



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO ÁLCOOL SESQUITERPÊNICO (-)- α -

BISABOLOL EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO

VASCULARES E NÃO-VASCULARES

FORTALEZA

2011

RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Fortaleza – CE

2011

RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO ÁLCOOL SESQUITERPÊNICO (-)- α -
BISABOLOL EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO
VASCULARES E NÃO-VASCULARES**

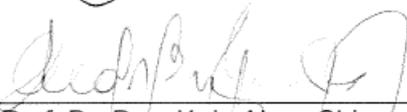
Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 07/10/2011

BANCA EXAMINADORA



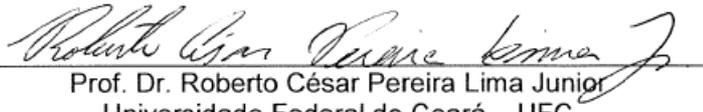
Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães – Orientador
Universidade Federal do Ceará – UFC



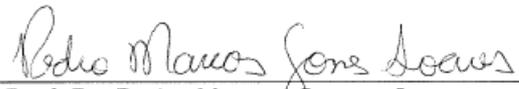
Prof. Dr. Deoclécio Alves Chiança Junior
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP



Prof. Dr. Mohammed Saad Lahlou
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S632e Siqueira, Rodrigo Bezerra de.
Efeitos farmacológicos do álcool sesquiterpênico (-)- α - bisabolol em preparações isoladas de músculo liso vasculares e não vasculares / Rodrigo Bezerra de Siqueira. – 2011.
167 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Farmacologia
Orientação: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
1. Matricaria. 2. Terpenos. 3. Farmacologia. 4. Músculo Liso I. Título.

CDD 615.323

Esse trabalho é dedicado especialmente aos meus pais, que nunca mediram esforços para investir naquilo que considero a minha maior herança, a educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, onipotente, ser maior e único que rege todas as nossas vidas, cuja simples vontade iluminou o meu caminho, concebeu força e sabedoria para enfrentar as adversidades e permitiu a minha caminhada até aqui.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo incentivo especialmente nos momentos mais difíceis.

À minha noiva Lêda, pela paciência, pela dedicação e pelo companheirismo, a acima de tudo, por sempre acreditar e apoiar as minhas aspirações pessoais.

Ao meu orientador, o professor Pedro Magalhães pela orientação competente e pela amizade.

Ao Professor Armênio Aguiar dos Santos pela ajuda inestimável, pela amizade e pelos sábios conselhos.

Aos Professores Saad Lahlou e Glória Isolina que há muito me auxiliam na árdua caminhada científica.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que de alguma forma contribuíram durante todo esse período de pós-graduação.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso, João Paulo, Walter Breno, Teresinha Brito, Patrícia Andréia, Francisco José, Helder Veras, Ubirajara Júnior, Vasco Diógenes, Luan Costa e Cássia Rodrigues, pela ajuda inestimável, pelos conselhos e pela agradável convivência.

Às agências de fomento em pesquisa pelo financiamento do período de pós-graduação.

Prefaciando o livro de Max Planck “Para onde vai a Ciência”, Einstein ensaiou, há tempos, uma classificação dos homens que se dedicam às atividades científicas, dividindo-os em três grupos. O primeiro grupo é integrado pelos que entram no Templo da Ciência porque nele se oferece uma oportunidade para o brilho de seus talentos peculiares. Do segundo grupo, fazem parte aqueles que se dedicam à ciência para viver, trabalhando com afinco para serem bem remunerados. Constituem o terceiro grupo os homens que foram irresistivelmente atraídos pela ciência, fascinados pela esperança de nela encontrarem uma satisfação aos seus mais íntimos anseios – ao anseio humano de obter uma imagem do mundo circundante que possa responder às tormentas e incógnitas de suas dúvidas interiores. São aqueles que fazem ciência para investigar, para conhecer, para compreender e para criar. São os verdadeiros homens da ciência, os verdadeiros artistas da ciência, desde que os outros dois grupos são simples artífices da ciência, levados ao seu templo por motivos apenas circunstanciais. Se as circunstâncias fossem outras, poderiam muito bem ser aplicados como burocratas ou bons homens de negócio.

Josué de Castro, no livro “ Três Personagens ”

RESUMO

Efeitos farmacológicos do álcool sesquiterpênico (-)- α -bisabolol em preparações isoladas de músculo liso vasculares e não-vasculares. Siqueira, R. J. B. Tese de Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2011.

Nesse estudo *in vitro* foram investigados os efeitos do álcool sesquiterpênico monocíclico (-)- α -bisabolol no comportamento contrátil de preparações isoladas de músculo liso de ratos e camundongos. Na tensão basal, o (-)- α -bisabolol (1 – 1000 μ M) induziu relaxamento em preparações duodenais, mas exibiu efeitos bifásicos em outros tecidos, contraindo preparações de aorta com endotélio e de bexiga urinária na faixa de concentração entre 30-300 μ M e relaxando as mesmas preparações em concentrações maiores. Quando aplicado após indução de pré-contracção sustentada, o (-)- α -bisabolol apresentou apenas propriedades relaxantes. Esse sesquiterpeno relaxou preferencialmente as contrações induzidas eletromecanicamente por uma elevada concentração extracelular de potássio em comparação com as induzidas de modo farmacomecânico pela adição de fenilefrina ou carbacol na câmara isolada. A potência farmacológica do (-)- α -bisabolol foi maior em vasos mesentéricos e menor em preparações isoladas de traquéia e cólon. Os tecidos que apresentaram atividade espontânea também foram influenciados de forma diferenciada pelo (-)- α -bisabolol, que aboliu as contrações espontâneas em tecidos duodenais e aumentou a amplitude das mesmas em preparações de bexiga urinária. O (-)- α -bisabolol apresentou efeitos inibitórios mais pronunciados para as curvas concentração-efeito obtidas para o cálcio e o bário em presença de agente indutor de acoplamento eletromecânico. O efeito vasodilatador do (-)- α -bisabolol em anéis de aorta não depende de fatores endoteliais e canais para potássio. Em preparações de aorta o (-)- α -bisabolol potencializou a contração fásica induzida pela cafeína em meio sem cálcio. Quando administrado *in vivo*, o (-)- α -bisabolol atenuou a resposta exacerbada ao carbacol observada em preparações de traquéia de ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina. Entretanto, esse sesquiterpeno não alterou a responsividade contrátil diminuída observada em preparações de bexiga urinária de camundongos tratados com ifosfamida. Em termos gerais, o (-)- α -bisabolol apresenta-se como uma substância biologicamente ativa no músculo liso. O mecanismo subjacente envolvido nas ações inibitórias do (-)- α -bisabolol está parcialmente relacionado à sua habilidade em reduzir o acoplamento eletromecânico.

Palavras-chave: camomila, óleo essencial, terpeno, músculo liso, acoplamento eletromecânico.

ABSTRACT

Pharmacological effects of the sesquiterpenic alcohol (-)- α -bisabolol in vascular and non-vascular smooth muscle preparations. Siqueira, R. J. B. Doctoral Thesis in Pharmacology, Federal University of Ceará, 2011.

In this *in vitro* study the effects of the monocyclic sesquiterpene alcohol (-)- α -bisabolol on the contractile behavior of rat and mouse smooth muscle preparations were investigated. Under resting tonus, (-)- α -bisabolol relaxed duodenal smooth muscle preparations, whereas it showed biphasic effects in other smooth muscles, contracting endothelium-intact aortic rings and urinary bladder strips at the concentration range of 30 - 300 μ M, and relaxing these tissues at higher concentrations. When applied on the steady state of sustained contractions, (-)- α -bisabolol showed only relaxing properties. It preferentially relaxed contractions induced electromechanically by a high extracellular concentration of K^+ than those induced pharmacomechanically by adding phenylephrine or carbachol in the bath chamber. The pharmacological potency of (-)- α -bisabolol was variable being higher in mesenteric vessels, whereas it exerted relaxing activity with lesser potency on tracheal or colonic tissues. Tissues possessing spontaneous activity were also differentially influenced by (-)- α -bisabolol that completely decreased spontaneous contractions in duodenum whereas increased their amplitude in urinary bladder. The (-)- α -bisabolol showed more pronounced inhibitory effects on the concentration-effect curves induced by calcium or barium when constructed in presence of an agent producing electromechanic coupling. The vasodilatory effect of (-)- α -bisabolol in aortic rings did not involve a role of endothelial factors or of potassium channels. In aortic preparations under calcium free conditions (-)- α -bisabolol augmented the phasic contractions induced by caffeine. *In vivo*, (-)- α -bisabolol attenuated the increased responses of carbachol in tracheal rings of ovalbumin-sensitized rats challenged with ovalbumin, but was without effect in the decreased responsiveness of urinary bladder strips in animals submitted to ifosfamide treatment. In summary, (-)- α -bisabolol is characterized as a biologically active substance on smooth muscle. At least part of the underlying mechanism involved in the (-)- α -bisabolol -induced inhibitory actions is related to its ability in reducing electromechanical coupling.

Keywords: chamomile, essential oil, terpene, smooth muscle, electromechanical coupling.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 - Distribuição percentual dos principais metabólitos secundários de plantas.	26
Figura 2 - Mecanismos celulares envolvidos na contração e no relaxamento das células musculares lisas.	35
Figura 3 - Ilustração da <i>Matricaria chamomilla</i> , (camomila alemã).	39
Figura 4 - Estrutura química do (-)- α -bisabolol e seus estereoisômeros relacionados.	41
Figura 5 – Representação esquemática do modelo experimental de desafio antigênico com ovalbumina.	57
Figura 6 – Representação esquemática da reação de Schultz-Dale observada em tecidos isolados de animais sensibilizados à ovalbumina.	57
Figura 7 – Representação esquemática do modelo experimental de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida.	58
Figura 8 – Representação esquemática do aparato utilizado para estudo da contratilidade in vitro de preparações isoladas de músculo liso.	60
Figura 9 – Representação esquemática do sistema de miógrafo utilizado para estudo da contratilidade in vitro de preparações isoladas de vasos sanguíneos de pequeno calibre.	62
Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a viabilidade funcional das preparações isoladas de músculo liso (Fase de estabilização).	64
Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o comportamento contrátil de preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais.	65
Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental	67

utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas.

Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas. 68

Figura 14 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas após ativação da proteína quinase C. 69

Figura 15 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS nas contrações induzidas em preparações isoladas de duodeno e cólon. 71

Figura 16 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para KCl ou agonistas. 72

Figura 17 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para CaCl₂ ou BaCl₂ em presença de KCl. 73

Figura 18 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para CaCl₂ em presença de agonistas ROCC. 75

Figura 19 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS em preparações de traquéia pré-contraídas com KCl e carbacol em meio com cálcio ou bário. 76

Figura 20 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar as contrações fásicas induzidas por fenilefrina e cafeína em preparações isoladas de aorta. 77

Figura 21 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS na entrada capacitativa de cálcio. 78

Figura 22 – Efeito do ABIS na tensão basal de preparações de músculo liso vascular. 83

Figura 23 – Efeito do ABIS na atividade espontânea de preparações 86

de músculo liso mantidas em tensão basal.

- Figura 24** – Traçados típicos dos efeitos de concentrações crescentes de ABIS em preparações isoladas de músculo liso mantidas em tensão basal. 87
- Figura 25** – Ação do ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso pré-contraídas com KCl. 89
- Figura 26** – Efeito da adição cumulativa de ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso pré-contraídas com agonistas farmacológicos. 91
- Figura 27** – Efeito do ABIS nas contrações induzidas por KCl em preparações isoladas de duodeno e cólon. 94
- Figura 28** – Efeito do ABIS nas contrações induzidas por carbacol em preparações isoladas de duodeno e cólon. 95
- Figura 29** – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B) na presença de KCl. 99
- Figura 30** - Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de bexiga urinária (A) e duodeno (B) na presença de KCl. 101
- Figura 31** – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de duodeno (A) e traquéia (B) na presença de carbacol e verapamil. 104
- Figura 32** – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de aorta na presença de fenilefrina e nifedipina. 106
- Figura 33** – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de carbacol em preparações isoladas de traquéia (A) e de fenilefrina em preparações isoladas de aorta (B). 108
- Figura 34** – Efeito inibitório do ABIS na curva concentração-efeito de K^+ em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B). 110
- Figura 35** – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de bário em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B) em

presença de KCl.

- Figura 36** – Efeitos do ABIS em preparações de traquéia contraídas com KCl e carbacol em meio contendo Ca^{2+} ou Ba^{2+} . 114
- Figura 37** – Influência de fatores endoteliais e canais para potássio no efeito relaxante do ABIS em preparações isoladas de aorta com endotélio pré-contraídas com fenilefrina. 117
- Figura 38** – Avaliação da participação da fosfodiesterase e da proteína quinase A na resposta inibitória vascular do ABIS. 119
- Figura 39** – Avaliação do efeito do ABIS após adição de ativador da proteína quinase C. 122
- Figura 40** – Efeito do ABIS na contração induzida por cafeína em preparações isoladas de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} . 124
- Figura 41** – Efeito do ABIS na contração fásica induzida por fenilefrina em preparações isoladas de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} . 125
- Figura 42** – Efeito do ABIS na contração induzida por cálcio após depleção dos estoques intracelulares. 127
- Figura 43** – Curvas concentração-efeito de carbacol em preparações de bexiga em modelo de cistite hemorrágica. 129
- Figura 44** – Curvas concentração-efeito de carbacol em preparações de traquéia de animais sensibilizados. 131
- Figura 45** – Efeito do ABIS na contração induzida por ovalbumina em preparações isoladas de músculo liso. 133

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 – Características gerais e físico-químicas do (-)- α -bisabolol.	42
Tabela 2 - Soluções nutritoras fisiológicas utilizadas nos experimentos de contratilidade in vitro.	53
Tabela 3 – Valores médios de tensão em preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais.	68
Tabela 4 – Valores médios de amplitude e frequência da atividade contrátil espontânea em preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais.	81
Tabela 5 - Valores de CI_{50} referentes os efeitos relaxantes induzidos pelo ABIS em preparações de músculo liso.	84
Tabela 6 - Valores de CI_{50} referentes os efeitos inibitórios induzidos pelo ABIS em preparações de duodeno e cólon	92
Tabela 7 - Valores de CI_{50} referentes aos efeitos inibitórios induzidos pelo ABIS em preparações isoladas de duodeno e cólon.	96
Tabela 8 - Valores de CI_{50} referentes ao efeito vasodilatador induzido pelo ABIS em presença de antagonistas e inibidores.	120

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ABIS	(-)-alfa-bisabolol
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BaCl₂	Cloreto de bário
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CAF	Cafeína
CaM	Calmodulina
CCE	Curva concentração-efeito
CCh	Carbacol
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
DAG	Diacilglicerol
EGTA	Ácido etileno-bis(β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
E.P.M	Erro padrão da média
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato ácido de potássio
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
LELC	Laboratório Escola Luís Capelo
LFC	Laboratório de Farmacologia Cardiovascular
MgCl₂ . 6H₂O	Cloreto de magnésio hexa-hidratado
MgSO₄ . 7H₂O	Sulfato de magnésio hepta-hidratado

MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato ácido de sódio
ODQ	1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-]-quinoxalin-1-ona
OVA	Ovalbumina
PHE	Fenilefrina
PDE	Fosfodiesterase
PKC	Proteína quinase C
ROCC	Canal para cálcio operado por receptor
SOCC	Canal para cálcio operado por estoque
TEA	Tetraetilamônio
UFC	Universidade Federal do Ceará
VOCC	Canal para cálcio operado por voltagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Plantas como fonte de substâncias biologicamente ativas	22
1.2 Constituintes terpênicos	26
1.3 O músculo liso	29
1.4 Efeitos biológicos e farmacológicos de espécies vegetais que contêm alfa-bisabolol	36
1.5 O alfa-bisabolol	41
1.6 Efeitos biológicos e farmacológicos do sesquiterpeno alfa-bisabolol	43
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1 Geral	49
3.2 Específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 CONSIDERAÇÕES NORMATIVAS ÉTICAS	51
4.2 ANIMAIS	52
4.3 SOLUÇÕES E DROGAS	52
4.4 MODELOS EXPERIMENTAIS	55
4.4.1 Modelo experimental de desafio antigênico com ovoalbumina	55
4.4.1.1 Procedimento de sensibilização dos animais	55
4.4.2 Desafio antigênico	55
4.4.3 Modelo experimental de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida	58
4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE DE PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO	59
4.5.1 Preparação dos tecidos a partir dos órgãos isolados e sistema de registro	59
4.5.2 Experimentos em miógrafo	61
	18

4.5.3	Protocolos experimentais	63
4.5.3.1	Avaliação da viabilidade funcional das preparações isoladas de músculo liso	63
4.5.3.2	CCE para o ABIS em preparações isoladas mantidas em tensão basal	64
4.5.3.3	CCE para o ABIS em preparações isoladas pré-contraídas	66
4.5.3.4	Caracterização do mecanismo de ação do ABIS em preparações isoladas de artéria aorta pré-contraídas	67
4.5.3.4	Efeito do ABIS na contração induzida por KCl ou carbacol em preparações isoladas de duodeno e cólon	70
4.5.3.5	Influência do ABIS na curva concentração-efeito para KCl e agonistas	71
4.5.3.7	Influência do ABIS na curva concentração-efeito para CaCl_2 em preparações isoladas mantidas em meio sem Ca^{2+} na presença de antagonistas de canais VOCC e agonistas de canais ROCC	74
4.5.3.8	Efeito do ABIS em preparações isoladas de traquéia pré-contraídas com KCl e carbacol em meio com cálcio ou bário	75
4.5.3.9	Efeito do ABIS na contração fásica induzida por fenilefrina ou cafeína em preparações de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+}	76
4.5.3.10	Efeito do ABIS em contrações induzidas após depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} em preparações isoladas de aorta	77
5.	RESULTADOS	81
5.1	AVALIAÇÃO GERAL DOS EFEITOS DO ABIS EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO	81
5.1.1	Efeitos do ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso mantidas em tônus basal	81
5.1.2	Efeitos inibitórios do ABIS na atividade rítmica espontânea de preparações de músculo liso mantidas sob tensão basal	84
5.1.5	Efeito inibitório do ABIS nas contrações induzidas por KCl e carbacol em preparações de duodeno e cólon	93
5.2.1	Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por Ca^{2+} em preparações isoladas de traquéia e aorta na presença de KCl	97
5.3	EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO Ca^{2+} EM PREPARAÇÕES ISOLADAS MANTIDAS EM MEIO SEM Ca^{2+} NA PRESENÇA DE AGONISTA FARMACOLÓGICO	102
5.3.1	Efeito do ABIS em curva concentração-efeito ao Ca^{2+} em preparações isoladas de duodeno e traquéia mantidas em meio sem Ca^{2+} na presença de carbacol e verapamil	102
5.3.2	Efeito do ABIS em curva concentração-efeito ao Ca^{2+} em preparação isolada de aorta mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de fenilefrina e nifedipina	105
5.4.1	Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por carbacol em preparações isoladas de traquéia	107
		19

5.5 EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO DE K ⁺ EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO	109
5.5.1 Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por K ⁺ em preparações isoladas de traquéia	109
5.6 EFEITO DO ABIS EM CURVA-CONCENTRAÇÃO AO Ba ²⁺ EM PREPARAÇÕES ISOLADAS MANTIDAS EM MEIO SEM Ca ²⁺ NA PRESENÇA DE KCL	111
5.8 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DO ABIS EM PREPARAÇÕES DE AORTA ISOLADA	116
5.8.1 Avaliação da participação de mediadores endoteliais e de canais de potássio no efeito vasodilatador do ABIS em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina	116
5.8.2 Efeito da inibição da enzima fosfodiesterase (PDE) e da proteína quinase-A (PKA) na curva concentração-efeito do ABIS em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina	118
5.9 EFEITO DO ABIS NA MOBILIZAÇÃO DE Ca²⁺ DOS ESTOQUES INTRACELULARES	123
5.9.1 Efeitos do ABIS na liberação de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático induzida por cafeína	123
5.9.2 Efeitos do ABIS na liberação de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático induzida por fenilefrina	125
5.10 EFEITO DO ABIS NA ENTRADA CAPACITATIVA DE CÁLCIO EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE AORTA	126
5.10.1 Efeito do ABIS nas contrações induzidas pela reposição de cálcio em presença de ácido ciclopiazônico após depleção dos estoques intracelulares em preparações isoladas de aorta	126
5.11 ESTUDO DOS EFEITOS DO ABIS EM MODELOS EXPERIMENTAIS	128
5.11.2 Efeitos do pré-tratamento com ABIS na curva concentração-efeito de carbacol em anéis isolados de traquéia após desafio antigênico com ovalbumina	130
5.11.3 Efeito do pré-tratamento com ABIS na contração induzida por ovalbumina em anéis isolados de traquéia após desafio antigênico	132
5.11.4 Efeito do ABIS na contração induzida por ovalbumina em tiras isoladas de fêo após desafio antigênico	132
6. DISCUSSÃO	135
7. CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas como fonte de substâncias biologicamente ativas

O conhecimento sobre as plantas vem sempre acompanhando em paralelo a evolução humana através das eras históricas (CUNHA, 2002). Dados literários acerca da utilização de espécies vegetais para a cura de doenças e outros males podem ser encontrados desde 50.000 anos atrás (DEVIENNE, et al, 2004). Nos primórdios, o homem buscou baseado na intuição descobrir soluções para várias de suas necessidades básicas como proteção, nutrição e reprodução. Entretanto, foi através de suas experiências e observações que o homem descobriu gradativamente nas plantas uma fonte potencial no tratamento de injúrias ou doenças. Além das plantas com efeitos benéficos, foram descobertas também as nocivas capazes de produzir alucinações ou até mesmo a morte (DEVIENNE et al, 2004). Nesse sentido, as civilizações primitivas perceberam precocemente a existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate à doença, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (CUNHA, 2002). Inicialmente, todo esse conhecimento acumulado foi sendo transmitido oralmente de geração em geração. A terapêutica baseada no uso de plantas esteve, ao longo da história, sob o domínio popular onde o conhecimento empírico do seu valor medicinal prestou um serviço inestimável (MENDONÇA, 1989). Com o aparecimento da escrita toda a informação referente ao conhecimento etnofarmacológico das espécies vegetais passa a ser compilada e armazenada como importante fonte de pesquisa e consulta (CUNHA, 2002).

Atualmente, as plantas têm fornecido um grande número de agentes clinicamente úteis, possuindo considerável potencial como fonte na projeção e no desenvolvimento de novos fármacos. Há estimativas de que existam aproximadamente 200.000 espécies de plantas no mundo, várias delas inclusive correndo o risco de extinção. Aproximadamente 20.000 espécies destas plantas são utilizadas na medicina tradicional, entretanto a maioria não foi avaliada detalhadamente do ponto de vista químico ou farmacológico. Postula-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos sejam derivados direta ou indiretamente de espécies vegetais (CALIXTO, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o valor intrínseco de uma planta medicinal se encontra no seu efeito terapêutico. A mesma OMS afirma que planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Essas substâncias são denominadas princípios ativos, e suas funções fisiológicas nas plantas associam-se à defesa contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar, ou a resíduos do próprio metabolismo vegetal. Pode-se deduzir que tais princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos principalmente através do metabolismo secundário das plantas (MONTANARI, 2002).

O óleo essencial (OE) de plantas denominadas “aromáticas” constitui o conjunto de substâncias voláteis, de natureza fluida e que são produzidos em células especiais como **metabólitos secundários**. O óleo essencial pode ser produzido em várias partes da planta e tem a função de proteção contra doenças e parasitas, além de atrair insetos que auxiliam na polinização. (LAVABRE, 1993) (MATOS & FERNANDES, 1975-1978; CRAVEIRO et al, 1976-a). O método mais empregado para a obtenção desses

óleos essenciais é a destilação pelo vapor: o óleo essencial é evaporado e condensado por resfriamento (CRAVEIRO et al, 1976-b). A maior parte desses óleos é insolúvel em água e menos denso que a mesma, porém formam soluções relativamente homogêneas com solventes orgânicos (MATOS & MATOS, 1989). Quimicamente, eles agregam uma combinação de diversos compostos químicos (denominados constituintes) como terpenos, sesquiterpenos, aldeídos, fenóis, álcoois, cetonas, compostos sulfurados e nitrogenados (MATOS & FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993). Podem conter de 20 a 60 constituintes em diferentes concentrações, mas normalmente apresentam dois ou três componentes em maior concentração (20-70%; constituintes majoritários) comparados com outros constituintes presentes apenas em traços percentuais. Geralmente, esses constituintes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI, 2008). Esses constituintes podem ser ativos ou inativos do ponto de vista farmacológico e as ações dos óleos essenciais provavelmente refletem uma ação combinada desses dois tipos de constituintes. Os constituintes ativos podem atuar de forma sinérgica ou não, ao passo que os constituintes inativos podem influenciar a farmacocinética dos ativos. Devido a essa complexa composição química, postula-se que os óleos essenciais apresentam também uma diversidade de ações farmacológicas, sendo fontes potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos (BAKKALI, 2008). Os óleos essenciais, assim como as plantas aromáticas das quais são extraídos, são empregados na medicina popular na forma de chás ou infusatos no tratamento da rinite alérgica, da cólica menstrual, da amebíase, e como sedativos, estomáquicos, anti-espasmódicos, anti-diarréicos, anti-parasitários, anti-microbianos, analgésicos, diuréticos, anti-maláricos, anti-sifilíticos, hipotensores e /ou anti-hipertensivos (EDRIS, 2007).

Segundo PINTO et al (2002), o Brasil não pode abdicar de sua vocação para a pesquisa de produtos naturais, em virtude da grandeza de seu litoral e por ser o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta. Apesar de o Brasil possuir um grande número de espécies vegetais e recursos naturais em abundância para o desenvolvimento das mesmas, alguns autores ainda consideram pouco expressivo o conhecimento científico das plantas medicinais brasileiras (PINTO et al, 2002). Nesse cenário, o Nordeste do Brasil possui um grande número de plantas aromáticas, fontes de óleos essenciais, além de energia solar em abundância para a produção das mesmas (CRAVEIRO, 1977).

As pesquisas científicas na área de produtos naturais de plantas têm como base seqüencial a comprovação da identidade botânica, a identificação da composição química dos compostos de origem vegetal, a obtenção, identificação e análise de princípios ativos, além da determinação da ação farmacológica e propriedades tóxicas (PINTO et al, 2002). As grandes descobertas de substâncias ativas vegetais podem ser creditadas em grande parte aos avanços tecnológicos para o isolamento e elucidação estrutural, associados ao rápido desenvolvimento na área biotecnológica que possibilita a utilização de ensaios biológicos simplificados e direcionados (VIEGAS et al, 2006). Isso é ilustrado pelo fato que nas três últimas décadas as pesquisas com plantas geraram diversos princípios químicos com atividades farmacológicas importantes (DEVIENNE et al, 2004; VIEGAS et al, 2006).

Apesar do exposto, as pesquisas dos grupos engajados em trabalhos sobre atividade biológica no Brasil não refletem a busca de aplicação para as moléculas isoladas de fontes naturais em toda a sua plenitude. Além disso, vale ressaltar que uma porcentagem significativa desses estudos de farmacologia e toxicologia de produtos naturais de plantas são realizados com extratos vegetais brutos ou frações quimicamente

complexas. Trabalhos envolvendo atividade farmacológica e toxicológica de princípios ativos puros, como os **terpenos e terpenóides** que podem servir como modelos químicos para a indústria farmacêutica, ainda são pouco representativos (PINTO et al, 2002).

1.2 Constituintes terpênicos

As plantas podem produzir substâncias na forma de metabólitos primários e secundários, que cumprem uma grande variedade de funções (CROTEAU et al, 2000; ZWENGER, 2008). Os metabólitos primários, que incluem aminoácidos, açúcares simples, ácidos nucleicos, e lipídios, são compostos fundamentais para diversos processos celulares. Os metabólitos secundários incluem compostos produzidos em

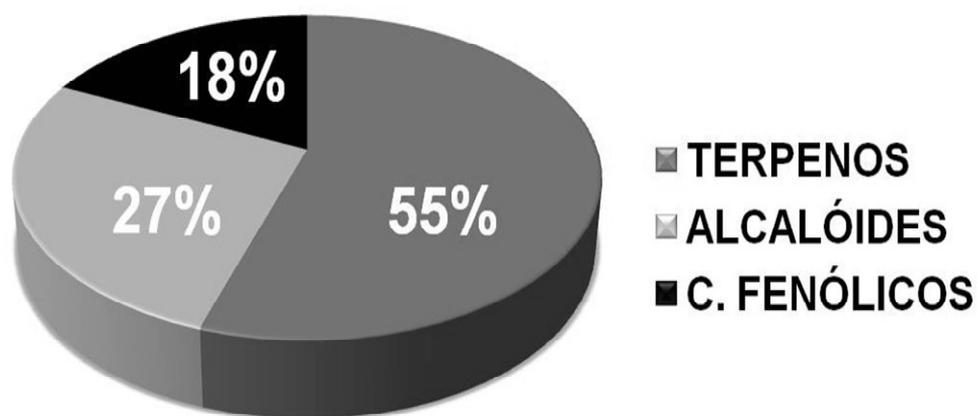


Figura 1. Distribuição percentual dos principais metabólitos secundários de plantas.

Modificado de CROTEAU et al, 2000.

resposta ao estresse, como no caso de agir como defensivo contra animais herbívoros (CROTEAU et al, 2000; KEELING et al, 2006; ZWENGER & BASU, 2008). As plantas podem manufaturar muitos tipos diferentes de metabólitos secundários, que têm sido subsequentemente explorados por humanos pelo seu papel benéfico em uma grande

diversidade de aplicações (BALANDRIN et al, 1985; ZWENGER & BASU, 2008). Segundo CROTEAU et al (2000), entre os principais grupos de metabólitos secundários de plantas os compostos genericamente denominados de terpenos constituem os mais numerosos e estruturalmente diversificados (Figura 1). Os terpenos ocorrem amplamente na natureza e constituem uma ampla e variada classe de hidrocarbonetos que são produzidos por várias espécies de plantas. Nas plantas eles funcionam como sinalizadores químicos, atraentes ou repelentes, uma vez que são responsáveis pela fragrância típica de muitas plantas. Por outro lado, altas concentrações de terpenos podem ser tóxicas e constituem assim uma importante arma contra animais herbívoros e agentes patogênicos (KESSLER & BALDWIN, 2001). A via biossintética dos terpenos envolve principalmente dois precursores: isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), ambos utilizados na via do mevalonato. Resumidamente, a biossíntese dos terpenos abrange a formação do precursor isopentenil difosfato (IPP), a adição repetida de IPPs para formar o precursor prenildifosfato, a modificação do prenildifosfato por sintetases específicas para terpenos para formar o esqueleto da cadeia dos terpenos e finalmente, a modificação enzimática secundária (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos (ROHDICH, 2001).

Em razão do que foi anteriormente descrito, tem sido estabelecido um sistema de nomenclatura para simplificar a complexidade inerente à grande diversidade de estruturas químicas dos terpenos. A teoria que forneceu o primeiro direcionamento conceitual para uma relação estrutural comum entre os terpenos foi formulada por WALLACH em 1887, após realizar investigações estruturais de vários terpenos. Sua teoria afirmou que os terpenos podem ser vistos como constituídos de uma ou mais unidades isopreno (2-metil-1,3-dieno; isoprenil) ligadas no formato “cabeça-cauda”

para formar cadeias lineares ou arranjos para formar anéis. A idéia de Wallach foi adicionalmente refinada em 1950 pelas formulações de RUZICKA da biogenética da regra de isopreno, enfatizando considerações mecanicistas da síntese de terpenos em termos de alongamentos etetrofílicos, reações cíclicas e rearranjos. A extensão da cadeia aumenta o número de reações cíclicas, o que permite uma grande variedade de estruturas (RUZICKA, 1950). De forma consensual, a unidade básica é uma molécula de cinco carbonos denominada unidade isopreno. Assim, a fórmula básica de todos os terpenos é $(C_5H_8)_n$, onde n é o número de unidades isopreno ligadas (PADUCH, 2007). A própria unidade isopreno simples representa, portanto, a classe mais básica de terpenos, os hemiterpenos. Uma unidade isopreno (isoprenil) ligada a uma segunda unidade igual é a definição característica de um monoterpeno (ou simplesmente terpeno) (C10). Enquanto os sesquiterpenos possuem três unidades isopreno (C15), os diterpenos (C20) e os triterpenos (C30) possuem duas e três unidades terpeno, respectivamente. Tetraterpenos (C40) consistem de quatro unidades terpeno e os politerpenos são aqueles formados pela junção de mais de quatro unidades terpeno (mais de oito unidades isopreno). O termo terpenóide é aplicado a um terpeno modificado, por exemplo, pela adição de compostos que contêm oxigênio tais como grupos hidroxil, carbonil, cetona ou aldeído (BAKKALI, 2008; PADUCH, 2007).

Nos últimos anos tem crescido substancialmente o conhecimento adquirido sobre a química de terpenos, alicerçado na bioinformática e nas bases de dados moleculares. Além disso, a compreensão das vias biossintéticas em vários estágios do desenvolvimento da planta tem permitido estimar uma grande potencialidade de efeitos biológicos dessas moléculas (MAINMONE & BARAN, 2007). A grande diversidade de estruturas e funções dos terpenóides tem provocado interesse crescente na sua aplicação comercial. Atualmente eles já são utilizados como inseticidas naturais e substâncias

protetoras no armazenamento de produtos agrícolas (ZWERGER & BASU, 2008; MAINMONE & BARAN, 2007). Também têm demonstrado utilidade na prevenção e na terapia de várias doenças, incluindo câncer, e também apresentam propriedades antimicrobiana, anti-fúngica, anti-parasitária, antiviral, anti-alérgica, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, imunomodulatória e **anti-espasmódica** (PADUCH, 2007).

1.3 O músculo liso

As células musculares lisas (ou não-estriadas) encontram-se dispostas em camadas ou lâminas constituindo órgão que delimitam cavidades, como o trato gastrointestinal, as vias aéreas, a vasculatura, o trato urogenital e o útero (WEBB, 2003; BERNE & LEVY, 2009). Quando ocorre a contração a célula muscular lisa encurta-se, e conseqüentemente altera as dimensões do órgão. Isso cumpre um importante papel fisiológico, uma vez que permite a propulsão do conteúdo luminal (como no peristaltismo do intestino) ou a variação do diâmetro de um tubo para regular resistência ao fluxo de seu conteúdo (como na vasoconstrição) (WEBB, 2003; BERNE & LEVY, 2009). O mecanismo básico envolvido na contração do músculo liso inclui a interação entre os filamentos de actina e miosina, à exemplo do músculo estriado, embora existam certas diferenças. O músculo liso contrai-se em respostas a sinais elétricos ou hormonais e exibe a capacidade de permanecer contraído por períodos extensos (BERNE & LEVY, 2009).

A alteração na concentração citoplasmática de Ca^{+2} [Ca^{+2}]_c, frente a estímulos específicos, constitui o mecanismo básico de regulação do estado contrátil do músculo liso. A concentração citoplasmática de cálcio necessária para o processo contrátil é finamente ajustada por canais iônicos, bombas, compartimentos e tampões

intracelulares (FADZEAN & GIBSON, 2002). Dessa forma, um aumento e uma diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ resultam em contração e relaxamento do músculo liso, respectivamente. No repouso, a $[Ca^{2+}]_c$ é muito menor que no fluido extracelular. Esse cálcio ativador intracelular pode se originar de duas fontes intimamente relacionadas, o espaço extracelular e os estoques intracelulares, principalmente o retículo sarcoplasmático (FADZEAN & GIBSON, 2002). Embora quase sem exceção a contração do músculo liso envolva uma combinação de entrada e liberação de cálcio, os vários tipos de músculo liso podem diferir marcadamente a esse respeito: (1) na contribuição relativa das duas fontes de cálcio para a contração e (2) nos canais iônicos através dos quais o cálcio extracelular pode ter acesso ao interior da célula (FADZEAN & GIBSON, 2002). O conjunto de eventos que envolvem o aumento na disponibilidade intracelular de cálcio necessário ao processo contrátil do músculo liso pode ser definido como acoplamento excitação-contração, separado didaticamente em mecanismos de acoplamento eletromecânico e farmacomecânico (SOMLYO & SOMLYO, 1994).

