

## Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda)

Hilzeth L.F. Pessôa<sup>1,2\*</sup>, Rita C.M. Oliveira<sup>1,3</sup>, Joelmir L.V. Silva<sup>1</sup>, Rosimeire F. Santos<sup>1</sup>; José C. Duarte<sup>1</sup>, Maria J.C. Costa<sup>4</sup>, Bagnólia A. Silva<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil,

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Departamento de Biofísica e Fisiologia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Teresina, PI, Brasil,

<sup>4</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil,

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, João Pessoa, PB, Brasil,

**RESUMO:** *Pomacea* sp. e sua desova têm uso popular para tratar diarreia e doenças respiratórias. Este trabalho objetivou avaliar a toxicidade aguda e os efeitos citotóxico e espasmolítico dos líofilos de *Pomacea lineata* e de sua desova. Os líofilos não apresentaram toxicidade aguda (até 2 g/kg v.o.) ou efeito citotóxico (até 1 mg/mL). *P. lineata* relaxou a traquéia pré-contraída com CCh na presença ( $E_{max} = 48,8 \pm 6,4\%$ ) e na ausência ( $E_{max} = 47,3 \pm 9,1\%$ ) de epitélio, já a desova relaxou apenas na presença ( $E_{max} = 36,3 \pm 2,5\%$ ) de epitélio. Os líofilos foram ineficazes sobre o tônus espontâneo da traquéia. *P. lineata* foi mais potente em inibir as contrações do íleo induzidas por ACh ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ) que por hist. ( $\log CI_{50} = 2,7 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ). A desova inibiu igualmente as contrações induzidas por ACh ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ) e hist. ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ). *P. lineata* foi mais potente em relaxar o íleo pré-contraído com ACh ( $\log CE_{50} = 1,7 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ ) do que com KCl ( $\log CE_{50} = 2,4 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ) ou hist. ( $\log CE_{50} = 2,2 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ ). A desova relaxou equipotentemente o íleo pré-contraído com KCl ( $\log CE_{50} = 2,3 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ ), ACh ( $\log CE_{50} = 1,9 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$ ) ou hist. ( $\log CE_{50} = 2,2 \pm 0,16 \mu\text{g/mL}$ ), sugerindo um bloqueio dos  $Ca_v$ . *P. lineata* e sua desova apresentam efeito espasmolítico justificando a sua utilização no tratamento de diarreia e de doenças respiratórias.

**Unitermos:** *Pomacea lineata*, toxicidade aguda, efeito citotóxico, efeito espasmolítico.

**ABSTRACT:** “Evaluation of the acute toxicity, cytotoxic and spasmolytic effects of *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda)”. *Pomacea* sp. and its eggs are used against diarrhea and respiratory diseases in folk medicine. The aim of this study was to investigate acute toxicity, cytotoxic and spasmolytic activity of lyophilized *Pomacea lineata* and its eggs. *P. lineata* and its eggs present no acute toxicity (until 2 g/kg p.o.) or cytotoxic effect (until 1 mg/mL). *P. lineata* and its eggs have no effect on guinea-pig trachea spontaneous tonus. *P. lineata* relaxed trachea pre-contracted with CCh in the presence ( $E_{max} = 48.8 \pm 6.4\%$ ) and absence ( $E_{max} = 47.3 \pm 9.1\%$ ) of epithelium, the eggs relaxed only in the presence ( $E_{max} = 36.3 \pm 2.5\%$ ) *P. lineata* was more potent to inhibit contractions induced by ACh ( $\log IC_{50} = 2.5 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ ) than histamine ( $\log IC_{50} = 2.7 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ ). The eggs inhibited contractions induced by ACh ( $\log IC_{50} = 2.5 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ) and histamine ( $\log IC_{50} = 2.5 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ) in a non-selective manner. *P. lineata* was more potent in relax ileum pre-contracted with ACh ( $\log EC_{50} = 1.7 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) than KCl ( $\log EC_{50} = 2.4 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ ) or histamine ( $\log EC_{50} = 2.2 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ ). The eggs were equipotent in relax ileum pre-contracted with of KCl ( $\log EC_{50} = 2.3 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ ), ACh ( $\log EC_{50} = 1.9 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$ ) or histamine ( $\log EC_{50} = 2.2 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$ ), that is suggestive of the blockade of the voltage-operated calcium channels. Collectively, the results validate folk use of *P. lineata* and its eggs to treat diarrhea and respiratory diseases.

**Keywords:** *Pomacea lineata*, acute toxicity, cytotoxic effect, spasmolytic effect

### INTRODUÇÃO

No Brasil as espécies de moluscos do gênero

*Pomacea* apresentam distribuição setentrional e litorânea, sendo encontradas em habitats dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do país (Thiengo, 1995). No

estado da Paraíba, a espécie *Pomacea lineata* é encontrada em corpos d'água permanentes (Batalla, 1992). Durante a época de estiagem estes moluscos se enterram no solo e sobrevivem graças a sua capacidade de estivação (Lum-Kong; Kenny, 1989).

