE relaxaria o útero pré-contraído com KCl ou ocitocina. O óleo relaxou o útero pré-contraído com 60 mM de KCl ($CE_{50} = 22,4 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) ou com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($CE_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), sendo mais potente para ocitocina. Em seguida, hipotetizou-se que o RL-OE estaria antagonizando os receptores de ocitocina, sendo essa hipótese confirmada, uma vez que, observou-se a inibição das curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina, desviando-as para a direita, de maneira não paralela e com redução do seu E_{max} , descartando-se um antagonismo do tipo competitivo. A participação dos receptores adrenérgicos foi avaliada. Para isso, utilizou-se a fentolamina, um antagonista dos receptores α , entretanto não houve alteração da potência tocolítica do RL-OE, sendo descartado o antagonismo desse receptor. Também utilizou-se o propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos β , constatando-se que a curva de relaxamento, na presença do bloqueador, foi desviada para a esquerda, com potencialização do RL-OE, descartando a ativação desses receptores. Outras vias que modulam a função contrátil do miométrio uterino são as vias do óxido nítrico (NO) e da ciclo-oxigenase (COX). Investigou-se a participação dessas vias no mecanismo de ação do óleo essencial utilizando L-NAME e indometacina, inibidores das vias do NO e da COX, respectivamente. Entretanto, o efeito do RL-OE não foi alterado na presença dos inibidores, descartando a participação dessas vias no seu mecanismo de ação tocolítica. Outra via investigada foi o modulação dos canais de K^+ . Para isso, utilizou-se bloqueadores não-seletivo e seletivos desses canais. A potência tocolítica do RL-OE ($CE_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) foi reduzida 2,2 vezes na presença de 5 mM de CsCl ($CE_{50} = 8,9 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$), bloqueador não seletivo desses canais, confirmando a participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do RL-OE. Para verificar qual(is) canal(is) de K^+ estariam envolvidos usou-se bloqueadores seletivos desses canais. O fato do TEA^+ 1 mM, bloqueador dos canais de K^+ de grande condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}); da apamina, um bloqueador dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}) e da glibenclamida, bloqueador dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) não alterarem o efeito tocolítico do RL-OE indica que os BK_{Ca} , SK_{Ca} e os K_{ATP} não estariam envolvidos em seu mecanismo de ação. Entretanto, a curva concentrações-resposta de relaxamento induzida pelo RL-OE foi desviada para direita na presença de 4-aminopiridina, bloqueador dos canais de K^+ dependentes de voltagem (K_v), com redução da potência tocolítica do RL-OE ($CE_{50} = 10 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), sugerindo o envolvimento dos K_v no mecanismo de ação tocolítica do RL-OE em útero de rata. Conclui-se que o RL-OE exerce efeito tocolítico modulando positivamente os canais de K^+ , especificamente os K_v , que bloqueariam de modo indireto os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), resultando no relaxamento da musculatura lisa uterina.

Palavras-chave: *Rollinia leptopetala*, óleo essencial, atividade tocolítica, útero de rata, canal de potássio.

ABSTRACT

Rollinia leptopetala R. E. Fries species, popularly known as “pinha-brava”, “bananinha” and “pereiro”, and traditionally cited as digestive. From *R. leptopetala* leaves was extracted an essential oil (RL-OE) that showed tocolytic effect in carbachol- (CCh) and oxytocin-induced phasic contractions on rat uterus. Thus, we aimed characterize the mechanism of tocolytic action of RL-OE using by functional techniques. Since the mechanisms to induce the phasic contractions are distinct from the tonic ones, we decided to evaluate whether RL-OE would relax rat uterus pre-contracted with KCl or oxytocin. The essential oil relaxed pre-contracted with 60 mM KCl ($EC_{50} = 22.4 \pm 2.4$ $\mu\text{g/mL}$) or 10^{-2} UI/mL oxytocin ($EC_{50} = 4.1 \pm 0.4$ $\mu\text{g/mL}$). After, it was hypothesized that RL-OE would antagonize oxytocin receptors, and this hypothesis was confirmed since cumulative concentration-response curves to oxytocin were inhibited, shifted to the right, in a non-parallel manner and with E_{max} reduction, discarding a competitive antagonism. The participation of adrenergic receptors was also evaluated. For this, phentolamine (an antagonist of α -receptors) was used, but none change in RL-OE tocolytic potency was observed, being discarded the involvement of this receptor. Additionally, propranolol (an antagonist of β -receptors) was used and the relaxation curve induced by RL-OE, in the blocker presence, was shifted to the left, with potentiation of oil effect and rejecting the hypothesis of β -receptors activation. Other pathways that modulate the myometrium contractility are nitric oxide (NO) and Cyclooxygenase (COX) pathways. The involvement of them in tocolytic mechanism of RL-OE was investigated using L-NAME and indomethacin, inhibitors of NO and COX pathways, respectively. However, RL-OE effect was not altered in the presence of inhibitors, discarding their contribution. The participation of K^+ channels was developed using non-selective and selective blockers of them. The tocolytic potency of RL-OE ($EC_{50} = 4.1 \pm 0.4$ $\mu\text{g/mL}$) was reduced 2.2 fold in the presence of 5 mM CsCl ($EC_{50} = 8.9 \pm 1.1$ $\mu\text{g/mL}$), a non-specific blocker K^+ channels, indicating participation of these channels. To investigate which subtypes of K^+ channels would be involved selective K^+ channels blockers were used. In the presence of 1 mM TEA⁺, blocker of large conductance calcium-activated K^+ channels (BK_{Ca}), apamin, blocker of small conductance calcium-activated K^+ channels (SK_{Ca}) and glibenclamide, blocker of ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}) did not changed the tocolytic action of RL-OE, showing that BK_{Ca} , SK_{Ca} and K_{ATP} are not involved. Interestingly, the relaxation curve induced by RL-OE was shifted to the right in the presence of 4-aminopyridine, blocker of voltage-gated K^+ channels (K_V), with reduction of RL-OE potency ($EC_{50} = 10 \pm 0.6$ $\mu\text{g/mL}$), indicating K_V participation in the mechanism of tocolytic action of RL-OE on rat uterus. Therefore, the tocolytic mechanism of RL-OE involves the positive modulation the K^+ channels, in special K_V subtypes, that indirectly blockade of voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_V) leading to uterine smooth muscle relaxation.

Keywords: *Rollinia leptopetala*, essential oil, tocolytic activity, rat uterus, potassium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Foto de <i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fries (A); detalhes de suas folhas (B)	28
Figura 2 - Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC β_1	33
Figura 3 - Papel dos canais de K^+ no tônus muscular liso miometrial.....	36
Figura 4 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (A) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B).....	53
Figura 5 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 300 nM de fentolamina e (C) de 300 nM de propranolol.....	58
Figura 6 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 100 μ M de L-NAME.....	61
Figura 7 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 μ M de indometacina.....	64
Figura 8 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl.....	67
Figura 9 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 1 mM de TEA $^+$ em útero de rata.....	70
Figura 10 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 100 nM de apamina em útero de rata.....	71
Figura 11 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 3 mM de glibenclamida em útero de rata.....	72
Figura 12 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em	

útero de rata pré-contráído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 3 mM de 4-aminopiridina em útero de rata..... 73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (▼) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (▽) em útero de rata.....	54
Gráfico 2 - Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (controle) (●) e na presença do RL-OE nas concentrações de 3 (○); 9 (■); 27 (□) e 81 (▲) µg/mL em útero de rata.....	56
Gráfico 3 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽), na presença (▼) de 300 nM de propranolol e (▼) de 300 nM de fentolamina em útero de rata.....	59
Gráfico 4 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (◆) de 100 µM de L-NAME em útero de rata	62
Gráfico 5 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (■) de 10 µM de indometacina em útero de rata.....	65
Gráfico 6 - Efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (▲) de 5 mM de CsCl em útero de rata.....	68
Gráfico 7 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (●) de 1 mM de TEA ⁺ em útero de rata.....	74
Gráfico 8 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (★) de 100 nM de apamina em útero de rata.....	74
Gráfico 9 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (◆) de 10^{-5} M de glibenclâmida em útero de rata.....	75
Gráfico 10 - Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (▽) e na presença (▲) de 3 mM de 4-aminopiridina em útero de rata.....	75

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).....	45
Tabela 2 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero de rata.....	54
Tabela 3 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (UI/mL) da ocitocina na ausência (controle) e na presença do RL-OE em útero de rata.....	56
Tabela 4 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (UI/mL) do RL-OE ausência (controle) e na presença de fentolamina e propranolol em útero de rata.....	59
Tabela 5 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (UI/mL) do RL-OE ausência (controle) e na presença de CsCl, apamina, TEA ⁺ , glibenclamida ou 4-aminopiridina em útero de rata.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

$[(Ca^{2+})_4-CaM]$	complexo cálcio-calmodulina
$[Ca^{2+}]_c$	concentração de Ca^{2+} citosólico
4-AP	4-aminopiridina
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
cAMP	monosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
CaM	calmodulina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
Ca_vT	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T
CCh	carbacol
CE₅₀	concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
COX	ciclo-oxigenase
CsCl	cloreto de cério
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
G_{i/o}	proteína G _i ou proteína G _o
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁

G_s	proteína G _s
GPCR	receptor acoplado à proteína G
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃ R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME	N ω nitro L arginina metil éster
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
OCI	ocitocina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGs	prostaglandinas
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLC	fosfolipase C
PLA₂	fosfolipase A ₂
PLD	fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RENAFITO	Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
Rho	pequena proteína G da família Rho
RL-OE	óleo essencial de <i>Rollinia leptopetala</i>

RyR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
SUR	receptor para sulfonilureia
SUS	Sistema Único de Saúde
TEA⁺	íon tetraetilamônio

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.....	23
1.1 Produtos Naturais.....	24
1.2 A Família Annonaceae.....	27
1.3 O gênero <i>Rollinia</i> e a espécie <i>Rollinia leptopetala</i> R. E. Fries.....	27
1.4 Óleos essenciais.....	29
1.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso.....	31
2 Objetivos.....	40
2.1 Gerais.....	41
2.2 Específicos.....	41
3 Material e métodos.....	42
3.1 Material.....	43
3.1.1 Produto-teste.....	43
3.1.2 Animais.....	43
3.1.3 Substâncias e reagentes.....	44
3.1.4 Soluções nutritivas.....	44
3.1.5 Equipamentos.....	45
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Preparação da solução-estoque.....	46
3.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do RL-OE em útero isolado de rata.....	46
3.2.2.1 Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina.....	46
3.2.2.2 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina.....	47
3.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	47
3.2.2.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	48
3.2.2.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	48
3.2.2.6 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	49

3.2.2.6.1 Efeito do RL-OE sobre às contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de TEA ⁺ , apamina, glibenclamida e 4-aminopiridina.....	49
3.3 Análise estatística	50
4 Resultados	51
4.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do RL-OE em útero isolado de rata.....	52
4.1.1 Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	52
4.1.2 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina.....	55
4.1.3 Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	57
4.1.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	60
4.1.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	63
4.1.6 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE.....	66
4.1.6.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA ⁺ , apamina, glibenclamida e 4-aminopiridina.....	69
5 Discussão	77
6 Conclusões	86
Referências	88
Anexo	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

Os produtos naturais são considerados como uma biblioteca natural de química combinatória que pode originar substâncias com diversidade química e farmacológica. No início do século XIX, F. W. Serturmer isolou a morfina do ópio, o que abriu as portas para uma nova era no uso de produtos naturais como medicamentos (WANG et al., 2011). A pesquisa em produtos naturais pelo seu potencial de cura vem desde os tempos antigos, e foi retomada e desenvolvida nos últimos anos (NABAVI et al., 2014; NABAVI et al., 2013).

Ao longo do século passado, um grande número de produtos naturais extraídos de plantas e de animais está associado com benefícios para a saúde, na prevenção e no tratamento de doenças (MORA-PALE et al., 2014). O termo "produtos naturais" é geralmente relacionado a metabólitos secundários produzidos por um organismo, os quais, na maioria dos casos, funcionam como mecanismos de defesa contra herbívoros, microrganismos e insetos. Uma variedade desses produtos, principalmente aqueles obtidos de fontes vegetais, contêm vários componentes ativos que são usados na área da saúde durante milhares de anos por uma fração significativa da população em diversas regiões do mundo (WANG et al., 2011).

Entre 70 e 95% das pessoas dos países em desenvolvimento usam medicamentos para a recuperação da saúde, e em algumas nações industrializadas o uso da medicina complementar é igualmente importante, como, por exemplo, Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70 a 90% das suas populações usam tratamentos complementares (WALJI; WIKTOROWICZ, 2013).

Atualmente, com o aumento da expectativa de vida, que chega a quase 75 anos de idade, e um aumento dos custos com os cuidados de saúde, estima-se que mais de 400 milhões de pessoas na América Latina usam a medicina tradicional, especialmente na atenção primária. Recentemente, um documento estratégico da OMS teve como objetivo abordar os novos desafios relacionados a essa prática, no qual exige que a equipe profissional responsável determine suas respectivas situações nacionais em relação à

Ferreira, P. B.

medicina complementar, e, em seguida, desenvolver e cumprir as políticas, regulamentos e diretrizes que refletem essas realidades (GUIDO et al., 2014).

No Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional nas comunidades indígena, quilombola, entre outros povos, seja pela transmissão oral entre gerações ou nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

O governo federal aprovou em junho 2006 o Decreto 5.813 que cria a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

De acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de maio de 2014, medicamento fitoterápico é aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não sendo considerado medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2014).

Quanto à comercialização de medicamentos fitoterápicos, as principais classes terapêuticas comercializadas no Brasil são indicadas como psicoléticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, antiespasmódicos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais e para auxiliar na circulação cerebral (VALEZE; BRENNAN, 2011). No Brasil, as especialidades farmacêuticas mais comercializadas são o Tebonin® e o Tanakan® (*Gingko biloba*) indicados para distúrbios vestibulares e cerebrais, o Laitan® (*Piper methysticum*) indicado

Ferreira, P. B.

como ansiolítico (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e o Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.) indicado como anti-inflamatório de uso tópico (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009).

No ano de 2008, o governo federal criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), com a finalidade de auxiliar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva e orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO). Ela é composta por uma lista de 71 espécies vegetais já utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, considerando o conhecimento tradicional e popular e os estudos químicos e farmacológicos disponíveis (BRASIL, 2012).

Nos últimos anos, a pesquisa de produtos naturais derivados de plantas medicinais têm progredido rapidamente na América Latina. Cerca de 30% de todas as drogas disponíveis como agentes terapêuticos são produtos naturais ou derivados deles (CALIXTO, 2005). Alguns motivos foram apresentadas para explicar o sucesso de produtos naturais na descoberta de drogas: alta diversidade química, criação de moléculas biologicamente ativas através da evolução e a semelhança estrutural com alvos proteicos em muitas espécies (FEHER; SCHMIDT, 2003).

Ainda nesse contexto, em uma extensa análise de novas drogas introduzidas entre 1981 e 2010, apenas 36% das 1073 novas entidades químicas podem ser classificadas como verdadeiramente sintéticas, ou seja, desprovida de inspiração natural na origem (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Diversas plantas medicinais têm sido utilizadas no tratamento de problemas menstruais, do parto ou relacionados à gravidez (ZHU et al., 2008), apresentando uma considerável variabilidade nos resultados obtidos (GRUBER; O'BRIEN, 2011). Apesar disso, considera-se os estudos científicos investigando os efeitos das plantas medicinais na fisiopatologia uterina, um campo vasto de investigação, sendo de grande interesse trabalhos que corroborem ou refutem as indicações tradicionais, a fim de conferir uma maior segurança ao seu emprego.

Dessa forma, estudos que investiguem as atividades farmacológicas atribuídas às plantas medicinais, conferindo um respaldo científico aos dados populares, são de suma importância para a ampliação do arsenal terapêutico

Ferreira, P. B.

ou descoberta de novas classes terapêuticas, a serem empregadas como ferramentas farmacológicas e/ou matéria-prima para a produção de medicamentos, a exemplo dos fitoterápicos, a serem utilizados nas enfermidades uterinas.

1.2 A Família Annonaceae

Dentre as famílias presentes na flora brasileira, merece destaque a família Annonaceae, uma das maiores famílias de angiospermas, com significativa contribuição para a diversidade de florestas de árvores tropicais em todo o mundo. Essa família pertence à ordem Magnoliales, possui distribuição pantropical, englobando 135 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (CHATROU; RAINER; MAAS, 2004; SOUZA; LORENZI, 2005).

No Brasil, essa família apresenta 29 gêneros e 388 espécies (MASS; LOBÃO; RAINER, 2012). No estado da Paraíba existem aproximadamente 7 gêneros e 12 espécies, sendo conhecidos pelos seus frutos comestíveis e espécies medicinais (PONTES; BARBOSA; MASS, 2004).

A família Annonaceae está distribuída nos trópicos onde crescem em baixas altitudes com o maior número de gêneros ocorrendo na América do Sul. O grande centro de distribuição da família é a região amazônica, as Guianas e o sudeste do Brasil. Suas espécies habitam as florestas de terra firme, as várzeas, os cerrados e os campos (SILVA; SILVA, 2006). Suas espécies são constituídas por plantas arbóreas ou arbustivas, sendo as trepadeiras também muito frequentes (HEGNAUER, 1964).

Do ponto de vista econômico, essa família possui importância considerável, como fonte de frutas, para a produção de álcool, além das plantas pertencentes aos gêneros *Cananga* e *Rollinia*, que são cultivadas por seus frutos comestíveis, e algumas plantas cujas sementes são utilizadas na produção de óleos comestíveis e sabão (LEBOEUF et al., 1982).