Durante o processo de acoplamento eletromecânico, o processo primário necessário para o aumento na concentração intracelular de cálcio (e conseqüentemente a contração do músculo liso) é a despolarização de membrana, com a conseqüente abertura de canais de cálcio operados por voltagem (VOCCs, do inglês *voltage operated calcium channels*) do tipo-L. Na maioria, mas não todos os músculos lisos, as contrações evocadas por despolarização de membrana secundária à elevada concentração extracelular de K^+ são completamente dependentes de cálcio extracelular e os bloqueadores de canais de cálcio do tipo-L (p.ex., diidropiridinas) inibem o processo contrátil. O acoplamento eletromecânico parece desempenhar um papel predominante no chamado comportamento fásico do músculo liso, no qual o potencial de membrana freqüentemente exhibe marcadas oscilações. Esse comportamento oscilatório resulta da

ativação sincrônica de canais iônicos dependentes de voltagem e de cálcio na membrana muscular, agindo para permitir um controle modulado por frequência e amplitude da concentração intracelular de cálcio (SOMLYO & SOMLYO, 1994).

Por outro lado, o acoplamento farmacomecânico não depende de mudanças no potencial de membrana. Nesse caso, o aumento na concentração intracelular de cálcio é possível a partir de uma combinação de dois processos, a entrada de cálcio através de canais de cálcio não-operados por voltagem, essencialmente os canais de cálcio operados por receptor (ROCC, do inglês *receptor operated calcium channels*) e os canais de cálcio operados por estoque (SOCC, do inglês *store operated calcium channels*), associada à liberação de cálcio dos estoques intracelulares (SOMLYO & SOMLYO, 1994). Os mecanismos farmacomecânicos para a contração após interação da célula muscular lisa com um agonista excitatório incluem: (1) Agonistas ligam-se a receptores acoplados a proteína G heterotrimérica, estimulando a atividade de fosfolipase C (PLC). Essa enzima é específica para o lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂), catalisando a formação de dois potentes segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG); (2) migração do IP₃ a partir da membrana e interação com um receptor específico situado do retículo sarcoplasmático, permitindo a liberação de cálcio a partir desse estoque intracelular (AKATA, 2007); (3) O DAG, junto com o cálcio, ativa a proteína quinase C (PKC), que fosforila proteínas-alvo específicas. Existem várias isoenzimas de PKC nos diversos músculos lisos (vascular, uterino, intestinal) e cada uma exerce um papel específico. Em alguns casos, a PKC exerce efeitos promotores de contração tais como fosforilação de canais de cálcio do tipo-L ou outras proteínas que regulam a ciclagem de pontes cruzadas. Ésteres de forbol, um grupo de compostos sintéticos que ativam a PKC, mimetizam a ação do DAG e induzem contração do músculo liso. O sinal de cálcio

produzido após administração de um agonista em células que demonstram acoplamento farmacomecânico frequentemente envolve uma elevação inicial rápida, mas transitória, na concentração intracelular de cálcio (proveniente do retículo sarcoplasmático), seguida de uma elevação menor, mas sustentada, dependente da entrada de cálcio (proveniente do espaço extracelular). Esse último processo de influxo, aliado ao processo de “sensibilização ao cálcio” permite que o aparato contrátil possa ser ativado por níveis de cálcio intracelular próximos do repouso, o que faz com que tais músculos possam manter um certo tônus por períodos prolongados na presença do agonista (AKATA, 2007). Esse processo é energeticamente favorável e ocorre nos chamados músculos lisos tônicos (WEBB, 2003). Os canais de Ca^{2+} regulados por estoque (SOCC) apresentam um comportamento fisiológico bastante peculiar. São ativados como resposta compensatória após a depleção do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, constituindo o fenômeno denominado “entrada capacitativa de cálcio” (PUTNEY, 1990). Isso implica que o retículo sarcoplasmático também apresenta um papel fundamental na regulação da concentração de Ca^{2+} citoplasmática (AKATA, 2007). O retículo sarcoplasmático possui um canal de Ca^{2+} dependente de Ca^{2+} denominado receptor para rianodina, que é sensível à rianodina e também à cafeína. A abertura desse canal apresenta uma latência curta de tempo, resultando em elevações localizadas do Ca^{2+} citoplasmático (SOMLYO & SOMLYO, 1994; ORALLO, 1996). Isso difere do receptor de IP_3 também situado no retículo sarcoplasmático, que é capaz de liberar uma grande quantidade de Ca^{2+} (ORALLO, 1996).

A concentração intracelular elevada de cálcio se liga à proteína calmodulina (CaM), e o agora chamado complexo cálcio-calmodulina (4Ca^{2+} -CaM) ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*). A MLCK, por sua vez fosforila a cadeia leve de 20 kDa da miosina (MLC, do inglês *myosin light*

chain) permitindo a interação entre actina e miosina (WEBB, 2003). Isso significa que o cálcio não ativa diretamente as proteínas contráteis do músculo liso. Ao invés disso, a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) de 20-kDa serve como mecanismo ativador da atividade de ATPase que promove interação actina-miosina, aumentando assim o número de ciclos de pontes cruzadas e permitindo a contração muscular (BARANY, 1996; SOMLYO et al, 1999).

O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de uma substância que estimula inibição do mecanismo contrátil (WEBB, 2003). Associado a isso, quando a concentração citoplasmática de Ca^{2+} diminui, a quinase da cadeia leve de miosina é inativada, por dissociar-se da calmodulina. Nesse momento, a fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP, do inglês *myosin light chain phosphatase*) desfosforila a cadeia leve da miosina induzindo o relaxamento (AKATA, 2007; WEBB, 2003). Independente de qual seja o mecanismo, o processo de relaxamento requer uma diminuição na concentração intracelular de cálcio e um aumento na atividade da MLC fosfatase (SOMLYO et al, 1999; WEBB, 2003). Além disso, a elevação na concentração de AMPc ativa proteína quinase A (PKA), que pode fosforilar a miosina quinase de cadeia leve e diminuir sua sensibilidade ao cálcio e induzir relaxamento do músculo liso (WEBB, 2003). Vários mecanismos estão implicados na remoção do cálcio citoplasmático, e envolvem o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática. A recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático é dependente da hidrólise do ATP. Essa Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA) quando fosforilada liga-se a dois íons cálcio, que são então translocados para a luz do retículo sarcoplasmático. A SERCA é inibida por vários agentes farmacológicos: tapsigargina, vanadato e ácido ciclopiazônico (WEBB, 2003). A membrana plasmática também possui um bomba do tipo Ca^{2+} -ATPase que fornece um

mecanismo adicional para reduzir a concentração do cálcio ativador na célula. Adicionalmente, trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana e funcionam para diminuir a concentração intracelular de cálcio. Esse antiporte de baixa afinidade está em associação direta com os níveis intracelulares de cálcio e pode ser inibido por amilorida e quinidina (WEBB, 2003).

A maioria dos fenômenos celulares relacionados à contração e o relaxamento do músculo liso estão representados pelo tecido muscular liso vascular conforme representação na figura 2 (Modificada de WEBB, 2003).

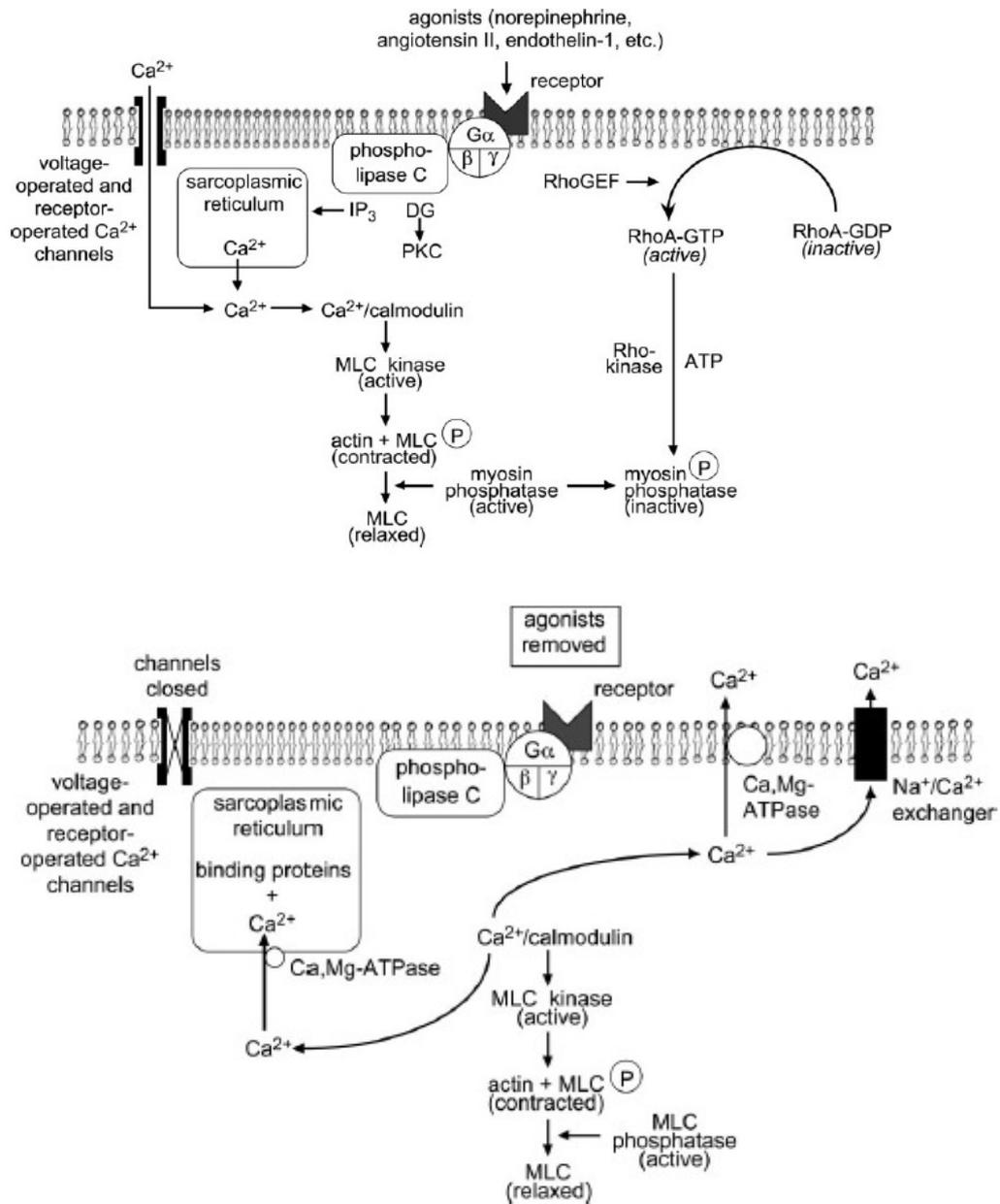


Figura 2. Mecanismos celulares envolvidos na contração (A) e no relaxamento (B) das células musculares lisas vasculares. (Fonte: Webb, 2003).

1.4 Efeitos biológicos e farmacológicos de espécies vegetais que contêm alfa-bisabolol

Algumas espécies vegetais que contêm naturalmente o alfa-bisabolol (ABIS) têm sido tradicionalmente utilizadas com fins medicinais (MCKAY & BLUMBERG 2006; KAMATOU & VILJOEN, 2010). Dessas espécies vegetais fontes de (-)- α -bisabolol, a mais amplamente estudada até o momento é certamente a *Matricaria recutita* ou simplesmente camomila. A camomila tem sido utilizada como planta medicinal há milhares de anos, na forma de chá preparado com as flores secas. Historicamente, há relatos que os egípcios consideravam a camomila sagrada como uma dádiva do deus sol, e a utilizavam para tratar febre e ensolação. A camomila também foi utilizada como planta medicinal nas civilizações greco-romanas. O nome “camomila” vem de duas palavras gregas significando “maçã da terra” em virtude de seu aroma semelhante à maçã. No século seis, foi utilizada para tratar insônia, lombalgia, neuralgia, reumatismo, problemas de pele, indigestão, flatulência e dor de cabeça. Na Europa ela é considerada como “cura tudo”, e na Alemanha é referida como “alles zutraut”, significando “capaz de qualquer coisa” (BERRY, 1995; GARDINER, 1999). Diferentes espécies vegetais de uso medicinal são denominadas popularmente de camomila; porém, a camomila verdadeira é definida como sendo constituída pelas inflorescências de *Matricaria recutita* Linn., *Asteraceae*, sendo também referida como sinônimo científica de *Chamomilla recutita* (L.) e *Matricaria chamomilla* L (GARDINER, 1999). É originária da Europa e Oeste Asiático e, atualmente, está dispersa em praticamente todos os continentes (GARDINER, 1999). Embora existam numerosas variedades de camomila, as duas mais populares são a camomila romana (*Anthemis nobilis*) e a camomila alemã (*Matricaria recutita*; Figura 3). A camomila alemã é considerada a mais potente das duas, além de ser a mais cultivada e ter recebido mais investigação científica (GARDINER, 1999).

A camomila é uma das plantas medicinais mais amplamente utilizada e bem documentada no mundo, sendo citada na farmacopéia de 26 países (SALAMON, 1992). No Brasil, a camomila também é uma planta muito utilizada, incluindo a população nordestina. Infusões e óleos essenciais preparados a partir de flores frescas ou secas possuem propriedades aromáticas, condimentares e de coloração. Ambas as preparações são utilizadas em vários produtos comerciais. É utilizada primariamente como sedativo, ansiolítico e anti-espasmódico, e no tratamento de leve irritação na pele e na inflamação (GARDINER, 1999). Os relatos iniciais creditaram à camomila alemã propriedades anti-inflamatória, bacteriostática, carminativa, sedativa, antiséptica e espasmolítica (NEWALL et al, 1996; BLUMENTHAL, 1998, GARDINER, 1999). Atualmente, a camomila alemã é utilizada internamente e externamente para tratar uma extensiva lista de condições. Ela é usada externamente no tratamento de úlceras, eczema, gota, irritações de pele, neuralgia, dor reumática e hemorróidas (MANN & STABA, 1986; NEWALL et al, 1996). Oncologistas europeus utilizam uma solução bucal de camomila chamada Kamillosan ® para tratar úlceras bucais induzidas por quimioterápicos (BLUMENTHAL, 1998). A Comissão Germânica E aprovou a camomila para uso externo na inflamação de pele, de membranas mucosas e na região ano-genital, doenças bacterianas de pele e inflamação do trato respiratório (BLUMENTHAL, 1998). A camomila também é amplamente utilizada internamente como chá ou bebida tônica para tratar ansiedade, histeria, pesadelos, insônia e outros problemas do sono, e até mesmo delirium tremens (MARTENS, 1995). A camomila tem especial utilização na medicina popular para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso, como a ansiedade. AWAD et al (2007) demonstraram que fitoterápicos obtidos de espécies como a camomila alemã, que são comercialmente disponíveis no Canadá, possuem a capacidade de interferir em enzimas cerebrais responsáveis pelo metabolismo do ácido gama-amino-

butírico (GABA), substância fisiologicamente importante na comunicação neuronal no sistema nervoso central. A camomila é bastante utilizada também no tratamento de distúrbios gastrintestinais incluindo flatulência, indigestão, diarreia, anorexia, náusea e vômito. A Comissão Alemã E recomenda a camomila para tratar espasmos gastrintestinais e doenças inflamatórias do TGI (BLUMENTHAL, 1998). Na Alemanha, por exemplo, flores de camomila podem ser legalmente comercializadas para obter uma preparação do tipo chá a ser utilizada no tratamento de espasmos intestinais e doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (TGI) (MCKAY & BLUMBERG, 2006). A preparação fitoterápica STW 5 (Iberogast®), que possui flores de camomila em sua composição, demonstrou eficácia equivalente à cisaprida (agonista serotoninérgico capaz de aumentar o trânsito peristáltico estomacal) para o tratamento de pacientes com dispepsia funcional associada a dismotilidade (RÖSCH et al, 2002). Há relato que tal efeito seja resultado da ação combinada dos componentes da preparação sobre o músculo liso gástrico, culminando em efeitos inibitórios na região proximal e excitatórios na região distal do estômago (SCHEMANN et al, 2006). Compostos fitoterápicos de plantas contendo alfa-bisabolol mostraram atividade anti-ulcerogênica com eficácia comparável à da cimetidina (KHAYYAL et al., 2001). Recentemente, foram descritas interessantes atividades da camomila na regeneração de tecidos lesionados, onde os animais tratados com a planta mostraram atividade de re-epitelização mais rápida do que os animais controle. Nesse processo, observou-se maior organização de feixes de fibras de colágeno, maior presença de fibroblastos com diminuição de células inflamatórias na região lesionada (JARRAHI et al., 2008; MARTINS et al., 2009).



Figura 3. Ilustração da *Matricaria chamomilla*, também conhecida como camomila alemã.

(Fonte: University and Jepson Herbaria; Collection: UCJEPS; Copyright © University and Jepson Herbaria)
http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=3333+3333+1207+0057

A camomila também apresentou efeitos benéficos na hiperglicemia bem como nas complicações provocadas pela diabetes. O extrato etanólico dessa planta foi capaz

de produzir redução dos níveis plasmáticos de glicose sem causar hipoglicemia severa, como acontece no caso da aplicação exagerada de insulina (KATO et al, 2008). Quando administrado em ratos diabéticos após tratamento com estreptozotocina, o extrato etanólico da camomila exerceu um efeito protetor sobre as células beta pancreáticas, além de diminuir o estado hiperglicêmico diretamente relacionado ao estresse oxidativo (CEMEK et al, 2008).

A camomila é geralmente segura para o consumo, embora a recomendação geral seja que pacientes com hipersensibilidade a utilizem com cautela (GARDINER, 1999). Vale ressaltar que apesar de sua ampla utilização como remédio doméstico, relativamente poucos ensaios bem projetados têm avaliado em detalhes os vários benefícios propostos pela camomila. Trabalho recente utilizando células humanas tem sugerido a inibição da fosfodiesterase-AMPC como mecanismo subjacente do efeito anti-espasmódico creditado à camomila (MASCHI et al, 2008). Apesar da evidência experimental fornecida pelo trabalho anteriormente citado, não fica evidente qual (ou quais) constituinte da camomila seria o principal responsável pelos efeitos observado.

Cerca de 120 constituintes distintos já foram identificados nas flores da camomila alemã (MADAY, 1999; GUPTA, 2010). Os principais incluem os azulenos (1 a 15%; incluindo o camazuleno), em menor extensão espatulenol apigenina, umbeliferona, ácido cafeico, luteonina, rutina, quercetina (0,5 a 5%), e o **terpenóide alfa-bisabolol** como constituinte majoritário (entre 75 e 80%) (MADAY, 1999; GUPTA, 2010).

1.5 O alfa-bisabolol

O alfa-bisabolol, também conhecido como alfa-4-dimetil-alfa-(4-metil-3-pentenil)-3-ciclohexeno-1-metanol, é um álcool sesquiterpênico monocíclico insaturado de ocorrência natural. Foi isolado pela primeira vez em 1975 a partir da Matricaria chamommila por Isaac e colaboradores. Conforme ilustrado na figura 4, a molécula alfa-bisabolol pode apresentar-se na forma de quatro estereoisômeros: (-)- α -bisabolol, (-)-epi- α -bisabolol, (+)- α -bisabolol e (+)-epi- α -bisabolol. O estereoisômero α -(+)-bisabolol é mais raro, enquanto que o α -(-)-bisabolol é o mais frequentemente encontrado em espécies vegetais (KAMATOU & VILJOEN, 2010).

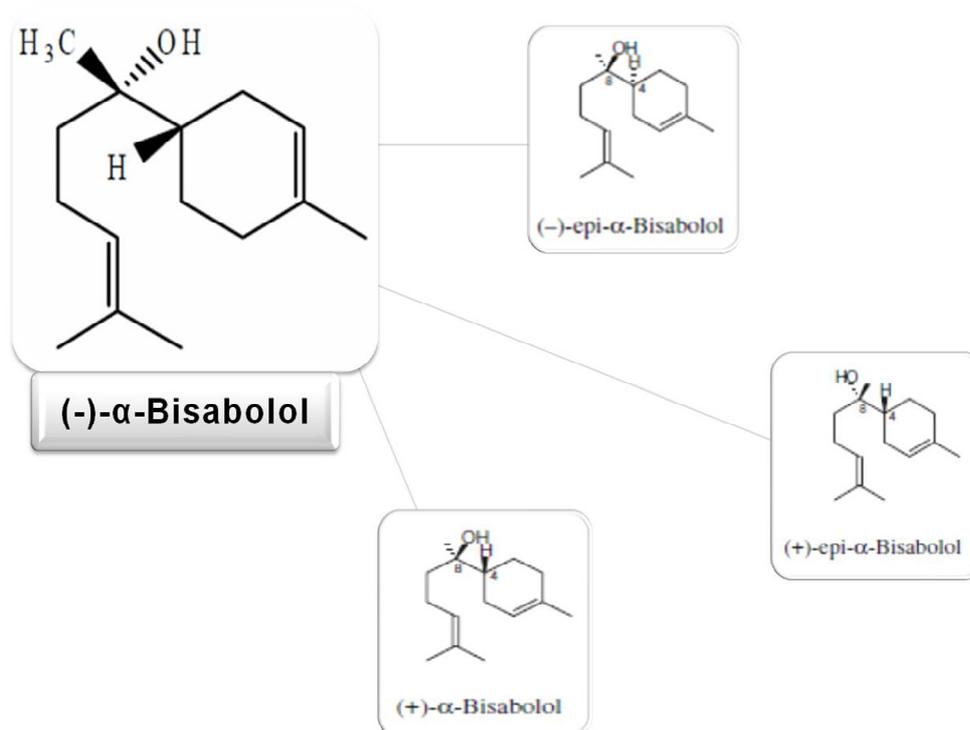


Figura 4. Estrutura química do (-)- α -bisabolol e seus estereoisômeros relacionados.

Fonte: KAMATOU & VILJOEN, 2010.

Geralmente, quando se refere ao alfa-bisabolol, o estereoisômero α -(-)-bisabolol (ABIS) está implicado. O ABIS (também conhecido como levomenol) está presente em várias espécies de plantas e pode ser obtido por hidrodestilação da camomila alemã (*Matricaria chamomilla*), da sálvia (*Salvia runcinata*), e das espécies *Vanillosmopsis sp.* (*V. pohlii*, *V. arborea*) e *Myoporum grassifolium*. *Matricaria chamomilla* e *Salvia runcinata* contêm até 50 e 90% de ABIS, respectivamente (ISAAC & THIEMER, 1975; VILJOEN et al, 2006; KAMATOU & VILJOEN, 2010). Outra fonte potencial menos explorada de ABIS é a madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus*) que pode conter até 85% desse sesquiterpeno (DE SOUZA et al, 2008; KAMATOU & VILJOEN, 2010).

O ABIS possui um fraco aroma adocicado floral e apresenta-se em temperatura ambiente como líquido de coloração amarelada (Sigma-Aldrich, 2011). É uma substância muito lipofílica e, portanto, praticamente insolúvel em água, mas solúvel em certos solventes orgânicos como o etanol. Possui certa propensão a se oxidar, sendo os

CARACTERÍSTICA		REF.
Peso molecular	222,37 g/mol	1
Fórmula	C ₁₅ H ₂₆ O	1
Densidade relativa	0,929 g/cm ³	2
Coloração	Amarelada	2
Ponto de ebulição	135 °C	2
Solubilidade	Água: insolúvel Solventes orgânicos: solúvel	2

Tabela 1. Características gerais e físico-químicas do ABIS. REF: Referência. (1) – BATHIA et al, 2008; (2) Sigma-Aldrich, 2011.

principais produtos da oxidação os óxidos de bisabolol A e B (KAMATOU & VILJOEN, 2010). A tabela 1 sumariza algumas características gerais e físico-químicas do (-)- α -bisabolol.

Os autores costumam associar o ABIS como uma substância de baixa toxicidade. Os dados disponíveis para toxicidade oral aguda indicam valores de DL₅₀ na ordem de 15.1 mL/kg para camundongos (HABERSANG et al, 1979) e superior a 5g/kg para ratos (CIR, 1999, MADHAVAN, 1999).

Tradicionalmente, o ABIS é utilizado em decorativos cosméticos, fragrâncias finas, xampus e outros produtos assim como em produtos não-cosméticos como detergentes de uso doméstico e também em formulações farmacêuticas. No setor farmacêutico, a aplicação do ABIS está relacionada aos relatos de suas propriedades anti-inflamatória, anti-espasmódica, anti-alérgica, vermífuga e permeadora de drogas (KAMATOU & VILJOEN, 2010). Embora seja bastante utilizado em preparações comerciais, estudos farmacológicos detalhados envolvendo o mecanismo de ação do ABIS como constituinte isolado ainda são escassos na literatura.

1.6 Efeitos biológicos e farmacológicos do sesquiterpeno alfa-bisabolol

Tradicionalmente, a atividade anti-inflamatória da camomila é atribuída ao ABIS (KAMATOU & VILJOEN, 2010). De fato, alguns estudos têm creditado uma ação desse sesquiterpeno em variadas condições de estresse inflamatório. O trabalho pioneiro de TORRADO et al (1995) relatou efeito protetor do ABIS no dano gástrico causado por ácido acetilsalicílico, um modelo experimental bem estabelecido e

associado eventos inflamatórios. Foi demonstrada também uma ação inibitória na desgranulação de mastócitos provocada pelo sulfato de protamina, revelando uma ação anti-histaminérgica do ABIS (MILLER et al, 1996). Também foi demonstrada atividade anti-úlceras do ABIS na lesão causada por etanol e indometacina, associada ao estresse inflamatório (BEZERRA et al, 2009; MOURA-ROCHA et al, 2009). LEITE et al (2010), demonstraram a habilidade do ABIS em atenuar os eventos adversos associados a modelos experimentais de nocicepção visceral e inflamação em camundongos. Em trabalho recente, KIM et al (2011) relataram efeito inibitório do ABIS na resposta inflamatória induzida em cultura de macrófagos (células RAW264.7). Segundo esses autores, o sesquiterpeno foi capaz de induzir regulação descendente da expressão gênica das enzimas COX-2 e iNOS através da inibição de fatores como o NF- κ B (KIM et al, 2011).

A atividade antitumoral do ABIS também tem merecido atenção especial na literatura científica. CAVALIERI et al (2004) relataram a capacidade que essa substância possui de provocar apoptose em linhagens de células de glioma humano com alto grau de malignidade. Seus efeitos citotóxicos são tempo- e dose-dependentes, e são mediados por indução de apoptose por vias mitocondriais. Por outro lado, o ABIS não afeta a viabilidade de células neuronais normais. Esses dados, associado à baixa toxicidade do ABIS, demonstram que essa substância tem um perfil de segurança que a tornam farmacologicamente interessante e com potencial utilização terapêutica. Em estudos de mutagenicidade, o ABIS mostrou possuir ação anti-mutagênica mediada por efeito inibitório na ativação metabólica de substâncias pró-mutagênicas (GOMES-CARNEIRO et al, 2005). O estudo de DARRA et al (2008) acrescentou uma nova visão do efeito antitumoral do ABIS, por inferir a mitocôndria como alvo da rápida e eficiente ação desse sesquiterpeno em células murinas de glioblastoma. Mais recentemente,

CHEN et al (2010) demonstraram, através de técnicas de biologia molecular, a capacidade do ABIS em induzir citotoxicidade para algumas linhagens celulares de câncer hepático humano, como PC-3, ECA-109 e HepG2. Além disso, esses mesmos autores corroboraram o papel central da mitocôndria no efeito apoptótico do ABIS em células tumorais (CHEN et al, 2010).

Acrescentando diversidade aos efeitos biológicos e farmacológicos do ABIS, ALVES et al (2010) apontaram esse sesquiterpeno como um novo bloqueador nervoso periférico. Eles observaram uma diminuição na excitabilidade neuronal em nervos isolados de camundongos, e creditaram esse efeito a um bloqueio de canais de sódio induzido pelo sesquiterpeno (ALVES et al, 2010).

Coube a HOLUB et al (1954) o primeiro relato uma ação espasmolítica do ABIS, enquanto ACHTERRATH-TUCKERMANN et al (1980) demonstraram que esse constituinte exerceu efeito inibitório nos espasmos induzidos por cloreto de bário em íleo de cobaia com uma eficácia próxima de 91% em relação à droga de referência (papaverina). Em estudo mais recente, MENEZES et al (2010) relataram um efeito hipotensor induzido pelo ABIS, indicando a possibilidade da existência de uma potencial atividade no músculo liso vascular por parte desse sesquiterpeno.

Apesar de existirem vários relatos na literatura sugerindo benefícios à saúde relacionados com a utilização medicinal de preparações de camomila, há pouca informação associando esses efeitos benéficos com o constituinte ABIS, especialmente no que diz respeito ao seu efeito sobre o músculo liso.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Plantas como a *Chamomilla recutita* (usualmente conhecida como camomila alemã) apresentam grandes quantidades do constituinte ativo alfa-bisabolol, um álcool sesquiterpênico insaturado.

Essa planta possui ampla utilização na medicina popular para o tratamento de diversas condições tais como inflamação, hiperglicemia e distúrbios gastrintestinais. Sabe-se também que grande parte dos terpenos exibe atividade biológica alterando o comportamento de tecidos musculares lisos. Uma vez que muitas dessas condições envolvem alterações no funcionamento da célula muscular lisa, decidimos investigar o efeito do sesquiterpeno alfa-bisabolol em preparações isoladas. Até o momento, os estudos que relatam os efeitos farmacológicos do alfa-bisabolol no músculo liso são escassos. Além de caracterizar seus efeitos em diferentes preparações isoladas, propomos dar ênfase à compreensão do seu modo de ação. Também iniciamos estudos para demonstrar a ação dessa substância em algumas células musculares lisas (p. ex. músculo liso traqueal e vesical) cujo comportamento motor apresenta-se alterado por estímulos inflamatórios. Pretendemos, portanto, estudar se essa substância possui efeitos diretos ao ser adicionado à solução extracelular que mantém esses tecidos, bem como avaliar, ao ser administrado in vivo, se será capaz de inibir o desenvolvimento de alterações do comportamento contrátil que sejam causadas por eventos inflamatórios.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Estudar o perfil da atividade farmacológica do álcool sesquiterpênico ABIS em preparações isoladas de músculo liso vascular e não-vascular.

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos do ABIS na tensão passiva e na atividade espontânea de preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais;
- Estudar os efeitos do ABIS em preparações isoladas de músculo liso expostas a estímulos contráteis diferenciados;
- Esclarecer o mecanismo de ação dos efeitos do ABIS na contratilidade do músculo liso de preparações isoladas de traquéia;
- Elucidar o mecanismo de ação dos efeitos observados para o ABIS sobre a contratilidade do músculo liso de preparações vasculares de aorta;
- Relatar os efeitos do ABIS em preparações isoladas de músculo liso de animais submetidos a modelos experimentais de disfunção contrátil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais que serão descritos nessa seção foram realizados em sua maioria no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Também foram realizados experimentos no Laboratório Escola Luíz Capelo (LELC) do DFF-UFC, e no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFC) do DFF da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1 CONSIDERAÇÕES NORMATIVAS ÉTICAS

Os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Guia de Princípios Éticos para Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório publicado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animal de Laboratório (www.cobea.org.br). Todos os procedimentos experimentais propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (protocolo 48/09) da UFC.

4.2 ANIMAIS

O estudo foi realizado em ratos Wistar machos (250-300 g) e camundongos Swiss machos (25-30 g), todos obtidos a partir de colônias locais mantidas no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno em grupos de 6 cada, respeitando o ciclo 12 h claro/12 h escuro. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e os animais tiveram livre acesso à água e alimento.

4.3 SOLUÇÕES E DROGAS

Para os procedimentos cirúrgicos foi utilizado o anestésico pentobarbital sódico disponível comercialmente (Cristália) em solução injetável. Nos experimentos com preparações isoladas de artéria aorta, artéria mesentérica e traquéia utilizou-se a solução nutritora fisiológica de Krebs-Henseleit. Em preparações isoladas de fundo de estômago, duodeno, cólon e bexiga urinária, foi utilizada a solução nutritora de Tyrode. As preparações isoladas de útero foram mantidas em solução nutritora de Jalon. Todas as soluções nutritoras foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos a partir de soluções-estoque previamente armazenadas. Essas soluções-estoque foram preparadas com sais puros de grau analítico, adquiridos da empresa Cequímica (Fortaleza). As composições de todas as soluções nutritoras anteriormente descritas estão sumarizadas na tabela 2.

Nos experimentos in vitro onde foram utilizadas soluções nominalmente sem cálcio, o cloreto de cálcio (CaCl_2) foi omitido ou foi substituído pelo cloreto de bário (BaCl_2), sempre preservando a mesma concentração molar total.

	Krebs-Henseleit	Tyrode
Composição	[mM]	[mM]
NaCl	118	136
KCl	1,2	5
KH_2PO_4	1,18	-----
NaH_2PO_4	-----	0,36
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,18	-----
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-----	0,98
NaHCO_3	25	11,9
CaCl_2	2,5	2
Glicose	11,1	5,5

pH 7.4

Tabela 2 – Composição das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos de contratilidade in vitro.

Os fármacos fenilefrina (PHE), carbacol (CCh), acetilcolina (ACh), verapamil, tetraetilamônio (TEA), L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), e cafeína foram solubilizadas diretamente em água destilada. Nifedipina, ácido ciclopiazônico, KT-5720 e 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-]-quinoxalin-1-ona (ODQ) foram solubilizados em DMSO (dimetil-sulfóxido). Indometacina foi solubilizada em água destilada contendo 5% de bicarbonato de sódio Glibenclamida e ácido etileno-bis(β -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) foram solubilizadas em solução de água destilada contendo 5% de NaOH. O citrato de sildenafil foi solubilizado em solução de água destilada contendo 0,5% de HCl. O método utilizado para solubilizar a albumina bovina (grau II) será descrito no item 4.4.1.1. Todas as drogas anteriormente citadas foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e preparadas em soluções com concentrações de 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara durante os experimentos. As diluições adicionais necessárias a cada protocolo experimental foram realizadas diretamente em solução nutritora.

A ifosfamida (HoloXane[®]) foi adquirida de ASTA Medica (Frankfurt, Alemanha) e solubilizada em solução salina (NaCl 0,9%) estéril, sendo ela gentilmente fornecida pelo Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA).

O (-)- α -bisabolol (ABIS) (grau de pureza $\geq 95\%$) foi adquirido de Sigma-Aldrich e foi solubilizado em solução nutritora contendo 0,5% de Tween 80 (Sigma-Aldrich), cuja concentração máxima na câmara nunca excedeu 0,06% (v/v).

Todas as soluções foram sonicadas e agitadas em aparelho Vortex imediatamente antes do uso, para permitir melhor homogeneização.

4.4 MODELOS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Modelo experimental de desafio antigênico com ovoalbumina

4.4.1.1 Procedimento de sensibilização dos animais

Ratos Wistar machos foram sensibilizados através da injeção intraperitoneal (i.p.) de 1 mg ovoalbumina (OVA; chicken egg albumin, grade II; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) administrada com $\text{Al}(\text{OH})_3$ (1 mg/mL em NaCl 0,9%) .