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, as espécies do gênero *Pomacea* são utilizadas como fonte de alimento e tanto o molusco quanto a sua desova são empregados na cura de doenças do "peito", tais como tosse, asma e tuberculose (Mesquita, 1982). Na Argentina, a desova é utilizada na cura de disenteria (Santos, 1982). A partir dessas premissas o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, a atividade hemolítica e o efeito espasmolítico do molusco *Pomacea lineata* e da sua desova.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (230-250 g), camundongos Swiss albinos, machos e fêmeas (20-30 g) e cobaias de ambos os sexos (350-500 g) provenientes do Biotério Thomas George do LTF/UFPB. Os animais eram alimentados com ração tipo "pellets" (Purina), com livre acesso à água, com ventilação e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (Certidão nº 0510/05).

### Soluções fisiológicas

Para os experimentos com traquéia de cobaia foi utilizada a solução de Krebs (mM): NaCl (118,0), NaHCO<sub>3</sub> (25,0), KCl (4,6), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5,7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,1), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (2,5) e glicose (11,0), e para os experimentos com íleo de cobaia solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994) (mM): NaCl (117,0), NaHCO<sub>3</sub> (25,0), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1,3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1,2), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (2,5) e glicose (11,0), ambas foram ajustadas para pH 7,4 e aeradas com carbogênio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

### Aparelhos

As amostras de *P. lineata* e da sua desova foram liofilizadas em um liofilizador (Edwards - Brasil) por 72 h. Os eritrócitos de rato foram centrifugados em uma centrífuga (FANEM 206 - Brasil). A hemólise foi quantificada em espectrofotômetro (BECKMAN DU 640 - EUA). As contrações isométricas foram monitoradas por transdutores de força (7003 UGO BASILE- Itália) acoplados a um polígrafo (GEMINI 7070 - UGO BASILE - Itália). As contrações isotônicas foram registradas em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF - Brasil). Os valores de pH foram verificados em um pHmetro digital (PG 2000 GEHAKA, Brasil).

### Preparação dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova

Os exemplares de *P. lineata* e suas desovas foram coletados no rio Jaguaribe em uma área do Jardim Botânico Benjamim Maranhão - João Pessoa, Paraíba, Brasil (W34 52'14"-W34 51'01"), liofilizados e mantidos à -20 °C. Os líofilos de *P. lineata* e de sua desova foram solubilizados em cremofor (3 %) e dissolvidos em água destilada (10 mg/mL).

### Determinação da toxicidade aguda e efeitos gerais dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova em camundongos

Dois grupos de 6 machos e 6 fêmeas de camundongos receberam uma dose de 2 g/kg v.o. (Resolução-RE Nº 90, de 16/03/2004 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde (MS), Brasil) de *P. lineata* e de sua desova, e foram feitas observações para a avaliação da atividade autônoma, atividade motora e reflexos a cada 30 min., durante 4 h consecutivas. A ocorrência de morte em cada grupo foi verificada após 24, 48 e 72 h e a DL<sub>50</sub> determinada segundo Litchfield e Wilcoxon (1949).

### Avaliação do efeito citotóxico: atividade hemolítica de *P. lineata* e de sua desova em eritrócitos isolados de rato

Os eritrócitos sedimentados foram ressuspensos em 0,5 mL de solução de Krebs. Os líofilos de *P. lineata* e de sua desova foram adicionados, em preparações diferentes nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, e incubados à temperatura ambiente por 1 h, sob agitação constante. Após este tempo, as suspensões foram centrifugadas a 5000 rpm por 3 min. e a ocorrência de hemólise foi quantificada em espectrofotômetro a 540 nm de acordo com Rangel et al., 1997.

### Efeito dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova sobre o tônus espontâneo e sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol (CCh) em traquéia isolada de cobaia na presença e na ausência de epitélio funcional

As cobaias eram sacrificadas por deslocamento cervical seguida por secção dos vasos cervicais, o tórax era aberto e a traquéia retirada. Após a dissecação, segmentos contendo 3-4 anéis de traquéia foram suspensos por hastes de aço inoxidável em cubas de banho para órgãos contendo 6 mL de solução de Krebs, sob tensão de 1 g, à 37 °C e mantidos em repouso por 1 h. Após o período de estabilização do tecido, dois relaxamentos de magnitudes similares eram induzidos com 10<sup>-6</sup> M de isoprenalina e após o retorno da preparação à tensão normal, concentrações crescentes de *P. lineata* ou de sua desova eram adicionadas, à cuba para observar se havia o relaxamento da traquéia no seu tônus basal. O relaxamento

observado foi comparado com o relaxamento máximo obtido na presença de  $10^{-6}$ M de isoprenalina. Para avaliar o efeito dos líofilos sobre o relaxamento da traquéia pré-contráida com CCh, após o período de estabilização foram obtidas duas contrações tônicas de magnitudes similares induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh, e sobre o componente tônico da segunda curva foram adicionadas concentrações crescentes dos líofilos de maneira cumulativa. O epitélio da traquéia era removido mecanicamente e a integridade do mesmo era verificada pela adição de  $10^{-4}$  M de ácido araquidônico à cuba durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, os anéis com relaxamento igual ou superior a 50 % foram considerados com epitélio e os com relaxamento inferior a 10 % foram considerados sem epitélio (Tschirhart et al., 1987). O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh e os valores da concentração de *P. lineata* e de sua desova que produziram uma resposta igual a 50 % do seu efeito máximo ( $CE_{50}$ ) foram obtidos por regressão não linear a partir de cada curva individual de relaxamento desses produtos, obtidas na ausência e na presença de epitélio funcional.

