

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HISTAMÍNICA DA CLEMASTINA E DA
PIRILAMINA EM ÍLEO DE *Cavia porcellus* (cobaio)**

Luciane Cristina Vieira

Porto Alegre

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HISTAMÍNICA DA CLEMASTINA E DA
PIRILAMINA EM ÍLEO DE *Cavia porcellus* (cobaio)**

Autora: Luciane Cristina Vieira

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Augusto Langeloh

Porto Alegre

2005

AGRADECIMENTOS

Certamente muitas pessoas colaboraram na execução deste trabalho e, por isso, alguns agradecimentos são necessários.

Agradeço ao querido professor Augusto Langeloh, meu orientador, pela paciência, compreensão e total apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu pai e minha mãe pelo esforço e dedicação sem medidas.

Ao meu marido, Marcel, pela paciência nos momentos difíceis.

À minha irmã, Juliana, pelo exemplo de força de vontade e ao meu irmão, André, pelo incentivo.

À Fabiana Uez pelo auxílio durante os experimentos e, principalmente, pela ajuda constante nesses dois anos.

Ao meu psiquiatra Ricardo Silveira e minhas terapeutas Simone Gallina e Mariana Lucas.

À Janaina Pereira e à Eliane Dallegrave pela amizade e auxílio na execução deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante este período: Mariangela, Beatriz, Vanessa, Ana, Fernanda, Viviane, Ieda, Cláudia, Angela, Joraci, Vera, Jociane e Simone.

Aos professores João Roberto Braga de Mello, Elaine Elisabetsky, Maria Beatriz Cardoso Ferreira, Cláudio Coimbra Teixeira, Roberto Contino Thaddeu e Mirna Bainy Leal pela acolhida no Departamento de Farmacologia.

Ao professor André Caríssimi por permitir o uso de seu laboratório e computadores.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, por mais uma vez permitir meus estudos de maneira gratuita.

Ao Laboratório Regional de Apoio Animal, LARA - RS, pelo fornecimento dos animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Laboratório Coveli Indústria e Comércio Ltda. por ceder as substâncias maleato de pirilamina e fumarato de clemastina, possibilitando a realização dos experimentos.

**Desconheço fato mais encorajador que a
habilidade inquestionável do homem para
melhorar sua vida através do esforço consciente.**

Henry David Thoreau

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar fármacos utilizados como anti-histamínicos na terapêutica de patologias alérgicas em pequenos animais. O modelo empregado foi órgão isolado *in vitro* (íleo de *Cavia porcellus*), o qual permitiu avaliar as variáveis farmacológicas DE_{50} , $E_{máx}$, pD_2 , pD'_2 e pA_2 . Comparamos as ações produzidas em curvas concentração-efeito para histamina e acetilcolina frente a diferentes concentrações de clemastina e pirilamina. Difenidramina foi empregada como controle. Os resultados permitiram confirmar que os dois fármacos atuaram efetivamente como anti-histamínicos no íleo isolado de *Cavia porcellus*. O principal efeito foi de antagonismo competitivo, porém, em concentrações maiores, apresentaram efeito não-competitivo e perderam a especificidade aos receptores da histamina. A clemastina com pA_2 de 8,63 foi 10 vezes mais potente do que a pirilamina ($pA_2 = 7,61$) como anti-histamínico, mas também apresentou significativo ($P < 0,05$; ANOVA, Bonferroni) efeito anticolinérgico, o qual não foi observado com a pirilamina. Entretanto, em concentrações mais elevadas, ambos apresentaram efeito anticolinérgico por mecanismo não-competitivo: clemastina a partir de 10^{-7} mol/L e pirilamina com 10^{-5} mol/L, resultando em pD'_2 de 5,66 e 5,36; respectivamente. Da comparação com difenidramina, concluiu-se que a clemastina foi cerca de 10 vezes mais potente no efeito competitivo enquanto a pirilamina foi menos potente. Quanto ao componente não-competitivo, a clemastina foi mais eficaz que a difenidramina enquanto a pirilamina foi menos eficaz. Se os efeitos obtidos com a clemastina e pirilamina no íleo isolado também se observarem quando empregados na terapêutica, *in vivo*, é de se esperar que a clemastina apresente mais efeitos adversos (anticolinérgicos) do que a pirilamina.