4.4.2 Desafio antigênico

Treze dias após o procedimento descrito no item anterior, os animais foram submetidos ao desafio antigênico por inalação do antígeno sensibilizante (ovalbumina). Nesse processo de desafio antigênico (broncoprovocação), os ratos foram alojados em caixas de acrílico (30 x 16,6 x 19,8 cm). Na parte superior da caixa foi disposta tampa removível para a colocação dos animais no compartimento interno. Nas porções laterais foram confeccionados dois orifícios: um para acoplar o nebulizador ultra-sônico (Respira Max® Inalador ultra-sônico, NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda., SP),

por meio do qual foi realizada a nebulização de solução com o antígeno sensibilizante e o outro servindo de escape, evitando a reinalação do ar expirado. Foram considerados animais desafiados os ratos previamente sensibilizados e que foram submetidos ao desafio antigênico por inalação do antígeno sensibilizante.

A ovalbumina utilizada no desafio antigênico foi preparada imediatamente antes da sua utilização em solução salina (NaCl 0,9%) e mantida à temperatura ambiente. Após o preparo, a solução de ovalbumina foi acondicionada em recipiente adaptado ao nebulizador acoplado à caixa de acrílico para permitir o processo de inalação do antígeno. Após colocação do animal na caixa de acrílico, o período máximo de duração da inalação foi estabelecido em 30 minutos, exceto quando ocorreu desconforto respiratório (aparecimento de tiragem intercostal, desconforto respiratório, aumento do ritmo respiratório ou tosse associada à coriza intensa) que poderia, eventualmente, comprometer a sobrevivência do animal. A inalação do antígeno nesse período de 30 minutos foi dividida em duas sessões em seqüência, de 15 minutos cada. Na primeira, utilizou-se 1 mg/mL de ovoalbumina e na segunda sessão 5 mg/mL. Em outro grupo experimental, os animais receberam pré-tratamento inalatório com ABIS (1 mg/mL) por 15 minutos e, logo em seguida (após 3 minutos) foram submetidos ao mesmo procedimento de desafio antigênico já descrito. A figura 5 sumariza todos os procedimentos experimentais anteriormente descritos.

Para verificação de êxito no processo de imunização foi utilizada a reação de Schultz-Dale nos experimentos de contratilidade. A ovalbumina (10 µg/mL) foi adicionada ao banho em alguns anéis da traquéia de um animal previamente sensibilizado. O aparecimento imediato de uma contração após a adição de ovalbumina indica que o animal foi sensibilizado com sucesso (Figura 6).

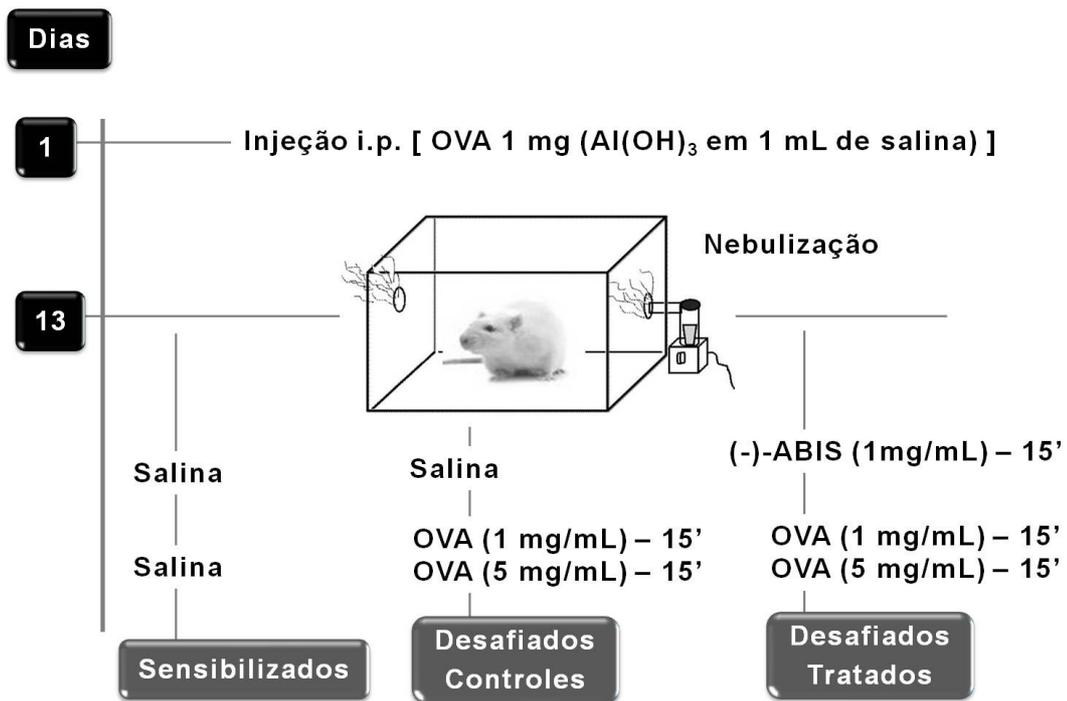


Figura 5 – Representação esquemática do modelo experimental de desafio antigênico com ovalbumina.

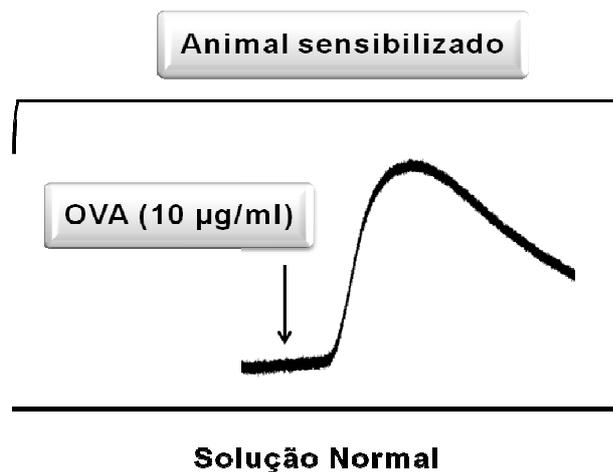


Figura 6 – Representação esquemática da reação de Schultz-Dale observada em tecidos isolados de animais sensibilizados à ovalbumina.

4.4.3 Modelo experimental de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Camundongos Swiss albinos foram divididos em três grupos. O grupo de indução de cistite hemorrágica recebeu uma dose única de ifosfamida (400 mg/kg, i.p.), enquanto que no grupo controle foi administrado volume equivalente de solução salina (NaCl 0,9%, i.p.). Em outro grupo experimental os animais foram tratados com ABIS (100 mg/kg, p.o.) 1 hora antes da injeção de ifosfamida. Os animais de todos os grupos foram sacrificados 12 horas (RIBEIRO et al, 2002) após receberem os tratamentos (Figura 7). Após o sacrifício, os tecidos vesicais foram rapidamente removidos para a realização dos protocolos experimentais referentes à contratilidade in vitro.

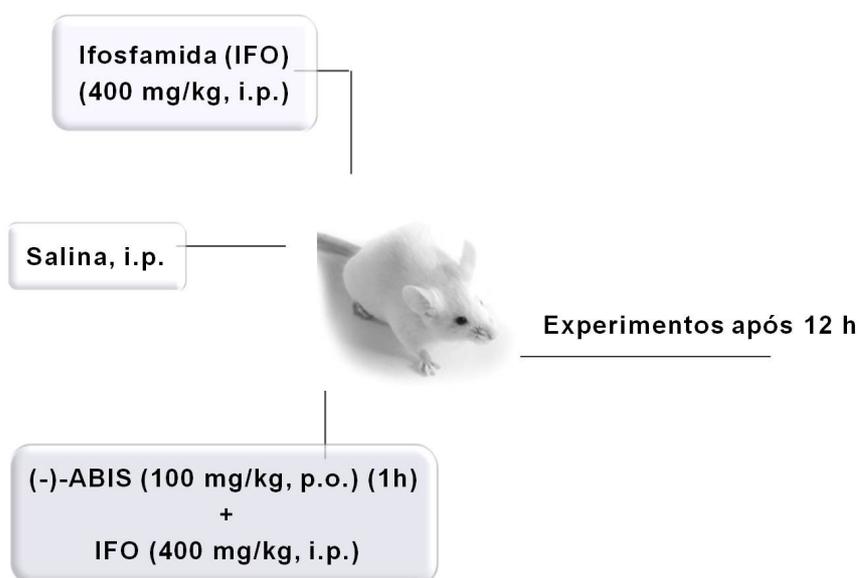


Figura 7 – Representação esquemática do modelo experimental de cistite hemorrágica induzida por ifosfamida

Tem sido estabelecido na literatura que os tecidos vesicais de animais tratados com ifosfamida apresentam disfunção funcional, com atenuação da resposta contrátil frente às curvas concentração-efeito de carbacol e KCl, em comparação com seus respectivos controles (MACEDO et al, 2011).

4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE DE PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO

4.5.1 Preparação dos tecidos a partir dos órgãos isolados e sistema de registro

Ratos e camundongos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e sacrificados por deslocamento cervical. Os órgãos foram rapidamente removidos e imersos em placa de Petri contendo solução nutritora fisiológica (pH = 7,4; em temperatura ambiente) para remoção do tecido conectivo e adiposo com auxílio de um dispositivo estereoscópico. As preparações isoladas de artéria aorta, cólon e traquéia foram dispostas em segmentos no formato de anéis. A luz dos anéis foi atravessada paralelamente por dois dispositivos triangulares de aço inoxidável suspensos por fios. Já as preparações de fundo de estômago, bexiga urinária e duodeno foram confeccionadas no formato de tiras longitudinais. As tiras foram amarradas em cada extremidade com fios de montadas verticalmente. Em seguida, todas as preparações de músculo liso obtidas a partir de seus respectivos órgãos isolados foram suspensas em câmaras (5 mL de capacidade) contendo solução nutritora fisiológica em pH 7.4, temperatura de 37 °C e continuamente aeradas com mistura carbogênica (95% O₂/5% CO₂).

Uma vez na câmara, a extremidade inferior das preparações foi conectada a uma haste fixa e a extremidade superior foi acoplada a um transdutor de força. As alterações produzidas na tensão muscular foram mensuradas de forma isométrica através do transdutor de força (ML870B60/C-V, AD Instruments, Austrália) ligado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab™ 8/30, AD Instruments), e foram expressas em gramas (g). A tensão passiva em repouso aplicada às preparações isoladas de artéria aorta, traquéia, bexiga urinária, fundo de estômago e duodeno foi de 1 g. Nas preparações de cólon foi aplicada tensão basal de 2 g. A figura 8 ilustra o aparato utilizado para o estudo de contratilidade das preparações de músculo liso descritas nesse item.

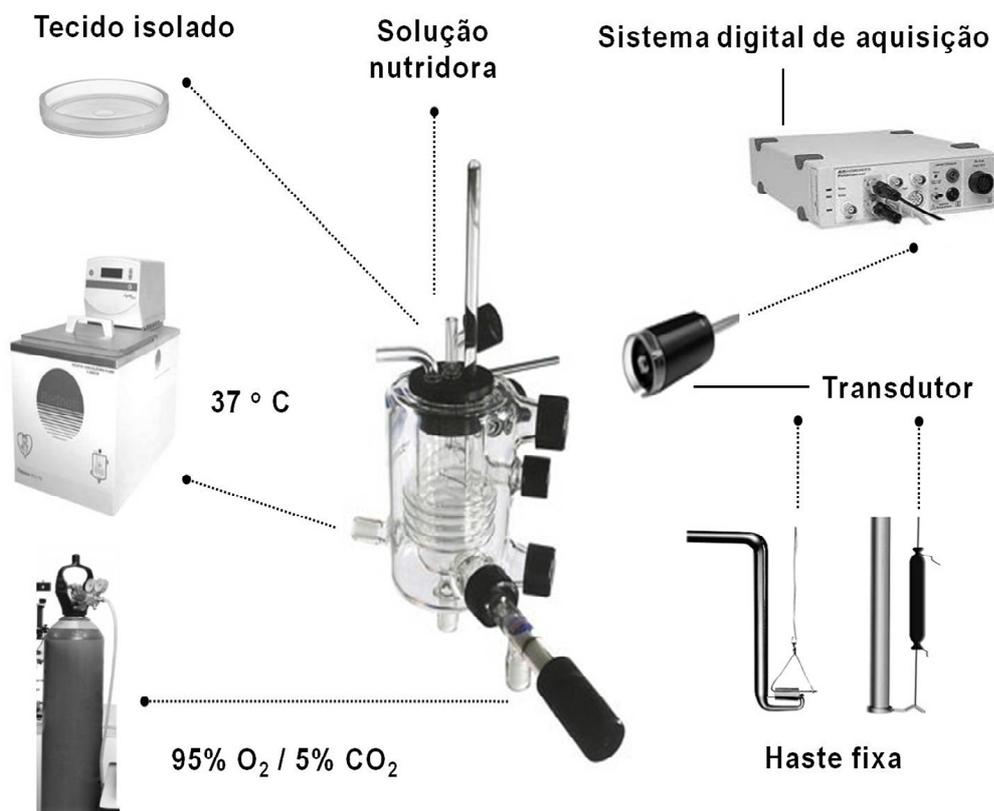


Figura 8 – Representação esquemática do aparato utilizado para estudo da contratilidade in vitro de preparações isoladas de músculo liso

4.5.2 Experimentos em miógrafo

Após eutanásia como descrito no item 4.5.1, o leito mesentérico de ratos foi completamente excisado e fixado no formato de arco em placa de Petri. Tal disposição permitiu a identificação e o isolamento, com auxílio de aparelho estereoscópico, dos vasos arteriais correspondentes ao segundo ramo da artéria mesentérica superior. Após apropriada dissecação, os ramos da artéria mesentérica foram dispostos em formato de anéis cilíndricos montados horizontalmente em um miógrafo (610M-DMT, Aarhus, Dinamarca). Dois fios de tungstênio (40 μm) foram cuidadosamente inseridos na luz dos segmentos arteriais. Um dos fios foi fixado ao micrômetro para o ajuste de tensão através do processo de normalização (descrito a seguir), o outro foi conectado ao transdutor de força para mensuração isométrica de força (em mN). Os anéis mesentéricos com endotélio foram incubados com solução nutritiva de Krebs-Henseleit (37°C; pH 7,4; aerada com 95% O₂/5% CO₂) por um período de 1 hora. Após esse período cada segmento foi submetido ao procedimento de normalização para estabelecimento da tensão passiva ideal (MULVANY & HALPERN, 1977) e após esse procedimento foi respeitado mais uma etapa de estabilização de 30 minutos. A figura 9 ilustra os procedimentos descritos nesse item.

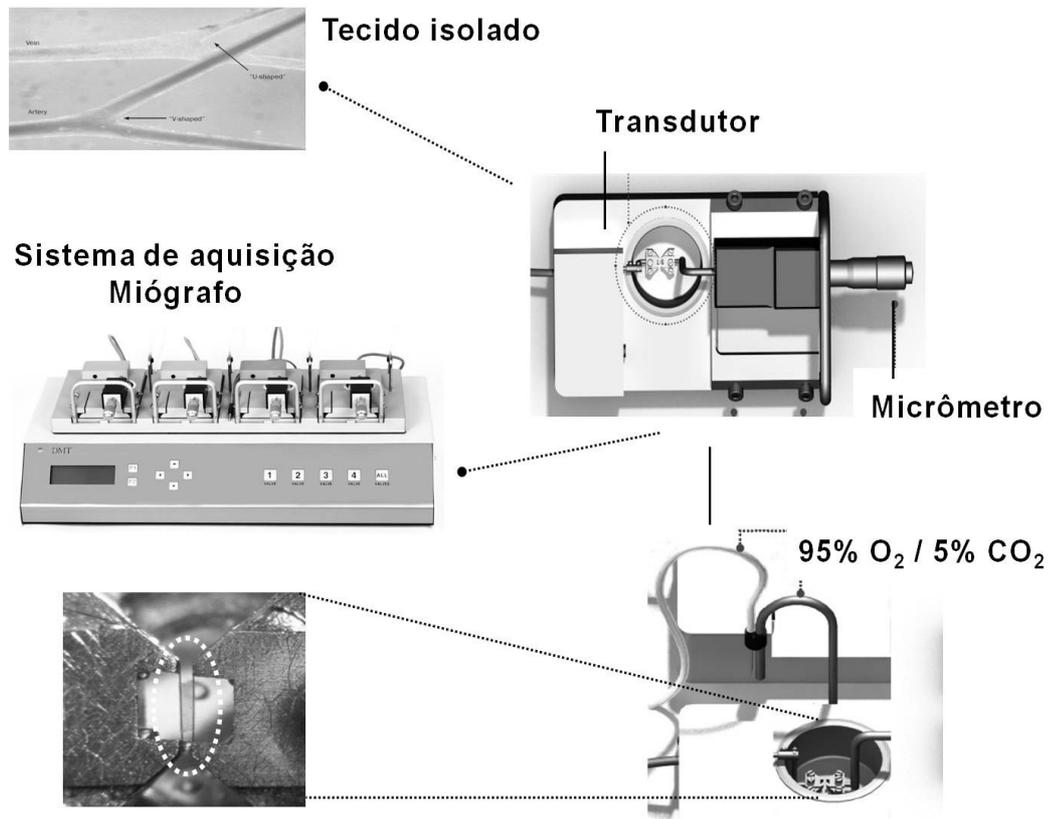


Figura 9 – Representação esquemática do sistema de miógrafo utilizado para estudo da contratilidade *in vitro* de preparações isoladas de vasos sanguíneos de pequeno calibre.

4.5.3 Protocolos experimentais

4.5.3.1 Avaliação da viabilidade funcional das preparações isoladas de músculo liso

Cada preparação isolada foi submetida a uma tensão inicial passiva por um período 60 minutos em solução nutritora. Durante esse período, o meio nutritivo foi renovado em intervalos de 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos. Após esse período, foram induzidas três contrações sucessivas com KCl (60 mM; solução despolarizante) intercaladas com lavagem da preparação com solução nutritora normal. As preparações que não reproduziram uma contração com magnitude similar nas três exposições ao KCl (60 mM) foram descartadas. Em alguns protocolos experimentais, a média percentual dessas respostas contráteis foi utilizada como contração de referência para expressar graficamente os dados obtidos. Nas preparações vasculares, o endotélio foi removido mecanicamente através de esfregaços suaves na luz vascular com haste de algodão embebido em solução fisiológica de Krebs-Henseleit. A remoção foi confirmada pela ausência de relaxamento da acetilcolina (1 μ M) em preparações pré-contraídas com fenilefrina (0,1 μ M; agonista α_1 -adrenérgico). Todos os procedimentos acima descritos foram genericamente denominados fase de estabilização, e encontram-se ilustrados na figura 10.

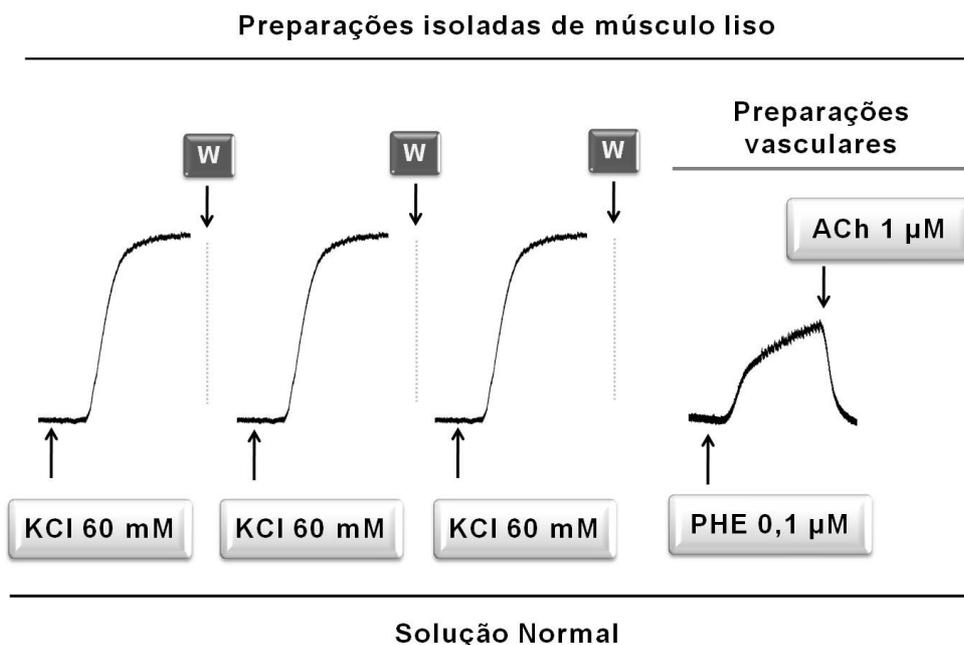


Figura 10 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a viabilidade funcional das preparações isoladas de músculo liso (Fase de estabilização); W = lavagem.

4.5.3.2 CCE para o ABIS em preparações isoladas mantidas em tensão basal

Para avaliar os efeitos do ABIS sobre a tensão basal de preparações isoladas de músculo liso, o álcool sesquiterpênico foi adicionado de forma crescente e cumulativa (1 – 3 – 10 – 30 – 100 – 300 – 600 – 1000 μM) à solução fisiológica nutritora normal na câmara de banho após a fase de estabilização respeitando rigorosamente o intervalo de 10 minutos entre cada concentração. Considerou-se alteração do tônus basal, a subtração entre a linha de base obtida ao final de cada período de exposição ao ABIS, da obtida na sua ausência, expressa em gramas. Nas preparações que apresentaram atividade contrátil espontânea foram mensuradas a frequências dos eventos e a amplitude (diferença pico-vale) dos mesmos na ausência e na presença do ABIS,

adicionado cumulativamente. Em grupo separado de preparações isoladas, foi construída a curva concentração-efeito para o veículo (Tween 80) nas mesmas concentrações usadas para solubilizar o ABIS, seguindo as condições experimentais descritas anteriormente. A figura 11 ilustra os procedimentos descritos nesse item.

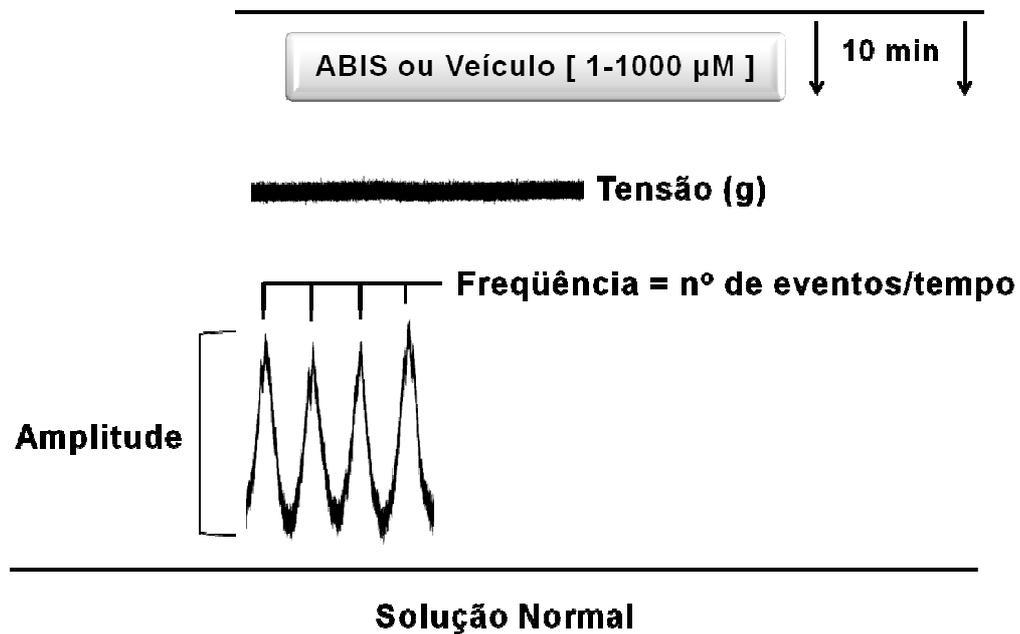


Figura 11 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o comportamento contrátil de preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais.

4.5.3.3 CCE para o ABIS em preparações isoladas pré-contraídas

Essas séries de experimentos foram realizadas para avaliar a resposta do ABIS em preparações isoladas de músculo liso mantidas em solução nutritora normal e submetidas a uma pré-contracção. Em todas as preparações isoladas foi utilizado o KCl (60 mM) para induzir uma contracção sustentada através do mecanismo eletromecânico (SOMLYO & SOMLYO, 1994). Para induzir uma contracção sustentada através do mecanismo farmacomecânico (SOMLYO & SOMLYO, 1994) foram utilizados o carbacol (1 μ M; agonista colinérgico) em preparações isoladas não-vasculares (exceto para duodeno e cólon que foram estimulados com contracções repetidas e não sustentadas e útero, por não ter sido feito esse protocolo) ou fenilefrina (1 ou 10 μ M) em preparações vasculares. Após o estabelecimento de uma fase estável (componente tônico) na pré-contracção induzida por um dos agentes anteriormente descritos, o ABIS ou o seu veículo foram adicionados de maneira similar ao descrito no item 4.5.3.2. Os resultados foram expressos como percentual (%) da resposta controle obtida por um dos agentes contráteis na ausência do ABIS. A figura 12 ilustra os procedimentos descritos nesse parágrafo.



Figura 12 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas.

4.5.3.4 Caracterização do mecanismo de ação do ABIS em preparações isoladas de artéria aorta pré-contraídas

Essa série de experimentos foi realizada para caracterizar o possível mecanismo de ação do efeito vasodilatador do ABIS em preparações isoladas de músculo liso de aorta. Para tanto, preparações isoladas de aorta foram incubadas com diversos antagonistas farmacológicos antes da indução de uma contração sustentada com fenilefrina. Anéis de aorta com endotélio foram pré-tratados com L-NAME (inibidor não-específico da enzima óxido nítrico sintase), ODQ (inibidor da guanilato ciclase), indometacina (inibidor da enzima ciclo-oxigenase), tetraetilamônio (bloqueador não-específico de canais de potássio), glibenclamida (bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP), KT-5720 (inibidor da proteína quinase A – PKA) ou citrato de sildenafil (inibidor da enzima fosfodiesterase 5). Todos os procedimentos acima descritos estão ilustrados na figura 13. A tabela 3 sumariza as concentrações e os tempos de incubação dos antagonistas, além da concentração de fenilefrina utilizada para induzir pré-contração em cada procedimento experimental.

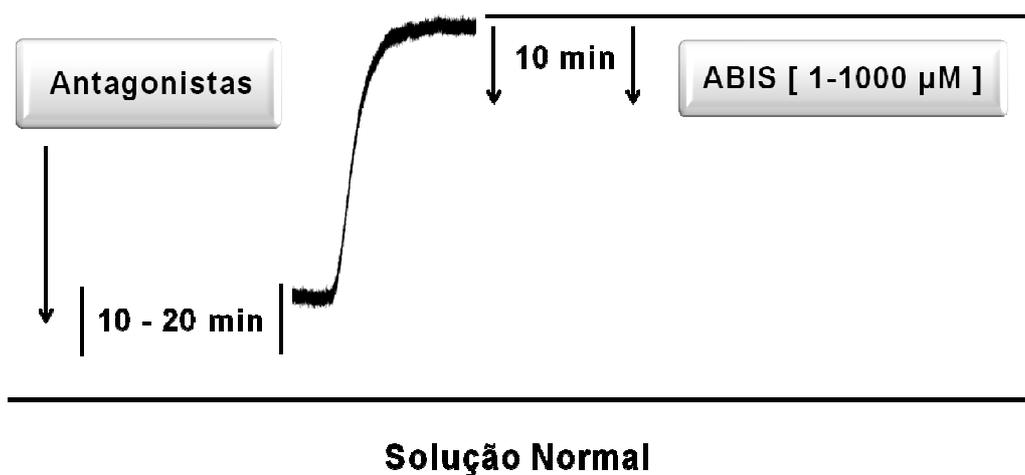


Figura 13 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas.

Antagonista	Concentração	t (min)	[PHE]
L-NAME	100 µM	20	0,3 µM
ODQ	10 µM	15	0,3 µM
Indometacina	10 µM	20	1 µM
Sildenafil	10 µM	10	10 µM
KT-5720	10 µM	10	1 µM
TEA	1 mM	10	1 µM
Glibenclamida	1 µM	10	1 µM

Tabela 3 – Resumo das concentrações e os tempos de incubação dos antagonistas e das concentrações de fenilefrina utilizadas para induzir pré-contracção. R [PHE] = concentração de fenilefrina; t (min) = tempo de incubação do antagonista em minutos.

Em outra série de experimentos, o éster de forbol (PDB; ativador da proteína quinase C) foi adicionado a anéis de aorta, com endotélio intacto, mantidos em solução sem Ca^{+2} em presença de EGTA (1 mM). Após o estabelecimento de uma contração sustentada induzida pelo PDB, o ABIS foi adicionado de forma cumulativa semelhante ao que foi descrito no item 4.5.3.3 (Figura 14).

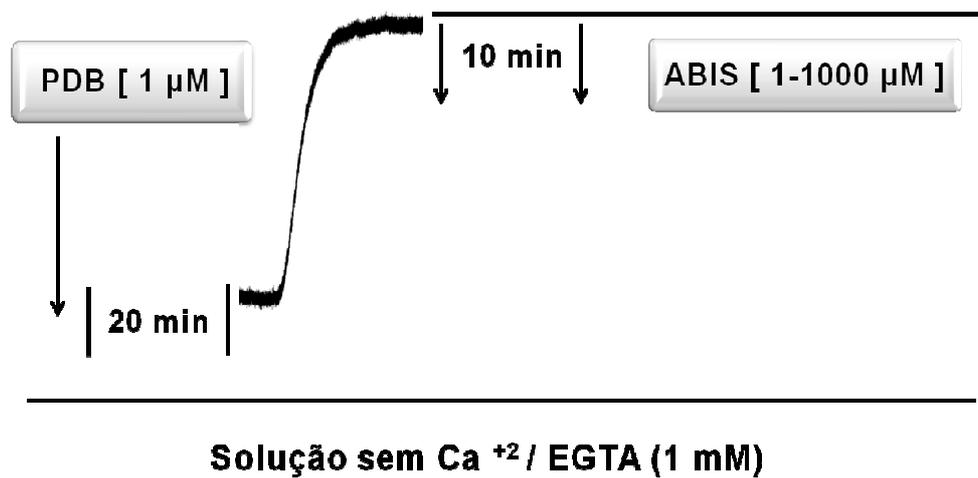


Figura 14 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS em preparações isoladas pré-contraídas após ativação da proteína quinase C. PDB = éster de forbol.

4.5.3.4 Efeito do ABIS na contração induzida por KCl ou carbacol em preparações isoladas de duodeno e cólon

Preparações isoladas de músculo liso de duodeno e cólon de ratos apresentam dificuldade inerente de manter contração sustentada e estável frente a agentes contráteis usuais como o KCl. Dessa forma, os alguns experimentos com preparações isoladas de duodeno e cólon foram realizados através da adição não-cumulativa de ABIS. Nesses experimentos, uma dada concentração isolada de ABIS (1 - 1000 μ M) foi adicionada à câmara de perfusão por 5 minutos e o estímulo contrátil foi aplicado ainda na presença do álcool sesquiterpênico. Após o registro da contração, foi promovida uma troca completa da solução nutritora. Esse procedimento foi repetido para todas as concentrações subseqüentes do ABIS permitindo assim a construção de uma curva concentração-efeito. A magnitude da contração foi mensurada no pico da deflexão. A resposta induzida pelo KCl ou CCh na ausência de ABIS foi considerada como controle para posterior comparação com as demais obtidas na presença do sesquiterpeno. A figura 15 ilustra os procedimentos descritos nesse item.

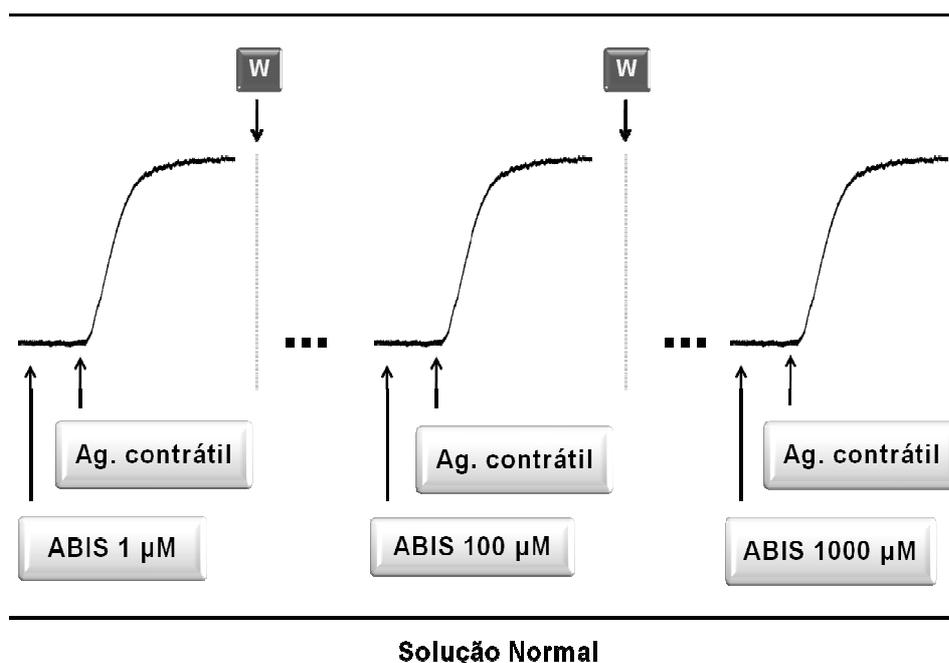


Figura 15 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS nas contrações induzidas em preparações isoladas de duodeno e cólon.

4.5.3.5 Influência do ABIS na curva concentração-efeito para KCl e agonistas

Em preparações isoladas de aorta foram confeccionadas curvas concentração-efeito (CCE) com adição cumulativa e crescente de KCl (10 – 20 – 40 – 60 – 100 – 120 mM), PHE (0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 µM), ou CCh (0,01 – 0,03 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 – 30 µM). Inicialmente, as curvas foram construídas na ausência do ABIS. Após um período de 60 minutos, com lavagens sucessivas do tecido para retorno às condições experimentais iniciais, os mesmos foram expostos por 10 min ao ABIS ou veículo (Tween 80) (100 ou 300 µM). Em seguida, foram construídas as mesmas curvas concentração-efeito descritas anteriormente ainda na presença do ABIS ou veículo. Os procedimentos descritos nesse item estão ilustrados na figura 16. A contração induzida pela concentração isolada de 60 mM de KCl durante a fase de

estabilização foi utilizada como referência para expressar os valores das curvas obtidas nessa série experimental.

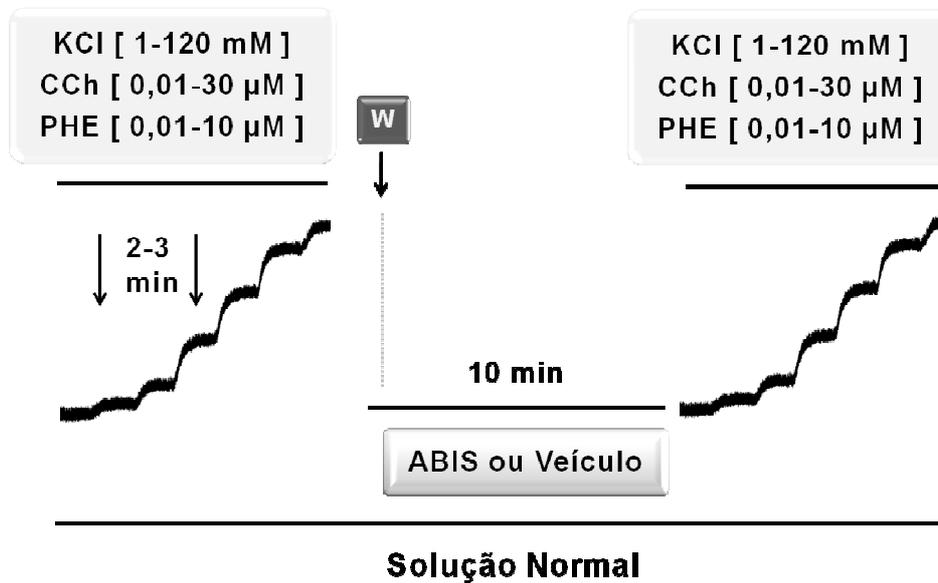


Figura 16 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para KCl ou agonistas. W = lavagem.