1.3 O gênero *Rollinia* e a espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries

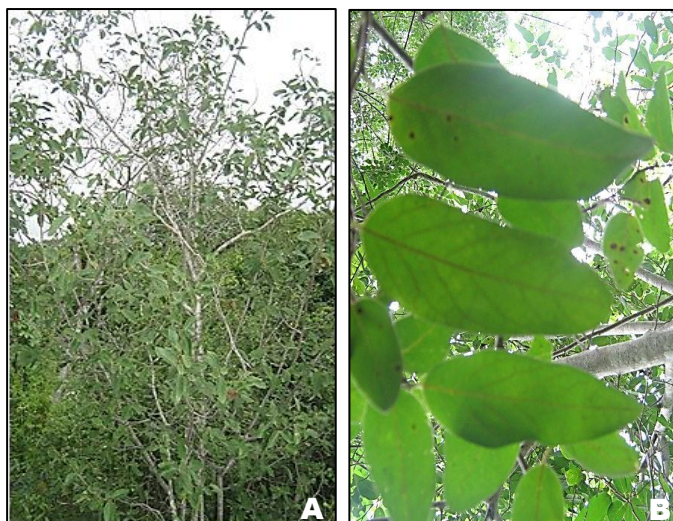
O gênero *Rollinia* que é formado por 65 espécies de ocorrência majoritária na América do Sul. Diversas atividades biológicas já foram descritas

Ferreira, P. B.

para espécies desse gênero, como: antitumoral e citotóxica para o extrato etanólico obtido das raízes de *Rollinia papilionella* Diels (DABRAH; SNEDEN, 1983), leishmanicida contra *Leishmania donovani* e *Leishmania braziliensis* para *R. emagrinata* (FEVRIER et al., 1999), antioxidante para o extrato dos frutos de *R. sylvatica* A. St.-Hil. (PEREIRA et al., 2013) e espasmolítica observada para o extrato metanólico obtido das folhas de *R. exsuka* (MONTEIRO et al., 2008).

A espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (Figura 1), uma árvore ou arbusto endêmico do Brasil, conhecido popularmente como “pinha-brava”, “bananinha” e “pereiro” (MAAS; VESTRA, 1992). Está distribuída geograficamente no Brasil pelos estados de Ceará, Paraíba, Piauí, Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro na região de vegetação de caatinga e é usada popularmente na região do cariri Paraibano como digestiva (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; COSTA, 2009).

Figura 1 – Foto de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (A); detalhes de suas folhas (B).



Fonte: TAVARES, 2007.

Constam na literatura alguns relatos de estudos fitoquímicos para essa espécie, onde foram isolados alcaloides (norisocoridina, 3-hidroxinornuciferina, discretamina, roemerina), sesquiterpenos (espatuleno e β -cariofileno), derivado caféico (cafeato de α -terpineol) (SETTE et al., 2000a,b; COSTA et al., 2012). Foi relatado também a composição química do óleo essencial das folhas de *R.*

Ferreira, P. B.

leptopetala, que apresenta 22 componentes, dos quais são majoritários o biciclogermacreno (22,47%), cis-4-tujanol (17,37%), α -terpineol (8,42%), germacreno D (7,72%), trans-cariofileno (6,63%) e guaiol (4,61%) (COSTA et al., 2008).

Quanto aos estudos de *R. leptopetala*, observou-se algumas atividades biológicas relevantes, tais como: antioxidante e citotóxica do extrato metanólico contra o microcrustáceo *Artemia salina* (DAVID et al., 2007), larvicida dos óleos essenciais obtidos das folhas e do caule, e do extrato metanólico das raízes frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* (FEITOSA et al., 2009), moduladora da ação do antibiótico norfloxacino frente às cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a esse antimicrobiano (COSTA et al., 2008). A partir do extrato metanólico das folhas evidenciou-se ação espasmolítica em íleo isolado de cobaia (MONTEIRO et al., 2008) e o mesmo efeito foi observado a partir do óleo essencial das folhas de *R. leptopetala* em aorta de rato, útero de rata, traqueia e íleo de cobaia, onde o mecanismo de ação espasmolítica neste último órgão envolve a modulação positiva dos canais de potássio (K^+) ativados por cálcio de alta condutância (BK_{Ca}) e dos canais de K^+ dependentes de voltagem (K_V), bloqueio dos canais de cálcio (Ca^{2+}) e redução do conteúdo citosólico de cálcio em miócitos intestinais da camada longitudinal de íleo de cobaia (CORREIA, 2013).

1.4 Óleos essenciais

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal (SIQUI et al., 2000). A utilização de óleos essenciais para fins de cura é conhecida na medicina popular desde a antiguidade (PERRY; PERRY, 2006; FRANZ, 2010), sendo muitos considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas (KELSEY; REYNOLDS; RODRIGUEZ, 1984).

São conhecidos mais de 3000 óleos essenciais, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria. Alguns dos componentes isolados dos óleos essenciais são usados em perfumes, produtos

Ferreira, P. B.

de maquiagem, produtos sanitários, odontológicos, agrícolas, conservantes e aditivos alimentícios, bem como, em remédios naturais (BAKKALI et al., 2008).

Nesse contexto, os óleos essenciais demonstram um grande potencial no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, juntamente com Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009). Além das várias atividades biológicas descritas, já existem resultados promissores quanto ao uso de produtos a base de óleos essenciais com indicação terapêutica, como por exemplo o Acheflan[®] produzido com extratos de “erva baleeira” (*Cordia verbenacea* DC.), contendo α -humuleno, cuja indicação é como anti-inflamatório de uso tópico para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais; o Rowachol[®], indicado para cálculos biliares e como colerético e colagogo, contendo borneol, α -pineno, cafeno, 1,8-cineol, mentona e mentol (HENRIQUE et al., 2009).

Diversas atividades farmacológicas foram descritas para os óleos essenciais. Dentre estas, pode-se destacar: antioxidante (KARIOTI et al., 2004), moduladora da resistência bacteriana do *Staphylococcus aureus* ao antibiótico norfloxacino (COSTA et al., 2008), larvicida contra as espécies de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (COSTA et al., 2005) e antileishmania e imunomoduladora (LÓPEZ; CUCA; DELGADO, 2009).

Além dessas atividades, é relatada atividade espasmolítica para diversos óleos essenciais, como os obtidos de *Ocimum gratissimum*, de espécies do gênero *Pelargoniums* (Geraniaceae) e o de *Perovskia abrotanoides* em íleo de cobaia (LIS-BALCHIN; HART; ROTH, 1997; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004; MADEIRA et al., 2005; SHAH et al., 2013), *Pterodon polygalaeflorus* em traqueia de rato (EVANGELISTA et al., 2007), *Casimiroa pringlei* em útero de rata (ZAVALA et al., 2008), *Xylopija langsdorfiana* e *Xylopija frutescens* em aorta de rato, útero de rata, traqueia e íleo de cobaia (CORREIA, 2013; SOUZA, 2014), *Lippia microphylla* em traqueia e íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013) e em útero de rata (SILVA, 2013).

1.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas ou seus derivados que atuem na musculatura lisa, já que esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos ocos dos sistemas do corpo. As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos, como os vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, vias aéreas e útero. Diante disso, a regulação da contração desse músculo apresenta um papel importante em muitos processos fisiopatológicos autonômicos. Por exemplo, a contração anormal é importante em condições, como a hipertensão arterial, vasoespasmos cerebrais e coronarianos, asma brônquica, disfunção erétil, dispepsia, diarreia, cólica intestinal e uterina, além de possíveis complicações no trabalho de parto (WEBB, 2003).

Em espécies não-primatas, o miométrio consiste em duas camadas distintas: uma camada longitudinal exterior e uma camada circular interna. No entanto, no ser humano, a subestrutura do miométrio não é tão bem definida (HUSZAR; NAFTOLIN, 1984). A espessura do miométrio é composta de feixes musculares entrelaçados que frequentemente envolvem numerosos vasos sanguíneos. Este arranjo histológico é fundamental para caracterizar a formação da placenta hemocorial característica de primatas (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

A reatividade do músculo liso uterino, em especial, possui um papel crítico na regulação e no controle da atividade contrátil do miométrio sendo que muitos problemas como abortos, partos prematuros, hemorragias pós-parto e cólicas uterinas estão associados a uma regulação anormal da contratilidade desse músculo (WORD, 1995; WRAY et al., 2001; SHMYGOL, WRAY, 2004).

No músculo liso, a contração pode ser obtida através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando a um aumento da concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$), ou induzida por um agonista (acoplamento fármaco-mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

A atividade uterina pode ser modulada por diversos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), a exemplo dos receptores acoplados à $G_{q/11}$ para ocitocina (OT), prostanoídes (FP e TP), endotelina (ET-A e ET-B). Os

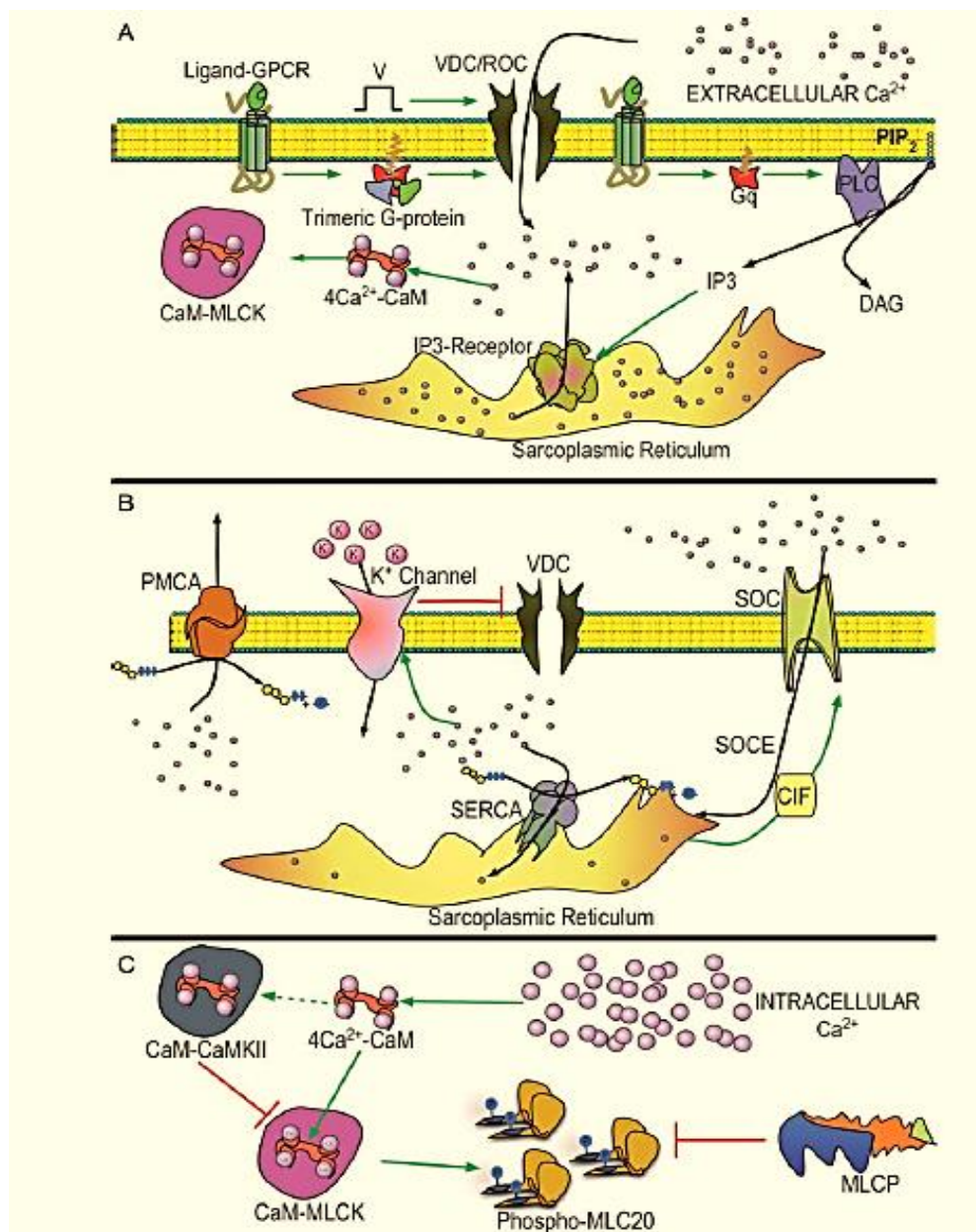
Ferreira, P. B.

receptores adrenérgicos α_1 também desempenham um papel importante na regulação da contratilidade do miométrio, havendo um aumento na densidade desses receptores no miométrio de ratas no final da gestação (MIHALYI et al., 2003). A ativação de GPCRs acoplados à $G_{q/11}$ levam a ativação da cascata da fosfolipase C, mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), estimulando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[Ca^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do RS ou estimular o influxo desse íon pelos múltiplos tipos de canais, incluindo canais de Ca^{2+} operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002). O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} à calmodulina (CaM) e este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) para fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e promover a interação de miosina com actina, levando a contração (Figura 2).

Entre os receptores metabotrópicos que modulam a atividade contrátil uterina, destacam-se os receptores OT. A ativação desses receptores nas células do músculo liso uterino, induzem a contração, por meio de um aumento do $[Ca^{2+}]_c$, e esse aumento deve-se a estimulação da proteína $G_{q/11}$ e da via da $PLC\beta_1$. Essa cascata é inibida por mecanismos que aumentem o cAMP intracelular, o que pode contribuir para a indução da latência uterina por agonistas β -adrenérgicos. Outra consequência da modulação positiva desses receptores é a ativação da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK) que, apesar de não afetar a mobilização intracelular induzida Ca^{2+} , tem sido relacionada com a inibição das contrações induzidas por ocitocina, através da ativação de ERK 1/2 que resulta em contração do miométrio (ZINGG; LAPORTE, 2003; WRZAL et al., 2012).

Ferreira, P. B.

Figura 2 – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



Fonte: AGUILAR; MITCHELL, 2010

Além dos GPCRs acoplados à $G_{q/11}$, outros subtipos de proteínas G participam da regulação dos processos de contração e relaxamento do músculo liso. Receptores que acoplam a G_s , tais como: adrenérgicos (β_2), prostanoides (EP_2 e IP), receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT $_7$) induzem o relaxamento uterino através do aumento dos níveis de monofosfato cíclico de

Ferreira, P. B.

adenosina (AMPc) no miométrio. Além disso, os receptores acoplados a $G_{i/o}$, como os adrenérgicos (α_2), os receptores da acetilcolina (M_2) e o $5-HT_1$ da serotonina potencializam a contratilidade por inibir a produção de AMPc (BERNAL, 2003).

O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel essencial a uma grande variedade de processos biológicos (CARAFOLI, 2007). No músculo liso, a causa primária para a produção da contração consiste no aumento da $[Ca^{2+}]_c$ (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula muscular lisa: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o RS que liberam Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

Nas células do músculo liso miometrial, os agonistas contráteis exercem a sua ação através da ativação dos receptores que promovem a liberação de Ca^{2+} via mensageiros secundários intracelulares. O útero possui ambos os receptores, receptor de IP_3 (IP_3R) e RyR , que promovem o aumento da concentração de Ca^{2+} para a sua função, desencadeando a resposta fisiológica, porém, os IP_3R são fisiologicamente mais importantes (WRAY; SHMYGOL, 2007).

A principal porta de entrada para o Ca^{2+} que vem do meio extracelular são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (CATTERALL, 2011), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Os Ca_v são complexos proteicos formados por 5 subunidades distintas: a subunidade α_1 , que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; as subunidades α_2 e δ estão ligadas por uma ponte de dissulfeto, formando um dímero, a subunidade β , intracelular e a subunidade γ , transmembranar. Essa família de canais de Ca^{2+} possui 10 membros, classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas (CATTERALL, 2011).

A entrada de Ca^{2+} em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura dos Ca_v (SHMIGOL;

Ferreira, P. B.

EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001). Os Ca_v1 ativados por alta voltagem e sensíveis à diidropiridinas são os principais subtipos de canal de Ca^{2+} expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

Na musculatura uterina, o subtipo de Ca_v mais presente são os Ca_v1 ou canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem de tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$). Além desse, o miométrio ainda possui outros tipos de Ca_v , incluindo nesse grupo os Ca_v3 ou canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T ($\text{Ca}_v\text{-T}$) que tem uma maior capacidade de condutância do que os Ca_v1 , sugerindo que esse tipo de canal desempenha um papel importante na propagação de potenciais de ação. Além disso, eles apresentam uma cinética de abertura mais rápida talvez por apresentarem limiar de excitação mais baixo do que os canais de Ca_v1 , o que pode ajudar a elevar o potencial para o limiar necessário para a ativação dos Ca_v1 e, conseqüentemente, desencadear o processo contrátil (WRAY et al., 2001; NOBLE et al., 2009; AGUILAR; MITCHELL, 2010).

O influxo dos íons Ca^{2+} pelos Ca_v são modulados pelos canais de potássio que desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular. Sendo assim, a contração do músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância, levando a hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao íon K^+ , ocasionando despolarização de membrana e conseqüente fechamento ou abertura dos Ca_v , respectivamente (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Dessa forma, a abertura dos canais de K^+ está associada com a manutenção do potencial de repouso e de inibição da atividade contrátil (VOGALIS, 2000b).

A hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por substâncias que abrem diretamente os canais de K^+ , como, por exemplo, a cromacalina, a levocromacalina e o nicorandil e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de K^+ da célula (GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização gerada pelo efluxo de íons K^+ reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 , diminuindo, portanto, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$, a fosforilação da miosina e, como conseqüência, levando ao relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

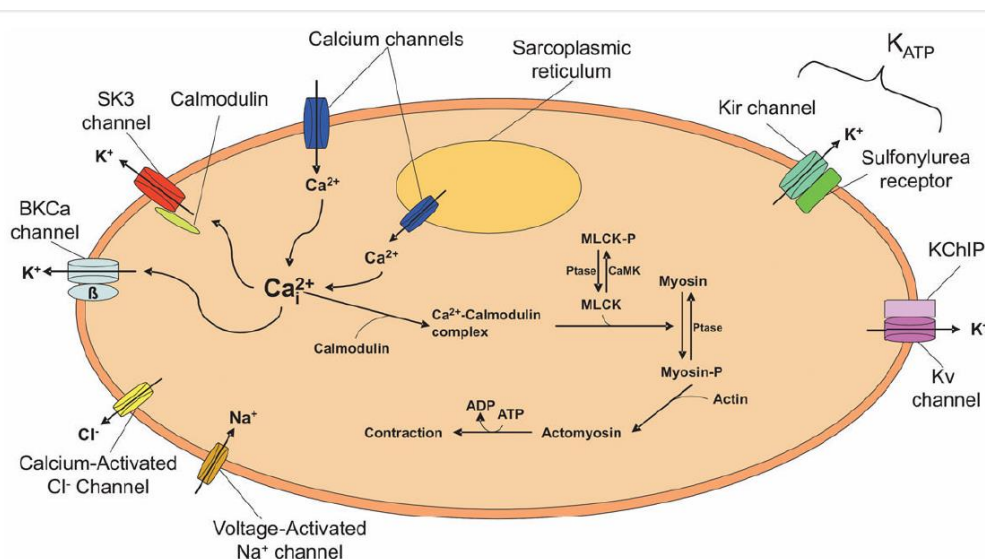
O tônus basal do músculo liso pode ser regulado por vários subtipos de canais de K^+ , dentre eles, os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), os canais

Ferreira, P. B.

de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), os canais de potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}), os canais de potássio sensíveis a voltagem (K_V), os canais de potássio retificadores de entrada (K_{ir}), entre outros (THORNELOE; NELSON, 2005). Todos estes subtipos de canais de K^+ foram detectados no miométrio humano (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

No miométrio, a repolarização ou hiperpolarização de membrana ocorre devido, principalmente, à ativação dos BK_{Ca} , que são regulados pela elevação da $[Ca^{2+}]_c$ na ordem de μM , e à ativação dos K_V , em decorrência da despolarização de membrana. Tal ativação leva a uma redução no influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da $[Ca^{2+}]_c$ (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007) (Figura 3).