ABSTRACT

This study has compared antihistaminic drugs used on allergic pathologies of small animals. The isolated guinea pig ileum was used to evaluate the pharmacological variables ED_{50} , $E_{m\acute{a}x}$, pD_2 , pD'_2 and pA_2 . Concentration-responses curves for histamine and acetylcholine were obtained in absence (control) and presence of increasing concentrations of clemastine and pyrilamine. Diphenhydramine was used as reference drug. The results showed that pyrilamine and clemastine acted effectively as antihistaminic in guinea pig isolated ileum. The main effect was competitive, but, in higher concentration revealed also a no-competitive effect. Clemastine ($pA_2 = 8,63$) was 10 times more powerful than the pyrilamine ($pA_2 = 7,61$) as antihistaminic, but in addition presented a significant ($P < 0,05$; ANOVA, Bonferroni) anticholinergic effect ($pA_2 = 7,48$), which wasn't observed with pyrilamine. Both clemastine and pyrilamine presented an anticholinergic effect through a no-competitive mechanism in more elevated concentrations: clemastine from 10^{-7} mol/L and pyrilamine from 10^{-5} mol/L, resulting in pD'_2 of 5,66 and 5,36 respectively. Through the comparison with diphenhydramine, it could be concluded that clemastine is about 10 times more potent against histamine in the competitive effect while pyrilamine has almost the same power. In relation to the no-competitive component, clemastine was more efficient than the diphenhydramine while the pyrilamine has smaller efficacy. If the effects observed with clemastine in the isolated ileum will also be observed when it is used in therapeutic (in vivo) it is expected to show more (anticholinergic) adverse effects than the pyrilamine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Histamina	14
2.2 Anti-histamínicos	20
2.2.1 Clemastina	25
2.2.2 Pirilamina	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Animais	30
4.2 Materiais e Equipamentos	30
4.3 Solução Nutritiva	31
4.4 Aparelhagem e Registro das Contrações Isotônicas	31
4.5 Isolamento e Montagem dos Órgãos	32
4.6 Curvas Concentração-Efeito Obtidas pelo Método das Doses Cumulativas	33
4.7 Método dos Parênteses (<i>bracketing</i>)	34
4.8 Protocolo Experimental	34
4.9 Variáveis Farmacológicas Avaliadas	35
4.10 Determinação da Concentração Eficaz 50 (CE₅₀)	35
4.11 Determinação da Afinidade do Agonista (pD₂)	35
4.12 Determinação da Afinidade do Antagonista (pA₂)	36
4.13 Determinação da Afinidade do Antagonista não-competitivo (pD'₂)	36
4.14 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Clemastina	38
5.2 Pirilamina	42
5.3 Difenidramina	46
6 DISCUSSÃO	50

7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Biotransformação da L-histidina em histamina	14
FIGURA 2 -	Estrutura química da difenidramina	23
FIGURA 3 -	Estrutura química da clemastina	26
FIGURA 4 -	Estrutura química da pirilamina	27
FIGURA 5 -	Representação esquemática da aparelhagem usada na experimentação farmacológica com músculo liso isolado	32
FIGURA 6 -	CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de clemastina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm	40
FIGURA 7 -	Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de clemastina, representadas na Figura 6. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. Em ambos os gráficos os pontos obtidos para histamina e acetilcolina mostram correlações positivas, sugerindo que a clemastina atua como antagonista contra ambos os agonistas, mas as posições relativas das retas merecem uma análise mais pormenorizada (vide texto)	41
FIGURA 8 -	CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de pirilamina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm	44