4.5.3.6 Influência do ABIS na curva concentração-efeito para CaCl_2 ou BaCl_2 em preparações isoladas mantidas em meio sem Ca^{2+} na presença de KCl

Essa série experimental foi projetada para avaliar se o ABIS produz efeito em contrações induzidas pelo influxo de Ca^{2+} ou Ba^{2+} a partir do meio extracelular mediante a abertura de canais de Ca^{2+} ativados por voltagem (VOCC). Após a fase de estabilização, preparações isoladas de aorta, traquéia, duodeno ou bexiga urinária foram mantidas em solução nutritora sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM) em presença de KCl (60 mM). Em seguida foi construída uma curva concentração-efeito cumulativa pela

adição de CaCl_2 ou BaCl_2 (0,1 – 0,5 – 1 – 3 – 10 – 20 mM). Após um período de 60 minutos, com lavagens sucessivas do tecido para retorno às condições experimentais iniciais, os mesmos foram expostos por 10 min ao ABIS ou veículo (Tween 80) (100 ou 300 μM). Em seguida, foram construídas as mesmas curvas concentração-efeito, ainda na presença do ABIS ou veículo, em condições similares às descritas anteriormente. Os valores das curvas obtidas nessa série experimental na presença e na ausência de ABIS (ou veículo) foram expressos em relação à contração induzida pela concentração isolada de 60 mM de KCl obtida durante a fase de estabilização. A figura 17 ilustra os procedimentos descritos nesse item.

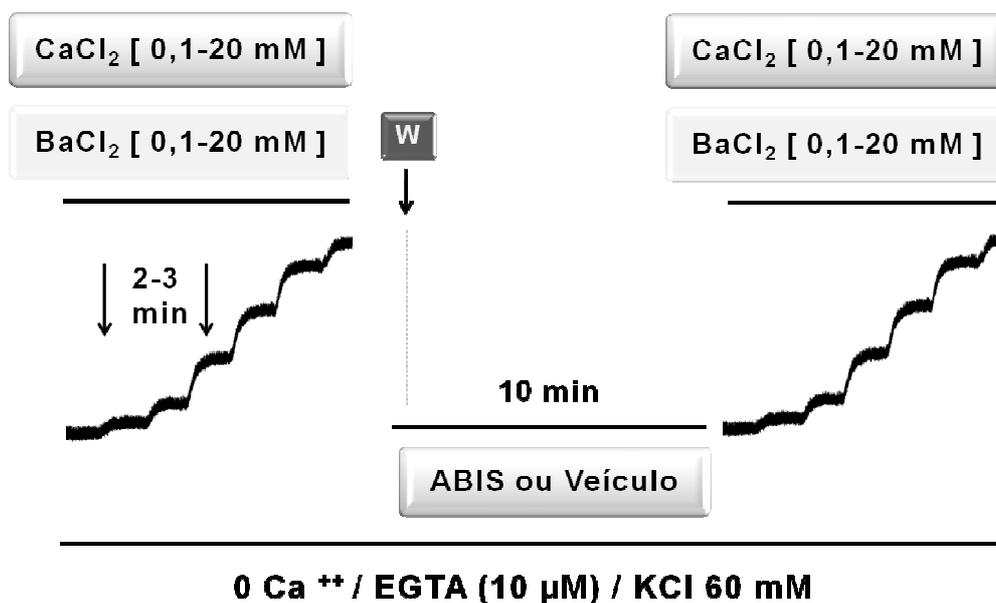


Figura 17 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para CaCl_2 ou BaCl_2 em presença de KCl. W = lavagem.

4.5.3.7 Influência do ABIS na curva concentração-efeito para CaCl_2 em preparações isoladas mantidas em meio sem Ca^{2+} na presença de antagonistas de canais VOCC e agonistas de canais ROCC

Os experimentos dessa série visaram avaliar se o ABIS exerce efeito em contrações induzidas pelo influxo de Ca^{2+} a partir do meio extracelular mediante a abertura de canais de Ca^{2+} ativados por receptor (ROCC). Após a fase de estabilização, preparações isoladas foram mantidas em solução nutritiva sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM). Em seguida, as preparações de aorta foram incubadas com nifedipina (1 μM) e PHE (60 μM) e as preparações de traquéia e duodeno com verapamil (10 μM) e CCh (60 μM). Nessas condições, foi construída uma curva concentração-efeito cumulativa pela adição de CaCl_2 ou BaCl_2 (0,1 – 0,5 – 1 – 3 – 10 – 20 mM). Após um período de 60 minutos, com lavagens sucessivas do tecido para retorno às condições experimentais iniciais, os mesmos foram expostos por 10 min ao ABIS ou veículo (Tween 80) (100 ou 300 μM). Em seguida, foram construídas as mesmas curvas concentração-efeito, ainda na presença do sesquiterpeno ou veículo, em condições similares às descritas anteriormente. A contração induzida pela concentração isolada de 60 mM de KCl obtida durante a fase de estabilização foi utilizada como referência para os valores das curvas obtidas nessa série experimental na ausência e na presença de ABIS (ou veículo). Os procedimentos descritos nesse item estão ilustrados de forma esquemática na figura 18.

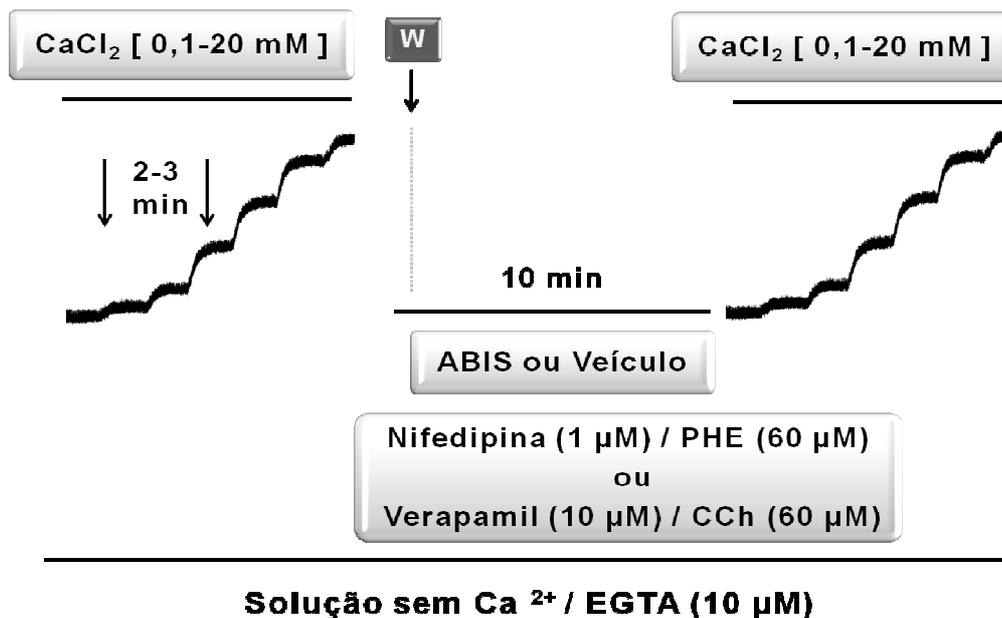


Figura 18 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS na curva CCE para CaCl₂ em presença de agonistas ROCC. W = lavagem.

4.5.3.8 Efeito do ABIS em preparações isoladas de traquéia pré-contraídas com KCl e carbacol em meio com cálcio ou bário

Com o objetivo de avaliar se o ABIS age na entrada de cálcio através de canais operados por voltagem, preparações de traquéia foram estimuladas com 100 mM de KCl na presença de solução contendo Ca²⁺ (2 mM) ou Ba²⁺ (2 mM). Após o estabelecimento da contração, a concentração de KCl foi aumentada em intervalos de 25 mM até atingir 150 mM para promover o estímulo máximo da contração relacionada a canais operados por voltagem. Quando essa última contração atingiu um platô, foi adicionado 10 μM de carbacol ainda na presença de alta concentração de KCl. Nessas condições, o ABIS foi adicionado às preparações e a contração registrada. A figura 19 ilustra a série experimental descrita nesse item.

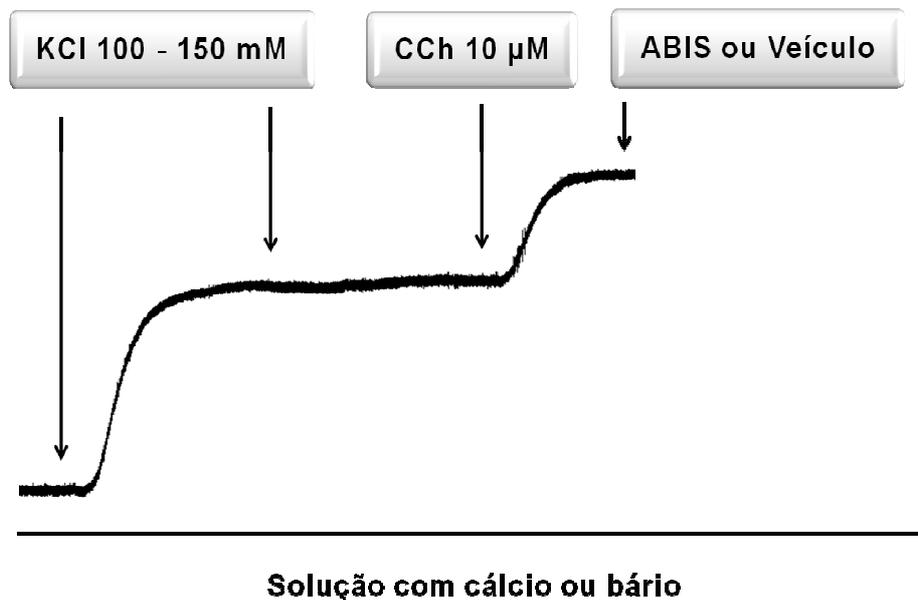


Figura 19 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar a influência do ABIS em preparações de traquéia pré-contraídas com KCl e carbacol em meio com cálcio ou bário.

4.5.3.9 Efeito do ABIS na contração fásica induzida por fenilefrina ou cafeína em preparações de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+}

Nesses protocolos experimentais, o objetivo foi avaliar o efeito do ABIS nas contrações secundárias à liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Após a fase de estabilização, preparações isoladas de artéria aorta com endotélio foram mantidas em meio sem Ca^{2+} (contendo 1 mM de EGTA) e em seguida foram adicionadas PHE (1 μM) ou cafeína (30 mM). Após este procedimento, as preparações foram novamente expostas a solução nutritora normal (com Ca^{2+}) por 60 minutos e estimuladas com PHE (1 μM) com objetivo de preencher novamente os estoques intracelulares de Ca^{2+} . Na seqüência, as preparações foram mais uma vez expostas a solução sem Ca^{2+} (contendo

EGTA 1 mM), incubadas com ABIS ou veículo (100 ou 300 μ M) por 10 min. Ainda em presença de ABIS (ou veículo) foi administrada PHE (1 μ M) ou cafeína (30 mM). A figura 20 ilustra os procedimentos acima descritos. A amplitude destas contrações fásicas obtidas antes e depois da incubação do ABIS (ou veículo) foi expressa em relação à contração induzida por KCl (60 mM) obtida durante a fase de estabilização.

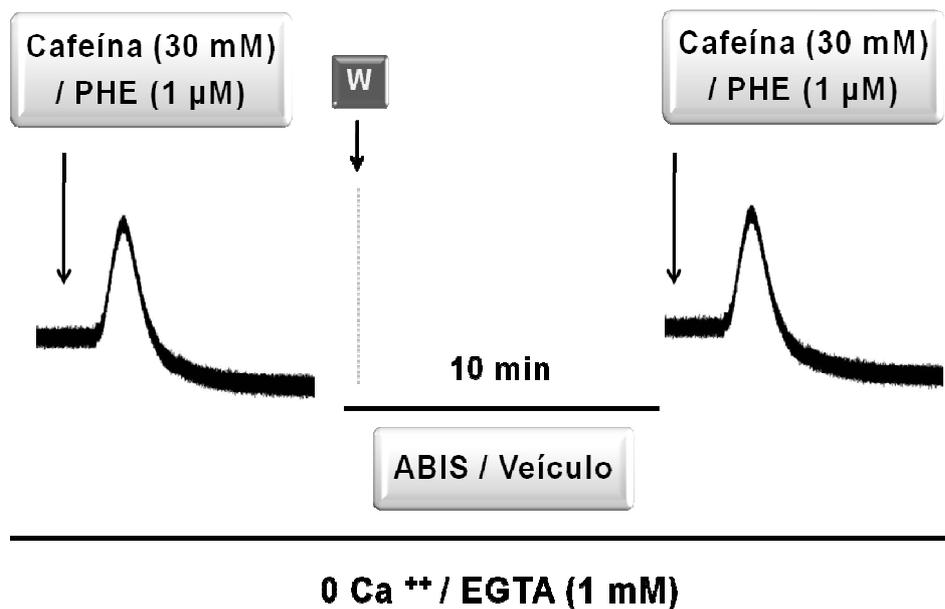


Figura 20 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar as contrações fásicas induzidas por fenilefrina e cafeína em preparações isoladas de aorta. PHE = fenilefrina; W = lavagem.

4.5.3.10 Efeito do ABIS em contrações induzidas após depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} em preparações isoladas de aorta

Esta série experimental teve como objetivo avaliar os efeitos do ABIS na entrada capacitativa de Ca^{2+} mediada por canais operados por estoque. Após a fase de estabilização em solução normal, preparações de aorta com endotélio foram mantidas

em meio sem Ca^{2+} (contendo EGTA-1 mM) sendo expostas repetidas vezes à fenilefrina (10 μM) para produzir depleção dos estoques intracelulares de Ca^{2+} . Em seguida, as preparações foram lavadas com solução sem Ca^{2+} (com 1 mM de EGTA) e mantidas nesse meio em presença de nifedipina (1 μM) e ácido ciclopiazônico (10 μM). Na etapa seguinte, as preparações foram incubadas com ABIS ou veículo (Tween 80) e depois estimuladas com Ca^{2+} (2,0 mM), a fim de induzir uma contração sustentada. A amplitude destas contrações obtidas em presença de ABIS ou veículo foi expressa em relação à contração induzida por KCl (60 mM) obtida durante a fase de estabilização. A série experimental acima descrita encontra-se ilustrada na figura 21.

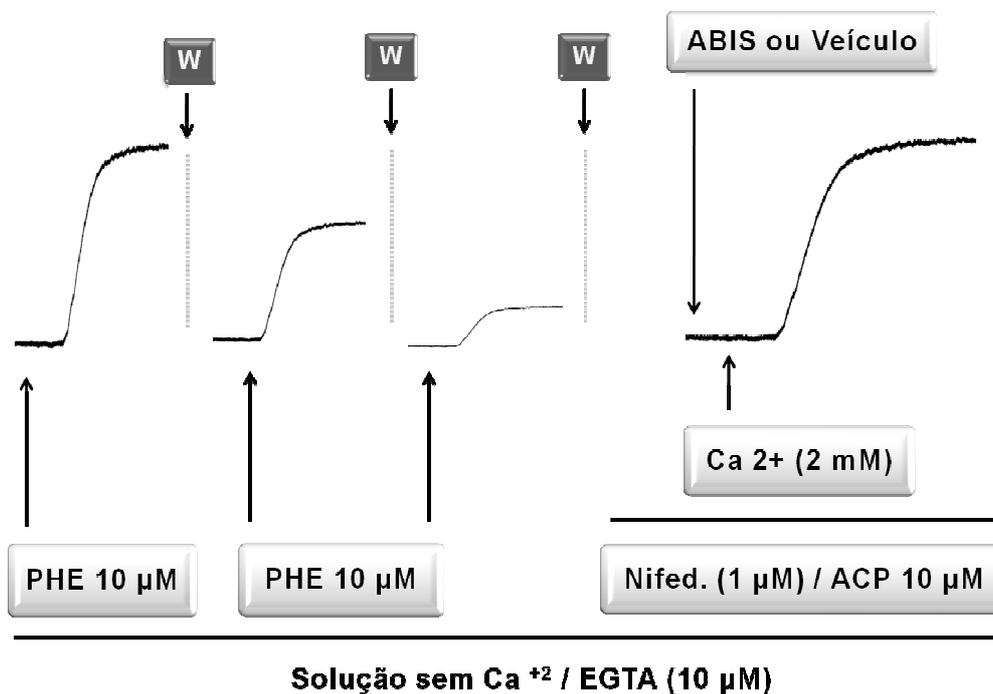


Figura 21 – Representação esquemática do protocolo experimental utilizado para avaliar o efeito do ABIS na entrada capacitativa de cálcio. W = lavagem; Nifed. = nifedipina; ACP = ácido ciclopiazônico.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). A significância dos resultados foi avaliada por teste t de Student e análise de variância (ANOVA) de uma-via ou duas-vias. Quando o teste ANOVA foi significativo, o teste posterior de múltipla comparação de Holm-Sidak foi utilizado. A significância estatística foi aceita quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO GERAL DOS EFEITOS DO ABIS EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO

5.1.1 Efeitos do ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso mantidas em tônus basal

Após o período de estabilização as preparações isoladas de músculo liso foram mantidas sem estímulo contrátil e apresentaram os valores médios de tensão basal sumarizados na tabela 4:

PREPARAÇÃO ISOLADA	TENSÃO MÉDIA (g)
Artéria mesentérica	0,63 ± 0,17 (6,18 ± 1,7 mN)
Artéria aorta	1,11 ± 0,14
Bexiga urinária	1,52 ± 0,24
Traquéia	1,00 ± 0,16
Fundo de estômago	2,57 ± 0,43
Duodeno	2,09 ± 0,09
Cólon	1,63 ± 0,23

Tabela 4 – Valores médios de tensão em preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais

Em condições basais na ausência de estímulos, o ABIS aumentou significativamente a tensão basal de anéis de aorta contendo endotélio intacto, na faixa de concentração de 100-600 μM , com efeito máximo de $10.1 \pm 3.2\%$ em relação à contração de referência induzida por 60 mM de KCl. Em anéis de aorta sem endotélio e em preparações de artéria mesentérica não foi observado o efeito contrátil induzido pelo ABIS (Figura 22).

Em preparações não-vasculares, o ABIS induziu pequena elevação na tensão basal na concentração de 30 μM ($7.0 \pm 1.8\%$), que foi seguida de um efeito relaxante nas concentrações maiores ($10.0 \pm 1.8\%$ em 1000 μM) ($p < 0.05$, teste de Holm-Sidak) em preparações de bexiga urinária, sem efeito significativo na tensão de anéis de traquéia (Figura 22). Nas preparações gastrintestinais de músculo liso o ABIS exerceu efeitos diferenciados com, efeito contrátil na faixa de 600-1000 μM em tiras fundo de estômago ($E_{\text{máx}} = 12,9 \pm 0,8\%$ em relação à contração de KCl-60 mM), efeito relaxante em tecidos de duodeno na faixa de concentração de 30-1000 μM e sem alteração na tensão basal de tiras isoladas de cólon (Figura 22). Utilizado isoladamente, o veículo para ABIS (Tween 80) não alterou os valores de tensão basal em nenhuma das preparações isoladas estudadas (dados não mostrados).

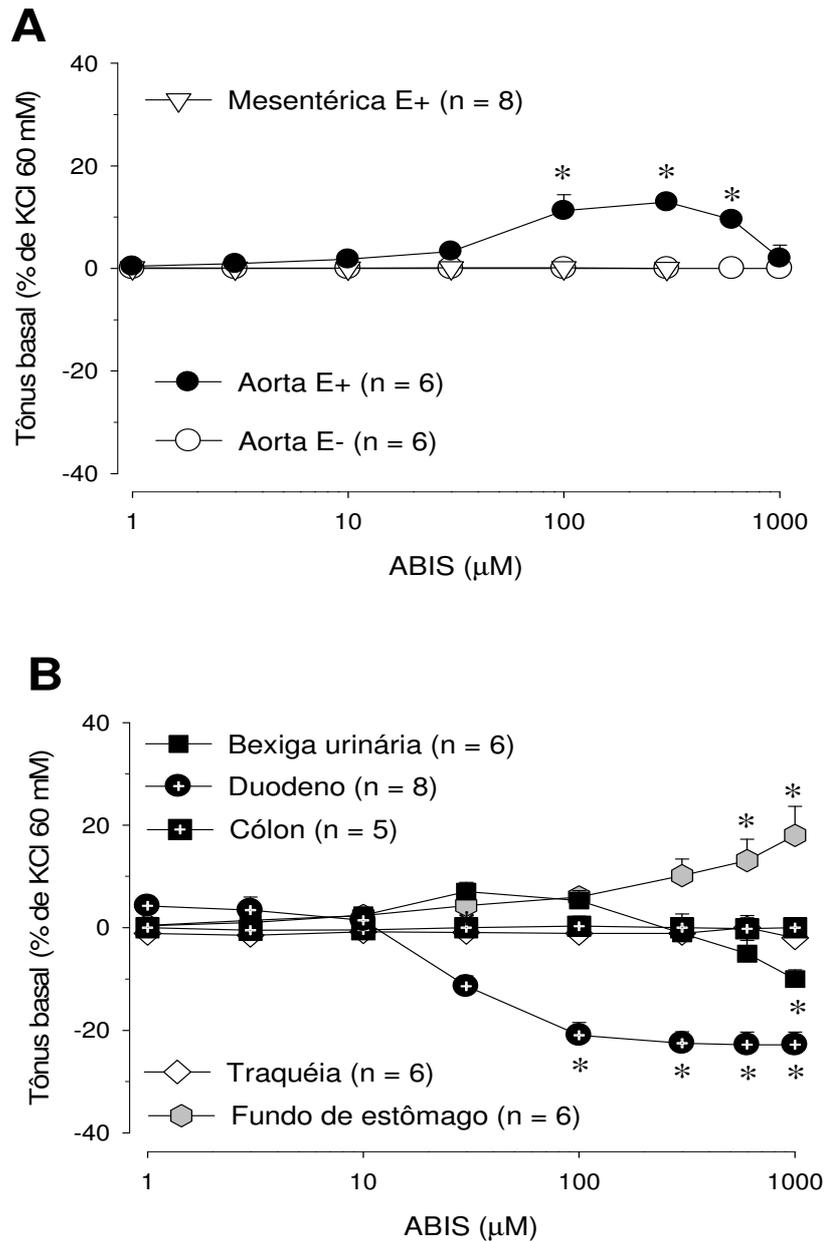


Figura 22 - Efeito do ABIS na tensão basal de preparações de músculo liso vascular. O gráfico demonstra os efeitos da adição cumulativa de ABIS (1-1000 μM) em: (A) anéis de aorta com endotélio (E +; círculo preto), sem endotélio (E -; círculo branco) e em anéis de artéria mesentérica com endotélio (E +; triângulo branco invertido). O gráfico demonstra os efeitos da adição cumulativa de ABIS (1-1000 μM) em anéis de traquéia (losango branco) e tiras de bexiga urinária (quadrado preto); (B) tiras de fundo de estômago (hexágono cinza), de duodeno (círculo preto cruzado) e de cólon (quadrado preto cruzado). As alterações na tensão basal foram expressas como percentual (%) da contração de referência induzida por KCl (60 mM). Os pontos representam valores médios \pm E.P.M. * indica diferença significativa em relação aos valores observados na ausência de ABIS ($p < 0.05$, teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.1.2 Efeitos inibitórios do ABIS na atividade rítmica espontânea de preparações de músculo liso mantidas sob tensão basal

Após período de estabilização, preparações isoladas de bexiga urinária, útero, fundo de estômago, duodeno, cólon, bexiga urinária e útero apresentaram atividade contrátil espontânea em condições basais sem adição de agente contrátil. A tabela 5 sumariza a média da amplitude e da frequência da atividade espontânea das referidas preparações.

PREPARAÇÃO ISOLADA	AMPLITUDE MÉDIA (g)	FREQUÊNCIA MÉDIA (contrações/min)
Bexiga urinária	0,08 ± 0,01	11,5 ± 1,4
Fundo de estômago	0,18 ± 0,02	4,25 ± 0,17
Duodeno	0,57 ± 0,06	30,9 ± 0,4
Cólon	0,22 ± 0,03	1,29 ± 0,07

Tabela 5 – Valores médios de tensão em preparações isoladas de músculo liso mantidas em condições basais.

Os efeitos secundários à adição do ABIS foram variáveis nessas preparações que apresentaram atividade espontânea. Nas preparações de bexiga urinária a amplitude das contrações espontâneas inicialmente aumentou na faixa de concentração de 30-100 μM ($p < 0.05$, teste de Holm-Sidak) e, em seguida, diminuiu após a adição das maiores concentrações (300 – 1000 μM) do ABIS. Essa diminuição, entretanto, não diferiu de maneira significativa da amplitude média de atividade espontânea registrada imediatamente antes da adição do ABIS (Figura 23 A). Na concentração de 300 μM , o ABIS inibiu completamente as contrações espontâneas em preparações de duodeno, sem efeito significativo em tiras de músculo liso de fundo de estômago e de cólon (Figura 23 B).

Em relação à frequência de atividade espontânea o ABIS exerceu diminuição significativa apenas em preparações isoladas de duodeno (Figura 23 B).

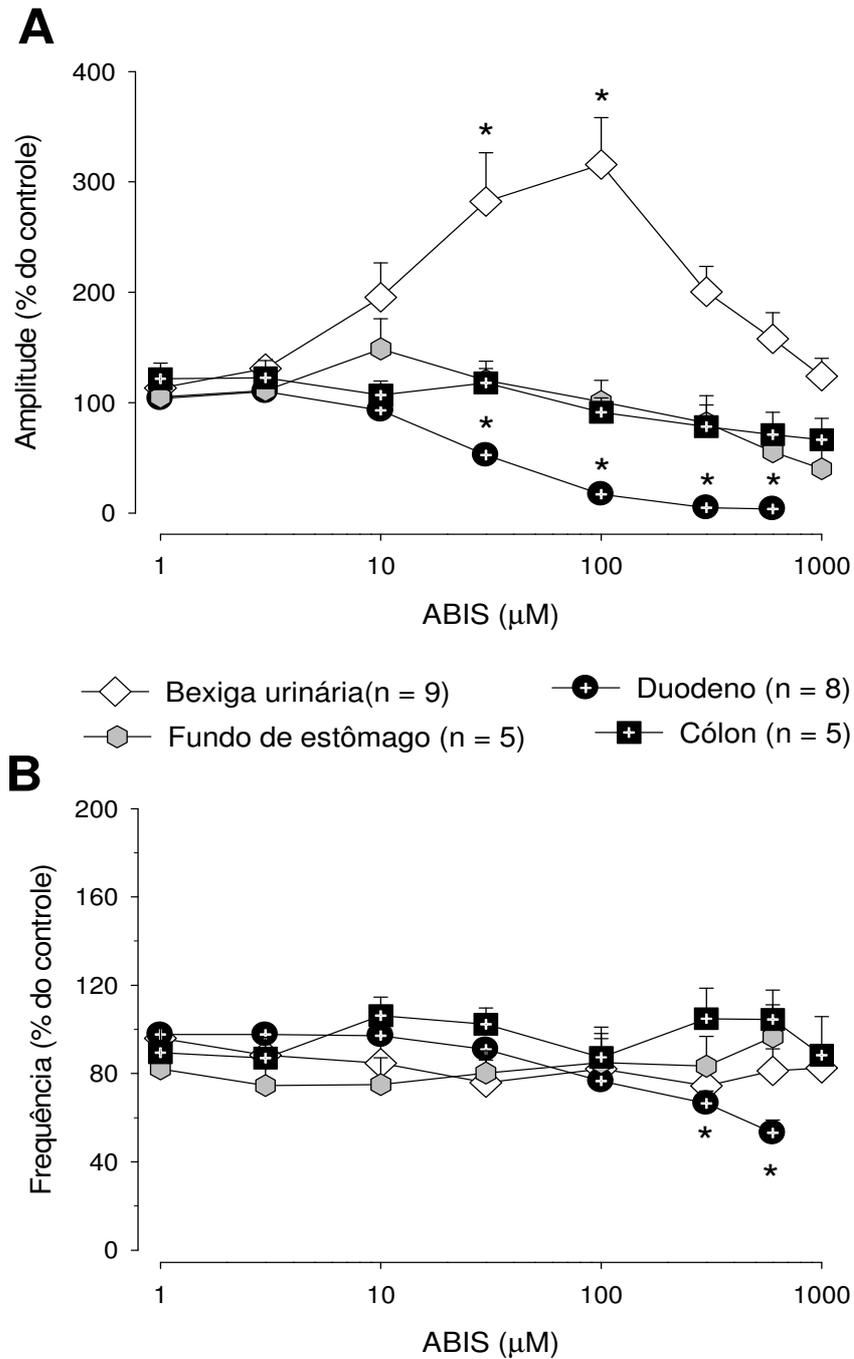


Figura 23 - Efeito do ABIS na atividade espontânea de preparações de músculo liso mantidas em tensão basal. O gráfico demonstra os efeitos da adição cumulativa de ABIS (1-1000 μ M) sobre a amplitude (A) e a frequência (B) da atividade espontânea em tiras isoladas de bexiga urinária (losango branco), fundo de estômago (hexágono cinza), bexiga urinária (losango branco), duodeno (círculo preto cruzado) e cólon (quadrado preto cruzado). Os valores da ordenada são expressos percentualmente em relação à amplitude ou frequência média de contração observada na ausência de ABIS. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. *, indica diferença significativa em relação à amplitude registrada antes da adição de ABIS ($p < 0,05$; ANOVA one-way seguido teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

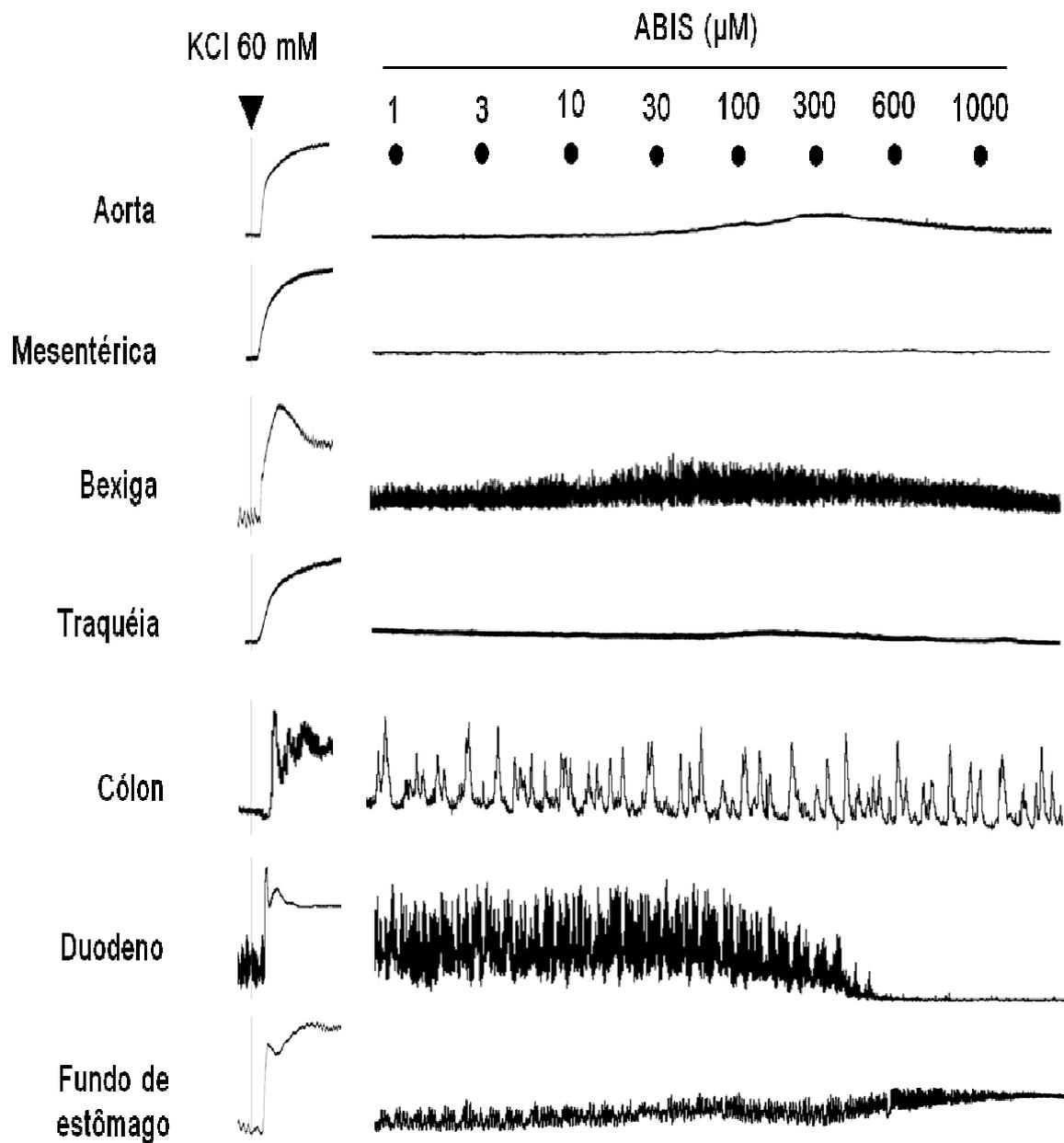


Figura 24 – Traçados típicos dos efeitos de concentrações crescentes de ABIS em preparações isoladas de músculo liso mantidas em tensão basal.

5.1.3 Efeito relaxante do ABIS em preparações de músculo liso submetidas a contrações sustentadas induzidas pelo acoplamento eletromecânico com alta concentração de KCl

Após período de estabilização, preparações isoladas de músculo liso foram expostas a solução nutritora contendo 60 mM de KCl. Com o estabelecimento de uma contração sustentada e estável foi construída uma curva concentração-efeito para o ABIS.

Conforme mostrado nas figuras 25 A e B, o ABIS (0,1–1000 μM) reverteu completamente a contração induzida por K^+ em preparações vasculares e não-vasculares, respectivamente.

Em preparações vasculares (Figura 25 A), a potência do ABIS em produzir efeito relaxante foi significativamente maior ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) em vasos mesentéricos (CI_{50} de 11.2 [7.2 – 17.4] μM) em comparação com anéis de aorta com endotélio (CI_{50} de 24.9 [17.0 – 36.5] μM), mas não em comparação com as preparações de aorta sem endotélio íntegro. Os valores de CI_{50} estão sumarizados na Tabela 6.

Em preparações não-vasculares (Figura 25 B), o ABIS exibiu uma potência significativamente diminuída ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) para reverter as contrações induzidas por KCl em tiras de bexiga urinária (CI_{50} de 50.3 [37.7 – 67.1] μM) em comparação com preparações de traquéia (CI_{50} de 33.3 [16.3 – 68.1] μM) e fundo de estômago (CI_{50} de 28.6 [18.0 – 45.3] μM) (Tabela 6).