#### **Efeito dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova frente às contrações fásicas induzidas por acetilcolina (ACh) e histamina (hist.) em íleo isolado de cobaia**

Os animais eram mantidos em jejum por 18 h e sacrificados como descrito anteriormente, o abdômen era aberto e o íleo retirado. Após a dissecação, segmentos de 2-3 cm de íleo eram suspensos por fio de algodão em cubas de banho para órgãos contendo 6 mL de solução Krebs modificado, sob tensão de 1 g à 37 °C e mantidos em repouso por 30 min. Após o período de estabilização, eram obtidas duas contrações fásicas de magnitude similares induzidas por  $10^{-6}$ M de ACh ou de hist. e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumado de um quimógrafo. Os líofilos foram adicionados, em várias concentrações e em preparações diferentes. Após 15 minutos de incubação era induzida uma terceira contração na presença do mesmo agonista e os efeitos inibitórios dos líofilos eram avaliados comparando-se a resposta na ausência (controle) e na presença das diversas concentrações dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova.

#### **Efeito dos líofilos de *P. lineata* e de sua desova sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, ACh ou hist. em íleo isolado de cobaia**

Após o período de estabilização descrito no item anterior, foram induzidas duas contrações isométricas por 40 mM de KCl,  $10^{-6}$  M de ACh ou hist., em preparações diferentes e sobre o componente tônico da segunda curva eram adicionadas concentrações crescentes dos líofilos de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como descrito para traquéia.

#### **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student (não-pareado) ou ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni, onde a diferença entre as médias foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Os valores de  $\log CE_{50}$  e  $\log CI_{50}$  (Neubig et al., 2003) foram calculados por regressão não-linear. Todos os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism® versão 3.03.

#### **RESULTADOS**

Os líofilos de *P. lineata* e de sua desova, na dose de 2 g/kg de peso do animal v.o. não induziram mortes nem alterações comportamentais, quando da determinação da toxicidade aguda e efeitos gerais dos mesmos em camundongos; não sendo portanto necessário calcular a  $DL_{50}$  de acordo com a Resolução-RE N° 90, de 16/03/2004 - ANVISA, MS, Brasil.

Os líofilos de *P. lineata* e de sua desova não apresentaram atividade hemolítica até a concentração de 1000  $\mu$ g/mL quando da avaliação do efeito citotóxico através da quantificação da atividade hemolítica dos mesmos em eritrócitos de rato

Os líofilos de *P. lineata* e de sua desova não modificaram o tônus espontâneo da traquéia de cobaia, entretanto, o líofilo de *P. lineata* relaxou de maneira dependente de concentração (9-750  $\mu$ g/mL) a traquéia pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $E_{max} = 48,8 \pm 6,4$  %) e na ausência ( $E_{max} = 47,3 \pm 9,1$  %), de epitélio funcional (Gráfico 1A). O líofilo da desova (9-750  $\mu$ g/mL) relaxou a traquéia pré-contráida com  $10^{-6}$  M de CCh apenas na presença ( $E_{max} = 36,3 \pm 2,5$  %) de epitélio funcional (Gráfico 1B). A responsividade da traquéia ao CCh foi revertida 60 min. após a retirada dos líofilos da cuba.

O líofilo de *P. lineata* inibiu de maneira dependente de concentração (27-750  $\mu$ g/mL) as contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de ACh ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,04$   $\mu$ g/mL) e hist. ( $\log CI_{50} = 2,7 \pm 0,04$   $\mu$ g/mL) (Gráfico 2A e B), sendo mais potente em inibir as contrações induzidas por ACh. O líofilo da desova inibiu de maneira equipotente e dependente de concentração (27-750  $\mu$ g/mL) as contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de ACh ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,02$   $\mu$ g/mL) e hist. ( $\log CI_{50} = 2,5 \pm 0,06$   $\mu$ g/mL) (Gráfico 2C e D). A responsividade do íleo aos agonistas testados foi revertida 30 min. após a retirada de ambos os líofilos da cuba.