- FIGURA 9 - Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de pirilamina, representadas na Figura 8. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. No gráfico de Schild os pontos obtidos para histamina mostram correlação positiva ($r^2 = 0,7799$), indicando que a pirilamina atua como antagonista competitivo contra este agonista, o que não se observa quando o agonista foi a acetilcolina 45
- FIGURA 10 - CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de difenidramina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm 48
- FIGURA 11 - Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de difenidramina, representadas na Figura 10. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. No gráfico de Schild os pontos obtidos para histamina mostram correlação positiva ($r^2 = 0,8951$), indicando que a difenidramina atua como antagonista competitivo contra este agonista, o que não se observa quando o agonista foi a acetilcolina 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos químicos e características dos anti-histamínicos	23
TABELA 2 - Exemplo hipotético de um fármaco em experimento	34
TABELA 3 - Valores médios de $E_{máx}$ e de $pD_2 \pm epm$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de clemastina	39
TABELA 4 - Valores de pA_2 e pD'_2 de clemastina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 7 e respectivas relações de potência entre as variáveis calculadas	39
TABELA 5 - Valores médios de $E_{máx}$ e de $pD_2 \pm epm$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de pirilamina	43
TABELA 6 - Valores de pA_2 e pD'_2 de pirilamina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 9 e relação de potência entre os pD'_2	43
TABELA 7 - Valores médios de $E_{máx}$ e de $pD_2 \pm epm$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de difenidramina	47
TABELA 8 - Valores de pA_2 e pD'_2 de difenidramina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 11 e respectivas relações de potência entre as variáveis calculadas	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
Antilog	Antilogaritmo
B	Concentração molar do antagonista em equilíbrio com o receptor
B'	Concentração molar do antagonista não-competitivo
CCE	Curva(s) concentração-efeito
CE ₅₀	Concentração que provoca 50% do efeito máximo
cm	Centímetro(s)
°C	Graus Celsius
DR	Relação de potência
E _{máx}	Efeito máximo
epm	Erro padrão da média
ER	Relação dos efeitos máximos
g	Gramas(s)
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
K _B	Constante de dissociação do complexo antagonista-receptor
K' _B	Constante de dissociação do antagonista não-competitivo
kg	Quilograma(s)
l	litro
log	Logaritmo
mg	Miligramas(s)
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
P	Probabilidade
pA ₂	Afinidade do antagonista competitivo
pD ₂	Afinidade do agonista
pD' ₂	Afinidade do antagonista não-competitivo
PO	<i>per os</i>
SNC	Sistema nervoso central

1 INTRODUÇÃO

O uso de substâncias com propriedades anti-histamínicas tem sido amplamente difundido em Medicina Veterinária. Sua indicação está relacionada ao controle de alergias que se apresentam sob a forma de rinite, urticária, conjuntivite, prurido, eczema, e outros (ANDRADE, 2002). Também são importantes neutralizando formação de edema em resposta a traumatismos, antígenos, alérgenos ou fármacos liberadores de histamina. A histamina está presente em quase todos os tecidos, mas há predomínio em pele e mucosas intestinal e brônquica.

Os antagonistas H_1 ou anti-histamínicos clássicos bloqueiam reversível, seletiva e competitivamente receptores H_1 , por apresentarem semelhança estrutural com o agonista (ROCHA E SILVA, 1969). São classificados conforme a estrutura química em etanolaminas, etilenodiaminas, alquilaminas, piperazinas, fenotiazinas e piperidinas, o que lhes confere algumas propriedades diferenciais como, por exemplo, efeito sedativo mais ou menos acentuado (ANDRADE, 2002).

Segundo Wannmacher (1992), embora os vários representantes sejam equivalentes terapêuticamente os pacientes têm respostas individuais diversas aos mesmos. Portanto, quando ocorre a necessidade de substituição de um anti-histamínico por outro, seja por ineficácia ou intolerância, deve-se escolher um representante de outra classe química.

Diversos produtos comerciais com diferentes substâncias ativas anti-histamínicas são encontrados como alternativas terapêuticas para uso em cães e gatos, o que dificulta, muitas vezes, optar por um ou outro, já que apresentam a mesma atividade farmacológica. O presente trabalho testou duas substâncias sob a forma de sais pertencentes a diferentes grupos: maleato de pirilamina, do grupo das etilenodiaminas, e fumarato de clemastina, do grupo das etanolaminas, procurando verificar eventuais vantagens ou desvantagens no uso de cada um deles, com o objetivo de facilitar a escolha terapêutica. Essas substâncias são encontradas nos produtos comerciais Allergovet[®] e Allergovet C[®], respectivamente, produzidos por Coveli Indústria e Comércio Ltda.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O desenvolvimento e o uso de agonistas e antagonistas específicos dos diferentes subtipos de receptores da histamina tem resultado em acúmulo significativo de conhecimento e compreensão relativos ao seu papel na fisiologia e patofisiologia de várias condições (RÄNTFORS; CASSUTO, 2003). Portanto, será feita uma revisão sobre histamina previamente a de anti-histamínicos, com o objetivo de propiciar maior entendimento de sua importância no organismo dos animais.