Figura 3 – Papel dos canais de K^+ no tônus muscular liso miometrial.



Fonte: BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007.

Dentre os subtipos de canais de K^+ , os BK_{Ca} são os mais estudados em músculo liso uterino, devido à sua abundância e seu significativo papel para a repolarização. Apenas alguns BK_{Ca} precisam ser ativados para produzir relaxamento uterino; assim, esses canais podem ter significativos efeitos sobre a atividade do miométrio. Vários reguladores celulares com ações uterotônicas modulam este canal, demonstrando o seu grande papel fisiológico na indução do relaxamento do músculo liso em resposta à despolarização (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). A contribuição desse subtipo de canal à

Ferreira, P. B.

corrente total de K^+ na célula varia dependendo da fase gestacional. Em miócitos de ratas não-grávidas, esses canais contribuem com aproximadamente 35% de toda a corrente de repolarização de K^+ , no entanto, no final de gestação, medições eletrofisiológicas mostram que a perda de correntes geradas por BK_{Ca} é concomitante com um aumento na contribuição de outros subtipos de canais de K^+ para manter a quiescência uterina (WANG et al., 1998)

Os SK_{Ca} estão constitutivamente associados com a calmodulina, e sua abertura é mediada através da ligação do Ca^{2+} (XIA et al., 1998). Além da abertura, a calmodulina também está envolvida na expressão desses canais na membrana plasmática (LEE et al., 2001). Os SK_{Ca} surgiram recentemente como reguladores críticos da contratilidade do miométrio durante a gestação e trabalho de parto (BOND et al., 2000). No miométrio humano grávido e não-grávido, a apamina, um inibidor dos canais SK_{Ca} , atenua o relaxamento induzido pelo NO (MODZELEWSKA et al., 2003). Estudos têm demonstrado que a expressão SK_{Ca3} deprime as contrações fásicas do útero de rata, limitando o influxo de Ca^{2+} (BROWN et al., 2007).

Outro subtipo de canal de K^+ amplamente expresso em músculo liso uterino é o K_V . Em resposta à despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz a repolarização e a restituição do potencial de membrana das células musculares lisas do miométrio. Esses canais contribuem para a manutenção do potencial de repouso de membrana dos miócitos e podem desempenhar um papel na manutenção da quiescência uterina antes do parto (LUNDGREN et al., 1997).

Fenotipicamente, existem vários tipos de correntes de K_V dependentes de voltagem, que diferem na sua cinética e sensibilidade farmacológica (KNOCK; SMIRNOV; AARONSON, 1999). A subfamília canal K_V que parece desempenhar o papel mais predominante no miométrio durante a gravidez tem sido a subfamília K_V4 . Desta subfamília, o $K_V4.2$ e suas unidades acessórias aumentaram antes do parto, enquanto $K_V4.1$ e $K_V4.3$ diminuíram sua expressão durante a gestação sugerindo que fatores solúveis, possivelmente hormônios, regulam canais K_V4 na gravidez (SUZUKI T, TAKIMOTO K., 2001). Do mesmo modo, em células cultivadas do miométrio humano, 17β estradiol, mas não

Ferreira, P. B.

progesterona, aumentaram as correntes geradas quando Kv estavam inibidos (KNOCK et al., 2001).

Os K_v4 estão associados com diferentes subunidades em vários tecidos (YANG et al., 2001). Uma destas subunidades são as proteínas de ligação de cálcio (KChIPs) (AN et al., 2000). Duas isoformas de KChIP2 e 4 foram encontradas no miométrio (SUZUKI; TAKIMOTO, 2005). Em ratos, KChIP2 é ativada no final da gestação, e aumenta a densidade da membrana celular aos K_v4 canais por induzir a expressão de canais do retículo endoplasmático para a membrana celular. KChIP também altera cinética do canal para permitir uma maior atuação do mesmo (SHIBATA et al., 2003; AN et al., 2000). As proteínas KChIP podem desempenhar um papel significativo na redução da excitabilidade do miométrio e consequentemente diminuição das contrações uterinas.

Estudos funcionais indicam que os K_{ATP} têm um papel importante na regulação da quiescência miometrial durante a gravidez. O retificador para entrada de K^+ dessa família de canais é o Kir6, enquanto que o receptor sulfonilureia (SUR) é responsável pela sensibilidade ao ATP, propriedades farmacológicas (INAGAKI et al., 1996). Estudos demonstraram que Kir6.1/SUR2B é regulada negativamente no final da gravidez, o que poderia facilitar o aumento da atividade do miométrio necessária para as contrações (CURLEY et al., 2002). A superexpressão das subunidades Kir6.1 e SUR2B do K_{ATP} contribuem para uma inibição das contrações induzidas por ocitocina em útero de ratas grávidas (SAWADA et al., 2005). Da mesma forma, no útero humano, os K_{ATP} são principalmente compostos pelas subunidades Kir6.1 e SUR2B e expressos em níveis mais elevados no miométrio não-grávido em relação ao final da gestação. Estes resultados sugerem que em humanos, a sub-regulação dos canais K_{ATP} podem contribuir para o aumento da excitabilidade uterina e a indução de contrações na gravidez e em humanos, a expressão dos canais K_{ATP} no miométrio é dependente da fase gestacional (BRAINARD, 2007).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico do músculo liso incluem a fosforilação, via PKA ou PKG, de vários substratos, ocasionando: o aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando, assim,

Ferreira, P. B.

a captação e a liberação de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[\text{Ca}^{2+}]_c$; a inativação dos IP_3R , pela PKG, reduzindo sua capacidade de liberar o Ca^{2+} do RS; a diminuição da formação do IP_3 , levando à diminuição da liberação de Ca^{2+} do RS; a inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo 4Ca^{2+} -CaM, causando uma redução nos níveis de rMLC fosforilada e, dessa forma, do processo contrátil; a inibição dos Ca_v , causando uma redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por diminuir o influxo de Ca^{2+} e a ativação de canais de K^+ que, por repolarização ou hiperpolarização, causam o bloqueio dos Ca_v (DANILA; HAMILTON, 2004; DUTTA et al., 2002; WOODRUM; BROPHY, 2001).

Outra via que leva ao relaxamento muscular ocorre em função da liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio como, por exemplo, o óxido nítrico (NO) (REMBOLD, 1996). A regulação fisiológica do miométrio uterino sofre ação do NO, que pode participar na iniciação e controle do sangramento menstrual (JOHNSON et al., 2004) e a liberação basal de NO está envolvida na síntese de prostaglandinas, especialmente de PGE_2 (SIEMIENIUCH et al., 2009), por meio de uma reação de S-nitrosilação da fosfolipase A_2 (PLA_2) e ativação da ciclo-oxigenase 2 (COX 2) (XU et al., 2007).

As prostaglandinas (PGs) são ramificações de uma grande família de compostos endógenos biologicamente ativos (PAYTON; BRUCKER, 1999), membros da família dos eicosanoides, derivados do ácido araquidônico (AA) por meio da conversão do AA pela enzima ciclo-oxigenase (COX). As PGs têm sido apontadas como sendo mediadoras da regulação do estado de contração uterina e a dismenorreia primária está relacionada com um elevado nível de prostaglandina no período da menstruação (CHWALISZ; GARFIELD, 2000).

Diante do exposto, decidiu-se investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito tocolítico de *R. letopetala* (RL-OE), com a finalidade de melhor caracterizar os efeitos desse produto natural no músculo liso uterino e assim contribuir para o alívio ou combate de processos patológicos associados ao miométrio, como abortos, partos prematuros, hemorragias pós-parto e cólicas uterinas.

2 OBJETIVOS

Ferreira, P. B.

2.1 Gerais

Contribuir para o estudo farmacológico da família Annonaceae, em particular da espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries.

Caracterizar o mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE) em útero isolado de rata através de estudos funcionais.

2.2 Específicos

Investigar:

1. Efeito tocolítico do RL-OE sobre o útero pré-contraído com KCl ou ocitocina;
2. A característica do bloqueio das contrações induzidas por ocitocina pelo RL-OE;
3. A participação dos receptores adrenérgicos, das vias do óxido nítrico e da ciclo-oxigenase na ação tocolítica do RL-OE;
4. A participação dos canais de potássio e determinar o(s) subtipo(s) desse(s) canal(is) que participa(m) da atividade tocolítica do RL-OE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Produto-teste

A espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries foi coletada no município de Serra Branca, Paraíba, em agosto de 2007. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A exsicata da espécie *R. leptopetala* (Agra 3567) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB.

O óleo essencial das folhas obtido da espécie *R. leptopetala* (RL-OE) foi gentilmente cedido pelo grupo dos Profs. Drs. Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF)/CCS/UFPB e membros do setor de Fitoquímica do PPgPNSB. A constituição química do óleo essencial foi analisada e evidenciou-se que os componentes majoritários são: biciclogermacreno (22,47%), cis-4-tujanol (17,37%), α -terpineol (8,42%), germacreno D (7,72%), trans-cariofileno (6,63%) e guaiol (4,61%) (COSTA et al., 2008).

3.1.2 Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando entre 150 e 250 g foram utilizadas todas procedentes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração (Labina[®]) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura (22 ± 1 °C) controladas e constantes. Os experimentos eram realizados no período de 08 às 20 h, sendo todos os procedimentos realizados seguindo os princípios de cuidados com animais “Guidelines for the ethical use in applied etiology studies” (SHERWIN et al., 2003) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CBiotec (CEUA/CBiotec), certidão nº 0104/2014 (Anexo 1).

3.1.3 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e a glicose foram obtidos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Fmaia (Brasil). O ácido clorídrico (HCl) P.A. e o hidróxido de sódio (NaOH) P.A. ambos obtido da Nuclear (Brasil) .

A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil). Já o N ω -nitro-L-arginina metil éster L-NAME, o cloreto de cério (CsCl), o cloreto de tetraetilamônio (TEA^+), a glibenclamida, a apamina, a 4-aminopiridina (4-AP), o dietilestilbestrol, a indometacina, o propranolol, a fentolamina e o óleo de castor (Cremophor[®]) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque, excetuando-se o dietilestilbestrol, a indometacina e a glibenclamida, que foram dissolvidos em etanol absoluto. Quando necessário essas soluções foram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas a cada protocolo experimental.

A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

3.1.4 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados, era utilizada uma solução nutritiva (ajustada ao pH 7,4 com HCl ou NaOH 1 N), aerada com carbogênio e mantida a 32 °C, cuja composição está discriminada na tabela 1:

Ferreira, P. B.

Tabela 2 - Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Composição	Concentração (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,6
MgCl ₂	2,1
CaCl ₂	2,2
NaHCO ₃	6,0
Glicose	5,6

3.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca de inscrição frontal em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil). As cubas eram acopladas a uma bomba termostática modelo Polystat 12002 Cole-Palmer (Vernon Hills, IL, EUA) para o controle da temperatura.

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. O sistema continha uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica Marte[®] modelo AY220 e os animais em balança semianalítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação da solução-estoque

O RL-OE era solubilizado em Cremophor[®] (3% v/v) e diluído em água destilada até a concentração de 10 mg/mL. Essa solução era preparada diariamente, uma vez que óleos essenciais caracterizam-se pela presença de compostos voláteis. De acordo com a necessidade de cada protocolo experimental as soluções eram novamente diluídas em água destilada. A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), nessa concentração, o Cremophor[®] é desprovido de efeito relaxante ou contrátil significativo em útero de rata, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (dados não mostrados). As concentrações do óleo essencial eram utilizadas em múltiplos de 3 para obter-se as concentrações que produzissem de 0% ao seu efeito máximo (E_{max}).

3.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do RL-OE em útero isolado de rata

3.2.2.1 Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

Como descrito por Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (1997), as ratas eram tratadas 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea, para indução do estro, o qual era confirmado pela hiperplasia dos cornos uterinos observados no momento da dissecação do útero. Decorrido este tempo, as ratas eram eutanasiadas por decapitação em guilhotina. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke-Ringer a 32 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgão isolado (6 mL) e deixados em repouso sob tensão de 1 g durante 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da

Ferreira, P. B.

preparação. Durante esse tempo, a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos.

Após o período de estabilização, uma contração submáxima era obtida com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão e durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por 60 mM de KCl ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina, o RL-OE era adicionado à cuba de maneira cumulativa em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo óleo essencial foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. Os valores de $E_{\max}$ e CE_{50} foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e calculados pelo uso de regressão não linear.

3.2.2.2 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina

O útero era montado como descrito no item 3.2.2.1. A preparação era lavada e após 15 minutos eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina (10^{-6} – 10^{-1} UI/mL) de amplitudes similares. Em seguida, na ausência da ocitocina, o RL-OE era incubado por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença do óleo essencial, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina era obtida.

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do óleo essencial com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas-controle. O efeito inibitório do óleo essencial foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} (concentração molar de uma substância que promove 50% do seu efeito máximo) e do $E_{\max}$ da ocitocina calculados a partir das curvas concentrações resposta, na ausência e na presença do RL-OE.

3.2.2.3 Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O útero era montado como descrito no item 3.2.2.1. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com ocitocina e sobre o

Ferreira, P. B.

componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado de forma cumulativa (curva-controle). Em outros experimentos, era adicionado à cuba 300 nM de fentolamina, antagonista dos receptores α adrenérgicos ou 300 nM de propranolol, antagonista dos receptores β adrenérgicos e após 20 minutos uma contração era induzida com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o óleo era adicionado de forma cumulativa (SHY et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do óleo essencial foi comparada na ausência (controle) e na presença dos antagonistas.

3.2.2.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O útero era montado como descrito no item 3.2.2.1. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado de forma cumulativa (curva-controle). Em outros experimentos, era adicionado à cuba 100 μ M de L-NAME, inibidor da sintase do óxido nítrico, e após 20 minutos na presença do inibidor uma contração era induzida com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado de forma cumulativa (SHY et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do óleo essencial foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

3.2.2.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O útero era montado como descrito no item 3.2.2.1. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado de forma

Ferreira, P. B.

cumulativa (curva-controle). Em outros experimentos, era adicionado à cuba 10 μ M de indometacina, um inibidor da ciclo-oxigenase, e após 20 minutos uma contração era induzida com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o óleo era adicionado de forma cumulativa (SHY et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do óleo essencial foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor

3.2.2.6 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O útero era retirado e montado segundo o descrito no item 3.2.2.1. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado de forma cumulativa (curva-controle). Em outros experimentos, era adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (CECCHI et al., 1987; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), e após 20 minutos uma contração era induzida com ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração o óleo era adicionado de forma cumulativa

O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do bloqueador e comparados com os valores de CE_{50} do RL-OE na ausência do bloqueador.

3.2.2.6.1 Efeito do RL-OE sobre às contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de TEA^+ , apamina, glibenclamida e 4-aminopiridina

O útero era retirado e montado segundo o descrito no item 4.2.2.1. Após este período era induzida uma contração por adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico da contração era adicionado o RL-OE de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento, era adicionado 1 mM de

Ferreira, P. B.

tetraetilamônio (TEA^+), que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (HUANG, 1998; MURRAY et al., 1991), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (TSAI et al., 1998), 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997) e, 3 mM de 4-aminopiridina (AARONSON, 2006), por 20 minutos em preparações diferentes. Decorrido esse tempo, uma nova contração pela adição do agonista era induzida na presença do bloqueador. Durante a fase tônica da segunda contração, o RL-OE era adicionado cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} e do E_{max} do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do bloqueador.

3.3 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como a média e o e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste t não pareado ou a análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, cujos valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Como parâmetro de eficácia foi utilizado o E_{max} e como parâmetro de potência foram utilizados a CE_{50} e a CI_{50} , sendo estes últimos calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003).

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, U.S.A.).

4. RESULTADOS

Ferreira, P. B.