O líofilo de *P. lineata* relaxou de maneira dependente de concentração (1 - 750  $\mu$ g/mL) o íleo pré-contráido com 40 mM de KCl ( $\log CE_{50} = 2,4 \pm 0,06$   $\mu$ g/mL),  $10^{-6}$  M de ACh ( $\log CE_{50} = 1,7 \pm 0,12$   $\mu$ g/mL) ou de hist. ( $\log CE_{50} = 2,2 \pm 0,18$   $\mu$ g/mL) (Figura 1A e Gráfico 3A). O líofilo de *P. lineata* foi mais potente em relaxar o íleo pré-contráido com ACh. O tempo médio de

relaxamento foi de 66,1 ± 28,6; 31,0 ± 10,8; e 59,2 ± 10,2 min. para KCl, ACh e hist., respectivamente. Por outro lado, o líofilo da desova relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente (0,3 - 750 µg/mL) o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl ( $\log CE_{50} = 2,3 \pm 0,15$  µg/mL),  $10^{-6}$  M de ACh ( $\log CE_{50} = 1,9 \pm 0,14$  µg/mL), ou de hist. ( $\log CE_{50} = 2,2 \pm 0,16$  µg/mL) (Figura 1B e Gráfico 3B). O tempo médio de relaxamento foi de 90,2 ± 27,1; 57,9 ± 12,0 e 56,7 ± 14,9 min. para KCl, ACh e hist., respectivamente. A responsividade do íleo aos agentes contráteis foi revertida 60 min. após a retirada de ambos os líofilos da cuba.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados, a toxicidade aguda e os efeitos citotóxico e espasmolítico dos líofilos de *Pomacea lineata* e de sua desova sobre os músculos intestinal e respiratório. O dado mais importante deste estudo é a demonstração, pela primeira vez, que *P. lineata* e sua desova apresentam efeito relaxante em traquéia e íleo isolados de cobaia, sem apresentar toxicidade aguda ou efeito citotóxico.

Como *P. lineata* e sua desova são utilizadas na medicina popular com finalidades terapêuticas sem o conhecimento de seu potencial toxicológico procedeu-se a avaliação de sua toxicidade aguda assim como do seu efeito citotóxico. Verificou-se que *P. lineata* e sua desova não apresentam toxicidade aguda, até a dose de 2 g/kg v.o., nem efeito citotóxico, até a concentração de 1 mg/mL, indicando a segurança de seu uso como alimento e em futura indicação terapêutica.

Uma vez que *P. lineata* e sua desova são utilizados na medicina popular para o tratamento de doenças respiratórias decidiu-se investigar os seus efeitos sobre a traquéia de cobaia, músculo das vias aéreas superiores. O epitélio das vias aéreas está envolvido na regulação da reatividade dos brônquios através da liberação de substâncias relaxantes tais como: os produtos da ciclooxigenase (prostaglandina  $E_2$ ), óxido nítrico (Munakata et al., 1990) e fatores relaxantes derivados do epitélio (EpDRF) (Ismailoglu et al., 2004). Sendo assim, investigou-se o efeito de *P. lineata* e de sua desova sobre a traquéia de cobaia pré-contraída com CCh na presença e na ausência de epitélio funcional e observou-se que *P. lineata* induziu relaxamento de maneira independente de epitélio funcional, dependente de concentração e equipotente (Gráfico 1A), o que indica que os EpDRF provavelmente não estão envolvidos neste efeito relaxante. Já a desova, apresentou efeito relaxante dependente de epitélio funcional (Gráfico 1B) sugerindo que os EpDRF podem estar envolvidos neste efeito. O fato de *P. lineata* e de sua desova relaxar a traquéia pré-contraída com CCh pode explicar o seu uso popular no tratamento de doenças respiratórias, como a asma que é caracterizada por broncoconstrição. Interessantemente, verificou-se que os líofilos não apresentaram quaisquer

efeitos sobre o tônus espontâneo da traquéia, o que é sugestivo de ausência de efeitos colaterais (contráteis ou relaxantes) nos músculos lisos respiratórios quando da sua utilização para outros fins, que não nas doenças respiratórias.

Uma vez que a desova é utilizada para o tratamento de diarreia, distúrbio caracterizado por espasmos intestinais, passou-se a investigar um possível efeito antiespasmódico dos líofilos em íleo de cobaia. Verificou-se que *P. lineata* inibiu de maneira dependente de concentração e não equipotente as contrações fásicas induzidas por ACh e hist. em íleo de cobaia sendo mais potente em relaxar o íleo pré-contraído com ACh (Gráfico 2A e B). A desova inibiu de maneira dependente de concentração, porém equipotente as contrações fásicas induzidas tanto por ACh quanto por hist. em íleo de cobaia (Gráfico 2C e D). Estes dados sugerem que *P. lineata* e a sua desova estariam agindo em um passo comum da via de sinalização que promove a contração do íleo e não por bloqueio de receptor, uma vez que cada um dos agonistas utilizados possui o seu receptor específico.

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio intracelular é a causa primária da contração (Berridge et al., 2000), que depende de estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana ( $V_m$ ) e o fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é sempre maior que a observada só com a mudança do  $V_m$  (Rembold, 1996). A contração no músculo liso em resposta a vários agentes é frequentemente composta por duas fases: um componente fásico rápido seguido por um lento mais sustentado, componente tônico (Bolton, 1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de  $Ca^{2+}$  no músculo liso. Em íleo de cobaia, os agonistas muscarínicos produzem esta resposta bifásica, e é sugerido que a contração fásica é causada por liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares mediados por trifosfato de inositol ( $InsP_3$ ) (Abdellatif, 1989; Kobayashi et al., 1989). Por outro lado, a contração tônica induzida pelos mesmos agonistas em íleo de cobaia é atribuída ao influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ), uma vez que esta é suprimida pelo bloqueador de  $Ca_v$ , verapamil (Jim et al., 1981). A probabilidade de abertura dos  $Ca_v$  é favorecida por uma despolarização de membrana por estímulo mediado por acoplamento fármaco e eletromecânico (Rembold, 1996).