2.1 Histamina

Definição - Segundo Bonamin e Abel (2002), a histamina pertence à classe dos autacóides, os quais são substâncias naturais do organismo, de estrutura química e atividades farmacológicas diversas. É um dos mediadores mais importantes da reação de hipersensibilidade imediata e da resposta inflamatória aguda. Também desempenha papel na regulação da secreção gástrica de ácido clorídrico e como modulador da liberação de neurotransmissores nos sistemas nervosos central e periférico (BROW; ROBERTS, 2003). Sua constituição química compreende um anel imidazol e um grupo amina, conectados por dois grupos metila. É um produto de transformações enzimáticas de aminoácidos: a L-histidina dá origem à histamina por ação da L-histidina-descarboxilase (Figura 1). A estrutura do anel imidazólico da histamina é extensivamente modificada ou substituída por outros grupamentos nos antagonistas H₁ (ADAMS, 1992). Todos os tecidos mamíferos que contêm histamina são capazes de sintetizá-la a partir da histidina, em virtude do seu conteúdo de L-histidina descarboxilase.

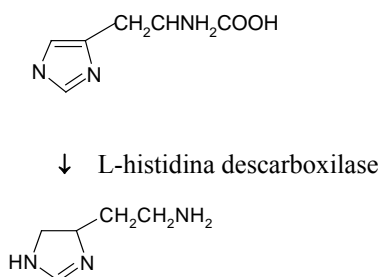


Figura 1 - Biotransformação da L-histidina em histamina.

Histórico - A histamina, ou 2-(4-imidazolil) etilamina ou, ainda, β -aminoetilimidazol, é uma amina biogênica descoberta no início do século XX. Foi detectada pela primeira vez como estimulante uterino. Distribui-se amplamente entre os tecidos dos mamíferos em ambos os compartimentos, neural e extra-neural (SCHWARTZ et al., 1991 apud IZZO et al., 1998). No início do século passado (1910-1911), Dale e Laidlaw submeteram a histamina a intenso estudo farmacológico, evidenciando sua capacidade de estimular diversos grupos de músculos lisos e de produzir intensa vasodilatação. Em 1927, Best, Dale, Dudley e Thorpe isolaram a histamina de tecidos hepático e pulmonar frescos, provando sua ocorrência natural no organismo. Não tardaram as evidências da presença da histamina em vários outros tecidos, derivando daí o seu nome (do grego *histos* = tecido) (ROCHA JÚNIOR, 2002).

Ocorrência - A histamina distribui-se amplamente, embora de modo desigual, por todo o reino animal, é constituinte de vários venenos e pode ser encontrada em bactérias e plantas (GARRISON, 1990). A histamina endógena está envolvida em inúmeros processos fisiológicos, além de reações alérgicas e secundárias a agressões tissulares (ROCHA JÚNIOR, 2002).

Suas concentrações variam consideravelmente em espécies diferentes; por exemplo, quantidades de histamina circulante são relativamente altas na cabra e no coelho, porém baixas em eqüinos, cães, gatos e humanos. Em geral, se admite que a maior parte da histamina armazenada no organismo se origina localmente da descarboxilação enzimática de histidina. A histamina dietética e a histamina produzida por bactérias entéricas são eliminadas rapidamente após absorção na circulação porta e fornecem pouco ou nada para os locais de armazenamento teciduais (ADAMS, 1992).

Origem e Destino – Os principais locais de armazenamento nos animais são os mastócitos, presentes em diversos tecidos, e os basófilos, no sangue (ACEVEDO, 1976). Segundo Garrison (1990), essas células sintetizam e armazenam a histamina em grânulos secretórios. Esses grânulos contêm histamina complexada com sulfato de heparina e sulfato de condroitina E. Sua liberação ocorre como resultado da interação de antígenos com

anticorpos IgE na superfície dos mastócitos em respostas alérgicas (reações de hipersensibilidade imediata).

A taxa de renovação metabólica nos mastócitos e basófilos é baixa e, caso haja depleção das reservas de histamina, a normalização da concentração do autacóide pode levar semanas. Ao contrário, nos demais sítios, a histamina é continuamente formada e liberada, em vez de ser armazenada (WANNMACHER, 1992).

Mecanismo de Ação - Para Burkhalter et al. (1998), a histamina em si tem valor limitado como fármaco, embora tenha importante papel *in vivo*. Quando administrada por via oral, exerce pouco efeito, quase nenhum, porque é rapidamente destruída no trato gastrointestinal e no fígado (SZABUNIEWICZ; McCRADY, 1983). Exerce sua atividade biológica através de sua combinação com receptores celulares específicos localizados na superfície da membrana celular. Entretanto, a farmacologia dos processos envolvendo a histamina se dá pelo uso de agentes anti-histamínicos, os quais são comumente empregados em diferentes espécies animais para inibir os efeitos (exacerbados) da histamina endógena (ADAMS, 1992) sobre seus receptores.