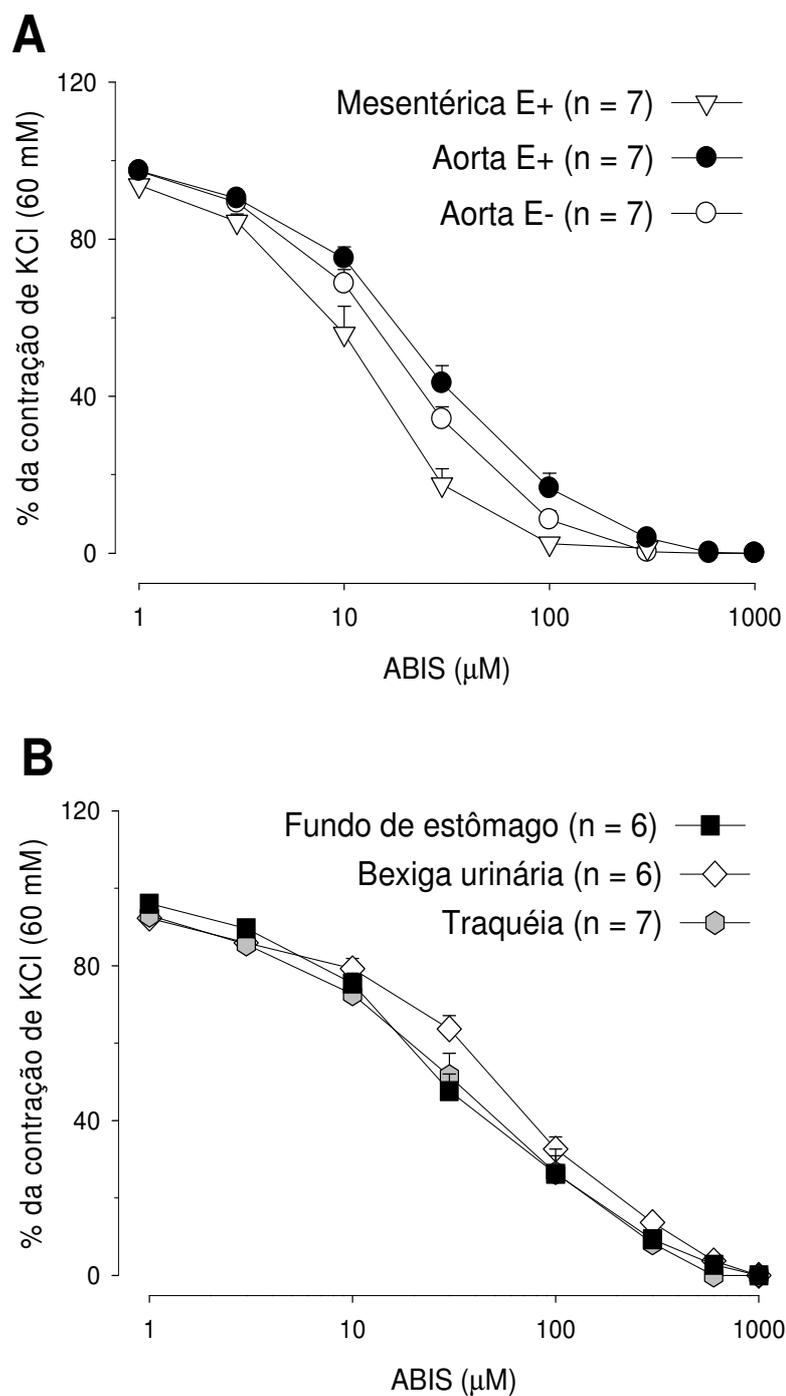


Figura 25 - Ação do ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso pré-contraídas com KCl. O gráfico exibe os efeitos relaxantes induzidos pela adição cumulativa de ABIS (1–1000 μM) durante a fase estável da contração induzida por 60 mM de KCl em: **(A)** preparações vasculares de artéria aorta com endotélio (círculo preto) e sem endotélio (círculo branco), e preparações de artéria mesentérica com endotélio (triângulo branco invertido); **(B)** preparações não-vasculares de bexiga urinária (losango branco), traquéia (hexágono cinza), fundo de estômago (quadrado preto), e útero (triângulo preto invertido). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.1.4 Efeito do ABIS em preparações de músculo liso submetidas a contrações sustentadas induzidas pelo acoplamento farmacomecânico

O acoplamento farmacomecânico foi induzido após exposição das preparações de músculo liso a concentração única de um agonista apropriado como a fenilefrina (1 μM em anéis de aorta ou 10 μM em anéis mesentéricos) e o carbacol (1 μM) em tecidos não-vasculares. Após o estabelecimento de uma contração sustentada, foi construída uma curva concentração-efeito para o ABIS.

O ABIS (0,1-1000 μM) foi capaz de reverter completamente as contrações induzidas por agonistas em preparações vasculares (Figura 26 A) e não-vasculares (Figura 27 B). A potência inibitória do ABIS variou significativamente ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) entre os tecidos vasculares, sendo menor em anéis de aorta com endotélio intacto (CI_{50} de 162.0 [91.0 – 288.2] μM) em comparação com preparações de aorta sem endotélio (CI_{50} de 66.1 [40.3 – 108.5] μM) ou preparações mesentéricas (CI_{50} de 13.5 [9.1 – 20.0] μM) (Tabela 6).

Em preparações não-vasculares (Figura 26 B), anéis de traquéia contraídos com carbacol exibiram a maior resistência ao efeito relaxante do ABIS, uma vez que o seu valor de CI_{50} (396.9 [245.7 – 641.2] μM) foi significativamente maior quando comparado ao da bexiga urinária (CI_{50} de 49.8 [31.1 – 70.8] μM) ou do fundo de estômago (CI_{50} de 43.7 [26.2 – 72.9] μM). Os valores de CI_{50} apresentaram-se também significativamente maiores ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) em anéis de aorta e traquéia submetidos ao acoplamento farmacomecânico em relação às mesmas preparações expostas ao estímulo eletromecânico (Tabela 6).

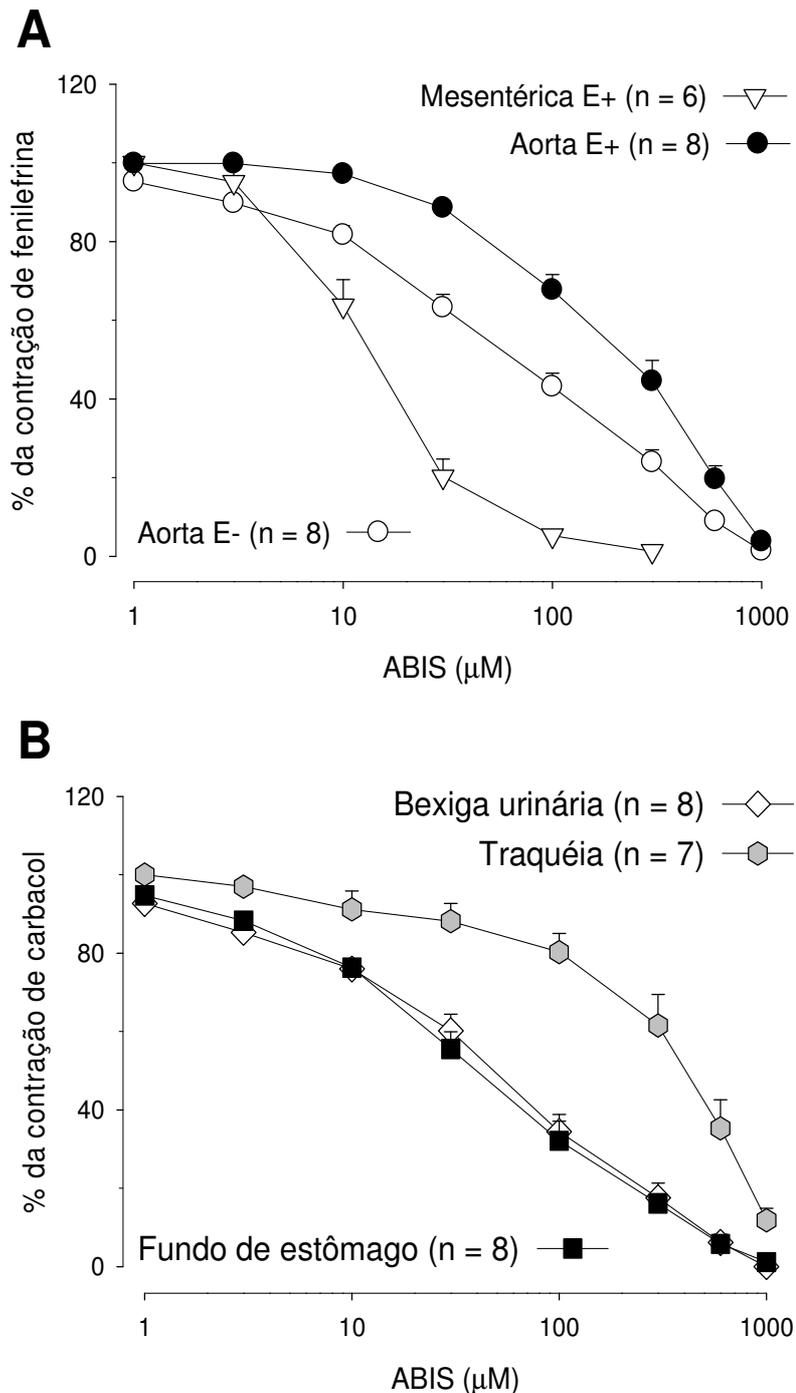


Figura 26 - Efeito da adição cumulativa de ABIS em preparações vasculares e não-vasculares de músculo liso pré-contraídas com agonistas farmacológicos. O gráfico (A) mostra os efeitos relaxantes induzidos pelo ABIS adicionado durante o componente estável da contração induzida por fenilefrina em preparações vasculares de aorta com endotélio (círculo preto) e sem endotélio (círculo branco), e de artéria mesentérica com endotélio (triângulo invertido branco); O gráfico (B) mostra os efeitos relaxantes induzidos pelo ABIS adicionado durante o componente estável da contração induzida por carbacol em preparações não-vasculares de fundo de estômago (quadrado preto), bexiga urinária (losango branco) e traquéia (hexágono cinza). (n) indica o número de experimentos realizados.

PREPARAÇÃO ISOLADA	ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO CONTRAÇÃO			
	ELETROMECCÂNICO		FARMACOMECCÂNICO	
	CI ₅₀ (µM)	n	CI ₅₀ (µM)	n
VASCULAR				
Aorta E +	24.9 [17.0 – 36.5]	7	162.0 [91.0 – 288.2] ^{a,d}	8
Aorta E -	18.2 [15.0 – 22.2]	7	66.1 [40.3 – 108.5] ^d	8
Mesentérica E +	11.2 [7.2 – 17.4] ^a	7	13.5 [9.1 – 20.0]	6
NÃO-VASCULAR				
Bexiga urinária	50.3 [37.7 – 67.1] ^b	6	49.8 [31.1 – 70.8]	8
Traquéia	33.3 [16.3 – 68.1]	7	396.9 [245.7 – 641.2] ^{b,d}	7
Fundo de estômago	28.6 [18.0 – 45.3]	6	43.7 [26.2 – 72.9]	8

Tabela 6 - Valores de CI₅₀ para os efeitos relaxantes induzidos pelo ABIS em preparações de músculo liso.

- O acoplamento eletromecânico foi promovido pela exposição das preparações de músculo liso a uma alta concentração de KCl (60 mM) no meio extracelular;
- No acoplamento farmacomecânico as preparações de músculo liso foram expostas à fenilefrina (1 ou 10 µM; tecidos vasculares) ou ao carbacol (1 µM; tecidos não-vasculares);
- Os valores de CI₅₀ foram expressos como médias geométricas (intervalo de confiança de 95%) e (n) corresponde ao número de experimentos;
- ^a e ^b, p < 0,05, teste de Mann-Whitney; comparação dos valores de CI₅₀ no grupo vascular (a) ou não-vascular (b) de preparações isoladas exposta ao mesmo acoplamento excitação-contracção;
- ^c, p < 0,05, teste de Mann-Whitney; comparação da mesma preparação no acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.

5.1.5 Efeito inibitório do ABIS nas contrações induzidas por KCl e carbacol em preparações de duodeno e cólon

Experimentos com preparações isoladas de duodeno e cólon foram realizados com a adição não-cumulativa de ABIS. Nessas preparações, o ABIS foi capaz de inibir as respostas contráteis induzidas por 60 mM de KCl (Figura 27) e 1 μ M de carbacol (Figura 28), exibindo maior potência no tecido duodenal.

Nas preparações duodenais, a adição não cumulativa de ABIS (1 – 600 μ M) resultou em valores de CI_{50} de 29.1 [18.4 – 46.1] μ M para as contrações induzidas por KCl e 20.4 [10.4 – 39.9] μ M para as contrações induzidas por carbacol (Tabela 7). Esses valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney).

Em preparações isoladas de cólon, após a adição de ABIS (100 – 1000 μ M) as CI_{50} apresentaram-se significativamente maiores ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) em relação aos tecidos duodenais, com valores de 257.7 [185.1 – 358.7] μ M para as contrações induzidas por KCl e 157.5 [106.7 – 232.5] μ M para as contrações de carbacol. Esses valores não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney).

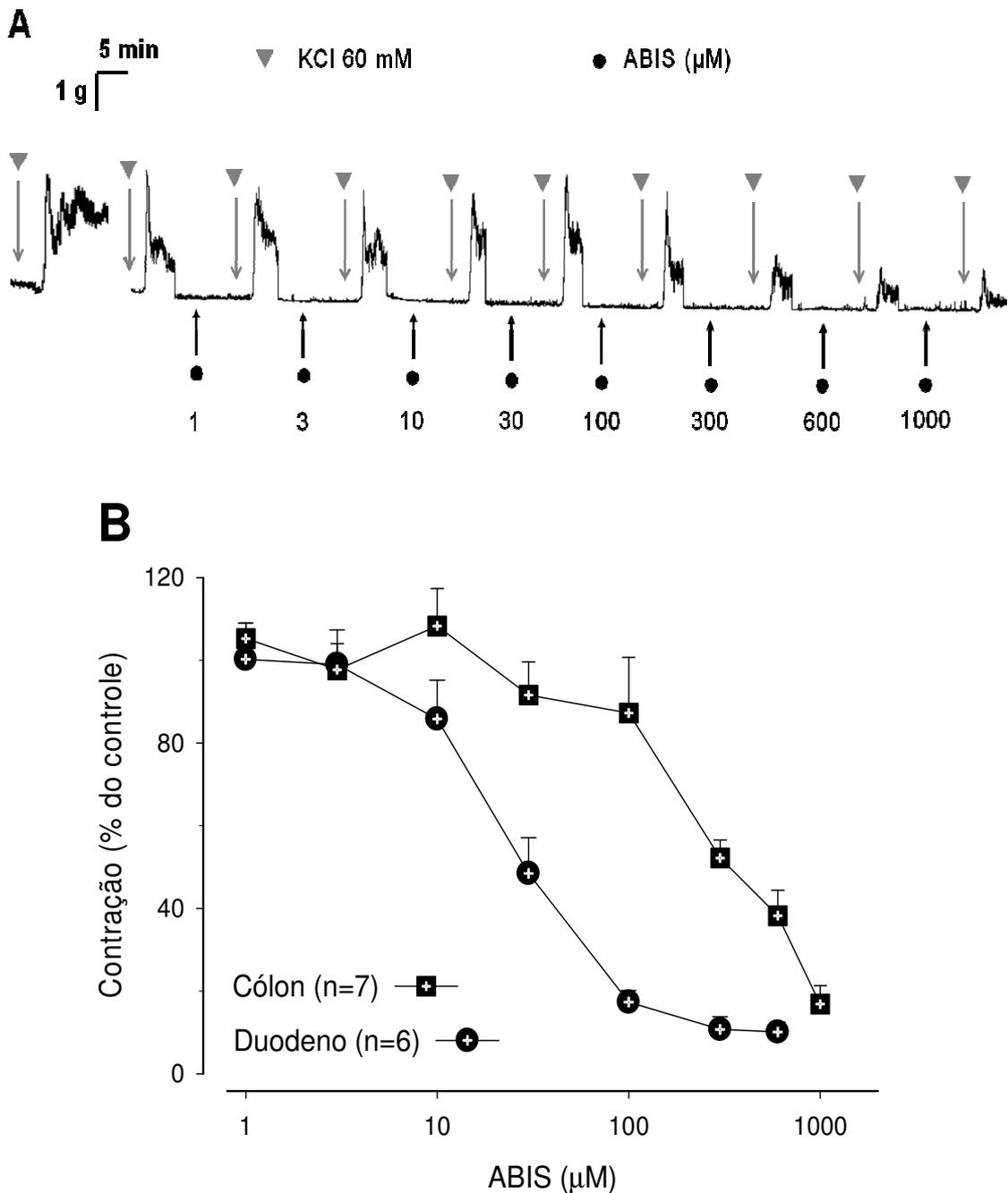


Figura 27 – Efeito do ABIS nas contrações induzidas por KCl em preparações isoladas de duodeno e cólon. (A) Traçados típicos do pré-tratamento não-cumulativo de concentrações crescentes de ABIS em tecidos colônicos contraídos com KCl; (B) O gráfico exibe o efeito inibitório obtido pelo pré-tratamento com ABIS nas contrações induzidas por 60 mM de KCl em preparações de duodeno (círculo preto cruzado) e cólon (quadrado preto cruzado). Os valores da ordenada são expressos percentualmente em relação ao valor médio da contração de KCl (60 mM) observada na ausência de ABIS. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. (n) indica o número de experimentos realizados.

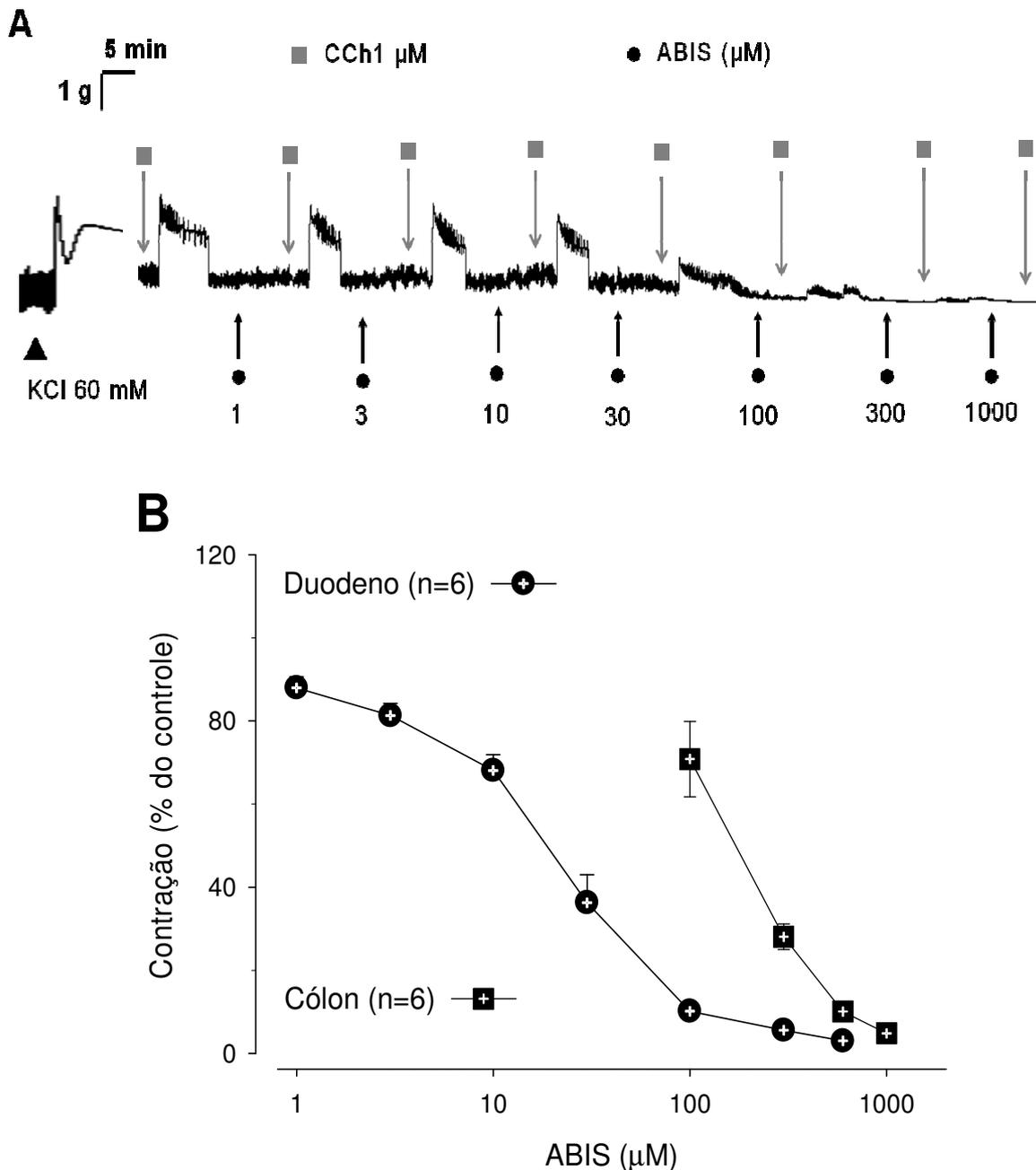


Figura 28 – Efeito do ABIS nas contrações induzidas por carbacol em preparações isoladas de duodeno e cólon. (A) Traçados típicos do pré-tratamento não-cumulativo de concentrações crescentes de ABIS em tecidos duodenais contraídos com carbacol; (B) O gráfico exibe o efeito inibitório obtido pelo pré-tratamento com ABIS nas contrações induzidas por 1 μM de carbacol em preparações de duodeno (círculo preto cruzado) e cólon (quadrado preto cruzado). Os valores da ordenada são expressos percentualmente em relação ao valor médio da contração de carbacol (1 μM) observadas na ausência de ABIS. Os valores são expressos em média \pm E.P.M. (n) indica o número de experimentos realizados.

PREPARAÇÃO ISOLADA	ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO			
	ELETROMECAÂNICO		FARMACOMECAÂNICO	
	CI ₅₀ (µM)	n	CI ₅₀ (µM)	n
Duodeno	29.1 [18.4 – 46.1]	8	20.4 [10.4 – 39.9]	6
Cólon	257.7 [185.1 – 358.7] ^a	6	157.5 [106.7 – 232.5] ^a	6

Tabela 7 - Valores de IC₅₀ referentes aos efeitos inibitórios induzidos pelo ABIS em preparações isoladas de duodeno e cólon.

- O acoplamento eletromecânico foi obtido após exposição das preparações isoladas de músculo liso a uma elevada concentração de KCl (60 mM) na presença de ABIS;
- O acoplamento farmacomecânico foi promovido pela adição de 1 µM de carbacol às preparações isoladas de músculo liso na presença de ABIS;
- Os valores de CI₅₀ foram expressos como médias geométricas (intervalo de confiança de 95%) e n corresponde ao número de experimentos;
- a, p < 0,05, teste de Mann-Whitney; corresponde à comparação entre as preparações de cólon e duodeno submetidas ao mesmo acoplamento excitação-contração.

5.2 EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO Ca^{2+} EM PREPARAÇÕES ISOLADAS MANTIDAS EM MEIO SEM Ca^{2+} NA PRESENÇA DE KCL

5.2.1 Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por Ca^{2+} em preparações isoladas de traquéia e aorta na presença de KCl

Em preparações de traquéia e aorta mantidas em solução nutritora normal, a adição de KCl (60 mM) produziu contração de amplitude igual a $0,85 \pm 0,09$ g e $0,98 \pm 0,09$ g, respectivamente. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM) a resposta contrátil sustentada induzida por KCl (60 mM) foi abolida em ambas as preparações isoladas. Em preparações de traquéia, na ausência de Ca^{2+} e do ABIS (controle), a subsequente adição cumulativa de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas, dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way). Esse efeito da adição cumulativa de CaCl_2 tonou-se significativo na concentração de 0,5 mM e alcançou valor máximo correspondente a $101 \pm 2,99$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. As contrações induzidas pela adição de CaCl_2 foram significativamente ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) reduzidas e abolidas nas preparações pré-tratadas com 100 e 300 μM de ABIS, respectivamente (Figura 29 A).

Em preparações de aorta, na ausência do ABIS (controle), o acréscimo cumulativo de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way) com valor máximo correspondente a 163,2

$\pm 4,1$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl (Figura 29 B). Seguindo o perfil dos efeitos observados em preparações isoladas de traquéia (Figura 29 A), as contrações induzidas pela adição de CaCl_2 também foram significativamente ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) reduzidas e abolidas nas preparações de aorta pré-incubadas com 100 e 300 μM de ABIS, respectivamente.

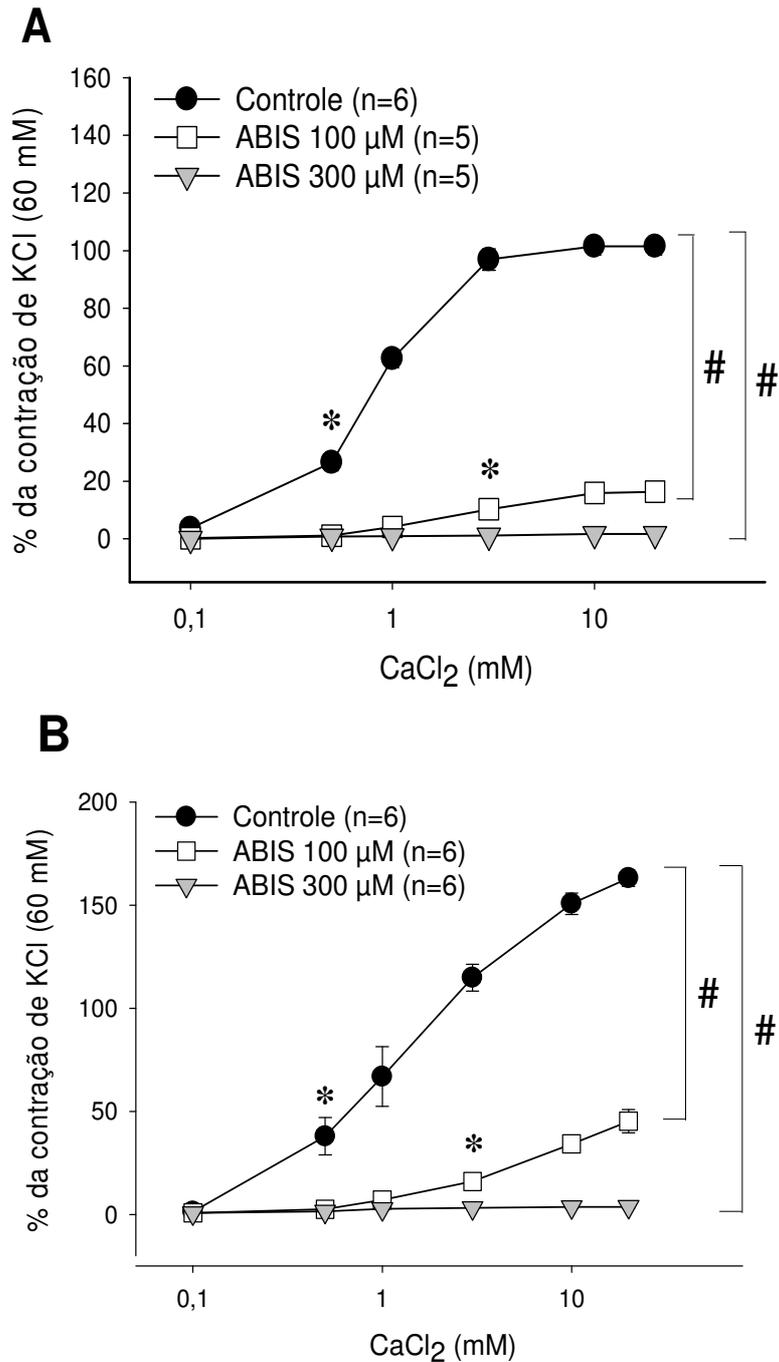


Figura 29 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B) na presença de KCl. As curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle; círculo preto) e em presença de ABIS nas concentrações de 100 μM (quadrado branco) e 300 μM (triângulo cinza invertido). As barras verticais indicam E.P.M. * resalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.2.2 Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por Ca^{2+} em preparações isoladas de bexiga urinária e duodeno na presença de KCl

Em preparações de bexiga urinária e duodeno mantidas em solução nutritiva normal, a adição de KCl (60 mM) produziu contração de amplitude igual a $1,54 \pm 0,16$ g e $2,01 \pm 0,13$ g, respectivamente. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM) a resposta contrátil sustentada induzida por KCl (60 mM) foi abolida em ambas as preparações isoladas.

Em preparações de bexiga mantidas em meio sem cálcio e em presença de KCl (60 mM), a subsequente adição cumulativa de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas e dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com valor máximo correspondente a $236,56 \pm 21,76$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. As contrações induzidas pela adição cumulativa de CaCl_2 foram abolidas ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) nas preparações pré-tratadas com 100 μM de ABIS (Figura 30 A).

Nas preparações de duodeno mantidas em solução sem cálcio e despolarizadas com KCl (60 mM), o acréscimo cumulativo de Ca^{2+} (0,1-20 mM) sem pré-tratamento com ABIS produziu contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way) com valor máximo correspondente a $117,93 \pm 9,8$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. Seguindo o mesmo perfil de resposta, as contrações induzidas após a adição cumulativa de CaCl_2 foram abolidas ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) preparações pré-tratadas com 100 μM de ABIS (Figura 30 B).

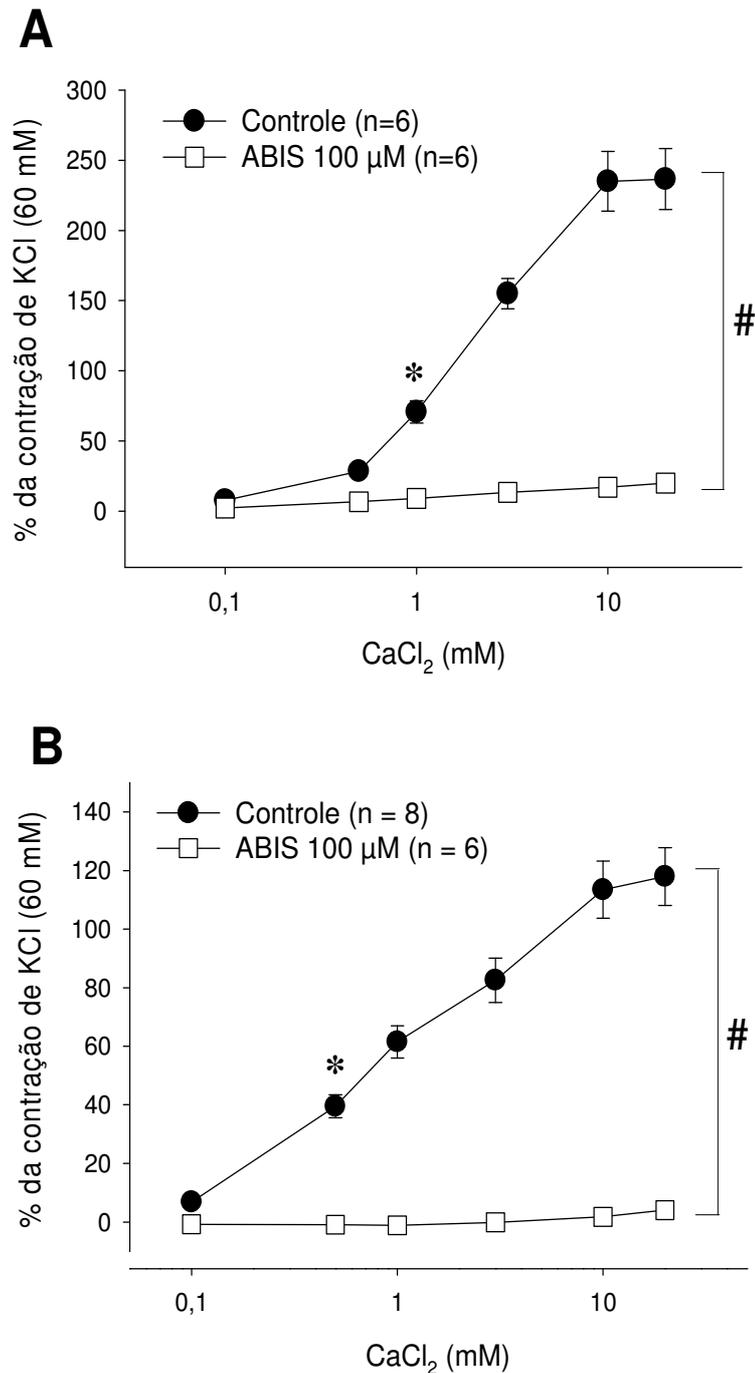


Figura 30 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de bexiga urinária (A) e duodeno (B) na presença de KCl. As curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle; círculo preto) e em presença de ABIS na concentração de 100 μM (quadrado branco). As barras verticais indicam E.P.M. * resalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.3 EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO Ca^{2+} EM PREPARAÇÕES ISOLADAS MANTIDAS EM MEIO SEM Ca^{2+} NA PRESENÇA DE AGONISTA FARMACOLÓGICO

5.3.1 Efeito do ABIS em curva concentração-efeito ao Ca^{2+} em preparações isoladas de duodeno e traquéia mantidas em meio sem Ca^{2+} na presença de carbacol e verapamil

Em preparações de duodeno mantidas em solução nutritora normal, a adição de carbacol (60 μM) produziu contração de amplitude igual a $2,75 \pm 0,25$ g. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM e verapamil 10 μM) a resposta contrátil induzida por carbacol (60 μM) foi transitória e de pequena magnitude ($0,25 \pm 0,02$ g). Em preparações de duodeno ainda na presença de carbacol e na ausência de Ca^{2+} e do ABIS (controle), a subsequente adição cumulativa de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas e dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com valor máximo correspondente a $90,82 \pm 6,42\%$ em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. As contrações induzidas pela adição cumulativa de CaCl_2 foram significativamente reduzidas ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) nas preparações pré-incubadas com 100 μM de ABIS (Figura 31 A).

Em preparações de traquéia mantidas em solução nutritora normal, a adição de carbacol (60 μM) produziu contração de amplitude igual a $2,15 \pm 0,34$ g. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca^{2+} contendo EGTA (1 mM) e verapamil (10 μM), a resposta contrátil do carbacol (60 μM) foi transitória e teve

pico de apenas $0,28 \pm 0,03$ g. Nessa condição e na ausência do ABIS, a subsequente adição cumulativa de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas e dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way) com valor máximo correspondente a $187,02 \pm 13,96$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. Quando a curva de cálcio foi construída após o pré-tratamento com 100 μM de ABIS houve diferença significativa ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) em relação ao grupo controle apenas na concentração de 1 mM de CaCl_2 (Figura 31 B).