4.1 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do RL-OE em útero isolado de rata

4.1.1 Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

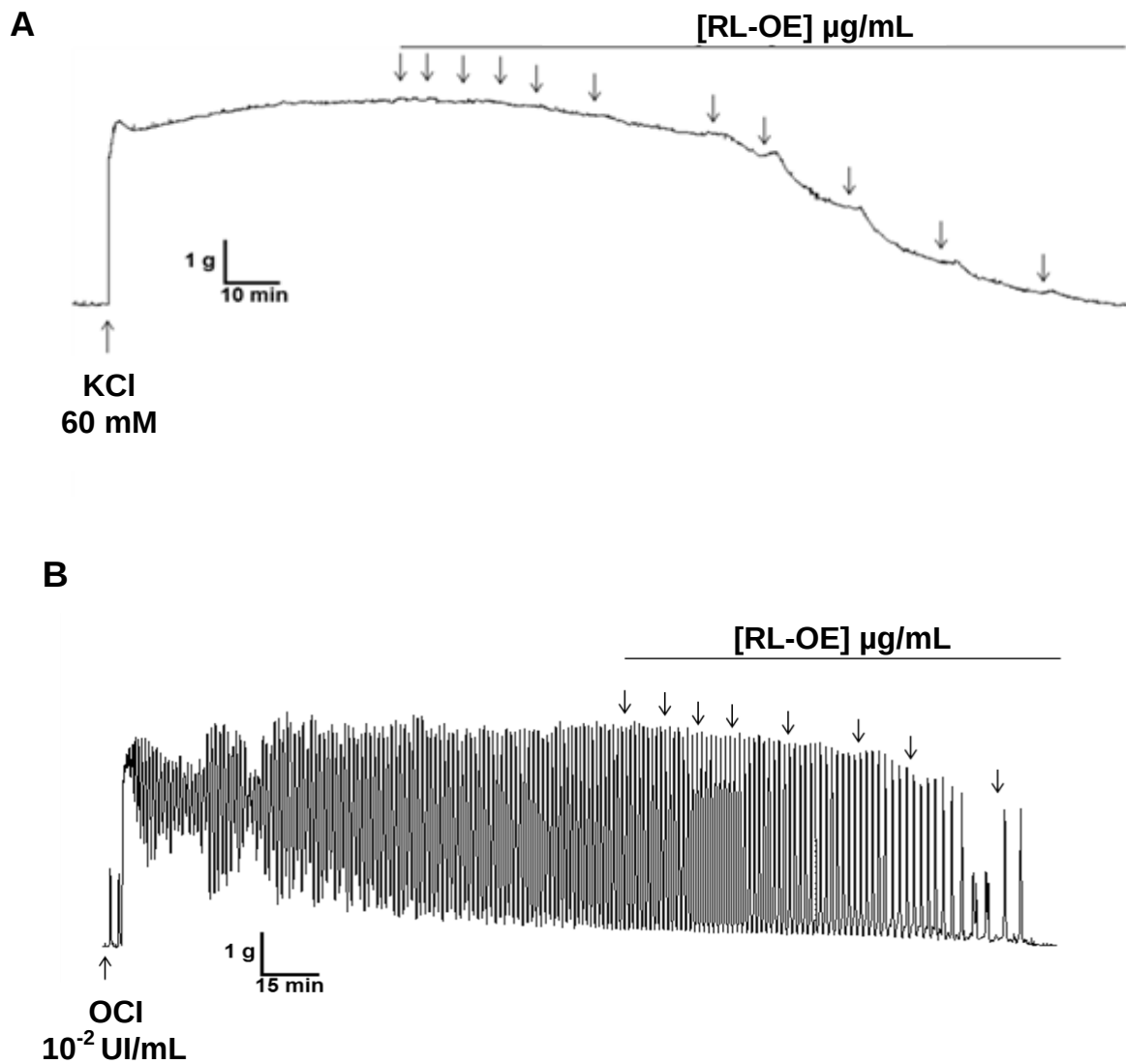
O RL-OE (0,01-729 ou 0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata (Figura 4) pré-contraído com 60 mM de KCl ($\text{CE}_{50} = 22,4 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) ou com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$), respectivamente. Com base nos valores de CE_{50} pode ser observado que o RL-OE foi 5,5 vezes mais potente em relaxar o útero pré-contraído com ocitocina quando comparado com o órgão pré-contraído com KCl (Tabela 2).

Os valores de E_{max} de $97,1 \pm 1,8$ e 100% do RL-OE foram atingidos na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$ e 27 $\mu\text{g/mL}$ quando as contrações foram induzidas por KCl e por ocitocina, respectivamente (Gráfico 1 e Tabela 2).

A responsividade do útero de rata à ocitocina foi 100% restaurada em $51,6 \pm 2,3$ minutos após a retirada do óleo essencial da cuba. Entretanto, essa responsividade não foi restaurada em até 2 horas em relação ao KCl.

Ferreira, P. B.

Figura 4 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contráido com 60 mM de KCl (**A**) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**).

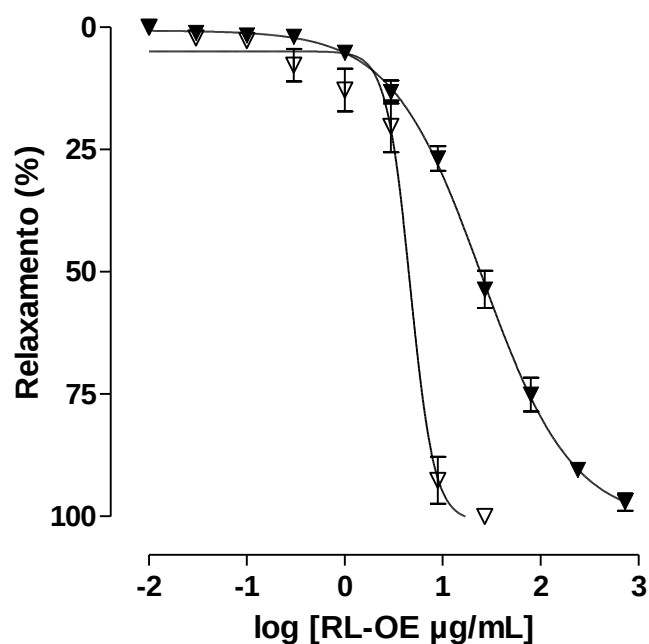


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ (**A**) e de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**B**), respectivamente, OCI = ocitocina.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Gráfico 1 – Efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (▼) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (▽) em útero de rata.



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

Fonte: FERREIRA, 2014.

Tabela 2 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero de rata.

Agentes contráteis	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
KCl	$97,1 \pm 1,8$	$22,4 \pm 2,4$
Ocitocina	100	$4,1 \pm 0,4$ ***

Teste t , *** $p < 0,001$ (KCl vs. ocitocina); $n = 5$.

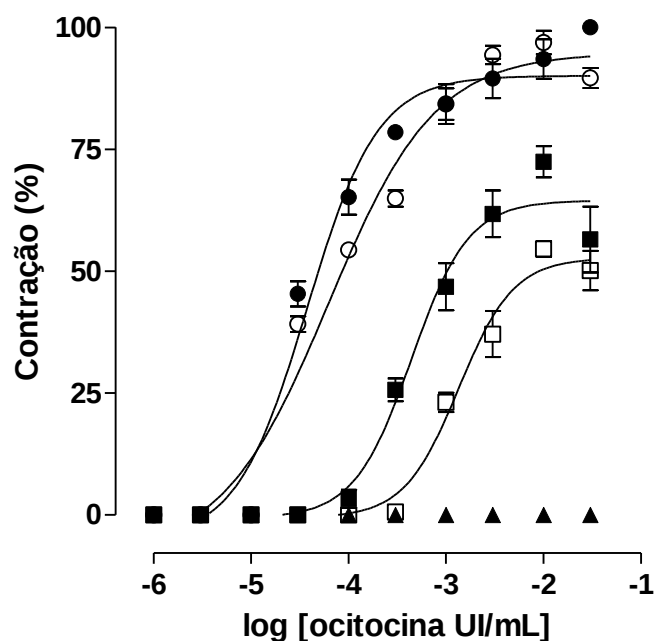
Fonte: FERREIRA, 2014.

4.1.2 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina

O RL-OE (9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por concentrações crescentes de ocitocina (Gráfico 2). As curvas cumulativas à ocitocina foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $96,9 \pm 2,4$; $72,7 \pm 3,3$; $55,4 \pm 1,6$; 0% na presença de 3, 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ do RL-OE, respectivamente (Gráfico 2 e Tabela 3). Os valores de CE_{50} da ocitocina passaram de $6,7 \pm 0,12 \times 10^{-5}$ UI/mL (controle) para $9,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$, $3,8 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ e $3,8 \pm 0,6 \times 10^{-4}$ UI/mL na presença de 3, 9, 27 $\mu\text{g/mL}$ do RL-OE, respectivamente (Tabela 3).

Ferreira, P. B.

Gráfico 2 - Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (controle) (●) e na presença do RL-OE nas concentrações de 3 (○); 9 (■); 27 (□) e 81 (▲) µg/mL em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, ****p* < 0,001 (Controle vs. RL-OE).

Fonte: FERREIRA, 2014.

Tabela 3 - Valores de E_{max} (%) e de CE_{50} (UI/mL) da ocitocina na ausência (controle) e na presença do RL-OE em útero de rata.

RL-OE (µg/mL)	E_{max} (%)	CE_{50} (UI/mL)
Ausência	100	$6,7 \pm 0,12 \times 10^{-5}$
3	$96,9 \pm 2,4$	$9,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
9	$72,7 \pm 3,3^{***}$	$3,8 \pm 0,3 \times 10^{-5*}$
27	$55,4 \pm 1,6^{***}$	$3,8 \pm 0,6 \times 10^{-4***}$
81	$0,0^{***}$	Nd

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, **p* < 0,05; ****p* < 0,001 (controle vs. RL-OE); Nd = não determinado; n = 5.

Fonte: FERREIRA, 2014.

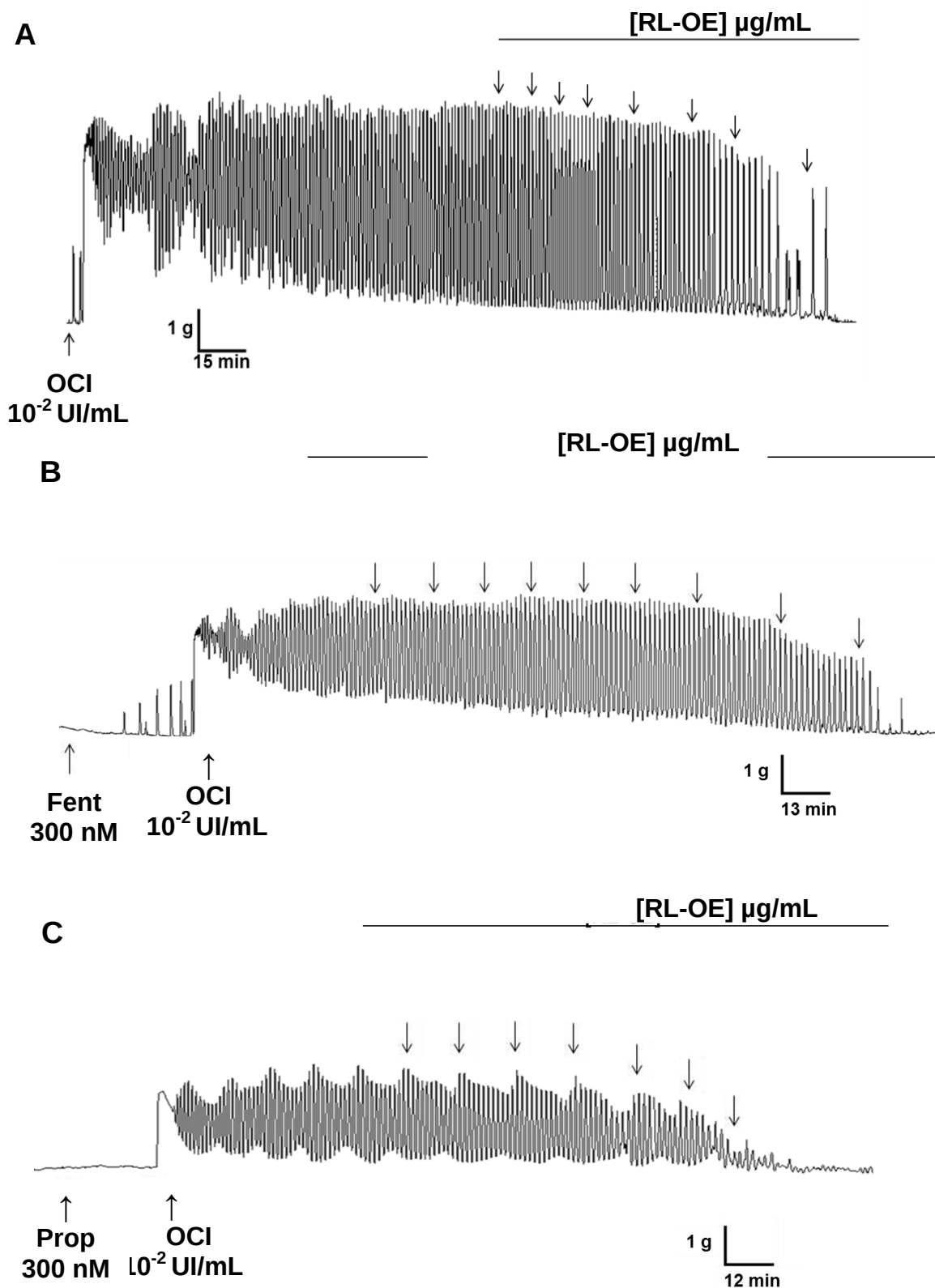
4.1.3 Avaliação do envolvimento dos receptores adrenérgicos no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O RL-OE (0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$, Figura 5A) relaxou o útero de rata pré-contráído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência e na presença de 300 nM de fentolamina ($n = 3$, Figura 5B), um antagonista dos receptores α adrenérgicos. Entretanto, a potência relaxante do óleo ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) não foi alterada quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na presença do antagonista ($\text{CE}_{50} = 3,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 3, tabela 4).

Por outro lado, o RL-OE (0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$, Figura 7A) relaxou o útero de rata pré-contráído por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência e na presença de 300 nM de propranolol ($n = 5$, Figura 5C), um antagonista dos receptores β adrenérgicos. A potência relaxante do óleo ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) foi potencializada cerca de 3 vezes na presença de propranolol ($\text{CE}_{50} = 1,4 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 3, tabela 4).

Ferreira, P. B.

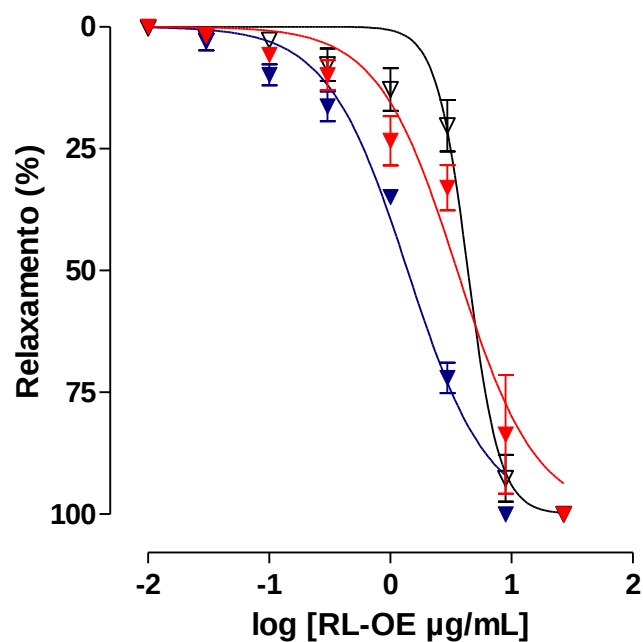
Figura 5 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contráido com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 300 nM de fentolamina e **(C)** de 300 nM de pro



As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ **(A e B)** e de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 9 $\mu\text{g/mL}$ **(C)** respectivamente, Fent = fentolamina, Prop = propranolol, OCI = ocitocina.

Ferreira, P. B.

Gráfico 3 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇), na presença ($\blacktriangledown$) de 300 nM de fentolamina e ($\blacktriangledown$) de 300 nM de propranolol, em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3, 5$).

Fonte: FERREIRA, 2014.

Tabela 4 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do RL-OE ausência (controle) e na presença de fentolamina e propranolol em útero de rata.

Bloqueadores	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ausência	100	$4,1 \pm 0,4$
Fentolamina	100	$3,5 \pm 0,4$
Propranolol	100	$1,4 \pm 0,05^{**}$

Teste t , $** p < 0,01$ (ocitocina vs. bloqueadores); $n = 5, 3$.

Fonte: FERREIRA, 2014.

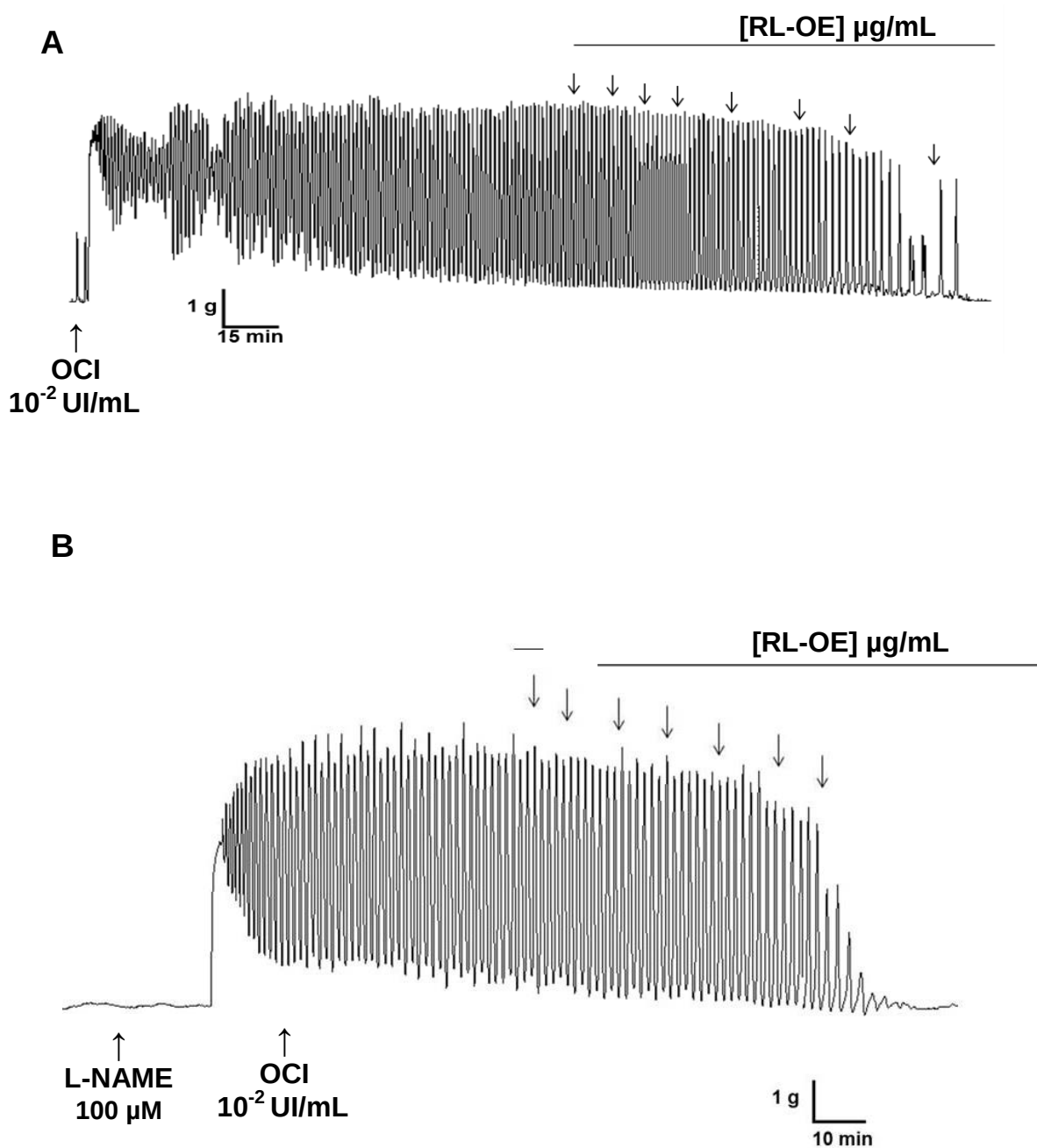
Ferreira, P. B.