O renovado interesse no uso clínico de antagonistas dos receptores H₁ surgiu nos últimos 15 anos em decorrência do desenvolvimento de antagonistas de segunda-geração, denominados, em conjunto, anti-histamínicos não-sedativos (BROW; ROBERTS, 2003). Entretanto, anti-histamínicos de segunda-geração como a terfenadina e a cetirizina, usados em medicina humana, os quais não ultrapassam a barreira hematoencefálica, não provaram serem efetivos em cães com prurido alérgico (HANSSON et al., 2004).

Três classes de receptores histamínicos, H₁, H₂ e H₃ foram identificadas em vertebrados (HILL, 1990 apud IZZO et al., 1998) e todas estão presentes no intestino delgado de *Cavia porcellus* (LEURS et al., 1991; BERTACCINI; CORUZZI, 1995 apud IZZO et al., 1998). A histamina contrai a musculatura longitudinal do intestino delgado de *Cavia porcellus* via subtipos de receptores H₁ (ZAVECZ; YELLIN, 1982; TRZECIAKOWSKI, 1987 apud IZZO et al., 1998), provavelmente devido à ação direta no músculo liso. O efeito da histamina não é tão acentuado no homem quanto no íleo de cobaio, sendo por esta razão que a resposta do íleo de cobaio constitui a base do bioensaio padrão da histamina (RANG et al., 2001).

Os receptores H_1 pertencem a uma família de receptores acoplados à proteína G, os quais são a maior família de receptores, incluindo mais de 150 subtipos diferentes, como os 1 e 2 para a histamina, os adrenérgicos e os receptores muscarínicos da acetilcolina. O interessante é que na família de receptores acoplados à proteína G, em humanos, o receptor H_1 e o receptor muscarínico possuem em torno de 45%, de semelhança na seqüência da proteína G acoplada, o que pode explicar os efeitos adversos anticolinérgicos de muitos anti-histamínicos (MERK, 2001).

Efeitos Fisiológicos - Uma vez liberada a histamina, em geral, exerce efeitos locais nos músculos lisos e nas glândulas; efeitos disseminados aparecem quando há liberação maciça e generalizada. O autacóide contrai muitos músculos lisos, como o dos brônquios e do intestino. Esses efeitos são mediados por receptores H_1 (ASH e SCHILD, 1966 apud BROW; ROBERTS, 2003). As respostas do músculo liso intestinal também variam de acordo com a espécie animal e a região, mas o efeito clássico é de contração (espasmogênico). Embora a influência espasmogênica dos receptores H_1 seja dominante na musculatura brônquica, receptores H_2 com função dilatadora também estão presentes (ROCHA JÚNIOR, 2002).

A histamina apresenta diferentes efeitos farmacológicos: (1) no sistema cardiovascular – diminuição da pressão sangüínea e edema; (2) no sistema respiratório – ativação de receptores H_1 que causam contração de músculos lisos respiratórios na maioria das espécies, exceto no gato; (3) no tecido glandular – aumento da secreção de ácido clorídrico e pepsina; (4) no tecido intradérmico – causa resposta tríplice, dor e prurido (DYER, 1997).

A ligação da histamina ao receptor H_1 na pele induz o endotélio vascular a liberar óxido nítrico, estimulando a guanililciclase e aumentando a produção de monofosfato de guanosina no músculo liso vascular, o qual resulta em vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e eritema (MERK, 2001).

A histamina contrai a musculatura dos bronquíolos em cobaias, cães e homem. Foi demonstrado tratar-se de uma ação mediada por receptores H_1 . No homem, o efeito das doses "terapêuticas" é pouco evidente quando se trata de pessoas saudáveis, mas em pacientes asmáticos a injeção de doses muito pequenas de histamina provoca uma

acentuada diminuição da capacidade vital por broncoconstrição. Na maioria das espécies a histamina é responsável pela contração uterina, mas na mulher são necessárias doses elevadas, capazes de provocar intensos efeitos adversos, o que exclui sua utilização terapêutica. No sistema cardiovascular, em gatos, a injeção intravenosa de pequenas doses de histamina provoca queda da pressão arterial; entretanto, se as doses são muito pequenas, a recuperação é rápida devido a biotransformação da histamina e ocorrência de reflexos compensatórios – descarga simpaticoadrenal. Com doses mais elevadas, a queda da pressão é muito intensa e persistente, levando ao choque histamínico (LITTER, 1973).