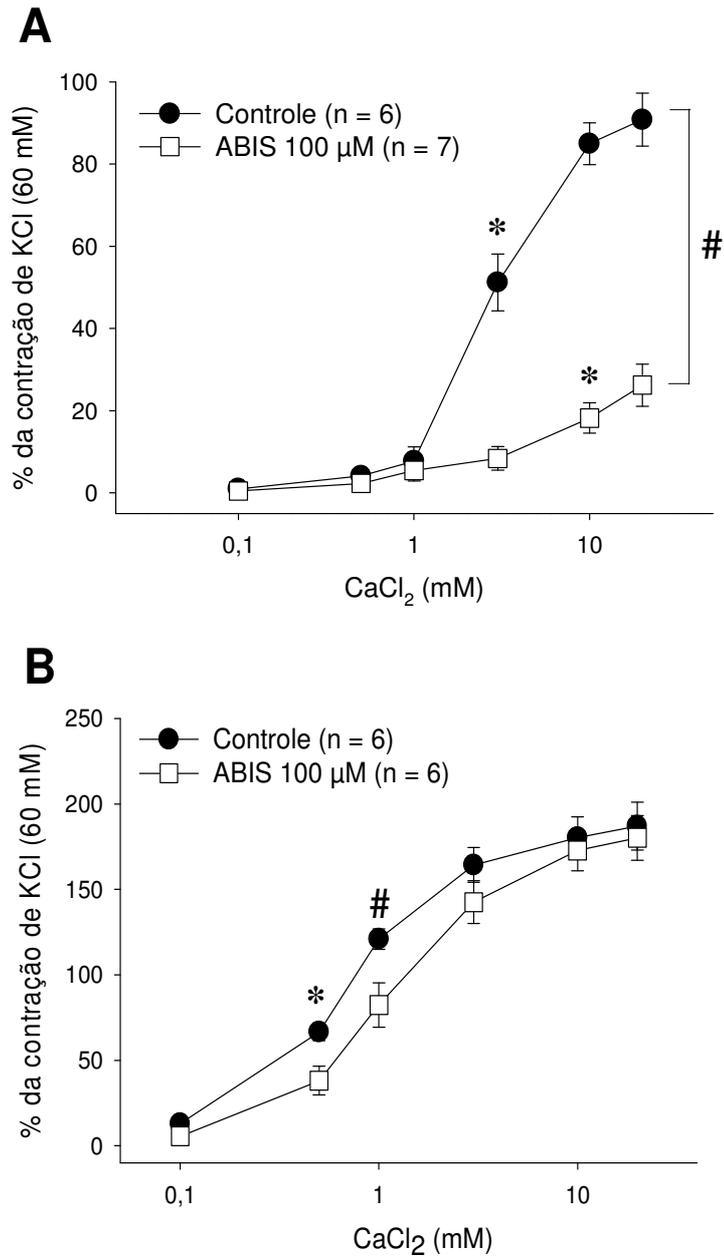


Figura 31 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de duodeno (A) e traquéia (B) na presença de carbacol e verapamil. As curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle; círculo preto) e na presença de ABIS na concentração de 100 μM (quadrado branco). As barras verticais indicam E.P.M. * ressalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.3.2 Efeito do ABIS em curva concentração-efeito ao Ca^{2+} em preparação isolada de aorta mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de fenilefrina e nifedipina

Em preparações de aorta mantidas em solução nutritora normal, a adição de fenilefrina (60 μM) produziu contração de amplitude média igual a $1,6 \pm 0,19$ g. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca^{2+} contendo EGTA (10 μM) e nifedipina (1 μM), a resposta contrátil da fenilefrina (60 μM) foi transitória e com amplitude máxima reduzida para $0,32 \pm 0,01$ g. O subsequente acréscimo cumulativo de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas e dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way) com valor máximo correspondente a $128,2 \pm 6,19$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. A curva controle de cálcio diferiu significativamente ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) da curva do grupo pré-tratado com ABIS (100 μM) apenas nas concentrações de 1, 10 e 20 mM de CaCl_2 (Figura 32).

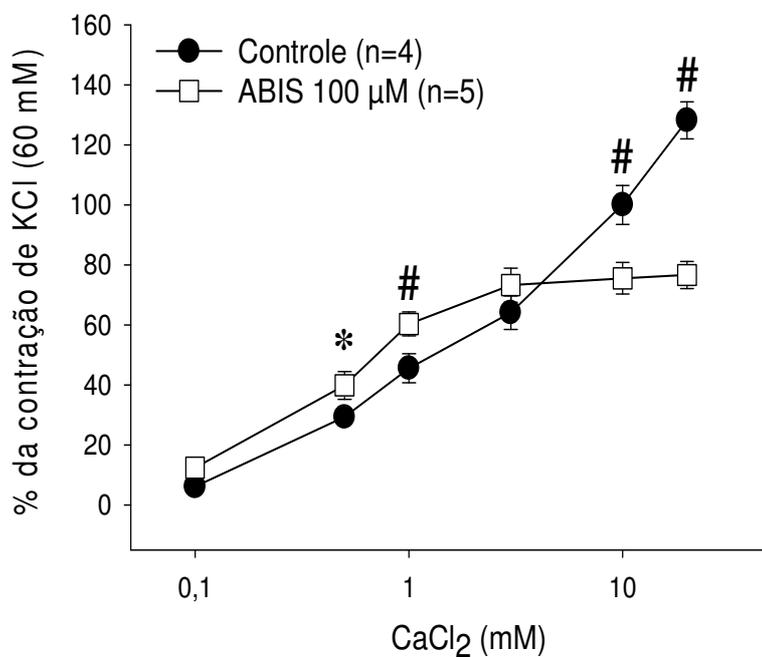


Figura 32 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de cálcio em preparações isoladas de aorta na presença de fenilefrina e nifedipina. As curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (círculo preto; controle) e na presença de ABIS na concentração de 100 μM (quadrado branco). As barras verticais indicam E.P.M. * resalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.4 EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO DE AGONISTAS FARMACOLÓGICOS EM PREPARAÇÕES DE MÚSCULO LISO

5.4.1 Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por carbacol em preparações isoladas de traquéia

Em preparações isoladas de traquéia mantidas em solução nutritora normal, a adição cumulativa de carbacol (0,01-10 μM) induziu contrações sustentadas e dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com resposta contrátil máxima de $218,67 \pm 3,98 \%$ em relação à contração induzida por KCl (60 mM). Ocorreu um significativo efeito inibitório ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) na curva concentração-efeito do carbacol em preparações pré-tratadas com 100 μM e 300 μM de ABIS (Figura 33 A).

Em preparações isoladas de aorta, a adição cumulativa de fenilefrina (0,01-10 μM) resultou em contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com resposta contrátil máxima média de $129,85 \pm 4,04 \%$ em relação à contração induzida por KCl (60 mM). A pré-incubação de 100 ou 300 μM de ABIS induziu redução significativa ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) das curvas concentração-efeito de fenilefrina (Figura 33 B).

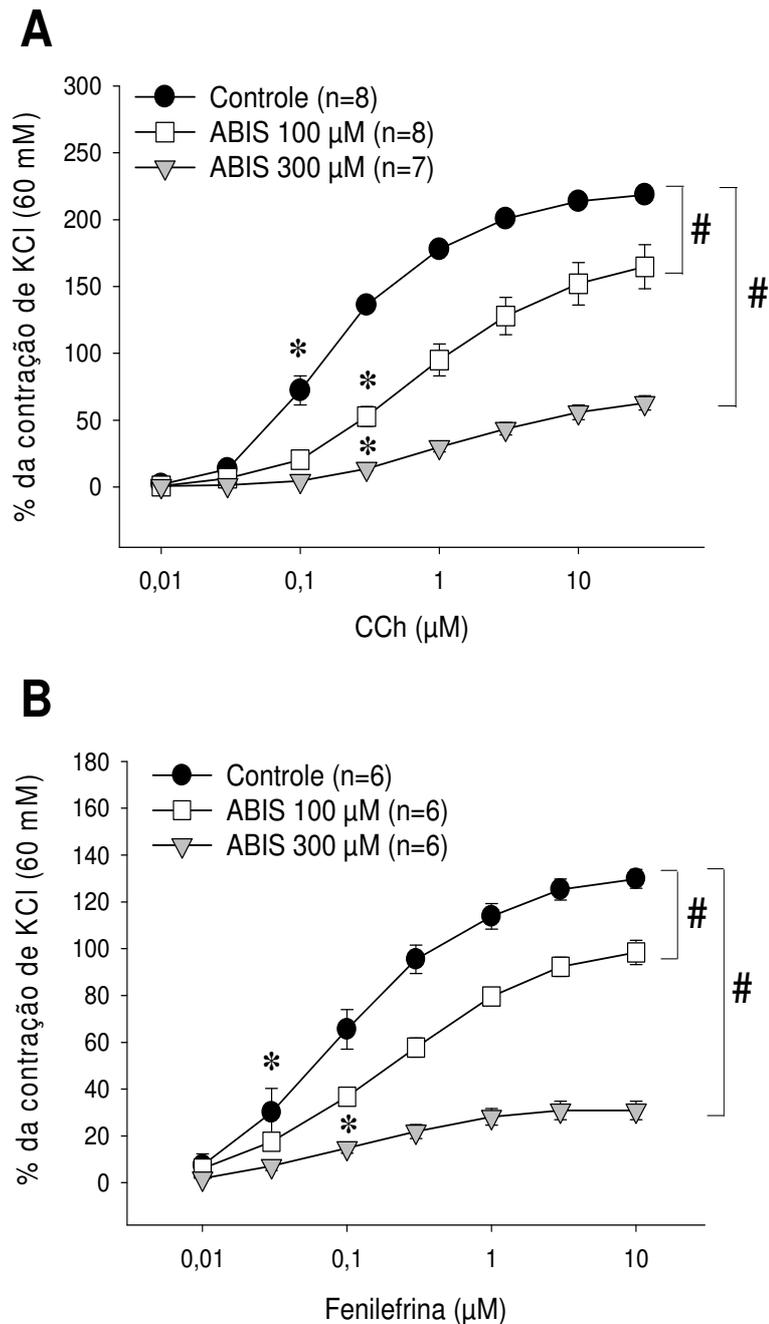


Figura 33 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de carbacol em preparações isoladas de traquéia (A) e de fenilefrina em preparações isoladas de aorta (B). As curvas foram obtidas na ausência (controle; círculo preto) e na presença de ABIS 100 μM (quadrado branco) ou 300 μM (triângulo cinza invertido). As barras verticais indicam E.P.M. * resalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.5 EFEITO DO ABIS NA CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO DE K⁺ EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE MÚSCULO LISO

5.5.1 Efeito do ABIS na curva concentração-efeito induzida por K⁺ em preparações isoladas de traquéia

Em preparações isoladas de traquéia mantidas em solução normal, a adição de concentrações cumulativas de K⁺ (10-120 mM) induziu contrações crescentes sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), cujo valor máximo foi correspondente a $123,26 \pm 2,06$ % da contração de referência induzida por KCl (60 mM). As contrações induzidas pela adição de CaCl₂ foram significativamente ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) reduzidas e abolidas nas preparações pré-tratadas com 100 e 300 μ M de ABIS, respectivamente (Figura 34 A).

Em preparações isoladas de traquéia mantidas em solução normal, a adição de concentrações cumulativas de K⁺ (10-120 mM) produziu contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com valor máximo correspondente a $132,39 \pm 1,71$ % da contração induzida por KCl (60 mM). Semelhante ao que foi observado com as preparações isoladas de traquéia, as contrações induzidas pela adição de CaCl₂ foram significativamente ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) reduzidas e abolidas nas preparações pré-tratadas com 100 e 300 μ M de ABIS, respectivamente (Figura 34 B).

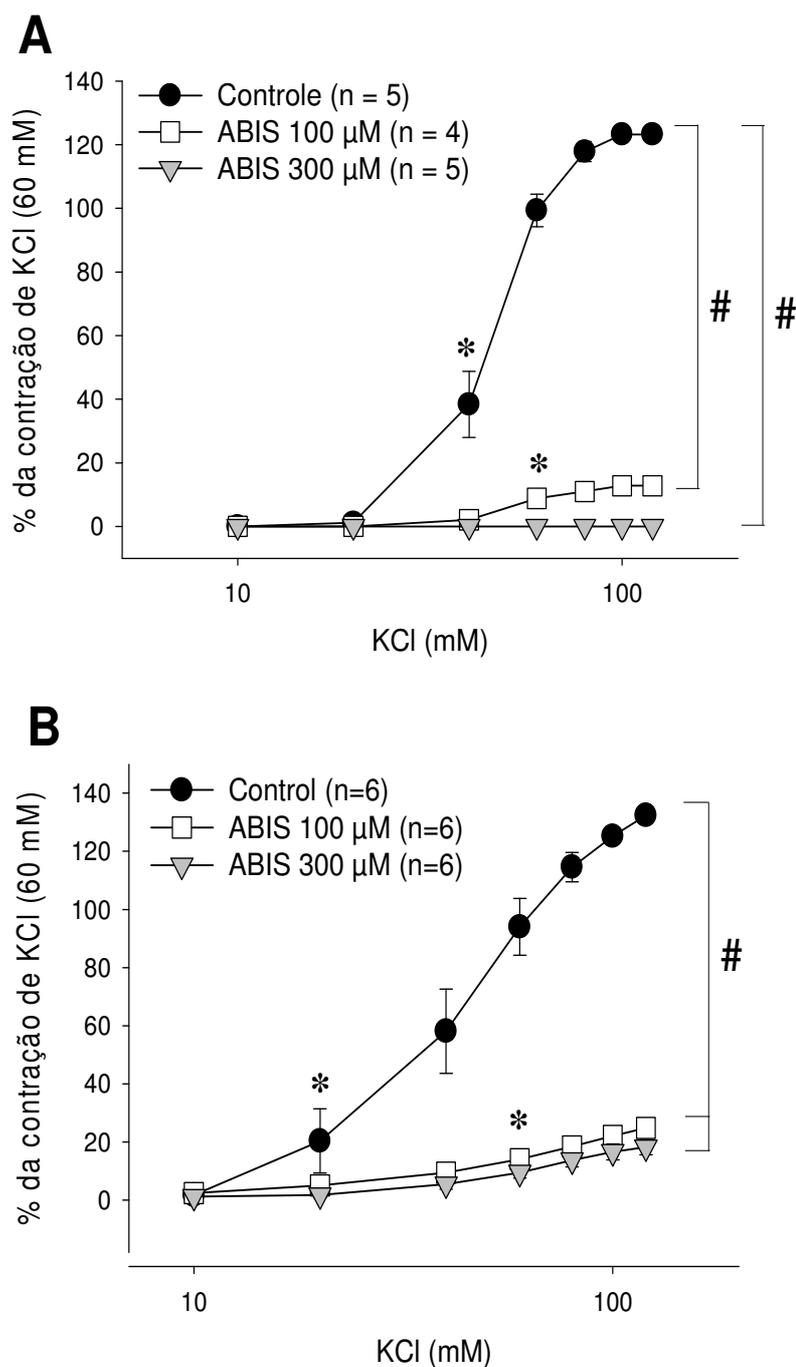


Figura 34 – Efeito inibitório do ABIS na curva concentração-efeito de K^+ em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B). Gráfico mostra curvas concentração-efeito de K^+ obtidas na ausência (controle; círculo preto) e na presença de 100 μ M (quadrado branco) e 300 μ M (triângulo invertido cinza) de ABIS. As barras verticais indicam E.P.M. * ressalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.6 EFEITO DO ABIS EM CURVA-CONCENTRAÇÃO AO Ba²⁺ EM PREPARAÇÕES ISOLADAS MANTIDAS EM MEIO SEM Ca²⁺ NA PRESENÇA DE KCL

Em preparações de traquéia mantidas em solução nutritora normal, a adição de KCl (60 mM) produziu contração de amplitude igual a $0,85 \pm 0,09$ g. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca²⁺ contendo EGTA (10 μ M) a resposta contrátil do KCl foi abolida. Nessa condição experimental, adição cumulativa de Ba²⁺ (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way), com valor máximo correspondente a $138,13 \pm 5,25$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. Essas contrações induzidas pela adição de CaCl₂ foram reduzidas e abolidas de maneira significativa ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak) nas preparações pré-tratadas com 100 e 300 μ M de ABIS, respectivamente (Figura 35 A).

Em preparações isoladas de aorta mantidas em solução nutritora normal, a adição de cloreto de potássio (60 mM) produziu contração de amplitude igual a $0,86 \pm 0,06$ g. Com a substituição da solução normal por outra nominalmente sem Ca²⁺ contendo EGTA (10 μ M) a resposta contrátil do KCl foi completamente abolida. Mantida essa condição experimental, a adição cumulativa de Ba²⁺ (0,1-20 mM) produziu contrações sustentadas dependentes de concentração ($p < 0,01$; ANOVA one-way) com valor máximo correspondente a $130,79 \pm 3,41$ % em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. Nessas preparações isoladas, as contrações induzidas pela adição de CaCl₂ também foram reduzidas e abolidas de maneira significativa ($p < 0,01$; ANOVA two-way, seguido do teste de Holm-Sidak) nos grupos pré-tratados com 100 e 300 μ M do sesquiterpeno ABIS, respectivamente (Figura 35 B).

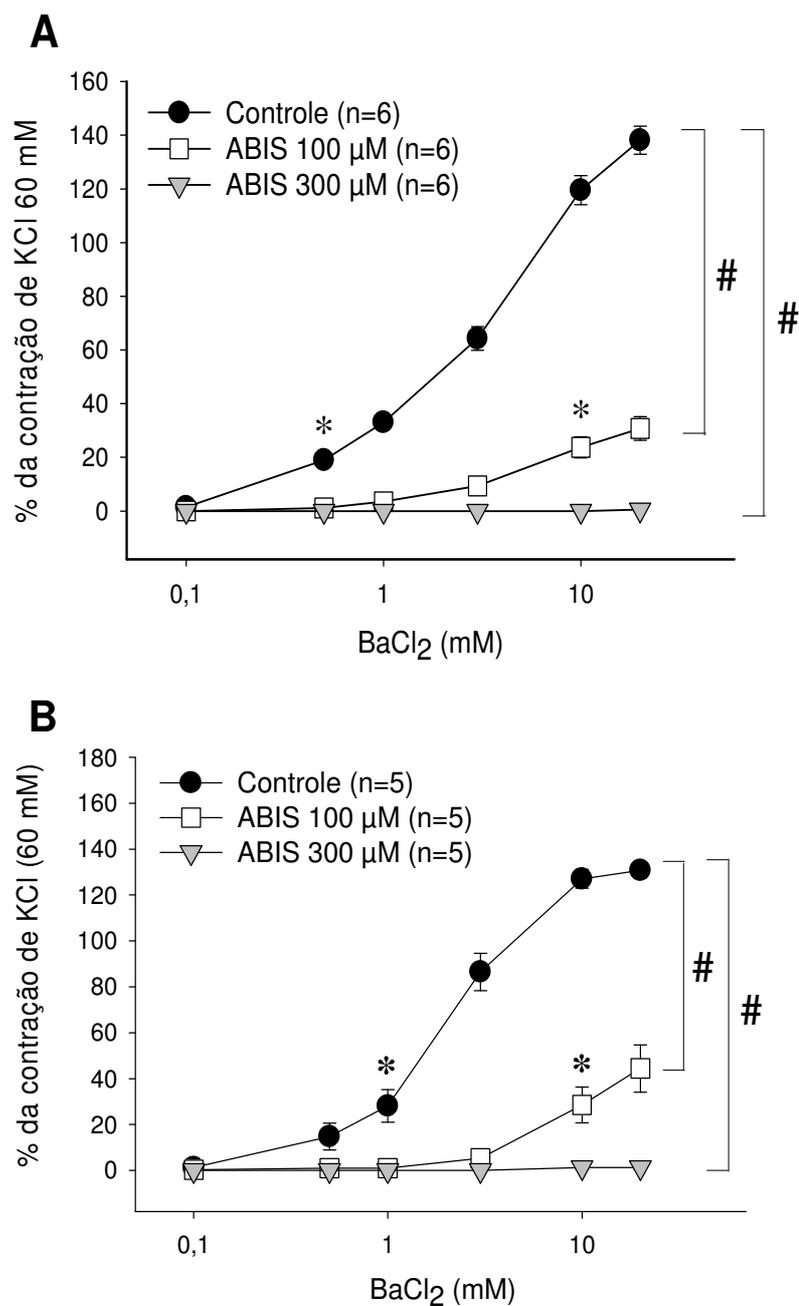


Figura 35 – Efeito do ABIS na curva concentração-efeito de cloreto de bário em preparações isoladas de traquéia (A) e aorta (B) em presença de KCl. As curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle; círculo preto) e na presença de ABIS nas concentrações de 100 μ M (quadrado branco) e 300 μ M (triângulo cinza invertido). As barras verticais indicam E.P.M. * resalta o primeiro efeito significativo para a curva controle ou para as curvas construídas em presença de ABIS ($p < 0,01$; ANOVA one-way seguido do teste de Holm-Sidak). # destaca diferença estatística significativa dos grupos tratados com ABIS em relação ao grupo controle ($p < 0,01$; ANOVA two-way seguido do teste de Holm-Sidak). (n) indica o número de experimentos realizados.

5.7 EFEITO DO ABIS EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE TRAQUÉIA CONTRAÍDAS COM UMA COMBINAÇÃO DE K⁺ E CARBACOL EM MEIO CONTENDO CÁLCIO OU BÁRIO

Preparações traqueais foram mantidas em solução contendo 2 mM de Ca²⁺ ou Ba²⁺ e uma resposta contrátil máxima foi evocada com 150 mM de KCl e com a adição subsequente de carbacol (10 µM). Nas preparações mantidas em meio com Ca²⁺, o carbacol induziu uma significativa contração sustentada adicional ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak) correspondendo a $162,1 \pm 9,3\%$ ($n = 6$) da obtida com 100 mM de KCl (Figuras 36 **a** e **c**). Nessas condições, a adição de uma elevada concentração de ABIS (300 µM) promoveu um discreto relaxamento da preparação para $115,1 \pm 12,8\%$, um valor que foi significativamente diferente do observado na ausência do ABIS ($p < 0,05$, teste de Holm-Sidak). Em preparações mantidas em meio com Ba²⁺, a adição de carbacol na fase estável da contração induzida por KCl (150 mM) produziu uma contração transitória que relaxou a um nível correspondente a $114,2 \pm 14,9\%$, um valor que não diferiu do observado com 100 mM de KCl. Por outro lado, o ABIS relaxou quase completamente as preparações de traquéia quando foi adicionado em tecidos mantidos em meio com Ba²⁺ na presença de KCl e carbacol ($p < 0,001$, teste de Holm-Sidak; $n = 6$) (Figura 36 **b** e **c**).

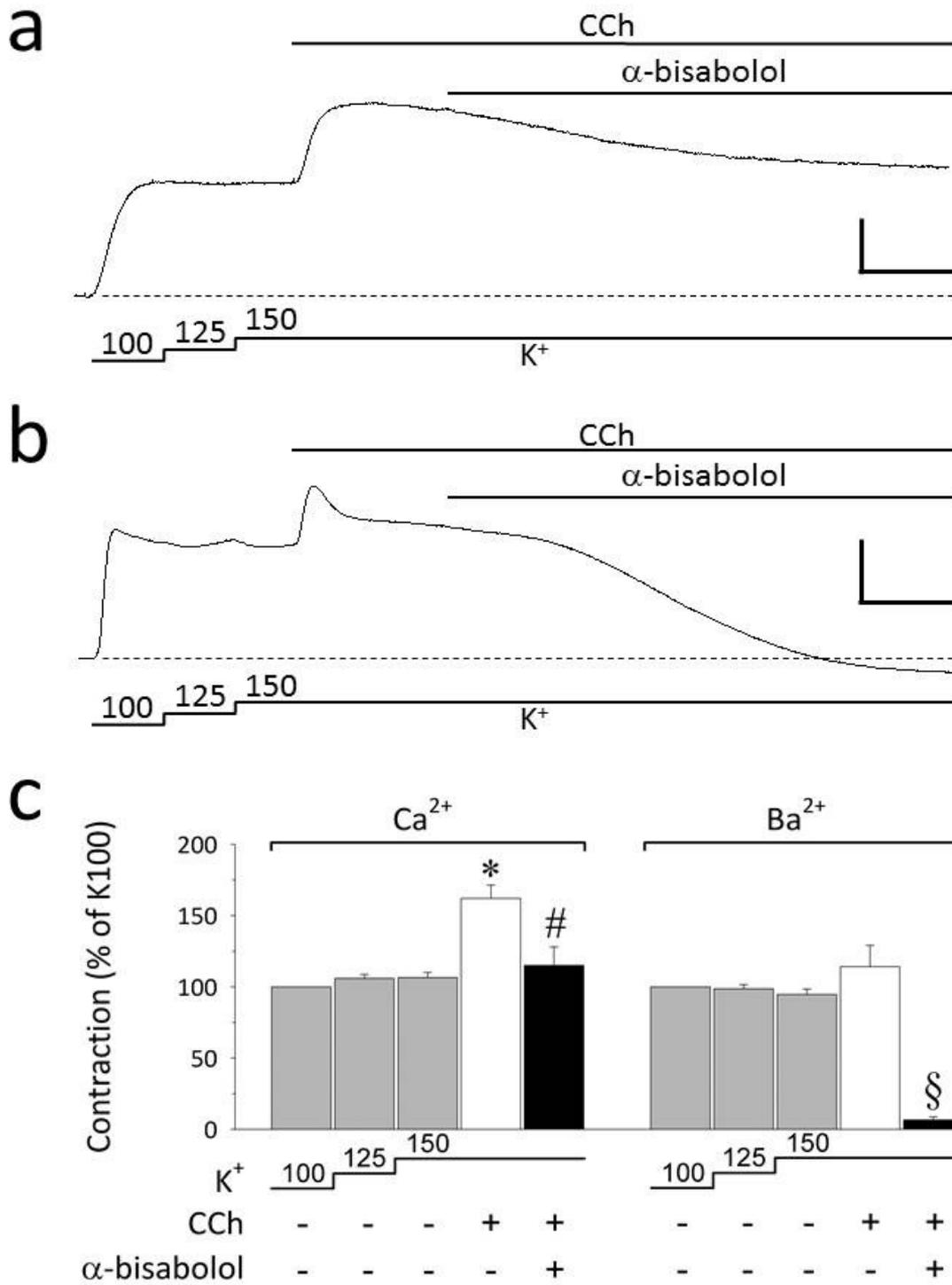


Figura 36 (legenda na próxima página)

Figura 36 - Efeitos do ABIS em preparações de traquéia contraídas com KCl e carbacol em meio contendo Ca^{2+} ou Ba^{2+} . Dois traçados típicos de dois experimentos demonstrando o efeito diferenciado do ABIS na contração induzida por carbacol (CCh) em preparações de traquéia despolarizadas com elevadas concentrações de KCl (100 – 150 mM) na presença de Ca^{2+} (painel a) ou Ba^{2+} (painel b). A resposta contrátil ao KCl (100 mM) foi inicialmente determinada e então o K^+ foi adicionado em incrementos de 25 mM até atingir 150 mM, para garantir a resposta máxima. Ainda na presença de elevada concentração de KCl, o carbacol (10 μM) foi aplicado e seguido pela adição de ABIS (300 μM). A linha pontilhada indica o tônus basal. Calibrações: vertical = 0.5 g; horizontal = 5 min. No painel c, os valores médios são expressos como % da contração induzida por KCl (100 mM). Barras verticais indicam E.P.M (n = 6 por grupo). *, p < 0.05, comparado a KCl 100 mM; #, p < 0.05, comparado a KCl (150 mM) + CCh; §, p < 0.05, comparado a ambos KCl-100 mM e KCl-150 mM + CCh (teste de Holm-Sidak).

5.8 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DO ABIS EM PREPARAÇÕES DE AORTA ISOLADA

5.8.1 Avaliação da participação de mediadores endoteliais e de canais de potássio no efeito vasodilatador do ABIS em preparações de aorta pré-contraídas com fenilefrina

Em preparações isoladas de anéis de aorta com endotélio a adição de fenilefrina (1 μM) resultou em contração com amplitude máxima de $1,52 \pm 0,15$ g. Em presença de L-NAME (100 μM), ODQ (10 μM) ou indometacina (10 μM), a mesma concentração de fenilefrina (1 μM) induziu contração com amplitude máxima de $1,66 \pm 0,16$ g, $2,17 \pm 0,22$ g e $0,89 \pm 0,04$ g, respectivamente. Em comparação com as preparações controle (CI_{50} de 162 [91 – 288,2] μM), o pré-tratamento com L-NAME, ODQ e indometacina não alterou significativamente ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney) a resposta vasodilatadora induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de ABIS (1-1000 μM) (Figura 37 A). Os valores de CI_{50} foram 213,5 [138,6 – 329,1] μM , 216,9 [141,7 – 332,1] μM , e 190,1 [130,4 – 277,07] μM , respectivamente (Tabela 8).

Em presença dos bloqueadores de canais de potássio TEA (1 mM) e glibenclamida (10 μM), a fenilefrina (1 μM) induziu contração com amplitude máxima de $2,31 \pm 0,25$ g e $1,15 \pm 0,05$ g, respectivamente. A resposta vasodilatadora do ABIS (1-1000 μM) também não foi significativamente ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney) modificada em presença TEA e glibenclamida (Figura 37 B) (CI_{50} de 318,3 [210,3 – 481,8] μM e 186,1 [114,5 – 302,4] μM , respectivamente) em comparação com as preparações controle (CI_{50} de 162 [91 – 288,2] μM) (Tabela 8).

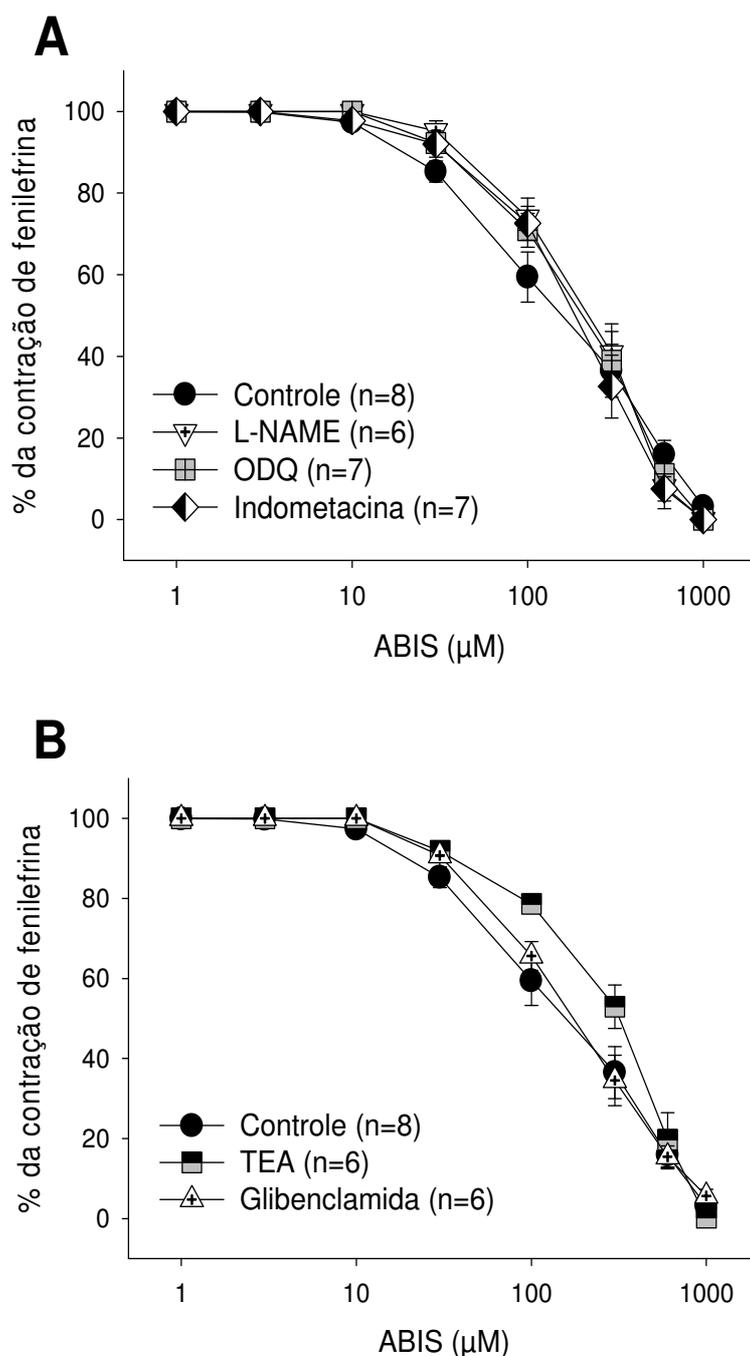


Figura 37 - Influência de fatores endoteliais e canais para potássio no efeito relaxante do ABIS em preparações isoladas de aorta com endotélio pré-contraídas com fenilefrina. (A) Gráfico demonstra o efeito vasodilatador do ABIS em preparação controle (círculo preto) e na presença de L-NAME (triângulo branco invertido cruzado), ODQ (quadrado cinza cruzado) e indometacina (losango semi-preenchido). (B) Gráfico demonstrando os efeitos do pré-tratamento com TEA (quadrado cinza semi-preenchido) e glibenclamida (triângulo branco cruzado), comparados com a preparação controle (círculo preto), na resposta vasodilatadora do ABIS em preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro. (n) indica o número de experimentos realizados. As respostas foram expressas como média \pm E.P.M em relação ao percentual (%) da contração induzida por fenilefrina antes da adição cumulativa de ABIS.

5.8.2 Efeito da inibição da enzima fosfodiesterase (PDE) e da proteína quinase-A (PKA) na curva concentração-efeito do ABIS em preparações de aorta pré-contráidas com fenilefrina

Em anéis de aorta isolada com endotélio, a adição de fenilefrina (1 μM) resultou em contração com amplitudes máximas de $1,79 \pm 0,41$ g e $1,07 \pm 0,24$ g em preparações controle e pré-tratadas com sildenafil (10 μM), respectivamente. Em presença do sildenafil o valor de CI_{50} ($347,5 [192 - 627,62]$ μM) aumentou significativamente ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) em relação ao grupo controle (CI_{50} de $162 [91 - 288,2]$ μM) (Figura 38 A).

Em preparações isoladas de anéis de aorta com endotélio a adição 1 μM de fenilefrina resultou em contração com amplitude máxima de $1,52 \pm 0,15$ g. A mesma concentração de fenilefrina (1 μM) produziu contração de amplitude máxima de $1,14 \pm 0,11$ g em presença de KT-5720 em preparações de aorta com endotélio intacto. Conforme ilustrado na figura 38 B, a resposta vasodilatadora induzida pela adição cumulativa de concentrações crescentes de ABIS (1-1000 μM) foi semelhante entre preparações controle e pré-tratadas com o inibidor da PKA (CI_{50} de $261,22 [179,3 - 380,5]$ μM) e a comparação estatística não apontou diferença significativa ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney) em comparação com as preparações controle (CI_{50} de $162 [91 - 288,2]$ μM).

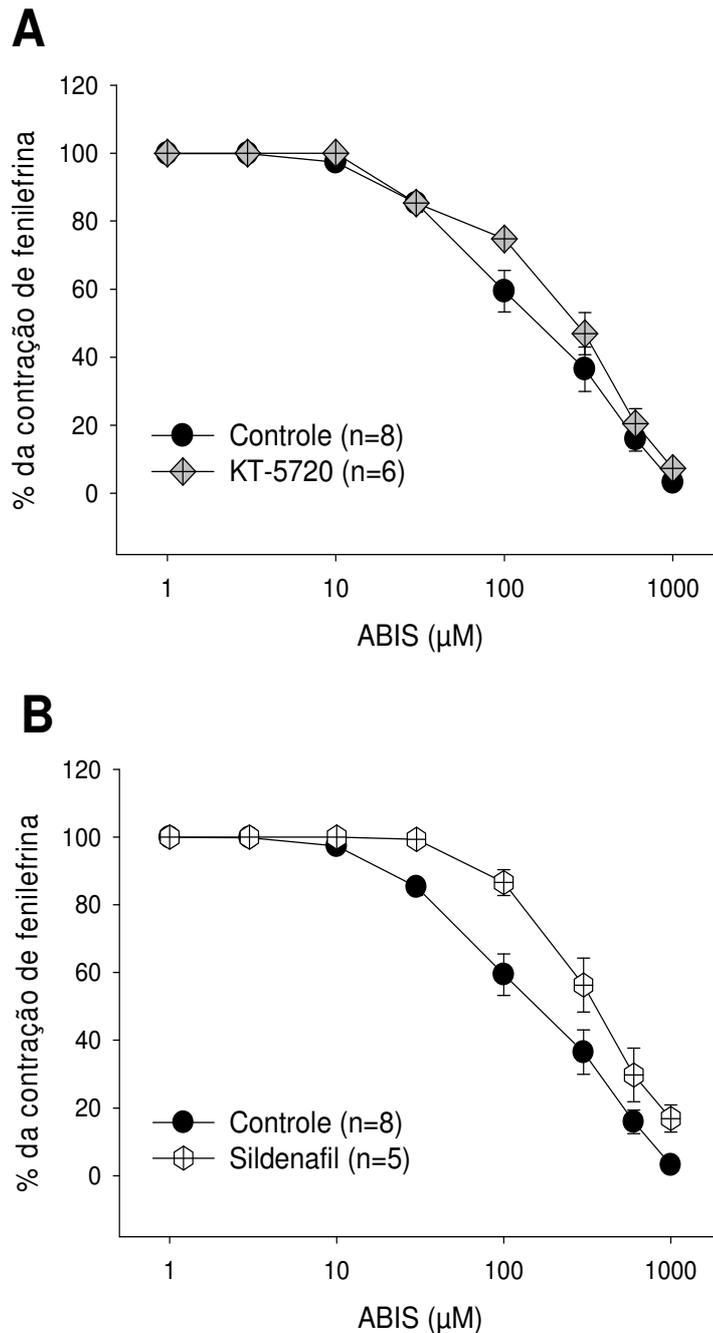


Figura 38 - Avaliação da participação da fosfodiesterase e da proteína quinase A na resposta inibitória vascular do ABIS. (A) Gráfico demonstrando o efeito do pré-tratamento com KT-5720 (hexágono cinza cruzado) em comparação com a preparação controle (círculo preto), na resposta vasodilatadora do ABIS em preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro. (B) Gráfico exibindo o efeito do pré-tratamento com sildenafil (hexágono branco cruzado) em comparação com a preparação controle (círculo preto), na resposta vasodilatadora do ABIS em preparações de anéis de aorta com endotélio íntegro. As respostas foram expressas como média \pm E.P.M em relação ao percentual (%) da contração induzida por fenilefrina antes da adição cumulativa de ABIS. (n) indica o número de experimentos realizados.