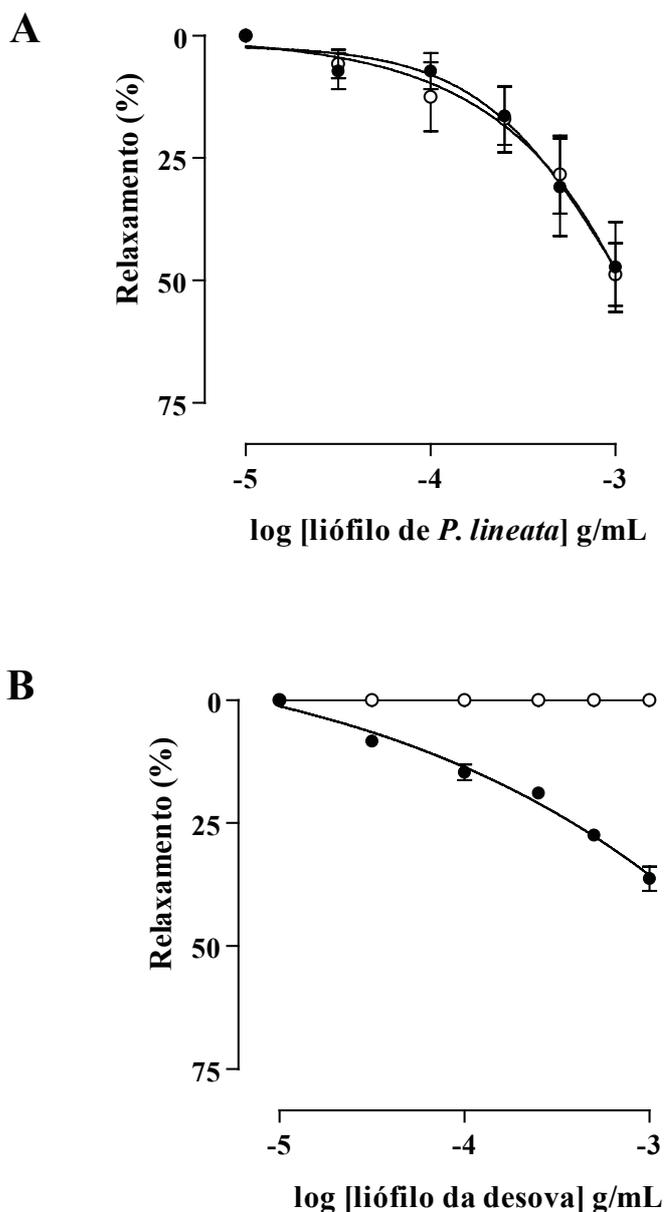
Para verificar se *P. lineata* e sua desova estariam agindo em nível de influxo de  $Ca^{2+}$  através da membrana plasmática, avaliou-se seu efeito sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por KCl (acoplamento eletromecânico), ACh ou hist. (acoplamento misto), em íleo de cobaia e observou-se que tanto o líofilo de *P. lineata* como o de sua desova relaxaram o íleo de cobaia pré-contraído com KCl, ACh ou hist. de maneira dependente de concentração (Figura 1A e B, Gráfico 3A e B). O efeito relaxante da desova sobre o íleo pré-contraído

com KCl, ACh ou hist. pode justificar a sua utilização para o tratamento de diarreia. Uma vez que a ACh é o neurotransmissor excitatório primário no controle das atividades contráteis da musculatura intestinal (Dale, 1914), o efeito relaxante mais potente de *P. lineata* sobre o íleo pré-contraído com ACh pode indicar a sua utilização também para o tratamento da diarreia. Como no músculo liso, os  $Ca_v$  são considerados o principal caminho de influxo de  $Ca^{2+}$  (Hofmann; Klugbauer, 1996) e sabendo-se que a ativação dos  $Ca_v$  é o passo comum na via de sinalização dos agentes contráteis testados, pode-se sugerir que o efeito relaxante de *P. lineata* e de sua desova em íleo de cobaia seja devido ao bloqueio do