4.1.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O RL-OE (0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) relaxou o útero de rata pré-contraído por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência e na presença (0,01-9 $\mu\text{g/mL}$, $n = 4$) de 100 μM de L-NAME, um inibidor da via do óxido nítrico (Figura 6). Entretanto, a potência relaxante do óleo ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) não foi alterada quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na presença de L-NAME ($\text{CE}_{50} = 2,8 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 4).

Ferreira, P. B.

Figura 6 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 100 μ M de L-NAME.

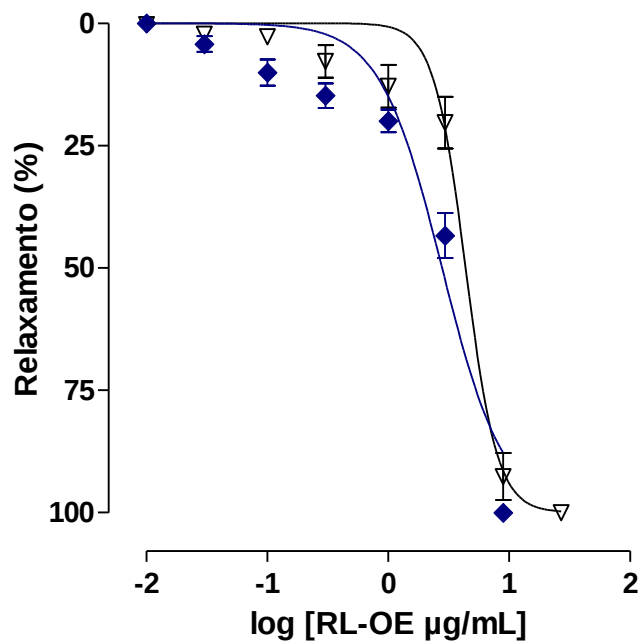


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 μ g/mL **(A)** e de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 9 μ g/mL **(B)** respectivamente, OCI = ocitocina.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Gráfico 4 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\blacklozenge$) de 100 μ M de L-NAME em útero de rata.



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

Fonte: FERREIRA, 2014.

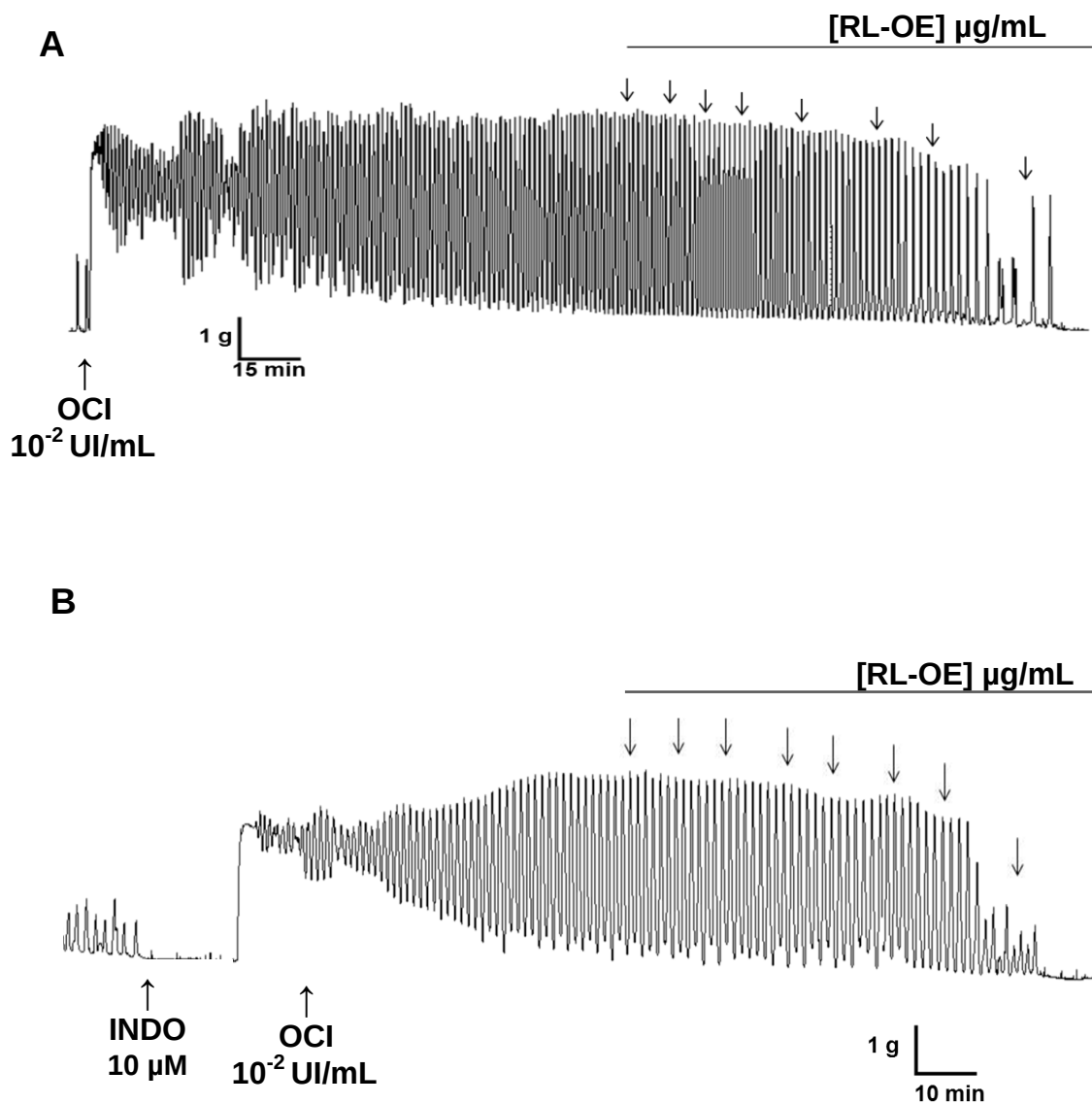
Ferreira, P. B.

4.1.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

A curva de relaxamento do RL-OE (0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) não foi alterada na presença de 10 μM de indometacina, um inibidor da via da ciclo-oxigenase (Figura 7, $n = 4$). Analisando os valores do CE_{50} foi observado que não houve diferença significativa entre seus valores na ausência ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) e na presença de indometacina ($\text{CE}_{50} = 2,9 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 5).

Ferreira, P. B.

Figura 7 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contráido com 10^{-2} M de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de $10 \mu\text{M}$ de indometacina.

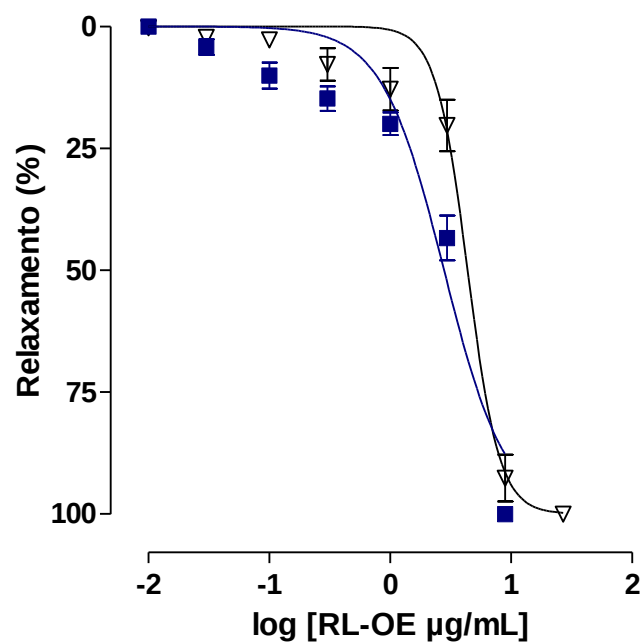


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e $27 \mu\text{g/mL}$ **(A e B)** respectivamente, OCI = ocitocina e Indo = indometacina.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\blacksquare$) de 10 μ M de indometacina em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5, 4).

Fonte: FERREIRA, 2014.

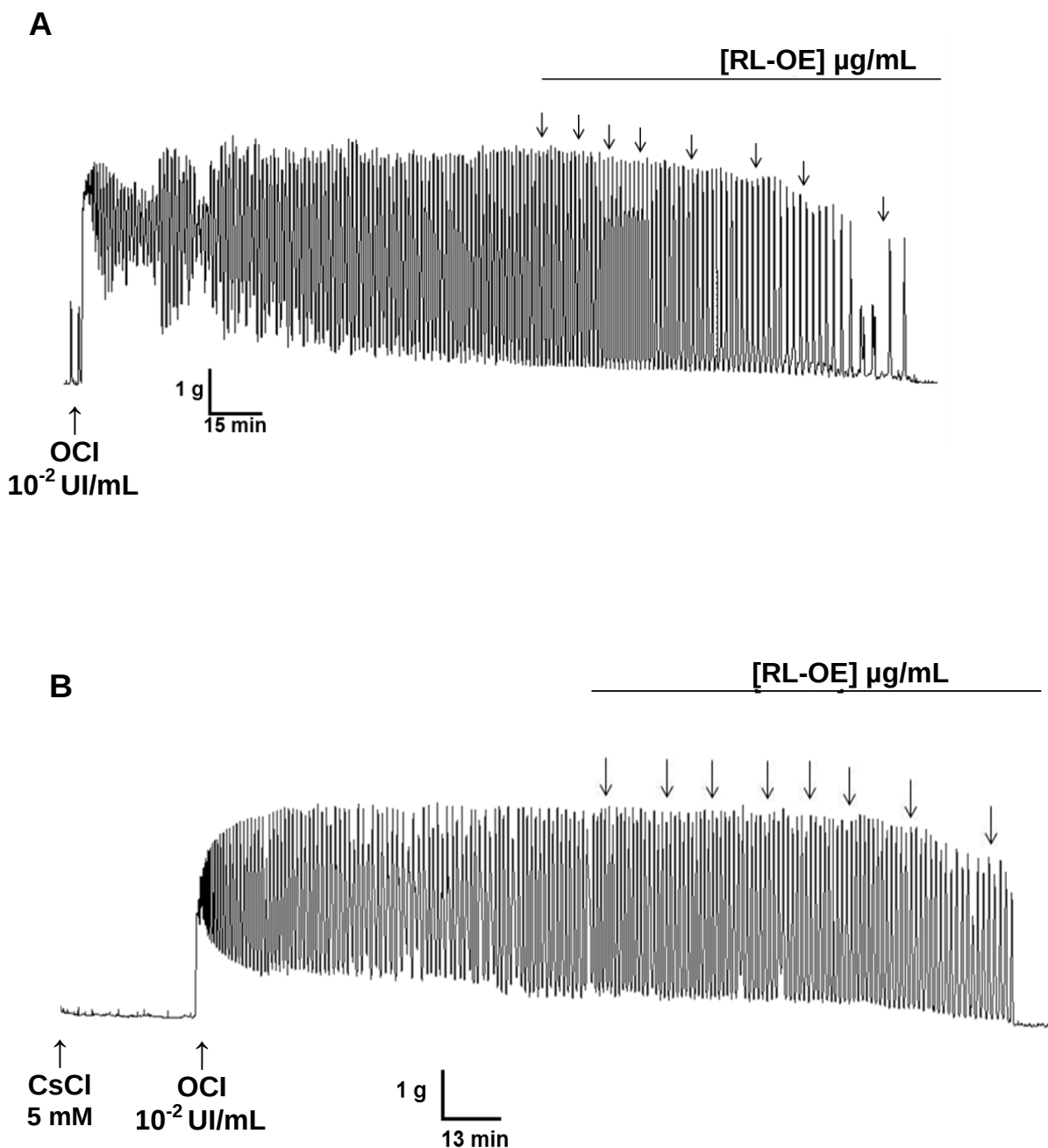
Ferreira, P. B.

4.1.6 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico promovido pelo RL-OE

O RL-OE relaxou o útero de rata pré-contraído por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (0,01-27 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) e na presença (0,01-81 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 8). Entretanto, a potência relaxante do óleo ($\text{CE}_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) foi reduzida em aproximadamente 2,2 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na presença de CsCl ($\text{CE}_{50} = 8,9 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 6).

Ferreira, P. B.

Figura 8 - Registros representativos do efeito relaxante do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 5 mM de CsCl.

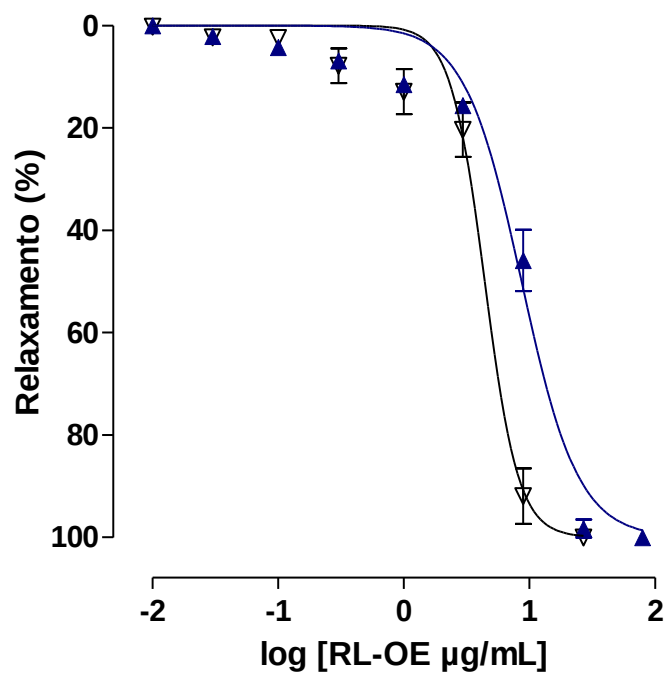


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ **(A)** e de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ **(B)**, respectivamente, OCI = ocitocina e CsCl = cloreto de cézio.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Gráfico 6 – Efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\blacktriangle$) de 5 mM de CsCl, em útero de rata.



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

Fonte: FERREIRA, 2014.

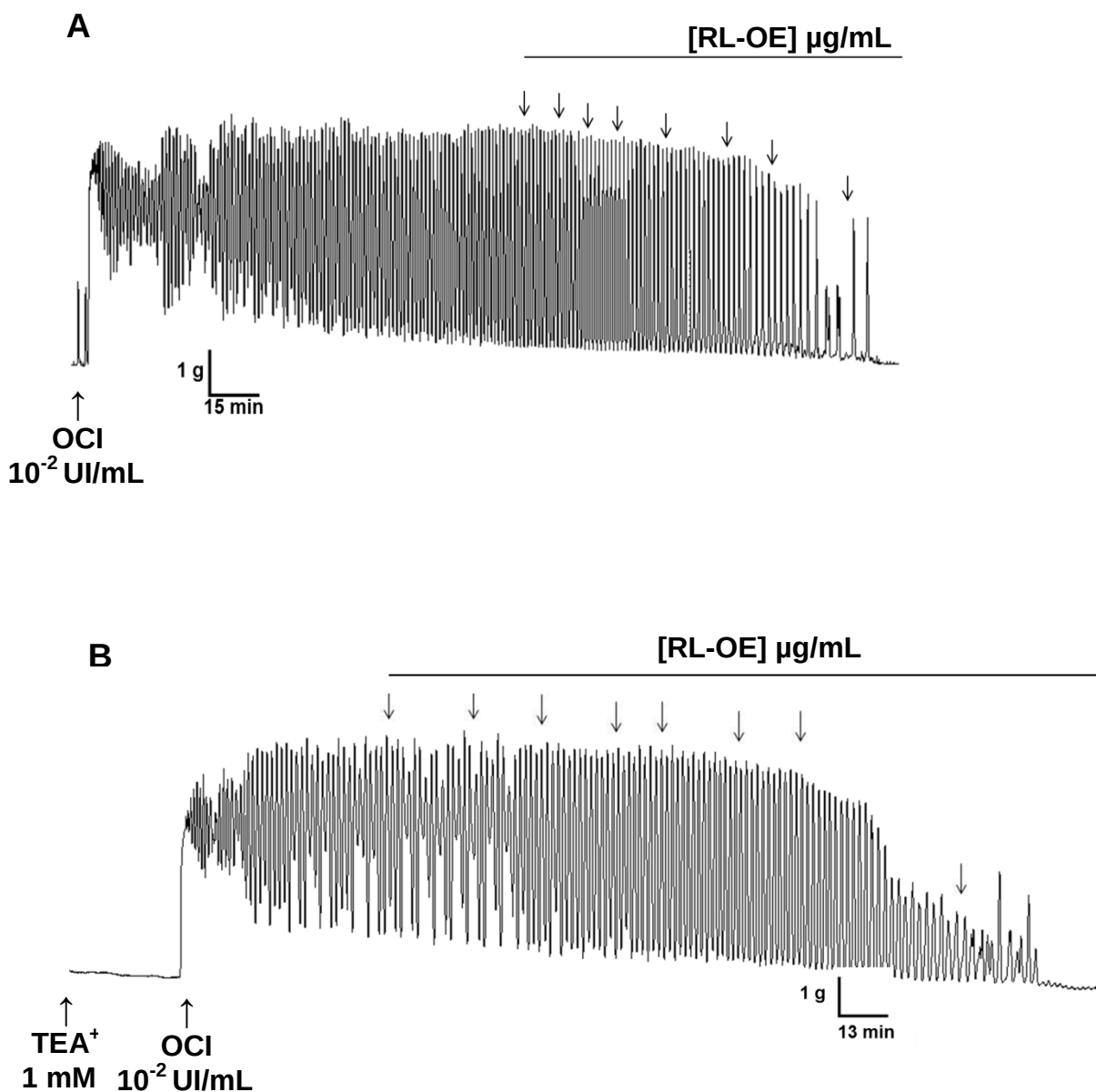
Ferreira, P. B.