Pré-tratamento	CI₅₀ (μM)	n
Controle	162 [91 – 288,2]	8
L-NAME	213,5 [138,6 – 329,1]	6
ODQ	216,9 [141,7 – 332,1]	7
Indometacina	190,1 [130,4 – 277,07]	7
TEA	318,3 [210,3 – 481,8]	6
Glibenclamida	186,1 [114,5 – 302,4]	6
KT-5720	261,22 [179,3 – 380,5]	6
Sildenafil	347,5 [192 – 627,62] *	5

Tabela 8 - Valores de CI₅₀ para o efeito vasodilatador induzido pelo ABIS em preparações isoladas de aorta controle e pré-tratadas com antagonistas e inibidores.

* p < 0,05; teste de Mann-Whitney.

5.8.3 Curva concentração-efeito do ABIS em preparações de aorta pré-contraídas com agente ativador da proteína quinase C (PKC), éster de forbol (PDB)

Em anéis de aorta com endotélio mantidos em meio sem Ca^{2+} na presença de EGTA (1 mM), a adição do éster de forbol (PDB) resultou em contração com amplitude máxima de $1,61 \pm 0,09$ g. Nessa condição, a figura 39 demonstra que a adição cumulativa de concentrações crescentes de ABIS (1-1000 μM) reverteram a pré-contração induzida pelo PDB de forma significativa a partir da concentração de 300 μM do sesquiterpeno ($p < 0,05$ ANOVA one-way, seguido pelo teste de Holm-Sidak). Entretanto, se comparado com as preparações controle pré-contraídas com fenilefrina (CI_{50} de 162 [91 – 288,2] μM), o ABIS exibiu uma potência farmacológica significativamente menor ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) nos anéis de aorta pré-contraídos com PDB, com valor de CI_{50} na ordem de 667,7 [482,5 – 924,05] μM .

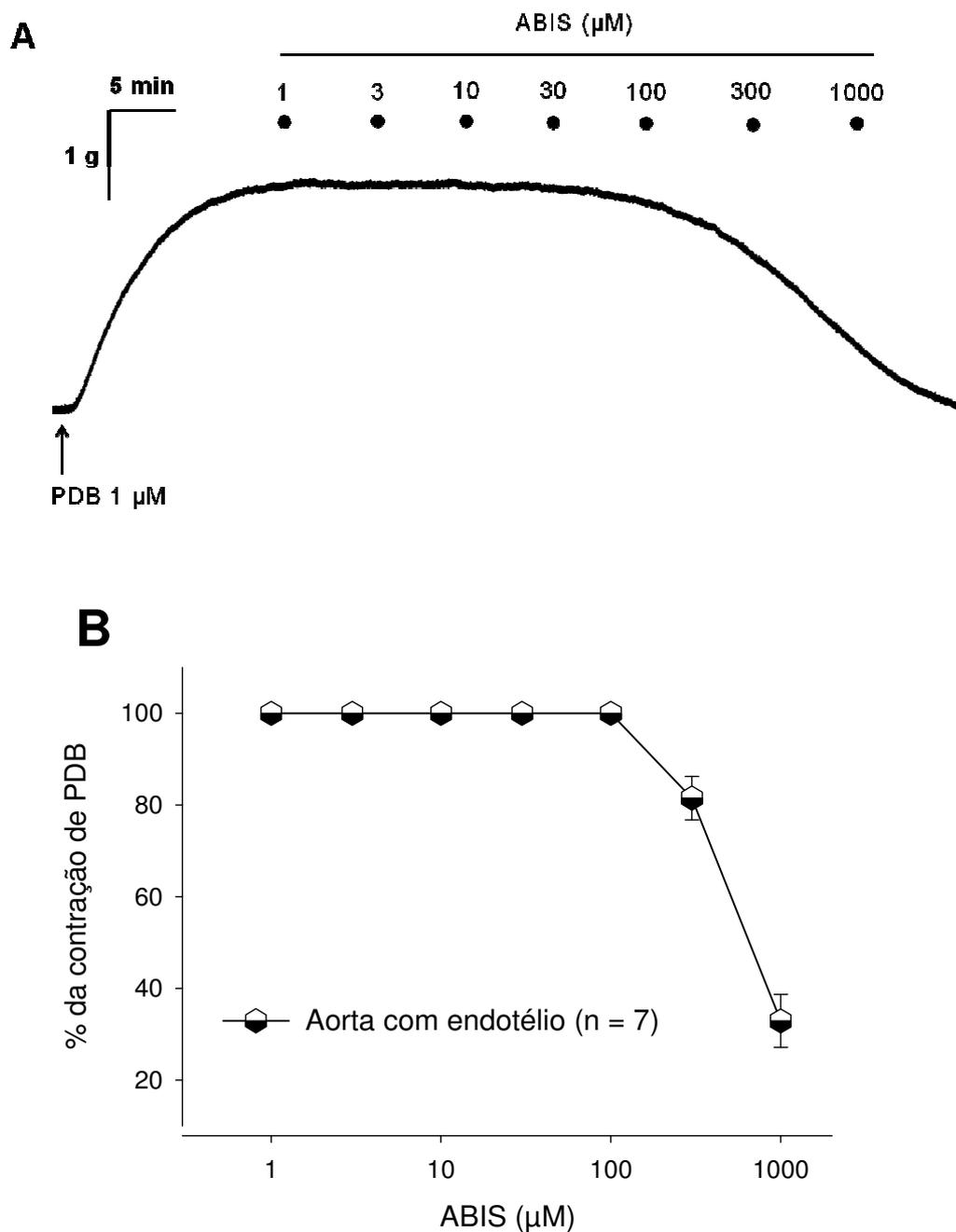


Figura 39 - Avaliação do efeito do ABIS após adição de ativador da proteína quinase C. (A) Traçado típico do efeito da adição cumulativa de ABIS em preparações isoladas de aorta pré-contraídas com éster de forbol em meio sem cálcio na presença de EGTA **(B)** Gráfico demonstrando o efeito da adição cumulativa do ABIS em preparações isoladas de aorta com endotélio pré-contraídas com éster de forbol (hexágono branco semi-preenchido). As respostas foram expressas como média \pm E.P.M em relação ao percentual (%) da contração induzida pelo éster de forbol antes da adição cumulativa de ABIS. (n) indica o número de experimentos realizados.

5.9 EFEITO DO ABIS NA MOBILIZAÇÃO DE Ca^{2+} DOS ESTOQUES INTRACELULARES

5.9.1 Efeitos do ABIS na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático induzida por cafeína

Em preparações isoladas de aorta mantidas em solução normal a adição de concentração isolada de KCl (60 mM) induziu uma contração com amplitude de $1,05 \pm 0,03$ g. Em meio sem Ca^{2+} na presença de EGTA (1 mM), a adição de cafeína (30 mM) produziu uma contração não-sustentada com amplitude média de $15,9 \pm 2,05$ % em relação à contração induzida por KCl (60 mM). Em comparação com as preparações controle, as amplitudes das contrações induzidas pela cafeína aumentaram em presença de ABIS nas concentrações de 100 μM ($23,42 \pm 3,66$ %) e 300 μM ($28,55 \pm 3,51$ %). Entretanto, esse efeito induzido pelo pré-tratamento com ABIS foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA one-way, seguido do teste de Holm-Sidak) apenas na maior concentração do sesquiterpeno (300 μM) (Figura 40).

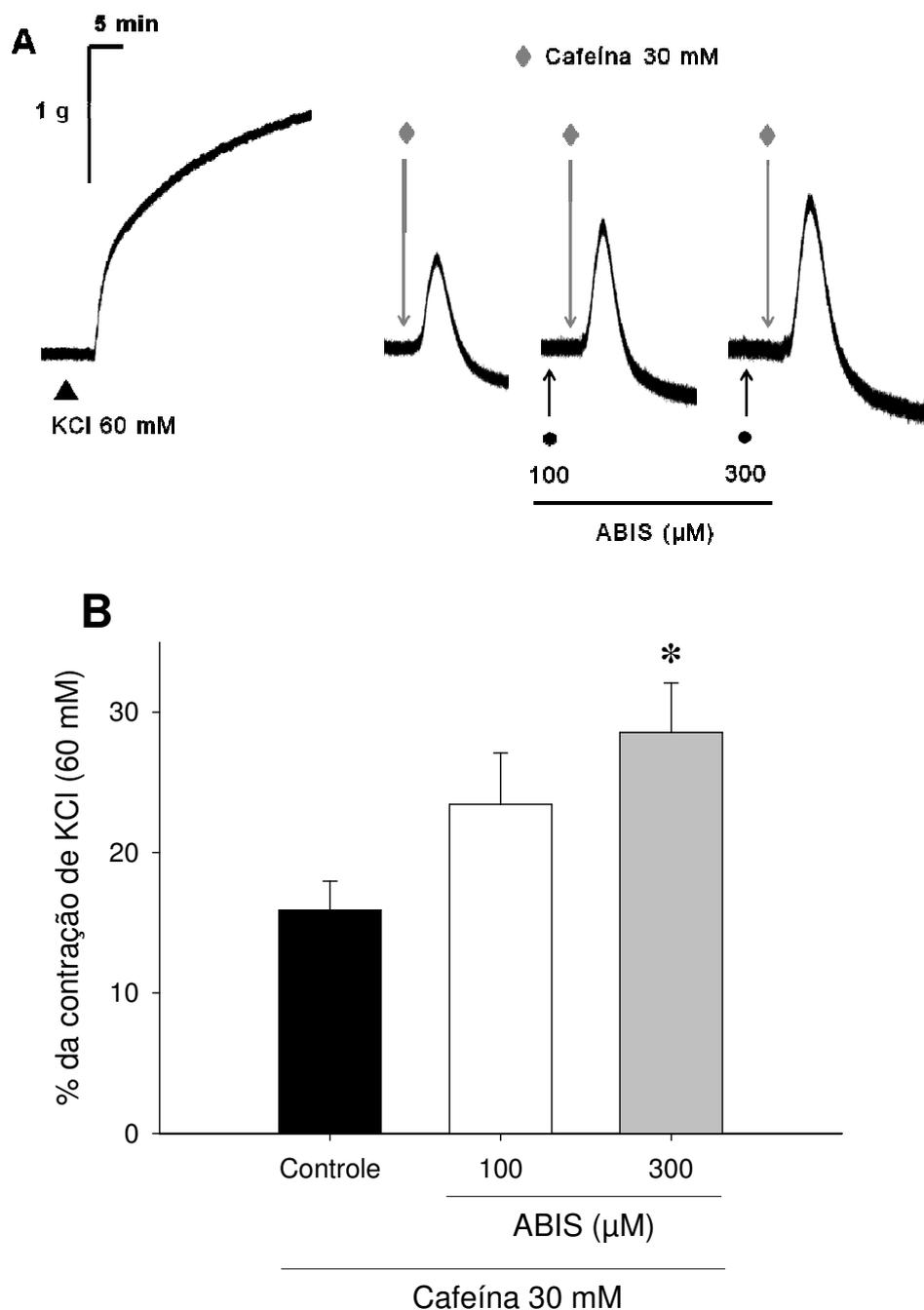


Figura 40 – Efeito do ABIS na contração induzida por cafeína em preparações isoladas de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} . (A) Traçados típicos das contrações fásicas induzidas pela cafeína em preparações controle e pré-tratadas com ABIS. (B) As colunas demonstram a magnitude relativa da contração fásica induzida pela cafeína (30 mM) na ausência (coluna branca; n = 8) e na presença de 100 μM (coluna cinza; n = 6) ou 300 μM (coluna preta; n = 6) de ABIS. Os valores foram expressos como percentual (%) da contração induzida por 60 mM de KCl e as barras verticais indicam E.P.M. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (ANOVA one-way, seguida do teste de Holm-Sidak).

5.9.2 Efeitos do ABIS na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático induzida por fenilefrina

Em preparações isoladas de aorta mantidas em solução normal a adição de uma concentração isolada de $1 \mu\text{M}$ fenilefrina induziu uma contração cuja amplitude máxima foi de $1,31 \pm 0,5 \text{ g}$. Em meio sem Ca^{2+} na presença de EGTA (1 mM), a mesma concentração de fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) produziu uma contração não-sustentada com amplitude média de $28,49 \pm 3,45 \%$ em relação à contração induzida por KCl (60 mM). Em presença de $100 \mu\text{M}$ e $300 \mu\text{M}$ de ABIS não ocorreu alteração significativa ($p > 0,05$; ANOVA one-way, seguido do teste de Holm-Sidak) na amplitude da contração fásica de fenilefrina, com valores relativos de $30,41 \pm 4,59 \%$ e $22,43 \pm 4,64 \%$, respectivamente (Figura 41).

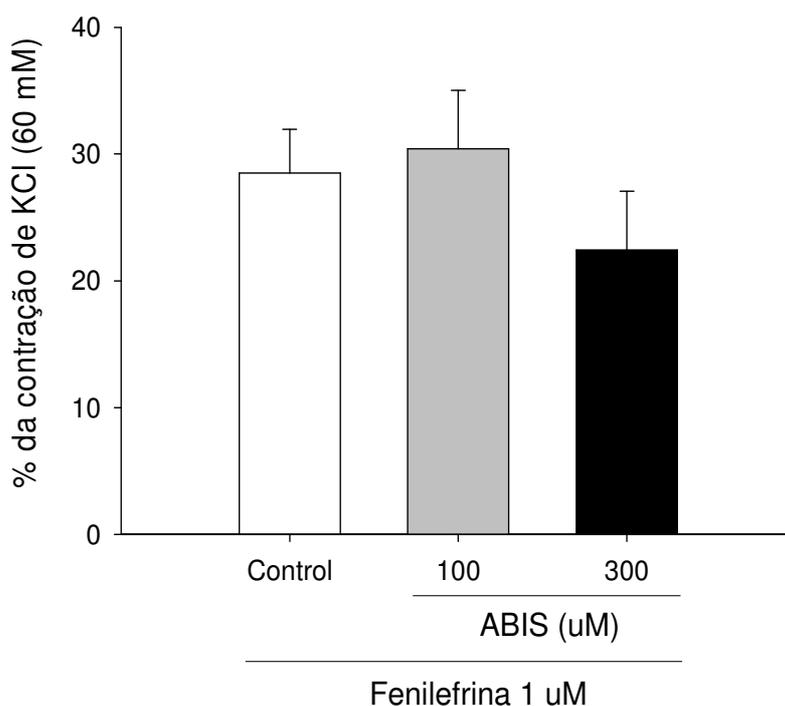


Figura 41 – Efeito do ABIS na contração fásica induzida por fenilefrina em preparações isoladas de aorta mantidas em meio sem Ca^{2+} . As colunas demonstram a magnitude relativa da contração fásica induzida pela fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) na ausência (coluna branca; $n = 8$) e na presença de $100 \mu\text{M}$ (coluna cinza; $n = 6$) ou $300 \mu\text{M}$ (coluna preta; $n = 6$) de ABIS. Os valores foram expressos como percentual (%) da contração induzida por 60 mM de KCl e as barras verticais indicam E.P.M.

5.10 EFEITO DO ABIS NA ENTRADA CAPACITATIVA DE CÁLCIO EM PREPARAÇÕES ISOLADAS DE AORTA

5.10.1 Efeito do ABIS nas contrações induzidas pela reposição de cálcio em presença de ácido ciclopiazônico após depleção dos estoques intracelulares em preparações isoladas de aorta

Em preparações isoladas de aorta mantidas em solução normal a adição de 60 mM de KCl induziu contração com amplitude média de $1,08 \pm 0,12$ g. Após contrações sucessivas com fenilefrina em meio normal para depleção dos estoques intracelulares, as preparações foram mantidas em solução sem Ca^{2+} em presença de EGTA (1 mM), nifedipina (1 μM) e ácido ciclopiazônico (ACP) (10 μM). Nessa condição experimental, a adição de Ca^{2+} (2 mM) induziu uma contração sustentada de $54,68 \pm 13$ % em relação à contração induzida por KCl (60 mM). O pré-tratamento com 100 μM de ABIS não alterou de maneira significativa ($p > 0,05$; teste t de Student) o efeito contrátil induzido por 2 mM de Ca^{2+} ($45,11 \pm 8,52$ % da contração de KCl 60 mM) (Figura 42).

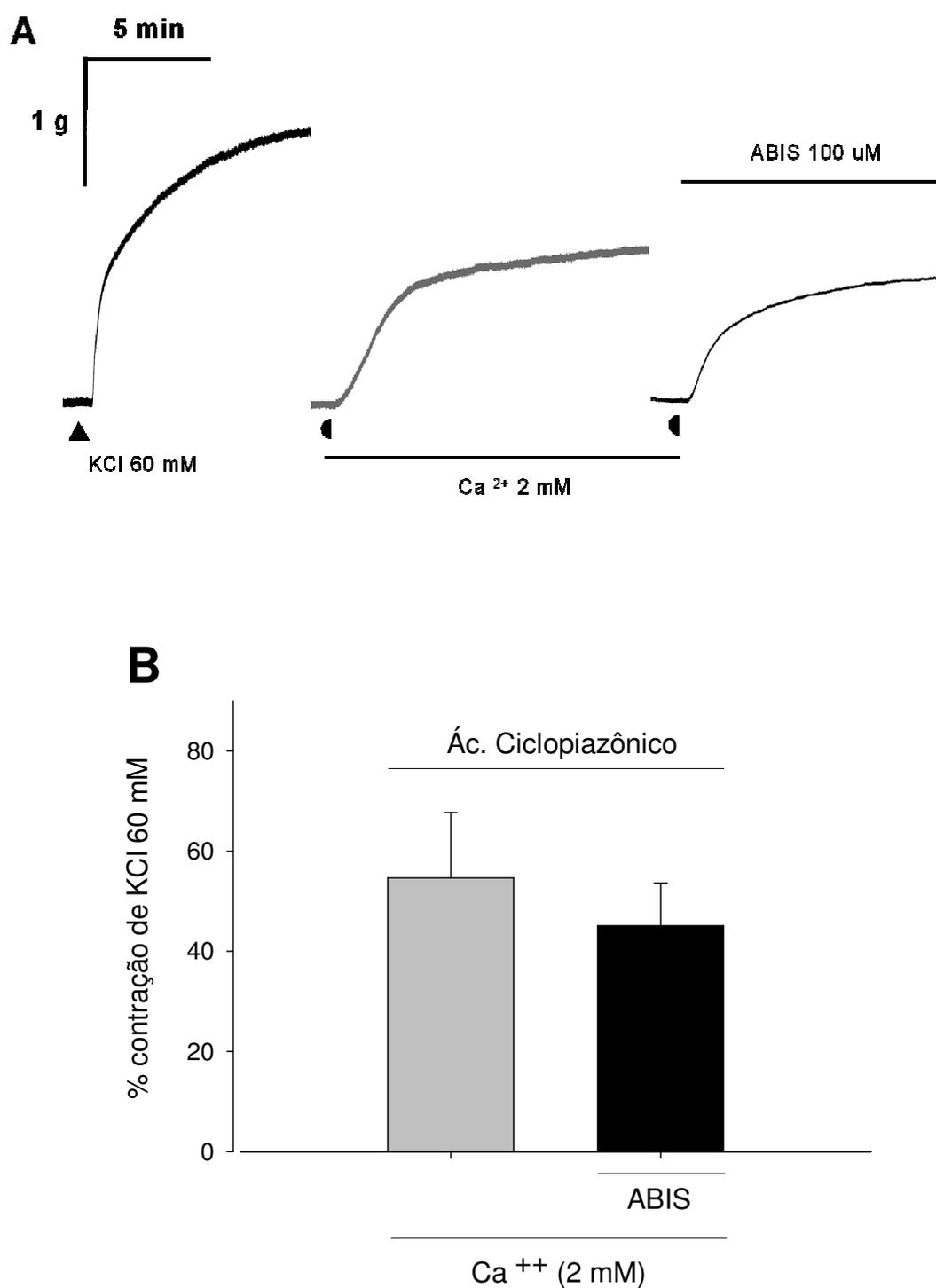


Figura 42 – Efeito do ABIS na contração induzida por cálcio após depleção dos estoques intracelulares. As colunas demonstram a magnitude relativa da contração sustentada induzida por Ca²⁺ (2 mM) na ausência (coluna cinza; n = 5) e na presença de 100 μM (coluna preta, n = 5) de ABIS. Os valores foram expressos como percentual (%) da contração induzida por 60 mM de KCl e as barras verticais indicam E.P.M.

5.11 ESTUDO DOS EFEITOS DO ABIS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

5.11.1 Efeitos do pré-tratamento com ABIS na curva concentração-efeito de carbacol em tiras isoladas de bexiga após indução de cistite hemorrágica

O tratamento de camundongos com ifosfamida diminuiu ($p < 0.05$, two-way ANOVA) a força contrátil de preparações isoladas de bexiga urinária estimuladas com carbacol ($0.001-10 \mu\text{M}$) em comparação com os tecidos controles tratados com salina. Os tecidos vesicais de camundongos tratados com ifosfamida apresentaram, após exposição à maior concentração do carbacol ($10 \mu\text{M}$), contração média de $0,8 \pm 0,2 \text{ g}$ ($n = 6$), um valor que foi significativamente menor ($p < 0.05$, teste de Holm-Sidak) que o observado em animais tratados com salina ($2.8 \pm 0.02 \text{ g}$; $n = 6$). O pré-tratamento com ABIS (100 mg/kg , p.o.) antes da administração de ifosfamida não alterou a resposta contrátil em comparação com as preparações de animais tratados apenas com ifosfamida ($E_{\text{máx}}$ de $0.6 \pm 0.2 \text{ g}$, $n = 6$; $p > 0.05$, teste de Holm-Sidak) (Figura 43).

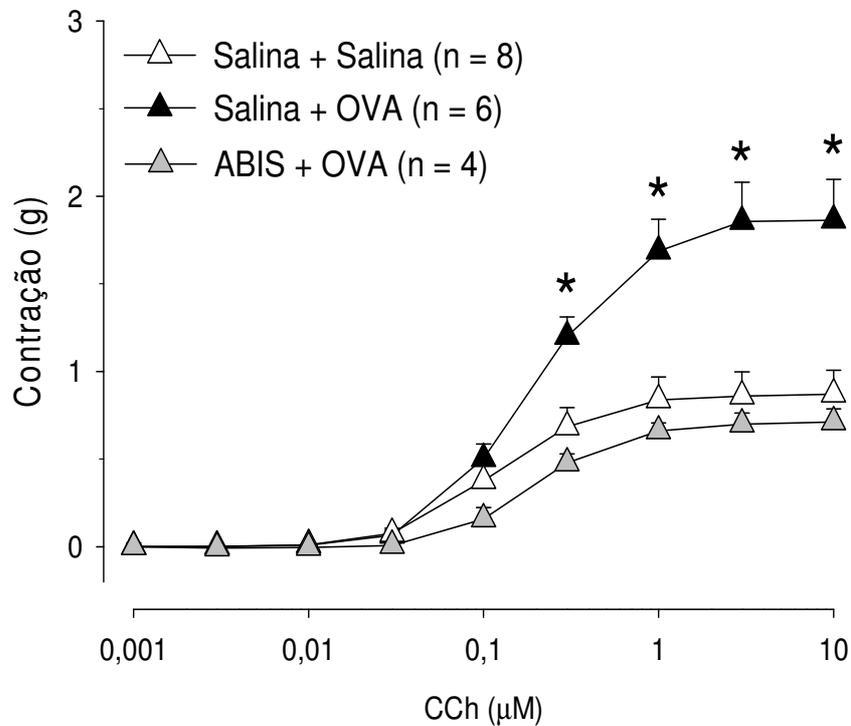


Figura 43 – Curvas concentração-efeito de carbacol em preparações de bexiga em modelo de cistite hemorrágica. A resposta contrátil foi avaliada após a adição cumulativa de carbacol (0,001-10 µM) em preparações isoladas de bexiga urinária de animais pré-tratados 24 horas antes com salina (controle; quadrado branco) ou ifosfamida (quadrado semi-preenchido). A mesma curva foi construída também em preparações de animais pré-tratados com ABIS (quadrado cinza) 1 hora antes da administração de ifosfamida. Os dados foram expressos em gramas como média ± E.P.M, com o número de experimentos destacado entre parênteses. *, indica diferença significativa em relação à curva controle. (n) destaca o número de experimentos realizados.

5.11.2 Efeitos do pré-tratamento com ABIS na curva concentração-efeito de carbacol em anéis isolados de traquéia após desafio antigênico com ovalbumina

Em preparações isoladas de traquéia, o desafio antigênico após inalação de ovalbumina em animais previamente sensibilizados aumentou de maneira significativa ($p < 0.05$, two-way ANOVA) as contrações induzidas por carbacol ($0,001-10 \mu\text{M}$) em comparação com os tecidos provenientes dos animais desafiados com salina. Na concentração de $10 \mu\text{M}$ de carbacol, as preparações de animais desafiados com ovalbumina apresentaram $E_{\text{máx}}$ de $1.9 \pm 0.2 \text{ g}$ ($n = 6$), um valor que foi significativamente maior ($p < 0.05$, teste de Holm-Sidak) que o observado em animais desafiados com salina ($0.9 \pm 0.1 \text{ g}$; $n = 8$) (Figura 44). As preparações de animais pré-tratados com ABIS (1 mg/ml) por via inalatória, 15 min antes do desafio antigênico com ovalbumina, apresentaram resposta contrátil que não diferiu significativamente em comparação com os tecidos de animais tratados com salina.

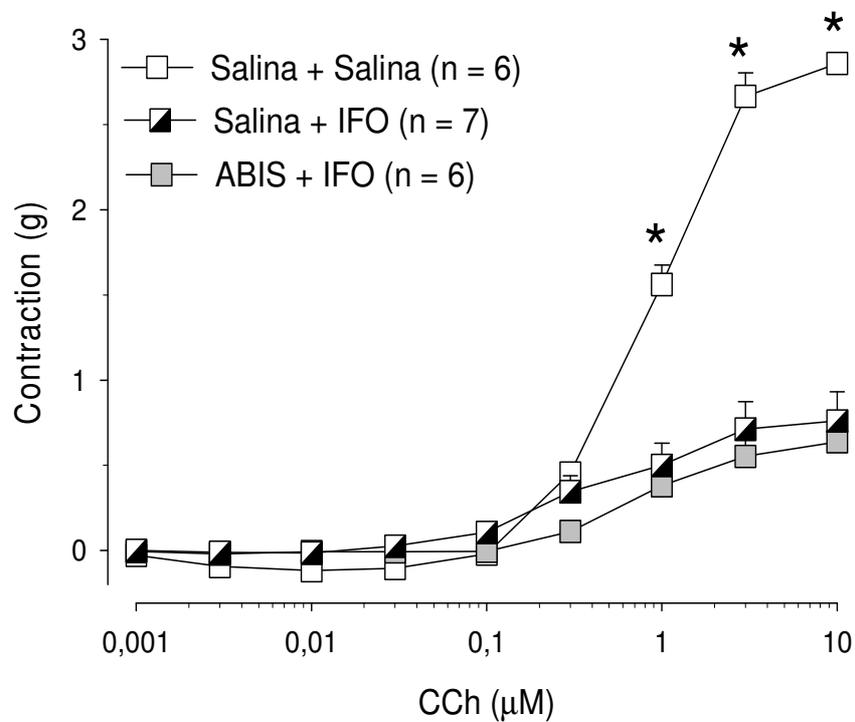


Figura 44 – Curvas concentração-efeito de carbacol em preparações de traquéia de animais sensibilizados. A resposta contrátil foi avaliada após a adição cumulativa de carbacol (0,001-10 µM) em anéis isolados de traquéia obtidos de animais sensibilizados à ovalbumina e pré-tratados 12 horas antes com salina (controle; triângulo branco) ou ovalbumina (triângulo preto) por via inalatória. A curva concentração-efeito foi realizada também em preparações de animais pré-tratados com ABIS (triângulo cinza), por via inalatória, 15 minutos antes da administração de ovalbumina. Os dados foram expressos em gramas como média ± E.P.M, com o número de experimentos destacado entre parênteses. *, indica diferença significativa em relação à curva controle. (n) destaca o número de experimentos realizados.

5.11.3 Efeito do pré-tratamento com ABIS na contração induzida por ovalbumina em anéis isolados de traquéia após desafio antigênico

Em preparações isoladas de traquéia de animais desafiados com ovalbumina, mantidas em solução normal, a adição de 60 mM de KCl resultou em contração de amplitude média de $0,9 \pm 0,08$ g. Nessas preparações, a adição de ovalbumina (10 μ g/ml) induziu uma contração não-sustentada com amplitude de $76,06 \pm 4,97$ % em relação à contração induzida por KCl (60 mM). Nas preparações de animais tratados com 1000 μ M de ABIS antes do desafio antigênico, a contração produzida pela mesma concentração de ovalbumina foi reduzida significativamente ($p < 0,05$; teste t de Student) para $33,53 \pm 5,87$ % (percentual da contração de KCl 60 mM) (Figura 45 A).

5.11.4 Efeito do ABIS na contração induzida por ovalbumina em tiras isoladas de íleo após desafio antigênico

Em preparações isoladas de íleo mantidas em solução normal a adição de 60 mM de KCl resultou em contração de amplitude média de $0,85 \pm 0,15$ g. Na ausência de ABIS, a adição de ovalbumina (10 μ g/ml) induziu uma contração não-sustentada, cuja amplitude foi de $52,39 \pm 10,35$ % em relação à contração induzida por KCl (60 mM). Após incubação de 300 μ M de ABIS, a contração produzida pela mesma concentração de ovalbumina foi reduzida significativamente ($p < 0,05$; teste t de Student) para $8,74 \pm 1,56$ % (relativa à contração de KCl 60 mM) (Figura 45 B).

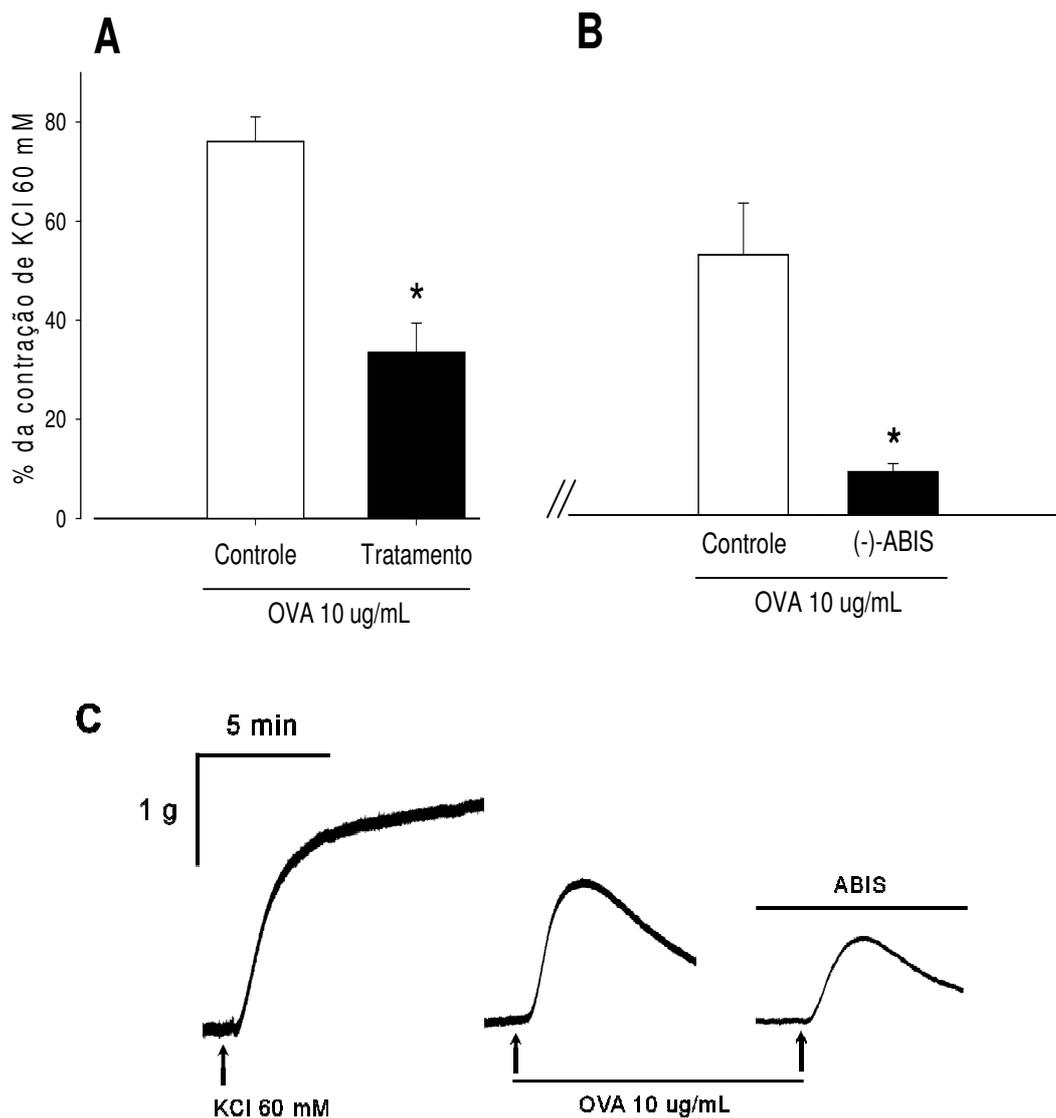


Figura 45 – Efeito do ABIS na contração induzida por ovalbumina em preparações isoladas de músculo liso. (A) Efeito inibitório do ABIS na contração induzida por ovalbumina em preparações isoladas de traquéia: as colunas demonstram a magnitude relativa da contração fásica induzida por ovalbumina (10 µg/ml) em animais desafiados pré-tratados, por via inalatória, com salina (controle; coluna branca; n = 4) ou ABIS 1000 µM (coluna preta; n = 4); (B) Efeito do pré-tratamento com ABIS na contração induzida por ovoalbumina em preparações isoladas de íleo: as colunas demonstram a magnitude relativa da contração fásica induzida por ovalbumina (10 µg/ml) na ausência (coluna branca; n = 6) e na presença de 100 µM (coluna preta; n = 6) de ABIS. Os dados foram expressos como média ± E.P.M em relação à contração induzida por 60 mM de KCl. *, indica diferença significativa (p<0,05; teste t de Student) em relação à amplitude relativa de contração registrada na preparação controle; (C) Traçados típicos demonstrando as contrações fásicas induzidas por OVA em preparações isoladas de traquéia na ausência e em presença de ABIS.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que, em condições de tensão basal, o ABIS exibe efeitos farmacológicos interessantes em preparações isoladas de músculo liso. Esses efeitos envolvem desde ações miorelaxantes em preparações isoladas de duodeno passando por propriedades contráteis em outros tecidos como tiras de fundo de estômago e anéis de aorta com endotélio. Apesar desses efeitos contrastantes, apenas ações predominantemente inibitórias do ABIS foram demonstradas quando as preparações isoladas de músculo liso foram previamente submetidas a um estímulo contrátil. Além disso, em algumas preparações isoladas como em anéis de aorta, traquéia e em segmentos de bexiga e duodeno, tais ações inibitórias parecem ser mais seletivas para os mecanismos celulares que envolvem o influxo de cálcio através de canais iônicos dependentes de voltagem do sarcolema.