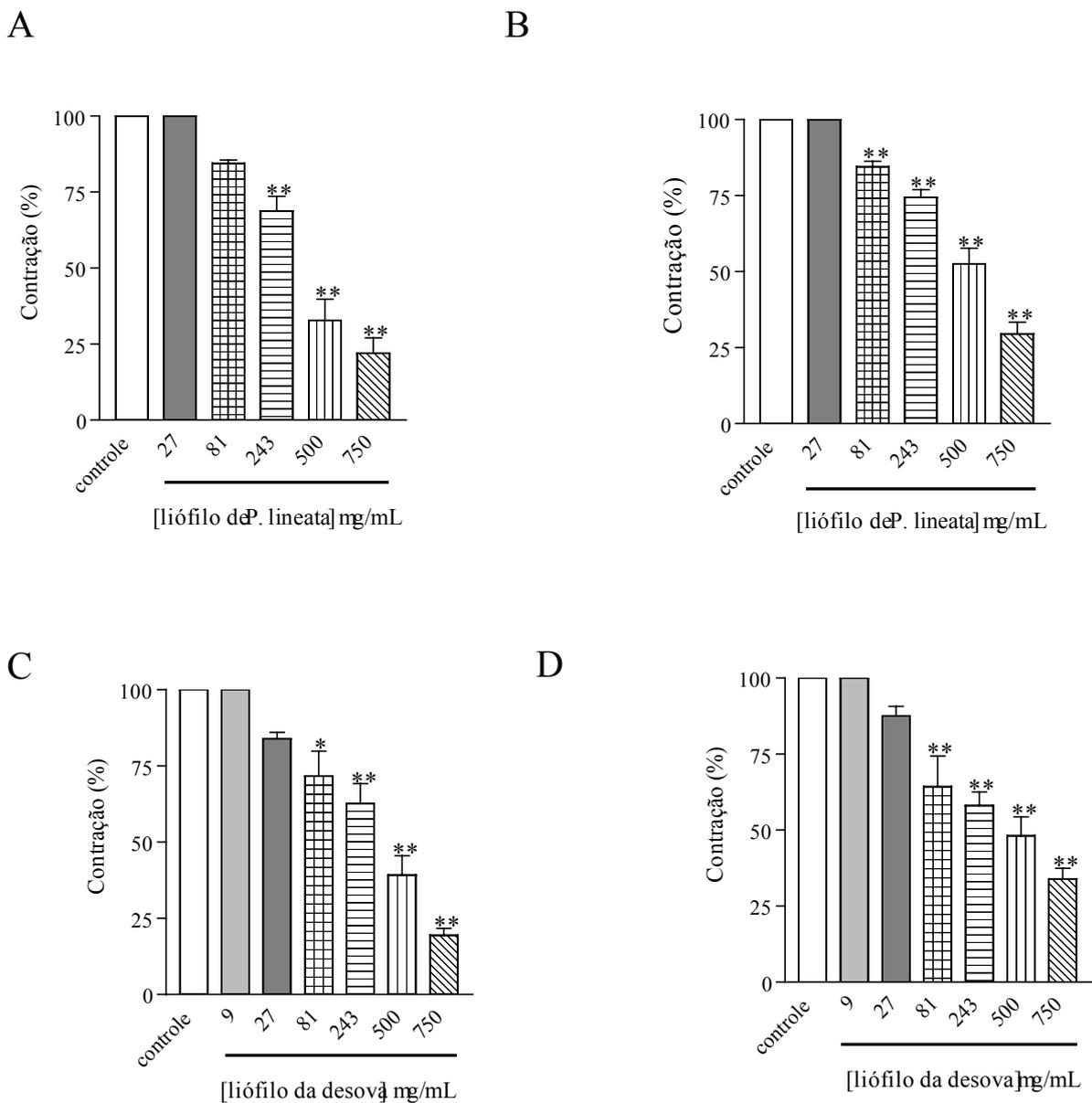
influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$ , o que validaria o seu uso popular como antidiarréico.