4.1.6.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de TEA⁺, apamina, glibenclamida e 4-aminopiridina

A curva de relaxamento do RL-OE ($CE_{50} = 4,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) não foi deslocada na presença de 1 mM de TEA⁺, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} ($CE_{50} = 3,4 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$) (Figura 9, Gráfico 7), 100 nM de apamina, um bloqueador dos SK_{Ca} ($CE_{50} = 4,8 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) (Figura 10, gráfico 8) e de 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador dos K_{ATP} ($CE_{50} = 5,1 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) (Figura 11, gráfico 9). Entretanto, na presença de 3 mM de 4-aminopiridina, um bloqueador dos K_V ($CE_{50} = 10 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$) a curva de relaxamento foi deslocada para a direita com redução da potência relaxante do óleo em 2,4 vezes (Figura 12, Gráfico 10, Tabela 5).

Ferreira, P. B.

Figura 9 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} M de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 1 mM de TEA⁺ em útero de rata.

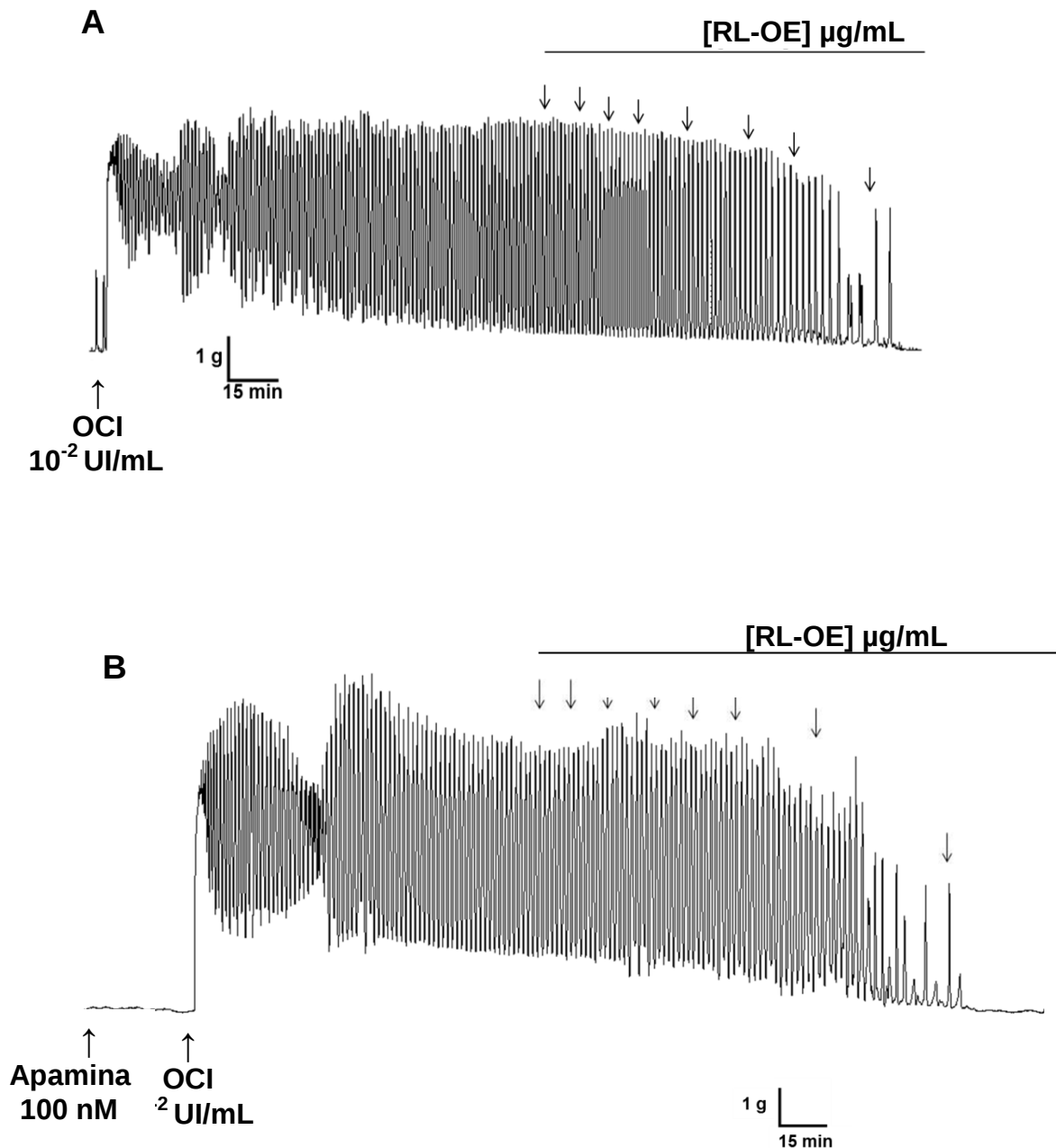


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**A** e **B**), respectivamente, OCI = ocitocina e TEA⁺ = tetraetilamônio.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

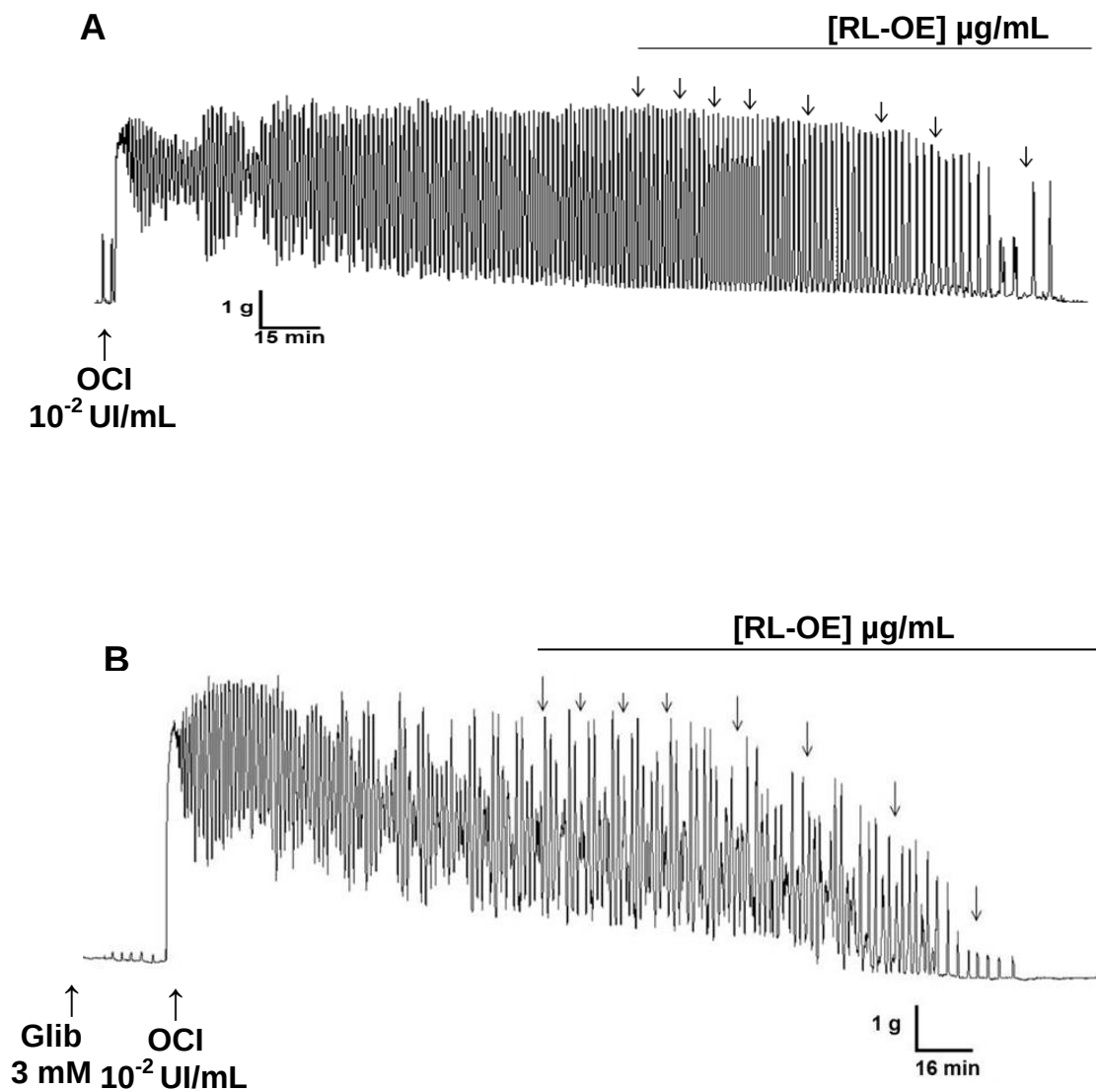
Figura 10 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 100 nM de apamina em útero de rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ **(A e B)**, respectivamente, OCI = ocitocina.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Figura 11 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contráido com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 3 mM de glibenclamida em útero de rata.

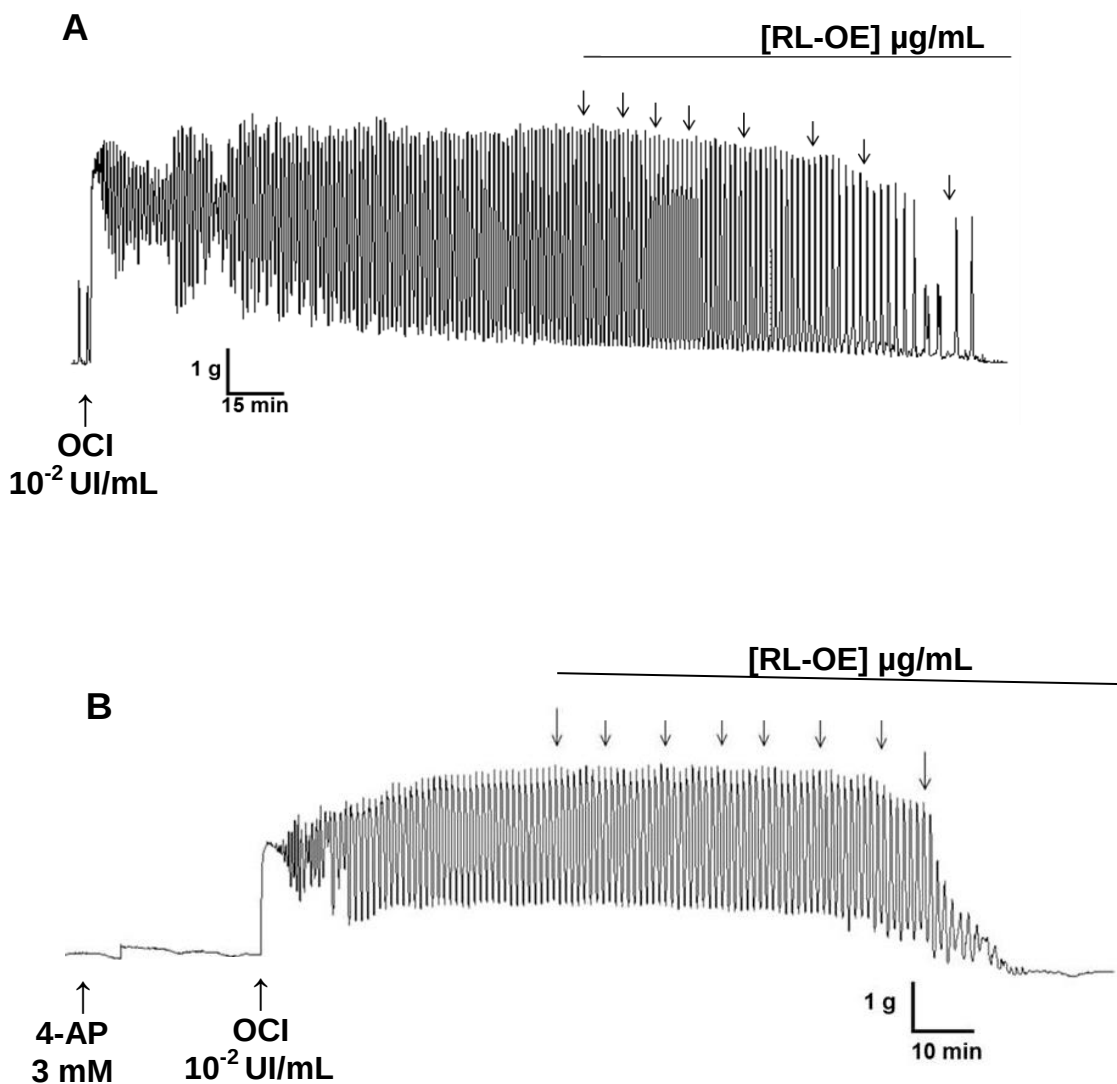


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**A** e **B**), respectivamente, OCI = ocitocina e Glib = glibenclamida.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Figura 12 - Registros representativos do efeito tocolítico do RL-OE em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência **(A)** e na presença **(B)** de 3 mM de 4-aminopiridina em útero de rata.

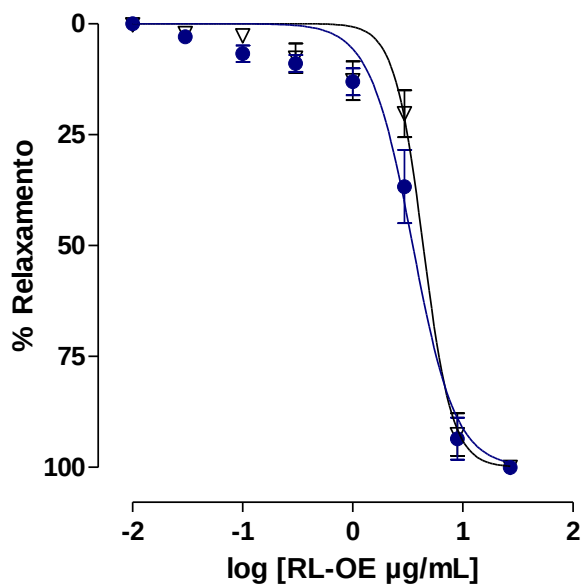


As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9 e 27 $\mu\text{g/mL}$ (**A** e **B**), respectivamente, OCI = ocitocina e 4-AP = 4-aminopiridina.

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

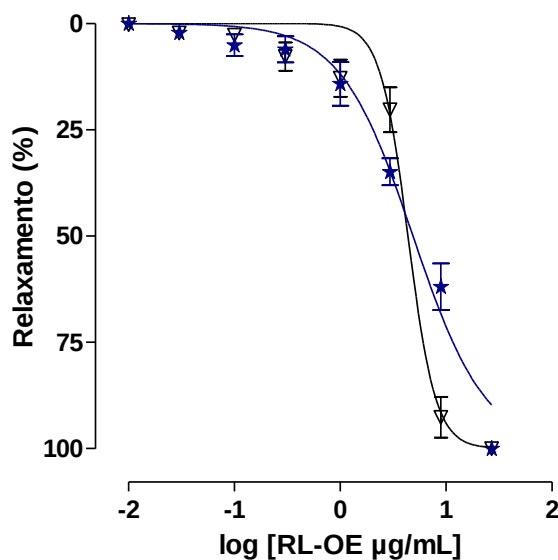
Gráfico 7 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\bullet$) de 1 mM de TEA⁺ em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5, 3).

Fonte: FERREIRA, 2014.

Gráfico 8 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\star$) de 100 nM de apamina em útero de rata.

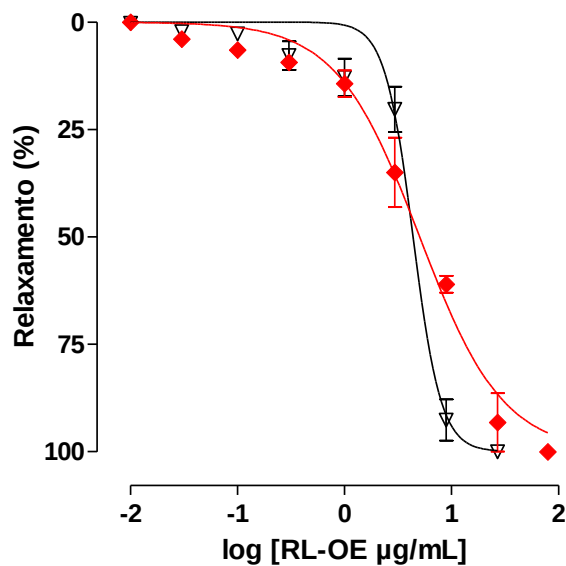


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5, 3).

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

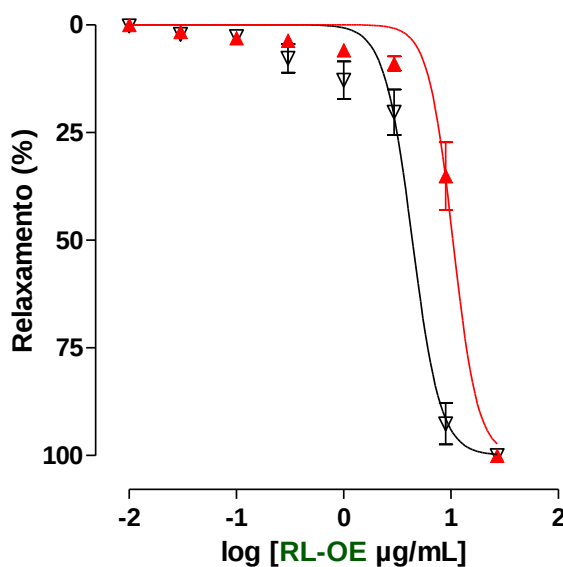
Gráfico 9 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\blacklozenge$) de 10^{-5} M de glibenclamida em útero de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5, 3).