Em anéis de aorta mantidos sob tensão basal, foi observado um efeito contrátil na faixa de concentração entre 100 e 600 μM de ABIS. Esse efeito contrátil induzido pelo ABIS parece ter origem endotelial uma vez que não foi reproduzido em preparações sem endotélio funcionalmente ativo. Efeitos contráteis dependentes do endotélio já foram descritos para outras substâncias voláteis como o óleo essencial de *Croton zehntneri*, rico em anetol (DE SIQUEIRA et al, 2006) como também para o próprio anetol usado isoladamente (SOARES et al, 2007). O mecanismo subjacente proposto para esse efeito contrátil do anetol parece envolver a abertura de canais de cálcio operados por voltagem, embora não tenhamos investigado diretamente se o ABIS seria capaz de agir por mecanismo semelhante. No entanto, deve ser destacado que esse efeito contrátil induzido pelo ABIS apresentou pequena amplitude (aproximadamente

13% da contração de referência induzida por 60 mM de KCl). Além disso, esse efeito não foi observado em preparações de vasos mesentéricos, indicando uma certa seletividade para vasos de condutância em comparação com vasos de resistência. Provavelmente, esse efeito contrátil relacionado ao endotélio induzido pelo ABIS em preparações isoladas de aorta não deve influenciar o sistema cardiovascular em animais intactos, uma vez que relato recente demonstrou apenas atividade hipotensora e bradicárdica quando esse álcool sesquiterpênico foi administrado por via intravenosa a ratos (MENEZES et al, 2010). Esse último relato nos despertou o interesse de investigar o possível efeito do ABIS não só no músculo liso vascular, mas também ampliando a investigação para preparações isoladas de outros órgãos.

Nesse sentido, em músculo liso vascular, foram estudados os efeitos do ABIS em preparações submetidas a estímulos eletromecânico e farmacomecânico (SOMLYO & SOMLYO, 1994). Nessas condições experimentais, o ABIS exibiu apenas efeitos relaxantes, sugerindo que a hipotensão induzida por esse composto em ratos (MENEZES et al, 2010) pode ser atribuída em alguma extensão às suas propriedades vasodilatadoras. Entretanto, a potência farmacológica necessária para induzir o completo efeito vasodilatador foi variável, ou seja, foi maior em preparações mesentéricas em comparação com a potência observada em preparações de aorta isolada. Esse achado sugere que o ABIS exerce ações inibitórias predominantemente em vasos envolvidos no controle hemodinâmico da resistência vascular, um dos principais fatores determinantes da regulação da pressão arterial (CHRISTENSEN & MULVANY, 2001).

Em anéis de aorta com ou sem endotélio, o ABIS relaxou a contração induzida por KCl com potência farmacológica significativamente maior que a observada nas preparações vasculares pré-contraídas com fenilefrina. Sabe-se que esses agentes

induzem contração no músculo liso através de mecanismos diferentes. O KCl em altas concentrações, por exemplo, induz abertura de canais de cálcio operados por voltagem (SOMLYO & SOMLYO, 1994), enquanto que a fenilefrina ativa processos celulares dependentes de receptores associados às proteínas-G, resultando na produção de trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (SUEMATSU et al, 1984; HASHIMOTO et al, 1986). Portanto, nossa hipótese é que nas preparações isoladas de aorta o ABIS age inibindo respostas contráteis que recrutam preferencialmente canais de cálcio operados por voltagem. Contudo, em preparações de vasos mesentéricos o efeito inibitório do ABIS tornou-se evidente a partir de concentrações menores e não apresentou seletividade significativa entre os estímulos eletromecânico e farmacomecânico. Essa diferença pode resultar da ausência de conflitantes influências vasoconstritoras e vasodilatadoras entre células endoteliais e musculares lisas conforme observado em anéis de aorta após estímulo com fenilefrina (em anéis de aorta sem endotélio os valores de CI₅₀ foram significativamente menores quando comparados com preparações com endotélio).

Em preparações não-vasculares, o ABIS exerceu efeitos inibitórios com potências farmacológicas que foram similares às observadas em anéis de aorta. Deve ser destacado que em preparações de traquéia o ABIS também inibiu preferencialmente o estímulo eletromecânico em comparação com as preparações contraídas com o agonista muscarínico carbacol, que ativa receptores acoplados à proteína-G (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998). Dessa forma, em preparações isoladas de traquéia de ratos o (-)-ABIS pode se comportar como inibidor de canais de cálcio operados por voltagem, semelhante ao que tem sido previamente descrito para outro constituinte volátil de origem natural como o 1,8-cineol (BASTOS et al, 2009).

Dados adicionais obtidos a partir de outras preparações como bexiga urinária, fundo de estômago e duodeno revelaram potência característica de relaxamento do ABIS. Nesses tecidos, os efeitos induzidos pelo ABIS exibiram perfil similar de inibição independente do agente contrátil utilizado (acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico). A única exceção diz respeito às preparações isoladas de cólon, onde o ABIS relaxou as contrações induzidas por KCl ou carbacol com potência farmacológica significativamente menor que a observada nas outras preparações.

No âmbito geral, as informações científicas sobre os efeitos farmacológicos do ABIS no sistema gastrointestinal ainda são escassas, embora já tenha sido relatado o efeito gastroprotetor desse sesquiterpeno (TORRADO et al, 1995; MOURA-ROCHA et al, 2010). Isso permite concluir que essa substância pode ser considerada potencialmente interessante para estudos farmacológicos que envolvam o comportamento motor do músculo liso em disfunções gastrintestinais e urinárias. Corroborando essa idéia, foi demonstrado que a preparação fitoterápica STW5, que possui a camomila como ingrediente, possui propriedades aceleradoras do esvaziamento gástrico que são úteis no tratamento de pacientes com dispepsia funcional secundária à dismotilidade (RÖSCH et al, 2002; SCHEMANN et al, 2006).

Conforme foi destacado, o ABIS exibiu, na maioria dos tecidos estudados, maior potência farmacológica em reverter a pré-contração induzida pelo acoplamento eletromecânico em comparação com o farmacomecânico. Nesse sentido foram realizados experimentos com a construção de curvas concentração-efeito para o KCl e para agonistas farmacológicos como carbacol e fenilefrina em preparações isoladas de traquéia e aorta. Mais uma vez, o ABIS apresentou efeitos inibitórios mais significativos para as curvas obtidas com o KCl em relação às obtidas com agonistas farmacológicos em ambas as preparações isoladas. Analisados em conjunto, esses

resultados reforçam a hipótese da ocorrência de ação inibitória preferencial do ABIS sobre o influxo transmembrana de Ca^{2+} por canais operados por voltagem.

Alguns experimentos foram realizados em preparações isoladas de traquéia para corroborar a hipótese que esse álcool sesquiterpênico pode agir como inibidor de canais para cálcio operados por voltagem. Em meio sem cálcio, anéis de traquéia expostos ao carbacol e ao verapamil (um bloqueador de canais de Ca^{2+} operados por voltagem) apresentaram resposta contrátil de forma dependente de concentração quando o cálcio foi adicionado cumulativamente ao meio extracelular. Em tais condições experimentais, não se espera recrutamento efetivo de canais de cálcio operados por voltagem (UNNO et al, 1996), mesmo assim, uma alta concentração do bloqueador de canal de cálcio voltagem-dependente foi usada para garantir que a participação desse tipo de canal fosse mínima. Como o desenvolvimento de força contrátil não foi significativamente alterado pelo pré-tratamento com o ABIS, é razoável concluir que, em preparações de traquéia de rato, esse álcool sesquiterpênico exibe limitada capacidade de inibição sobre a contração induzida pelo influxo transmembrana de cálcio através de canais operados por receptores insensíveis ao verapamil (SOMLYO & SOMLYO, 1994). Esses resultados foram claramente distintos dos observados quando as preparações de traquéia foram expostas a um estímulo contrátil puramente eletromecânico induzido por uma solução despolarizante rica em KCl. Nessa condição, o pré-tratamento com ABIS aboliu a contração até mesmo nas maiores concentração de Ca^{2+} adicionadas. Essa conclusão pode ser assumida também com base nos resultados obtidos nas mesmas condições experimentais em preparações de anéis isolados de aorta. Além disso, é interessante observar que o primeiro efeito significativo da contração induzida pela adição de cálcio em presença de ABIS ocorreu nas maiores concentrações de CaCl_2 em preparações isoladas de aorta e traquéia mantidas em meio com agonistas farmacomecânicos, em

comparação com as preparações despolarizadas com KCl. Entretanto, tais conclusões não se aplicam ao tecido duodenal, visto que a eficácia do ABIS foi semelhante para os dois tipos de estímulos contráteis.

Para confirmar essa hipótese, outra série de experimentos foi executada, permitindo que os anéis de traquéia fossem mantidos em meio contendo bário em substituição ao cálcio. Tal substituição baseou-se no fato que o bário é pouco permeável por canais operados por receptor, embora esse íon possa fluir livremente através de canais operados por voltagem (CUTHBERT et al, 1994). Para produzir abertura completa dos canais operados por voltagem, as preparações foram estimuladas com elevadas concentrações de KCl. A contração máxima induzida pela via dependente de voltagem foi obtida pelo aumento da concentração de KCl até 150 mM, nível em que não foi observado incremento na resposta contrátil. Por outro lado, a adição de carbacol na fase estável da contração induzida pela máxima concentração de KCl induziu contração adicional sustentada em preparações em meio contendo Ca^{2+} , enquanto que nas preparações em presença de bário, a adição de carbacol no platô da contração induzida por K^+ produziu apenas contração transitória que retornou ao nível contrátil observado com 150 mM de KCl. Esses achados indicam que os receptores muscarínicos recrutam outras vias para induzir o influxo de Ca^{2+} (CUTHBERT et al, 1994). É interessante destacar que a adição do ABIS após a estabilização da contração combinada de KCl e carbacol relaxou completamente apenas as preparações mantidas em presença de bário, reforçando a hipótese que o álcool sesquiterpênico age seletivamente no acoplamento eletromecânico de preparações isoladas de traquéia.

Nesse sentido, os resultados obtidos em preparações de aorta mantidas em meio sem cálcio e com a construção de uma curva concentração-efeito para o bário nos mostram que, nesse tecido, o ABIS parece também atuar por mecanismo semelhante.

Embora os protocolos não tenham sido os mesmos dos descritos acima para a combinação entre carbacol e K^+ em traquéia, a construção de curva concentração-efeito para o bário em tecido traqueal revelou efeito inibitório de magnitude comparável ao observado na aorta.

No presente estudo foi investigado também o mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do ABIS em preparações isoladas de aorta. Foi visto que a resposta inibitória do ABIS sobre a pré-contracção induzida por fenilefrina não foi alterada de maneira significativa pela retirada do endotélio. Além disso, o efeito vasodilatador promovido pela adição cumulativa do ABIS não foi modificado nas preparações isoladas de aorta com endotélio intacto pré-tratadas com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME), com o inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ), ou com o anti-inflamatório (indometacina), indicando que as ações do sesquiterpeno independem da liberação de óxido nítrico ou de prostaglandinas. O efeito relaxante do (-)-ABIS também não se deve à via de produção do AMPc, visto que a pré-incubação do inibidor da proteína quinase A, KT-5720, não interferiu na sua ação vasodilatadora, embora esse resultado deva ser analisado com cautela visto que alguns estudos questionam a eficácia desse inibidor em preparações intactas.

Também é possível inferir que a ativação de canais para K^+ não explica o efeito vasodilatador do (-)-ABIS, visto que o pré-tratamento dos anéis de aorta com TEA ou glibenclamida não interferiu com a resposta do ABIS sobre a pré-contracção da fenilefrina. Por outro lado, em anéis de aorta pré-tratados com o inibidor da enzima fosfodiesterase 5 (PDE 5), sildenafil, o efeito vasodilatador do ABIS foi ligeiramente atenuado, mas de maneira significativa. De fato, a comparação da potência farmacológica para o efeito vasodilatador do ABIS nessas condições apontou para um valor de CI_{50} significativamente maior no grupo das preparações isoladas de aorta

mantidas em presença do sildenafil. Esses resultados levantam a possibilidade que ABIS possa exercer parte dos seus efeitos relaxantes vasculares através de mecanismos celulares que envolvam a participação da enzima fosfodiesterase, fato que novamente ressalta a importância limitada dos resultados negativos obtidos com o KT-5720. Contudo serão necessários mais estudos empregando inibidores de outras isoformas da enzima PDE, bem como da avaliação da produção de nucleotídeos cíclicos para esclarecer melhor esse efeito do ABIS.

Em outra série experimental foi observado o efeito da adição do ABIS sobre a contração induzida pelo éster de forbol (PDB). Sabe-se que essa substância é capaz de ativar a proteína quinase C (PKC) e aumentar a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio. Tal efeito pode ser corroborado a partir experimentos funcionais de contratilidade, uma vez que os anéis tratados com o PDB contraíram de forma sustentada mesmo quando mantidos em meio sem cálcio. Uma vez que o ABIS foi capaz de reverter essa contração cálcio-independente, podemos concluir que esse álcool sesquiterpênico pode interferir em uma etapa do processo contrátil mediada intracelularmente. Entretanto, deve ser ressaltado que a CI_{50} para esse efeito foi significativamente mais alta do que a observada para outros efeitos inibitórios do ABIS, indicando que essa ação ocorre de forma mais inespecífica do que, por exemplo, para as vias eletromecânicas.

Foi analisada também a influência do ABIS na liberação de cálcio dos estoques intracelulares. O ABIS foi incapaz de inibir os eventos contráteis mediados pela ativação da liberação de Ca^{2+} dos seus estoques localizados no retículo sarcoplasmático mediado por IP_3 , conforme demonstrado nos experimentos em que as preparações vasculares foram mantidas em meio sem cálcio e foram estimuladas com o agonista alfa-1 fenilefrina. Tal ineficácia do ABIS foi evidente mesmo em concentrações

suficientes para inibir significativamente as respostas do tecido vascular pré-contraído. Contudo, o ABIS interferiu com as respostas mediadas pela adição da cafeína, agente que libera cálcio por vias relacionadas ao mecanismo chamado de liberação de cálcio induzida pelo próprio cálcio, envolvendo a participação de receptores para rianodina situados no retículo sarcoplasmático. Em preparações de aorta pré-incubadas com a maior concentração do ABIS avaliada nessa série experimental, a contração fásica induzida pela adição de cafeína em meio sem cálcio foi aumentada significativamente em comparação com o grupo controle. Sabe-se que essa contração fásica induzida pela cafeína está relacionada à mobilização do cálcio do estoque intra-reticular. Entretanto, a mesma concentração do ABIS que aumentou a contração fásica da cafeína também induziu relaxamento do músculo liso vascular em preparações de aorta pré-contraídas. É possível que ambos os efeitos anteriormente citados possam ocorrer simultaneamente, com predominância do efeito inibitório do ABIS sobre a contração do músculo liso vascular.

Embora o ABIS tenha sido capaz de inibir as contrações provocadas pelo influxo transmembrana de cálcio por vias dependentes de voltagem, ele não interferiu com a contração decorrente da ativação das vias de entrada de cálcio controladas pelos estoques intracelulares (Putney, 1996). Essas vias são mediadas por proteínas coletivamente chamadas de canais operados por estoque, e são ativadas pelo tratamento do tecido com agentes farmacológicos como o ácido ciclopiazônico. Mesmo em meio sem cálcio, a presença de inibidores da bomba SERCA do retículo sarcoplasmático enviam mensagens ainda não totalmente esclarecidas para que o sarcolema abra canais catiônicos que permitem um novo preenchimento dos estoques intracelulares de cálcio. Como o ABIS não interferiu nessa resposta, isso reforça a conclusão que suas ações

inibitórias podem ocorrer preferencialmente para os mecanismos de influxo de cálcio ativados por voltagem.

A hipótese que o ABIS é uma substância interessante em modelos experimentais que envolvem disfunção do músculo liso é reforçada pelos achados de animais submetidos a condições inflamatórias após desafio antigênico induzido pela ovalbumina ou pelo tratamento com o agente alquilante ifosfamida. Sabe-se que o desafio antigênico é capaz de induzir hiperresponsividade de vias aéreas associada à hipercontratilidade em indivíduos asmáticos (CHINEN & SHEARER, 2004). Também já está bem estabelecido que o tratamento com o quimioterápico ifosfamida altera a contratilidade do músculo liso urinário, induzindo nesse caso um efeito detrimental de hipocontratilidade (MACEDO et al, 2011). Nas condições experimentais do presente trabalho, o pré-tratamento com ABIS reduziu o fenótipo de hiperresponsividade de vias aéreas em animais desafiados. Também reduziu o efeito contrátil da ovalbumina provocado pela reação de Schultz-Dale tanto em tecido traqueal como em tecido duodenal de animais previamente sensibilizados ao antígeno. Contudo, o mesmo pré-tratamento não recuperou a função contrátil de preparações isoladas de bexiga urinária de animais tratados com ifosfamida. No entanto, tem sido mostrado que o ABIS atenua a nocicepção visceral em modelo de cistite induzida por ciclofosfamida (LEITE et al, 2011).

Os efeitos do ABIS sobre o comportamento contrátil relacionado à atividade espontânea de algumas preparações como bexiga urinária, fundo de estômago, duodeno e cólon foi avaliado. As maiores concentrações do ABIS foram capazes de abolir a amplitude das contrações espontâneas em preparações duodenais, mas não alterou significativamente a amplitude observada em preparações de fundo de estômago e cólon. Em preparações isoladas de bexiga urinária o ABIS exibiu efeitos bifásicos, com

aumento da amplitude das contrações espontâneas na faixa de concentração de 30 a 100 μM , seguida de diminuição de amplitude nas maiores concentrações. Entretanto, deve ser destacado que o ABIS não alterou a frequência das contrações espontâneas, indicando que os efeitos induzidos por esse sesquiterpeno são provavelmente de natureza miogênica, agindo preferencialmente em mecanismos relacionados à geração de força no músculo liso, não exercendo efeitos em eventos marca-passo. Esse efeito miogênico pode ser reforçado pelos achados obtidos pelas propriedades relaxantes do ABIS em preparações de músculo liso despolarizadas com alta concentração de K^+ , uma condição experimental que inativa canais rápidos de Na^+ (CATTERALL et al, 2000; MEEKS & MENNERICK, 2004), excluindo um possível papel de neurônios intramurais nos efeitos inibitórios do ABIS.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- O ABIS exerce efeitos diferenciados na tensão e na atividade espontânea em preparações isoladas de músculo liso mantidas sem estímulo contrátil;
- Em preparações submetidas a estímulos contráteis os efeitos do ABIS são essencialmente inibitórios;
- Os efeitos inibitórios do ABIS são observados preferencialmente em preparações submetidas a estímulos contráteis eletromecânicos;
- Mecanismos celulares associados à inibição da enzima fosfodiesterase podem estar envolvidos no efeito vasodilatador do ABIS;
- O ABIS é capaz de interferir com a mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático sensível à cafeína;
- O ABIS exerce efeitos diferenciados em modelos experimentais de disfunção contrátil do músculo liso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. (18) 3, p. 472-508, 2008.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -dependent regulation of vascular tone. **J Anesth**. 21, p. 220-231, 2007.

ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. S. V.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; SILVA, D. F.; MACEDO-COSTA, M. R.; HIGINO, J. S. Efeito antiaderente do extrato de da *Matricaria recutita* Linn. Sobre microorganismos do biofilme dental. **Rev Odontol UNESP**. (39)1, p. 21-25, 2010.

ALVES, H. M.A.; GONÇALVES, J. C. R.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M. Evaluation of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neuroscience Letters**, 2010.

ANGUS, J. A.; WRIGHT, C. E. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 44, p. 395-407, 2000.

ANTER, J.; JIMÉNEZ, M. R.; BEDMAR, Z. F.; PULIDO, M. V.; ANALLA, M.; MORAGA, A. A.; SERRANO, A. M. Antigenotoxicity, Cytotoxicity, and Apoptosis Induction by Apigenin, Bisabolol, and Protocatechuic Acid. **J Med Food**. 14 (0), p. 1-8, 2011.

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

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**. 228, p. 1154-1160, 1985.

BARANY, M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction. San Diego, CA: Academic, 1996.

BASTOS, V. P.; BRITO, T. S.; LIMA, F. J.; PINHO, J. P.; LAHLOU, S.; ABREU MATOS, F. J.; SANTOS, A. A.; MAGALHÃES, P. J. Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 36 (11), p. 1120-6, 2009.

BATHIA, S. P.; Mc GINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on alpha-bisabolol. **Food and Chemical Toxicology**. 46, p. 72-75, 2008.

BERNE & LEVY. Fisiologia. 6.ed. Elsevier, 2009.

BERRY, M. Herbal products. Part 6. Chamomiles. **Pharmaceutical Journal**. 254, p. 191-193, 1995.

BEZERRA, S. B.; LEAL, L. K. A. M.; PINTO, N. A. N.; CAMPOS, A. R. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and K^+_{ATP} channels. **J Med Food**. 12 (6), p. 1403–1406, 2009.

BLUMENTHAL, M. The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council, 1998.

BORSATO, A. V.; DONI-FILHO, L.; CÔCCO, L. C.; PAGLIA, E. C. Rendimento e composição química do óleo essencial de Chamomilla recutita (L.) Rauschert seca em camada fixa a 60°C. **Rev Bras Pl Med**. v.10, n.4, p. 29-36, 2008.

BUDAVARI, S. Editor, The Merck Index (twelfth ed.), Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., p. 208–209, 1996.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines phytotherapeutic agents. **Braz J Med Biol Res**. 33. p. 179-189, 2000.

CAVALIERI, E.; MARIOTTO, S.; FABRIZI, C.; CARCERERI, A.; GOTTARDO, R.; LEONE, S.; BERRA, L. V.; LAURO, G. M.; CIAMPA, A. R.; SUZUKI, H. α -bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 315, p. 589-594, 2004.

CAVALIERI, E.; BERGAMINI, C.; MARIOTTO, S.; LEONI, S.; PERBELLINI, L.; DARRA, E.; SUZUKI, H.; FATO, R.; LENA Z, G. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. **FEBS Journal**. 276, p. 3990-4000, 2009.

CEMEK, M.; KAGA, S.; SIMSEK, N.; BUYUKOKUROGLU, M. E.; KONUK, M. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nat Med**. 62, p. 284–293, 2008.

CHEN, W.; HOU, J.; YIN, Y.; JANG, J.; ZHENG, Z.; FAN, H.; ZOU, G. α -bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a Fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NF κ B. **Biochemical Pharmacology**. 80, p. 247–254, 2010.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Advances in Asthma, Allergy and Immunology Series: Basic and clinical immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 114, p. 398–405, 2004.

CHRISTENSEN K. L.; MULVANY, M. J. Location of resistance arteries. **J Vasc Res**. 38(1). p. 1-12, 2001.

CIR. Cosmetic ingredient review. Final report on the safety assessment of bisabolol. **International Journal of Toxicology**. 18, p. 33–40, 1999.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**. v.12, p. 189–194, 1998.

CRANKSHAW, D. J. Pharmacological techniques for the in vitro study of the uterus. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 45, p. 123–140, 2001.

CRAVEIRO, A. A., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extractions. **J Chem Educ**. 53, p. 652, 1976-a.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Estudo de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. **Cienc Cult**. 28, p. 180, 1976-b.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc Cult**. 29, p. 445, 1977.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B, Grissem W, Jones R (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318, 2000.

CUNHA, P. A. Aspectos históricos sobre plantas medicinais seus constituintes ativos e fitoterapia. **www.antoniopcunha.com.br**, 2004.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **Am J Physiol.** 266, p. 620-627, 1994.

DANIEL, E. E.; KWAN, C.Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.** 45, p. 141– 158, 2001.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIMB, S.; MANARA, A.; SHOJI, K.; MARÉCHAL, J. D.; MARIOTTO, S.; CAVALIERI, E.; PERBELLINI, L.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 476, p. 113-123, 2008.

DE SIQUEIRA, R. J. B.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sciences.* 20, p. 15-22, 2005.

DE SOUZA, A. T.; BENAZZI, T. L.; GRINGS, M. B.; CABRAL, V.; DA SILVA, E. A.; CARDOZO-FILHO, L.; ANTUNES, O. A. C (2008) Supercritical extraction process and phase equilibrium of Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil using supercritical carbon dioxide. **J Supercrit Fluids.** 47, p. 182–187, 2008.

DETONI, C. B.; OLIVEIRA, D. M.; SANTO, I. E.; PEDRO, A. S.; EL-BACHA R.; SILVA, V. E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B.; MAGALHÃES, C. E. C. Evaluation of thermal-oxidative stability and antiglioma activity of Zanthoxylum tingoassuiba essential oil entrapped into multi- and unilamellar liposomes. **J Liposome Res.** 6, 2011.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Rev Bras Pl Med (Botucatu)*. 6, p. 11-14, 2004.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytother Res.** 21, p. 308–323, 2007.

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 polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology.** 109, p. 515–522, 2007.

FEDAN, J. S.; VAN SCOTT, M. R.; JOHNSTON, R. A. Pharmacological techniques for the in vitro study of airways. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.** 45, p. 159–174, 2001.

GARDINER, P. Chamomile (*Matricaria recutita*, *Anthemis nobilis*). Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology.** v.3, n.7, p. 408-414, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUPTA, V.; MITTAL, P.; BANSAL, P.; KHOKRA, S. L.; KAUSHIK, D. Pharmacological potential of *Matricaria recutita* – A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**. 2 (1), p. 12-16, 2010.

HASHIMOTO, T.; HIRATA, M.; ITOH, T.; KANMURA, Y.; KURIYAMA, H. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. **J Physiol**. 370, p. 605-18, 1986.

HABERSANG, S.; LEUSCHNER, F.; ISAAC, O.; THIEMER, K. Pharmakologische Untersuchungen zur Toxizität des (-)- α -Bisabolols. **Planta Medica**. 37, p. 115–123, 1979.

HOLUB, M.; HEROUT, V.; SORM, F. Synthesis of α -bisabolol - a spasmolytically active sesquiterpenic alcohol. **Cesk Farm**. 4 (3). p. 129-131, 1955.

ISAAC, O.; THIEMER, K. Biochemical studies on chamomile components: in vitro studies about the antipeptic activity of (-)- α -bisabolol. **Arzneimittelforschung**. 25, p. 1352–1354, 1975.

JAKOVLEV, V.; VON SCHLICHTEGROLL, A. On the inflammation inhibitory effect of (-)-alpha-bisabolol, an essential component of chamomilla oil. **Arzneimittelforschung**. 19, p. 615–616, 1969.

JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K.; KUNDE, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. **Planta Med.** 35, p. 125–140, 1979.

JARRAHI, M.; VAFAEI, A. A.; TAHERIAN, A. A.; MILADI, H.; RASHIDI, P. A. Evaluation of topical *Matricaria chamomilla* extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. **Nat Prod Res.** 22 (14), p. 1197-1202, 2008.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; KENAWY, S. A.; SEIF-EL-NASR, M.; MAHRAN, L. G.; KAFABI, Y. A.; OKPANYI, S. N. Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination. **Arzneimittelforschung**. 51, p. 545-53, 2001.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **J Am Oil Chem Soc.** 87. p. 1-7, 2010.

KATO, A.; MINOSHIMA, Y.; YAMAMOTO, J.; ADACHI, I.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. **J Agric Food Chem.** 56 (17), p. 8206-11, 2008.

KEELING, C. I.; BOHLMANN, J. Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytol.** 170, p. 657-675, 2006.

KESSLER, A.; BALDWIN, T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emission in nature. **Science.** 291: 2141-2144, 2001.

KIM, S.; JUNG, E.; KIM, J. H.; PARK, Y. H.; LEE, J.; PARK, D. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology.** In press, 2011.

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2.ed. Rio de Janeiro, Record, 1993.

LEITE, G. O.; PENHA, A. R.; FERNANDES, C. N.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. Gastroprotective mechanism of *Vanillosmopsis arborea* bark essential oil. **Fitoterapia.** 80, p. 77-80, 2009.

LEITE, G. O.; LEITE, L. H.; SAMPAIO, R. S.; ARARUNA, M. K.; MENEZES, I. R.; COSTA, J. G.; CAMPOS, A. R. (-)- α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. **Fitoterapia.** 82 (2), p. 208-11, 2010.

LONGHURST, P. A.; UVELIUS, B. Pharmacological techniques for the in vitro study of the urinary bladder. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** 45, p. 91– 108, 2001.

MACEDO, F. Y.; MOURÃO, L. T.; PALHETA, R. C.; JUCÁ, D. M.; LIMA, R.C.; NETO, J. S.; MAGALHÃES, P. J.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 67, p. 935-943, 2011.

MADAY, E.; SZOKE, E.; MUSKATH, Z.; LEMBERKOVICS, E. A study of the production of essential oils in chamomile hairy root cultures. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**. 24, p. 303-8, 1999.

MADHAVAN, B. N. Final report on the safety assessment of bisabolol. **Int J Toxicol** 18, p. 33–40, 1999.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology**. v.3, n.7, p. 396-407, 2007.

MANN, C.; STABA, E. The chemistry, pharmacology, and commercial formulations of chamomile. **Herbs, spices and medicinal plants**. 1, p. 235-280, 1986.

MARTENS, D. Chamomile: The Herb and the Remedy. **The Journal of the Chiropractic Academy of Homeopathy**. 6, p. 15-18, 1995.

MARTINS, M. D.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; MARTINS, M. A. T.; PAVESI, V. C. S.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; FERNANDES, K. P. S.

Comparative analysis between *Chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. **Phytotherapy Research**. 23 (2): p. 274-8, 2009.

MASCHI, O.; CERO, E. D.; GALLI, G. V.; CARUSO, D.; BOSISIO, E.; AGLI, M. D. Inhibition of human cAMP-phosphodiesterase as a mechanism of the spasmolytic effect of *Matricaria recutita* L. **J Agric Food Chem**. 56, p. 5015–5020, 2008.

MATOS, M. J. A.; FERNANDES, A. Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste. Convênio BNB-CNPq-UFC, 1975-1978.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. Farmacologia – Curso teórico-prático. Fortaleza, Edições UFC, 1989.

McKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**. 20, p. 519–530, 2006.

MENEZES, I. A.; BARRETO, C. M.; ANTONIOLLI A. R.; SANTOS, M. R.; DE SOUSA, D. P. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Z Naturforsch C**. 65 (9-10), p. 562-6, 2010.

MILLER, T.; WITTSTOCK, U.; LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E. Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells. **Planta Med**. 62 (1), p. 60-1, 1996.

MONTANARI, I. Plantas medicinais. Campinas-SP-Brasil. www.cpqba.unicamp.br, 2002.

MORALES-YUSTE, M.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; VALERO-LÓPEZ, A.; NAVARRO-MOLL, M. C. Activity of (-)-alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. **Phytomedicine**. In press. 2009.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*. 41, p. 19-26, 1977.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. London: Pharmaceutical Press. 296, 1996.

ORALLO, F. Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. **Pharmacol Ther**. 69, p. 153-171, 1996.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp**. 55, p. 315-327, 2007.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 25, p. 45-61, 2002.

PUTNEY, J. W. Capacitative calcium-entry revisited. *Cell Calcium*. 11, p. 611-634, 1990.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F. C.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **The Journal of Urology**. 167, p. 2229–2234, 2002.

ROCHA, M. N. F.; VENÂNCIO, E. T.; MOURA, B. A.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; RIOS, E. R. V.; SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F. Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. **Fundam Clin Pharmacol**. 24 (1), p. 63-71, 2010.

ROCHA, N. F.; RIOS, E. R.; CARVALHO, A. M.; CERQUEIRA, G. S.; LOPES, A. D.; LEAL, L. K.; DIAS, M. L.; SOUSA, D. P.; SOUSA, F. C. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. Epub ahead of print, 2011.

ROHDICH, F.; KIS, K.; BACHER, A.; EISENREICH, W. The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. **Curr Opin Chem Biol**. 5, p. 535–540, 2001.

RÖSCH, W.; VINSON, B.; SASSIN, I. A randomised clinical trial comparing the efficacy of a herbal preparation STW 5 with the prokinetic drug cisapride in patients with dysmotility type of functional dyspepsia, **Z Gastroenterol.** 40, p. 401–408 2002.

RUZICKA, L. Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia.** 9, p. 357–367, 1953.

SALAMON, I. Production of Chamomile, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, in **Slovakia. Journal of Herbs, Spices, & Medicinal Plants.** 1, p. 37-45, 1992.

SCHEMANN, M; MICHEL, K; ZELLER, F; HOHENESTER, B; RÜHL, A. Region-specific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. **Phytomedicine.** 13, Suppl 5, p. 90-9, 2006.

SEKI, T.; KOKURYO, T.; YOKOYAMA, Y.; SUZUKI, H.; ITATSU, K.; NAKAGAWA, A.; MIZUTANI, T.; MIYAKE, T.; UNO, M.; YAMAUCHI, K.; NAGINO, M. Antitumor effects of alpha-bisabolol against pancreatic cancer. **Cancer Science.** Epub ahead of print, 2011.

SOARES, P. M.; LIMA, R. F.; DE FREITAS, P. A.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M.; CRIDDLE, D. N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. **Life Sci.** 81 (13), p. 1085-1093, 2007.

SOMLYO, AP; SOMLYO AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**. 372 (6503), p. 231-6, 1994.

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. 134, p. 201–234, 1999.

SOUSA, O. V.; OLIVEIRA, M. S.; RABELLO, S. V.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; LEITE, M. N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. – Asteraceae. **Rev Bras Farmacog**. 13, p. 50–53, 2003.

SUEMATSU, E.; HIRATA, M.; HASHIMOTO, T.; KURIYAMA, H. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. **Biochem Biophys Res Commun**. 120 (2), p. 481-485, 1984.

TORRADO, S.; TORRADO, S.; AGIS, A.; JIMENEZ, M. E.; CADÓRNIGA, R. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. **Pharmazie**. 50 (2), p. 141-3, 1995.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. 29, p. 326-337, 2006.

VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; KAMATOU, G. P. P.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The essential oil composition and chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its allies *S. repens* and *S. runcinata*. **J Essent Oil Res**. 18, p. 37–45, 2006.

VILA, R.; SANTANA, A. I.; ROSÉS, R. P.; VALDERRAMA, A.; CASTELLI, M. V.; MENDONÇA, S.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M. P.; CANIGUERAL, S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. **Bioresource Technology**. 2009.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. 3 (1), p. 1-7, 2008.

WALLACH, O. Zur kenntnis der terpene und ätherische öle, vierte abhandlung. **Liebigs An Chem**. 238, p. 78-88, 1887.

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