#### AGRADECIMENTOS

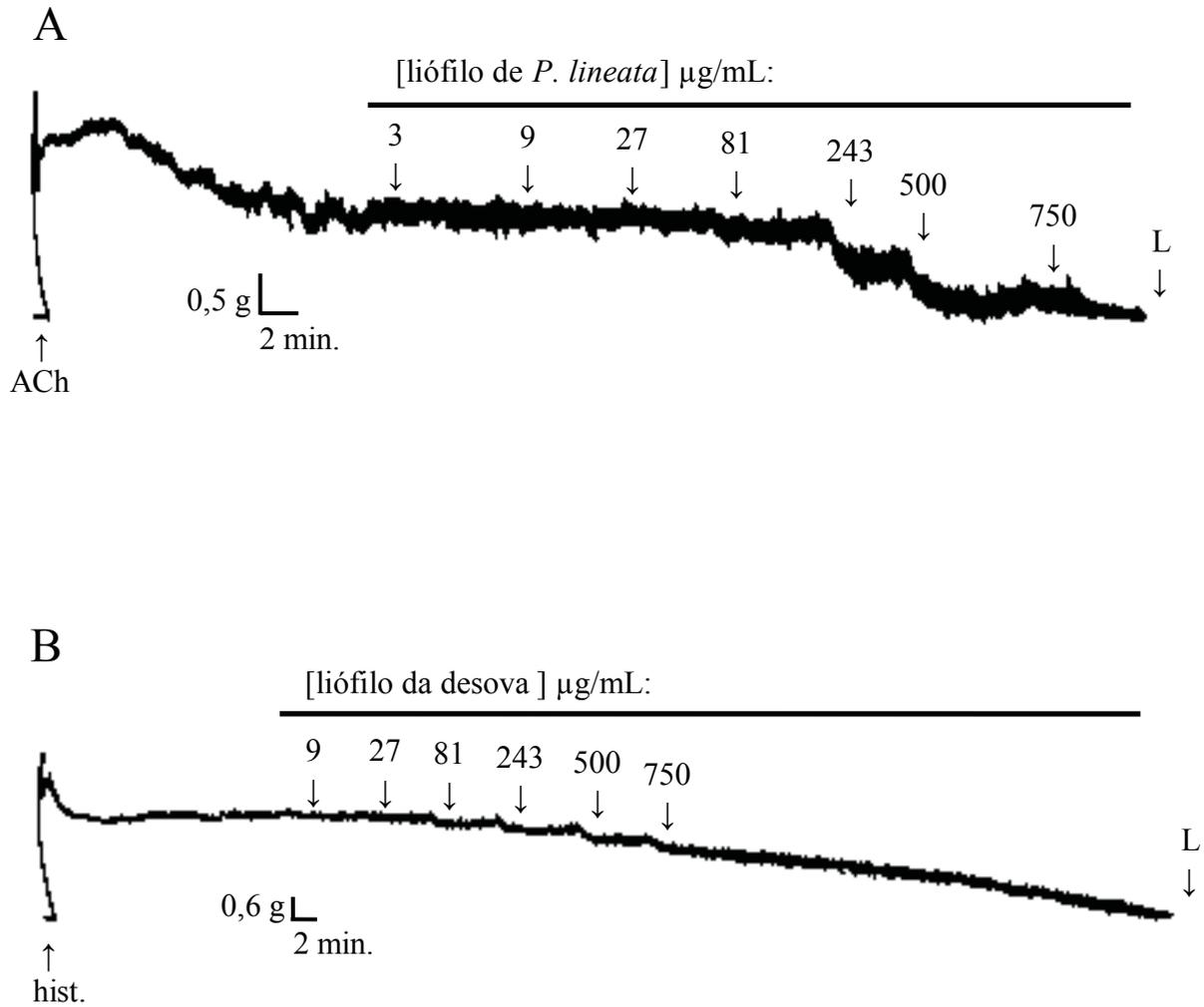
Os autores agradecem a direção do Jardim Botânico Benjamim Maranhão - João Pessoa - PB pela permissão para coleta de *P. lineata* e de sua desova, ao Prof. Paulo Roberto de Oliveira Rosa (LGA/CCEN/UFPB) pela determinação das coordenadas geográficas do local de coleta e ao Dr. Francisco José Pegado Abílio (DME/CE/UFPB) pela identificação dos espécimes de *P. lineata*.



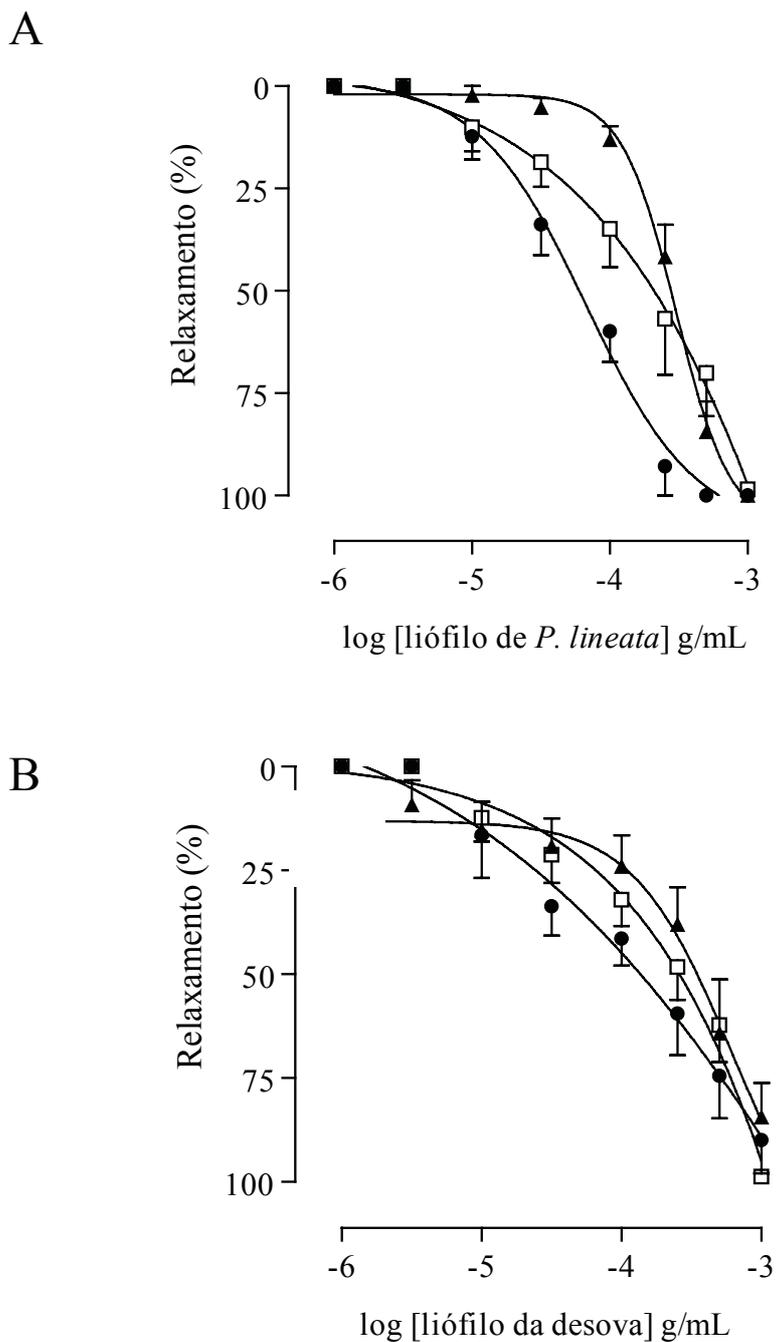
**Gráfico 1.** Efeito dos liófilos de *P. lineata* (A) e de desova (B) sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh em traquéia isolada de cobaia na presença (●) e na ausência (○) de epitélio funcional (n = 3).