Fonte: FERREIRA, 2014.

Gráfico 10 – Efeito tocolítico do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (∇) e na presença ($\blacktriangle$) de 3 mM de 4-aminopiridina em útero de rata.



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

Fonte: FERREIRA, 2014.

Ferreira, P. B.

Tabela 5 - Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (UI/mL) do RL-OE ausência (controle) e na presença de CsCl, TEA⁺, apamina, glibenclamida ou 4-aminopiridina em útero de rata.

Bloqueadores	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} (µg/mL)
Ausência	100	4,1 ± 0,4
Cloreto de cézio	100	8,9 ± 1,1 **
TEA ⁺	100	3,4 ± 0,3
Apamina	100	4,8 ± 0,2
Glibenclamida	100	5,1 ± 0,7
4-aminopiridina	100	10 ± 0,6 ***

Teste t , ** p < 0,01, *** p < 0,001 (ocitocina vs. bloqueadores); n = 5, 3.

Fonte: FERREIRA, 2014.

5 DISCUSSÃO

Ferreira, P. B.

No presente trabalho, foi investigado o mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial obtido das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE), sendo demonstrado pela primeira vez que o RL-OE exerce efeito tocolítico por antagonismo não competitivo, pseudo-irreversível, dos receptores de ocitocina e por modulação positiva dos canais de potássio sensíveis à voltagem (K_v).

A função do miométrio tem importância vital em processos fisiológicos, tais como transporte do espermatozoide e implantação de embriões, e em distúrbios, tais como, a dismenorreia e endometriose (AGUILAR; MITCHELL, 2010). No momento, há uma compreensão limitada sobre a regulação da contratilidade uterina no estado não-grávido. No entanto, uma melhor compreensão da ação de drogas sobre a fisiologia uterina é essencial para o planejamento de estratégias e intervenções que possam prevenir ou tratar esses distúrbios miométriais.

Muitas plantas medicinais são utilizadas no tratamento de problemas relacionados com menstruação, gravidez e parto (WESTFALL, 2001; BORN et al., 2005; ZHU et al., 2008), com relativo sucesso (GRUBER; O'BRIEN, 2011). Nesse contexto, alguns estudos relataram a atividade tocolítica de óleos essenciais em útero isolado de rato, tais como o óleo essencial de *Mentha pulegium* (SOARES et al., 2005), *Lippia microphylla* Cham. (SILVA, 2013), *Xylopia langsdorffiana*, *X. frutescens* e *R. leptopetala* (CORREIA, 2013).

Em um estudo anterior realizado por Correia (2013), foi demonstrado que o RL-OE exerce efeito espasmolítico não seletivo sobre aorta de rato, íleo e traqueia de cobaia e útero de rato. Diante do relato da ação tocolítica de diversos óleos essenciais e, tendo em vista que o RL-OE apresenta essa atividade em útero de rato, decidiu-se investigar o mecanismo de ação pelo qual o óleo essencial de *R. leptopetala* exerce seus efeitos nesse órgão.

Na triagem farmacológica preliminar realizada por Correia (2013), verificou-se que o RL-OE inibe as contrações fásicas induzidas por CCh e por ocitocina, de maneira dependente de concentração, em útero de rato, apresentando maior potência em antagonizar as contrações induzidas por ocitocina quando comparadas ao CCh.

No músculo liso uterino, vários agentes contráteis causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico,

Ferreira, P. B.

que se desenvolve lentamente ao longo de 15 min e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979). As células do miométrio têm um padrão fenotípico para a manutenção da atividade contrátil de um estado de repouso para discretas contrações, até um ritmo de contrações intermitentes com frequência, amplitude e duração variáveis (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Baseado no fato de que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes aos do componente fásico em útero de rata (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), resolveu-se verificar se o RL-OE promoveria o relaxamento do útero pré-contraído com KCl, um agente contrátil que atua por acoplamento eletromecânico ou, com ocitocina, um agonista que atua por acoplamento do tipo misto (eletromecânico e fármaco-mecânico) (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Como pode ser observado na Figura 4, no Gráfico 1 e na Tabela 2, o óleo essencial foi mais potente em relaxar o órgão pré-contraído com ocitocina do que com KCl, sugerindo uma possível ação do RL-OE nos receptores de ocitocina. Assim, levantou-se a proposição do RL-OE estar agindo nesses receptores para promover sua ação tocolítica.

A ocitocina é o mais potente e específico agonista contrátil para o músculo liso uterino, sendo a densidade de receptores no útero de ratas não-grávidas muito altos e comparáveis aos observados no momento do parto (ARTHUR et al., 2008). Para confirmar ou descartar a hipótese que o RL-OE estaria antagonizando os receptores de ocitocina, decidiu-se caracterizar o efeito inibitório do RL-OE frente às curvas concentrações-resposta cumulativas a esse agonista. De acordo os resultados obtidos (Gráfico 2 e Tabela 3), observou-se um desvio das curvas cumulativas à ocitocina para a direita, de forma não-paralela e com redução do E_{max} , descartando, dessa maneira, o antagonismo do tipo competitivo.

O antagonismo do tipo não competitivo pode ocorrer quando há ligação do antagonista ao mesmo sítio de ligação do agonista (antagonismo pseudo-irreversível) ou em um sítio distinto (antagonismo alostérico) (BLUMENTHAL, GARRISON, 2011). Diante do resultado observado, pode-se sugerir que o RL-OE exerce um antagonismo do tipo pseudo-irreversível, já que não houve saturação do efeito, pois a resposta contrátil a ocitocina não

Ferreira, P. B.

atingiu um valor limitante característica do antagonismo alostérico. Esse mesmo perfil foi observado por Correia (2013) com o RL-OE em íleo de cobaia.

Outros receptores envolvidos na modulação da contratilidade do miométrio uterino são os receptores adrenérgicos. Está descrito na literatura que ativação de receptores adrenérgicos α induzem contração uterina por meio de um aumento da $[Ca^{2+}]_c$, e que o subtipo desses receptores mais expresso em miométrio não-grávido é o receptor adrenérgico α_{1B} e em miométrio grávido o α_{1D} (DUCZA, 2002). Com isso, avaliou-se a participação dos receptores adrenérgicos α na atividade tocolítica de RL-OE com a utilização da fentolamina (SHY et al., 2012), bloqueador do receptor adrenérgico α , e evidenciou-se que não houve alteração significativa da potência tocolítica do óleo, descartando a inibição dos receptores adrenérgicos α (Gráfico 3, Tabela 4, Figura 5B).

Um alvo terapêutico já estabelecido para o tratamento de distúrbios relacionados à contratilidade do miométrio são os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, tais como a terbutalina e ritodrina, que causam o relaxamento dessa musculatura via aumento de AMPc. Três subtipos de receptores adrenérgicos β foram identificados e caracterizados molecular e farmacologicamente (TERRAS et al, 1967a, b; ARCH et al, 1984), sendo no miométrio identificados os subtipos β_2 e β_3 (ENGSTROM et al., 1997; LIU et al., 1998).

Estudos demonstram que receptores OT e os receptores adrenérgicos interagem em um ponto comum da via de sinalização da ativação da MAPK, resultando na modulação positiva da contratilidade do miométrio (ativação de ERK 1/2. Para avaliar se a ativação dos receptores β -adrenérgicos estariam participando do mecanismo de ação tocolítica de RL-OE, testou-se o efeito do óleo na presença de propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos β (SHY et al., 2012), e constatou-se que a curva de relaxamento, na presença do bloqueador, não foi inibida, mas sim desviada para a esquerda com potencialização do efeito do óleo (Gráfico 3, Tabela 4, Figura 5C). Esse efeito pode ser atribuído a uma possível ativação de um ponto comum da via de sinalização entre OT e receptores β -adrenérgicos, sugerindo a participação desses receptores no mecanismo de ação do produto testado.

Ferreira, P. B.

O NO é um radical livre derivado da L-arginina pela ação da sintase do óxido nítrico (NOS). Esta molécula tem diversas funções fisiológicas, incluindo a participação em lesão celular, regulação da resistência vascular e na transdução de sinal (MUNGRE et al., 2003). As principais isoformas de NOS expressas no miométrio são a iNOS e eNOS (HAN; MAGEE; KHORRAM, 2005). A indução da iNOS, com a subsequente liberação de NO está envolvida no aumento da produção de PGE₂ por ativação da ciclo-oxigenase (COX) tipo 2, processo esse relacionado com o relaxamento do miométrio (FRANCHI et al, 1994; XU et al., 2008). Essa ativação se dá por uma reação de S-nitrosilação entre o NO/iNOS com a PLA₂ (XU et al., 2008). A fim de avaliar a participação do NO no efeito tocolítico de RL-OE, utilizou-se o L-NAME, um inibidor da sintase de NO (SHY et al., 2012), e observou-se que não houve alteração significativa da potência tocolítica do RL-OE quando comparada com a potência relaxante na presença do inibidor (Gráfico 4, Figura 6).

Outra via alternativa que está envolvida na contratilidade uterina é a modulação da síntese de prostaglandinas (PGs) provenientes da via da COX. A síntese de PGs a partir do ácido araquidônico é catalisada pela COX. Estudos demonstraram que a inibição da COX é capaz de suprimir as contrações anormais no útero (AYAR, 2007). As PGs desempenham um papel importante na mediação de várias etapas durante a gravidez e o parto. Estes incluem a indução de ovulação, implantação, decidualização, imunossupressão, dilatação das artérias uterinas e início de parto. Em primatas, a administração de PGF_{2α}, resulta em dilatação do colo do útero e contrações do miométrio. Além disso, a inibição da síntese de PG por medicamentos não-esteroidais prolonga o trabalho de parto (ARSLAN; ZINGG, 1996).

Para avaliar o possível envolvimento da via da COX no mecanismo de ação tocolítica do RL-OE, testou-se o efeito do óleo na presença de indometacina, um inibidor da COX (SHY et al., 2012). Verificou-se que essa via não é modulada pelo óleo essencial, uma vez que, não houve alteração curva de relaxamento na ausência ou na presença do inibidor (Gráfico 5, Figura 7).

A excitabilidade do miócito uterino ocorre como na maioria dos outros tipos de células excitáveis, por meio do movimento dos íons Na⁺, Ca²⁺ e Cl⁻ no compartimento citosólico a partir do espaço extracelular, e de íons K⁺ no

Ferreira, P. B.

sentido oposto. Os três primeiros estão concentrados no espaço extracelular, enquanto que o último é mais concentrado no meio intracelular (SANBORN, 1995).

O Ca^{2+} é responsável por desencadear uma variedade de processos celulares nos neurônios, músculos e muitas células não-excitáveis e tem como função mais importante a sinalização celular quando do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). O Ca^{2+} , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é um sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982).

A contração do músculo liso é consequência principalmente do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através dos Ca_v , como pela ligação do agonista a um receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como o CCh e a ocitocina ligam-se a GPCRs e ativam a cascata de fosfoinosítídeos, através da produção de IP_3 mediada pelas proteínas G_q e G_{11} , estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do RS (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através RYR e estimular a entrada de Ca^{2+} através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais para Ca^{2+} operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

Os principais fatores para o estabelecimento do potencial de repouso nas membranas das células musculares lisas são os vários canais de K^+ presentes. A variedade de canais de K^+ com diferentes propriedades farmacológicas, cinética e de dependência de voltagem foram identificados em miócitos uterinos humanos (KHAN et al., 2001). Estes canais conduzem uma corrente para o meio extracelular durante os períodos em que o músculo não está ativo, e, assim, mantêm o potencial de repouso. Além disso, a condutância para o K^+ repolariza a membrana pós-estimulação, diminuindo assim a excitabilidade na ausência de um estímulo (ANWER et al., 1993; KHAN et al., 1997; BRAINARD et al., 2005; AARONSON, 2006).

Ferreira, P. B.

Diante dessas premissas, resolveu-se investigar a participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do RL-OE em nível funcional utilizando-se bloqueadores desses canais como ferramentas farmacológicas. Uma vez que a potência relaxante do óleo essencial na presença de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (CECCHI et al., 1987; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), foi reduzida significativamente em cerca 6 vezes, com desvio da curva de relaxamento para direita, é sugestivo de que haja a participação de canais de K^+ no mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial em útero de rata (Gráfico 6, Tabela 5, Figura 8).

Fatores como íons Ca^{2+} , voltagem e metabólitos tais como ATP podem aumentar a condutância de vários tipos de canais de K^+ localizados na membrana, como BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_V e K_{ATP} , respectivamente. Todos estes tipos de canais de K^+ foram detectados no miométrio humano, mas a predominância e como interagem entre si continua sendo alvo de estudos (AARONSON, 2006).

Os BK_{Ca} desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso das células do miométrio. Esses canais são compostos por quatro subunidades α e por quatro β , e têm uma grande condutância e capacidade de resposta ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$, bem como alterações de voltagem da membrana plasmática. Eles regulam a excitabilidade celular por meio do aumento da condutância ao K^+ quando a $[Ca^{2+}]_c$ aumenta, antagonizando assim o estímulo despolarizante, além de ser reconhecidamente o principal subtipo de canal de K^+ envolvido na regulação do tônus uterino (BRAINARD; KOROVINKA; ENGLAND, 2007).

Diante dessas premissas, investigou-se se o RL-OE estaria modulando positivamente os BK_{Ca} para produzir o seu efeito tocolítico (SANBORN, 2000). Na presença de 1 mM de TEA^+ , que nessa concentração bloqueia especificamente os BK_{Ca} (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), não houve alteração na potência relaxante do óleo essencial quando comparada com a curva de relaxamento na ausência deste bloqueador (Gráfico 7, Figura 9, Tabela 5). Esse resultado diferiu do apresentado por Correia (2013), que demonstrou que o RL-OE age sobre os BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica em íleo de cobaia, provavelmente, devido as diferenças entre a densidade desses canais nos diferentes órgãos (BRAINARD; KOROVINKA; ENGLAND, 2007).

Ferreira, P. B.

Os SK_{Ca} geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso uterino. Estão constitutivamente associados a calmodulina, que medeia a abertura do canal através da ligação com o cálcio (XIA et al., 1998). Hipotetizou-se que os SK_{Ca} poderiam estar participando do mecanismo de ação induzido pelo RL-OE. Caso essa hipótese fosse verdadeira o relaxamento do útero de rata induzido pelo óleo essencial deveria ser atenuado na presença de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (TSAI et al., 1998), o que não aconteceu como pode-se observar no Gráfico 8, assim descartando-se a contribuição desses subtipos de canais de K⁺ no mecanismo de ação tocolítico do RL-OE (Tabela 5, Figura 10).

Outros canais de K⁺ foram caracterizados no miométrio de várias espécies (SANBORN, 1995; MIYOSHI et al., 2004), a exemplo dos K_{ATP}. Os canais K_{ATP} são um complexo de pelo menos duas proteínas, o receptor de sulfonilureias (SUR), responsável pela sensibilidade as sulfoniureias, aos abridores do canal e ao ATP, associado a uma subunidade formadora do poro que pertence à família Kir6.0, ambos essenciais a funcionalidade do canal (STANDEN, 1997). A isoforma predominante dos K_{ATP} em células miometriais é a Kir6.1/SUR2B, apesar da isoforma Kir6.2/SUR1 também já ter sido evidenciada (CHIEN et al., 1999; CURLEY et al., 2002). Os ativadores dos K_{ATP} diminuem as contrações uterinas, no entanto, eles são mais potentes em miométrio humano não grávido do que em grávidos (SANBORN, 2000). Para avaliar se os K_{ATP} estariam participando do mecanismo de ação tocolítica de RL-OE, testou-se o efeito do mesmo na presença de glibenclamida, inibidor destes canais (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), e observou-se que não houve alteração na potência relaxante do óleo quando comparado com a curva de relaxamento na ausência do bloqueador, descartando o envolvimento dos K_{ATP} (Gráfico 9, Tabela 5, Figura 11).

Outro tipo de canal de K⁺ amplamente expresso no músculo liso uterino são os canais de K⁺ sensíveis a voltagem (K_V). Cada canal é composto de quatro subunidades, sendo que cada subunidade (S) possui seis regiões hidrofóbicas (S1-S6), que formam o domínio transmembrana. Essas regiões hidrofóbicas são ligadas por sequências de aminoácidos hidrofílicos, os quais são expostos no espaço intra ou extracelular. Cada subunidade contém um

Ferreira, P. B.

domínio carboxi- e amino-terminal citoplasmático. A região S4 é carregada, contendo um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos, sendo essa região um importante componente do sensor de voltagem do canal. A via de permeação do canal é formada, em parte, pela região de ligação das seqüências transmembranares S5 e S6 e é chamada de H5 ou região do poro (JAN; JAN, 1992).

Visto que os K_V contribuem para o potencial de repouso nas células do miométrio uterino, uma vez que em resposta a despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz repolarização das células para restabelecer o potencial de repouso (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007), levantou-se a hipótese de que o RL-OE poderia induzir seu efeito tocolítico por ativação dos K_V que ao repolarizar a membrana, levaria indiretamente a redução do influxo de Ca^{2+} via bloqueio dos Ca_V e culminando ao relaxamento uterino.

Para tanto avaliou-se o efeito relaxante do RL-OE na ausência e na presença da 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_V (AARONSON, 2006), e observou-se que a curva de relaxamento do RL-OE foi desviada para a direita na presença do bloqueador, com redução da potência relaxante em cerca de 3 vezes, quando na ausência do bloqueador. Estes dados demonstram que, provavelmente, o relaxamento produzido pelo RL-OE em útero isolado de rata está associado à ativação dos K_V , semelhante ao observado por Correia (2013) em íleo de cobaia.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que o mecanismo de ação pelo qual o RL-OE exerce seu efeito tocolítico envolve o antagonismo dos receptores de ocitocina e a modulação positiva dos canais de K^+ , em especial os K_V , que levam a uma diminuição do influxo de Ca^{2+} e consequente relaxamento do músculo liso do útero de ratas não grávidas. No entanto, não se descarta a participação de outras vias, como o bloqueio dos Ca_V , inibição das fosfodiesterases, ativação da PKA, inibição da via da Rho/RhoK, que poderão ser investigadas futuramente.

6 CONCLUSÕES

Ferreira, P. B.

Na investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE), em útero isolado de rata, pode-se concluir que:

- O(s) constituinte(s) presentes no RL-OE atuam por um antagonismo não-competitivo, pseudo-irreversível dos receptores de ocitocina;
- O RL-OE não está ativando os receptores adrenérgicos β ou antagonizando os receptores α ;
- Possivelmente age num ponto comum da via de sinalização dos receptores de ocitocina e adrenérgicos β ;
- As vias do NO e dos prostanoídes não participam do mecanismo de ação tocolítica do RL-OE;
- Não há envolvimento dos canais de K^+ do tipo BK_{Ca} , SK_{Ca} e K_{ATP} na ação tocolítica do RL-OE;
- O mecanismo de ação tocolítica do RL-OE envolve modulação positiva dos canais de K^+ do tipo K_v , o que indiretamente bloquearia o influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, levaria ao relaxamento uterino.
- Não se podem descartar outros mecanismos não investigados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

AARONSON, P. I. TRPC Channel upregulation in chronically hypoxic pulmonary arteries: the HIF-1 bandwagon gathers steam. **Circulation Research**, v. 12, p. 1465–1467, 2006.

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

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

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC). **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. S1 – S168, 2007.

AN, W. F.; BOWLBY, M. R.; BETTY, M.; CAO, J.; LING, H. P.; MENDOZA, G.; HINSON, J. W.; MATTSSON, K. I.; STRASSLE, B. W.; TRIMMER, J. S., RHODES, K. J. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. **Nature**, v. 403, p. 553-556, 2000.

ANWER, K.; OBERTI. C.; PEREZ, G.J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J.K.; MONGA, M.; SANBORN, B.M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

Ferreira, P. B.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BERNAL, A. L. Mechanisms of labour - biochemical aspects. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 110, suppl. 20, p. 39-45, 2003.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645 – 648, 1998.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Natural Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil. 2009

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOND, C. T.; SPRENGEL, R.; BISSONNETTE, J. M.; KAUFMANN, W. A.; PRIBNOW, D.; NEELANDS, T.; STORCK, T.; BAETSCHER, M.; JERECIC, J.; MAYLIE, J.; KNAUS, HANS-GÜNTHER; SEEBURG, P. H.; ADELMAN, J. P. Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca^{2+} -activated K^{+} channel subunit, SK3. **Science**, v. 289, p. 1942-1946.

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca^{2+} signals. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2213 – 2222, 2001.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 18, n. 3, p. 332–339, 2007.

Ferreira, P. B.

BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 332–339, 2007.

BRASIL. Anvisa. Resolução de Diretoria Colegiada nº 26, 2014. Brasília, DF, maio, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Atenção Básica, n. 31. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BROWN A, CORNWELL T, KORNIYENKO I, SOLODUSHKO V, BOND CT, ADELMAN JP, TAYLOR, M. S. Myometrial expression of small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels depresses phasic uterine contraction. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, p. 832–840.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium. **Subcellular Biochemistry**, v. 45, 2007.

Ferreira, P. B.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CECCHI, X.; WOLFF, D.; ALVAREZ, O.; LATORRE, R. Mechanisms of Cs^+ blockade in a Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). In: Smith, N. et al. (eds.). **Flowering Plants of the Neotropics**, p. 18-20, 2004.

CHIEN, E.K.; ZHANG, Y.; FURUTA, H.; HARA, M. Expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in female rat reproductive tissues: overlapping distribution of messenger ribonucleic acid for weak inwardly rectifying potassium channel subunit 6.1 and sulfonylurea binding regulatory subunit 2. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. 180:1121–6, 1999.

CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. **Human Reproduction**, v. 15, p 96–111, 2000.

CORREIA, A. C. C. Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens* Aubl. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 309-304, 2005.

COSTA, V. C. O. ; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, C. S.; CASTELLO-BRANCO, M. V. S.; DINIZ, M. F. F. M.; LIMA, C. U. G. B.; SANTOS, B. V. O.; PITA, J. C.

Ferreira, P. B.

L. R.; SILVA, M. S.; SETTE, I. F. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. *Química Nova* (Impresso), v. 35, p. 138-142, 2012.

COSTA, V. C. O. Constituintes químicos de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries: alcaloides, sesquiterpenos e um novo derivado caféico. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2009.

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SILVA, M. S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 245-248, 2008.

CURLEY, M.; CAIRNS, M.T.; FRIEL, A.M.; McMEEL, O.M.; MORRISON, J.J.; SMITH, T.J. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium. **Molecular Human Reproduction**, 8:941–5, 2002.

DABRAH, T. T.; SNEDEN, A. T. Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia papilionella*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 436-436, 1983.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p.521–525, 2004.

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

DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDOFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p.985–996, 2002.

Ferreira, P. B.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

FEHER, M.; SCHMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 43, n. 1, p. 218-227, 2003.

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 375-378, 2009.

FEVRIER, A., FERREIRA, M.E., FOURNET, A., YALUFF, G., INCHAUSTI, A., ROJAS DE ARIAS, A., HOCQUEMILLER, R., WAECHTER, A.I. Acetogenesis and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v. 65, p. 47-49, 1999.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho–Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GRUBER, C.W.; O'BRIEN, M. Uterotonic plants and their bioactive constituents. **Planta Medica**, v. 77, p. 207-20, 2011.

GUIDO, P.C.; RIBAS, A.; GAIOLI, M.; QUATTRONE, F.; MACCHI, A. The state of the integrative medicine in Latin America: The long road to include

Ferreira, P. B.

complementary, natural, and traditional practices in formal health systems. **European Journal of Integrative Medicine**, *in press*.

GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.

GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242 - 251, 1994.

HEGNAUER, R. Chemotaxonomie der Pflazen. **Basiléia e Suttgart, Birkhauser Verlag**, v. 3, p. 116, 1964.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e perspectiva terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia: 2. Ed. – Itajaí: **Universidade do vale do Itajaí**, 2009. Cap. IX, p. 221 – 256.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action In Vivo **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 829-833. 1997.

HUSZAR, G.; NAFTOLIN, F. The myometrium and uterine cervix in normal and preterm labor. **New England Journal of Medicine**, v. 9, p. 571–581, 1984.

INAGAKI, N.; GONOI, T.; CLEMENT, J. P.; WANG, C. Z.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J.; SEINO, S. A family of sulfonylurea receptors determines the

Ferreira, P. B.

pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. **Neuron**, v. 16, p. 1011-1017, 1996

JAN L.Y.; JAN Y.N. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. **Annual Review of Physiology**, 54:537-55; 1992.

JOHNSON, M. C.; MALIQUEO, M.; BORIC, M. A.; VILLAVICENCIO, A.; VANTMAN, D.; VEGA, M. Differential in vitro actions of nitric oxide on human endometrial cell survival. *Fertil Steril*, v. 81, p. 176-184, 2004.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopia aethiopica* (Dun) S. Rich. (ANNONACEAE) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8094-8098, 2004.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUEZ, E. Biology and chemistry of plant trichomes. **Plenum Press**, 1984

KHAN, R. N. MATHAROO-BALL, B. ARULKUMARAN, S. ASHFORD, M. L. J. Potassium channels in the human myometrium. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 255-264, 2001.

KHAN, R. N. MATHAROO-BALL, B. ARULKUMARAN, S. ASHFORD, M. L. J. Potassium channels in the human myometrium. **Experimental Physiology**, v. 86, n. 2, p. 255-264, 2001.

KNOCK, G. A.; TRIBE, R. M.; HASSONI, A. A.; AARONSON, P. I. Modulation KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, p. 203-219, 1996.

KNOCK, G. A.; SMIRNOV, S. V.; AARONSON, P. I. Voltage-gated K⁺ currents in freshly isolated myocytes of potassium current characteristics in human

Ferreira, P. B.

myometrial smooth muscle by 17beta-estradiol and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1526-1534, 2005.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.

LEE, Y. H.; HWANG, M. K.; MORGAN, K. G.; TAGGART, M. J. Receptor-coupled contractility of uterine smooth muscle: from membrane to myofilaments. **Experimental Physiology**, v. 2, p. 283– 288, 2001.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; ROTH, G. The spasmolytic activity of the essential oils of scented *Pelargominus* (Geraniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1997.

LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiya discreta*. **Parasite Immunology**, v. 3, n. 10, p. 623-630, 2009.

LUNDGREN, D.W.; MOORE, J. J.; CHANG, S. M.; COLLINS, P. L.; CHANG, A. S. Gestational changes in the uterine expression of an inwardly rectifying K^{+}

Ferreira, P. B.

channel, ROMK. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 216, p. 57-64, 1997.

MAAS, P. J. M.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 20 de outubro de 2014.

MAAS, P.J.M., WESTRA, L.Y.T. Organization for Flora Neotropica, The New York Botanical Garden. **Flora Neotropica Monograph 57**, New York, p. 121, 1992.

MADEIRA, S. V. F.; RABELO, M.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, P. M. G.; MEIRELES, A. V. P.; MONTENEGRO, C.; LIMA, R. F.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomedicine**, v. 12, p. 506-509, 2005.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Spasmolytic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 539-546, 2004.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MIYOSHI H, YAMAOKA K, GARFIELD RE, OHAMA K. Identification of a non-selective cation channel current in myometrial cells isolated from pregnant rats. **Pflugers Arch**, v. 4, p. 457–464, 2004.

MODZELEWSKA, B.; KOSTRZEWSKA, A.; SIPOWICZ, M.; KLESZCZEWSKI, T.; BATRA, S. Apamin inhibits NO-induced relaxation of the spontaneous

Ferreira, P. B.

contractile activity of the myometrium from non-pregnant women. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 8, 2003.

MONTEIRO, F. S.; COSTA, V. C. O.; QUEIROGA, K. F.; TAVARES, J. F.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Comparação do efeito antiespasmódico de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries e *Rollinia exsucca* A. DC. em íleo isolado de cobaia. **XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, São Paulo, 2008

MORA-PALE, M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, S.; LINHARDT, R. J.; DORDICK, J. S.; KOFFAS, M. A. G. Biochemical strategies for enhancing the *in vivo* production of natural products with pharmaceutical potential. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 86-94, 2014.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca^{2+} transients. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75–77, 1982.

MURRAY M. A.; BERRY J. L.; COOK S. J.; FOSTER R. W.; GREEN K. A.; SMALL R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K^+ channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1814-1818, 1991.

NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; HABTEMARIAM, S.; MOGHADDAM, A. H.; SUREDA, A.; JAFARI, M. Hepatoprotective effect of gallic acid isolated from *Peltiphyllum peltatum* against sodium fluoride-induced oxidative stress. **Industrial Crops and Product**, v. 44, p. 50–55, 2013.

NABAVI, S.F.; DAGLIA, M.; MOGHADDAM, A. H.; HABTEMARIAM, S.; NABAVI, S. M. Curcumin and liver disease: From chemistry to medicine. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 62–77, 2014.

Ferreira, P. B.

NASCIMENTO, R. J. B.. ESTUDO DE ESPÉCIES DO GÊNERO SOLANUM (SOLANACEAE): QUIMIOTAXONOMIA E ENSAIOS BIOLÓGICOS. 2006 Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585–587, 1980.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 311–335, 2012.

NIELSEN-KUDSK, J. E. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. *Studies on isolated airways and arteries. Danish Medical Bulletin*, 43: 429-447. 1996.

NOBLE, K.; MATTHEW, A.; BURDYGA T.; WRAY, S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, s. 1, p. s11-s19, 2009.

OLIVEIRA, G. A. A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**. v. 33, p. 375 - 384, 2003.

PAYTON, R. G.; BRUCKER, M. C. Drugs and Uterine Motility. **Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing**, v. 28, nº. 6, p. 628-637, 1999.

Ferreira, P. B.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; HERTZ, RIOS, A. O. R.; VIZZOTTO, M.; FLÔRES, S. H. Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 19-24, 2013.

PERRY, N. S.; PERRY, E. K. **Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. CNS Drugs**, v. 20, n. 4, p. 257-280, 2006.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.

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 CaCl_2 . **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, p. 4–11, 2000.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SAWADA K, MORISHIGE K, HASHIMOTO K, TASAKA K, KURACHI H, MURATA Y, KURACHI, Y. Gestational change of K^+ channel opener effect is correlated with the expression of uterine K_{ATP} channel subunits. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, p. 203-219, 1996.

Ferreira, P. B.

.

SCHURT, D. A.; TRASSATO, L. B.; SOUZA, G. R.; SILVA, W. L. M. Uso de óleo essencial de *Lippia microphylla* na inibição do crescimento in vitro de *Rhizoctonia solani*. **45º Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Manaus, Amazonas, 2012.

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333 – 1355, 2002.

SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; SILVA, M. S. The first tetrahydroprotoberberine alkaloid from the genus *Rollinia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 393-394. 2000a.

SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from *Rollinia leptopetala*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 318-320. 2000b.

SHAH, A. J.; RASHEED, M.; JABEEN, Q.; AHMED, A.; TAREEN, R. B.; GILANI, A. H.; NADIR, M.; AHMAD, V. U. Chemical analysis and calcium channel blocking activity of the essential oil of *Perovskia abrotanoides*. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 1633-1636, 2013

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, S. B.; DUNCAN, I. J. H.; ERHARD, H. W.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O'CONNOR, C. E.; PETHERICK, C. J. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, p. 291-305, 2003.

SHIBATA R, MISONOU H, CAMPOMANES CR, ANDERSON AE, SCHRADER LA, DOLIVEIRA LC, CARROLL, K. I.; SWEATT, J. D.; RHODES, K. J.; TRIMMER, J. S. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 36445-36454, 2003.

Ferreira, P. B.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated $[Ca^{2+}]$ transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **The Journal of Physiology**, v. 511, p. 803–811, 1998.

SHMYGOL, A.; WRAY, S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 35, p. 501-508, 2004.

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

SIEMIENIUCH, M. J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; DEPTULA, K.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D. J. Effects of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide on prostaglandins secretion by the bovine oviduct differ in the isthmus and ampulla and depend on the phase of the estrous cycle. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1056–1066, 2009.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil-I. Famílias Annonaceae e Gnetaceae. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 1, p. 53-58, 2006.

SILVA, M. C. C. Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata. **Trabalho de Conclusão de Curso (Centro de Ciências da Saúde)**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

Ferreira, P. B.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129–145, 1968.

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.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica sistemática - guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa SP, 2005.

STANDEN NB. Properties of cloned K_{ATP} channels mimic those of β -cells. **Journal of Physiology**. 498:1; 1997.

SUZUKI, T.; TAKIMOTO, K. Differential expression of Kv4 pore-forming and KChIP auxiliary subunits in rat uterus during pregnancy. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 288, 335-341, 2005.
the pregnant human myometrium. **The Journal of Physiology**, v. 518, p. 769-81, 1999.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215–242, 2005.

TSAI, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by an Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p.18–29. 1998.

Ferreira, P. B.

VALEZE, F. H.; BRENZAN, M. A. Perfil de utilização de medicamentos fitoterápicos pela população do município de Boa Esperança – PR. SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2011.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacology Reviews**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_c$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315 - 329, 1989.

VOGALIS, F.; HILLSLEY, K.; SMITH, T. K. Diverse ionic currents and electrical activity of cultured myenteric neurons from the guinea pig proximal colon. **Journal of Neurophysiology**, v. 83, p. 1253-1263, 2000b

WALJI, R.; WIKTOROWICZ, M. Governance of natural health products regulation: An iterative process. **Health Police**, v. 111, p. 86-94, 2013.

WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; HE, R.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, v. 8; p. 1141-1151, 2011.

WANG, S. Y.; YOSHINO, M.; SUI, J. L.; WAKUI, M.; KAO, P. N.; KAO, C. Y. Potassium currents in freshly dissociated uterine myocytes from nonpregnant and late-pregnant rats. **Journal Of General Physiology**, v. 112, p. 737-756, 1998.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

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

Ferreira, P. B.

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

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407; 2005.

WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239–246, 2001.

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

WRZAL, P. K.; GOUPIL, E.; LAPORTE, S.A.; HÉBERT, T. E.; ZINGG, H.H. Functional interactions between the oxytocin receptor and the β_2 -adrenergic receptor: Implications for ERK1/2 activation in human myometrial cells. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 334-341, 2012.

XIA, X. M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G.; JOHNSON-PAIS, T.; KEEN, J. E. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, v. 395, p. 503–507, 1998.

XU, L.; HAN, C.; LIM KYU AND WU,T. Activation of Cytosolic Phospholipase A2_ through Nitric Oxide-induced S-Nitrosylation, **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 3077-3087, 2008.

YANG, E.K.; ALVIRA, M. R.; LEVITAN, E. S.; TAKIMOTO, K. Kv beta subunits increase expression of Kv4.3

ZAVALA, M.; MACÍAS, A.; OROPEZA, M.; CÁRDENAS, N.; PONCE-MONTER, H.; CAMPOS, M. G.; PÉREZ, S.; PÉREZ, C. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. **Fitoterapia**, v. 79, p. 446-450, 2008.

Ferreira, P. B.

ZHANG, A.; SUN, H.; QIU, H.; XIJUN WANG, X. Advancing Drug Discovery and Development from Active Constituents of Yinchenhao Tang, a Famous Traditional Chinese Medicine Formula. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, 2013

ZHU, B.; SYMONDS, A.L.J.; MARTIN, J. E.; KIOUSSIS, D.; WRAITH, D.C., LI, S.; WANG, P. Early growth response gene 2 (Egr-2) controls the self-tolerance of T cells and prevents the development of lupuslike autoimmune disease. **The Rockefeller University Press**, v. 295, n. 10, 2008.

ZINGG, H.H.; LAPORTE, S.A. The oxytocin receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, p. 222-227, 2003

ANEXO

Ferreira, P. B.

ANEXO A – Certidão do Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 29 de abril de 2014.

CEUA Nº 0104/14

Ilmo(a). **Bagnólia Araújo da Silva**

Departamento **Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de ciências da Saúde - UFPB**

Orientando(a): **Paula Benvindo Ferreira, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **28/04/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação do mecanismo de ação tocolítica do óleo essencial das folhas de Rollinia leptopetala R. E. Fries (Annonaceae) em útero isolado de rata.**

Com previsão de empregar **90 Ratas WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/04/2014 a 27/02/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br