**Gráfico 2.** Efeito dos liófilos de *P. lineata* (A e B) e de desova (C e D) frente às concentrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de ACh (A e C) e de hist. (B e D) em íleo isolado de cobaia (n = 5). As colunas e barras representam a média ± e.p.m. respectivamente. Anova “one-way”, seguido do teste de Bonferroni, \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  (controle x liófilos de *P. lineata*/desova).



**Figura 1.** Registro original representativo do efeito dos liófilos de *P. lineata* (µg/mL) (A) e de desova (µg/mL) (B) sobre o íleo de cobaia pré-contraído com  $10^{-6}$  M de ACh e hist., respectivamente. L = lavagem.



**Gráfico 3.** Efeito dos liófilos de *P. lineata* (A) e de desova (B) sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▲) ou por  $10^{-6}$  M de ACh (●) e de hist. (□) em íleo isolado de cobaia (n = 5).

## REFERÊNCIAS

- Abdellatif AA 1989. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. *Life Sci* 45: 757-786.
- Batalla JF 1992. *Estudo da biologia e ecologia do gastrópode Pomacea lineata (Spix, 1827) nos reservatórios de Gramame e Mamuaba - Alhandra - Paraíba, Brasil*. João Pessoa, 78p, Dissertação (Mestrado), Departamento de Sistemática e Ecologia, UFPB.
- Berridge MJ, Lipp PE, Bootman M 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21.
- Bolton TB 1979. Mechanisms of action of neurotransmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev* 59: 606-718.
- Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996. Normas para o estudo da toxicidade de produtos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br> Acesso em 11 jun. 2006.
- Dale HH 1914. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* 6: 147-190.
- Hofmann F, Klugbauer N 1996. Molecular biology and expression of smooth muscle L-type calcium channels. In: *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York: Academic Press.
- Ismailoglu UB, Sahin-Erdemli I, Sungur A, Ilhan M 2004. Effects of lipopolysaccharide on epithelium-dependent relaxation in coaxial bioassay. *Eur J Pharmacol* 487: 233-239.
- Jim K, Harris A, Rosenberger LB, Triggle DJ. 1981. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (methoxyverapamil) in smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 76: 67-72.
- Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV, Somlyo AP 1989. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic  $Ca^{2+}$ -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-triphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem* 264: 17997-18004.
- Litchfield LTJR, Wilcoxon F 1949. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 19: 388-397.
- Lum-Kong A, Kenny JS 1989. The reproductive biology of the ampullariid snail *Pomacea urceus* (Müller). *J Mollus Stud* 55: 53-65.
- Mesquita EFM 1982. *Anatomia e histologia do aparelho reprodutor e dados biológicos de Pomacea sp (Mollusca, Gastropoda, Pilidae)*. Rio de Janeiro, 88p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Invertebrados, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Munakata M, Masaki Y, Sakuma I, Ukita H, Otsuka Y, Homma Y, Kawakami Y 1990. Pharmacological differentiation of epithelium-derived relaxing factor from nitric oxide. *J Appl Physiol* 69: 665-670.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A 2003. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 55: 597-606.
- Rangel M, Malpezzi ELA, Susini SMM, Freitas JC 1997. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon* 35: 305-309.
- Rembold CM 1996. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M *Biochemistry of smooth muscle contraction*. San Diego, Academic Press.
- Santos E 1982. *Os moluscos (vida e costumes)*. Belo Horizonte. Editora Itatiaia.
- Spix JB, Wagner JA 1827. *Testacea fluviatilia quae in itinere per Brasiliam*. Monarchii. IV, 36 pp., 29 pls.
- Sun YD, Benishin CG 1994.  $K^+$  channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 271: 453-459.
- Thiengo S 1995. Família Pilidae Connolly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: Barbosa, FS (org.) *Tópicos em malacologia médica*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 50-69.
- Tschirhart E, Frossard N, Bertrand C, Landry Y 1987. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 310-316.