Em cães e primatas, assim como nos gatos, a resposta da pressão sangüínea à histamina é hipotensão, causada por uma brusca queda na resistência vascular periférica. A queda da pressão sangüínea é dose-dependente, mas em geral dura pouco por causa de reflexos compensatórios e inativação da histamina (ADAMS, 1992). Em coelhos a histamina é um agente vasoconstritor de vasos sangüíneos calibrosos. Esta atividade constritora é insignificante em carnívoros, nos quais predomina a vasodilatação da microcirculação.

Quando injetada por via intradérmica, a histamina desencadeia um fenômeno característico conhecido como “resposta tripla” ou tríplice resposta de Lewis (WANNMACHER, 1998). Essa resposta consiste em (1) um ponto vermelho localizado, que se estende por alguns milímetros ao redor do local de injeção, que aparece dentro de poucos segundos e atinge um máximo em cerca de 1 minuto; (2) rubor vermelho mais intenso, ou “eritema”, que se estende cerca de 1 cm ou mais além da mancha vermelha original e desenvolve-se mais lentamente; e (3) uma pápula que é visível dentro de um a dois minutos e ocupa a mesma área da pequena mancha vermelha original no local da injeção. A mancha vermelha resulta do efeito vasodilatador direto da histamina; o rubor é devido à estimulação induzida pela histamina de reflexos axônicos que indiretamente provocam vasodilatação; e a pápula reflete a capacidade da histamina de aumentar a permeabilidade vascular.

Fenômenos de hipersensibilidade associados a reações antígeno-anticorpo produzem liberação ativa da histamina do *pool* de mastócitos. A histamina livre desempenha, então, um importante papel na mediação de manifestações fisiológicas de tais reações, como

vasodilatação, prurido, contração da musculatura lisa e edema (PLAUT, 1979 apud ADAMS, 1992).

Injeções repetidas de histamina são capazes de provocar tolerância, sendo que os animais tratados podem resistir a altas doses que, nos demais, produziriam choque ou broncoconstrição fatal (LITTER, 1973).

Efeitos Fisiopatológicos - A liberação de histamina dos mastócitos diretamente, sem sensibilização prévia, têm maior tendência a ocorrer após injeção IV de determinadas categorias de substâncias: amidas, amidinas, compostos de amônio quaternário, compostos de piridínio, piperidinas, alcalóides, bases antibióticas, tubocurarina, succinilcolina, morfina, meios de contraste radiológicos e certos carboidratos expansores plasmáticos. O fenômeno é objeto de preocupação clínica, visto que pode ser responsável pela ocorrência inesperada de reações anafilatóides (LEVY et al., 1987 apud BROW; ROBERTS, 2003).

As condições clínicas nas quais ocorre liberação de histamina em resposta a outros estímulos incluem urticária ao frio, urticária colinérgica e urticária solar. Sua liberação também ocorre sempre que há lesão celular inespecífica de qualquer causa. É importante lembrar que a liberação de histamina fornece apenas uma explicação parcial para todos os efeitos biológicos que resultam das reações de hipersensibilidade imediata. Isso se deve à liberação de um amplo espectro de outros mediadores da inflamação com a ativação do mastócito. A concentração de histamina é particularmente alta nos tecidos que contêm grande número de mastócitos, como a pele, a mucosa da árvore brônquica e a mucosa intestinal (BROW; ROBERTS, 2003).

Em animais domésticos, a histamina liberada de tecido lesado é supostamente um mediador em vários estados patológicos, incluindo reações alérgicas a fármacos, venenos e outros antígenos, timpanismo do ruminante, alimentação excessiva e outros distúrbios gastrintestinais de ruminantes, laminite, azotúria, retenção placentária, pneumonia, edema intestinal do suíno e vários tipos de síndromes de choque circulatório (por exemplo, choque séptico). Entretanto, o papel da histamina nessas condições em geral tem uma base mais empírica do que experimental (SZABUNIEWICZ; McCRADY, 1977 apud ADAMS, 1992).

A histamina, ao atuar através dos receptores H₁, inibe o apetite (OOKUMA et al., 1993 apud BROW; ROBERTS, 2003). Os neurônios que contém histamina podem participar na regulação da ingestão de água, da temperatura corporal e da secreção de hormônio antidiurético, bem como no controle da pressão arterial e da percepção da dor.

Efeitos Causados por Histamina em Cães e Gatos - O prurido, manifestado através de coceiras, arranhaduras, lambidas, mordidas, mastigação e fricção, é o sinal mais comum de doença de pele canina. O prurido pode ser causado por muitos fatores, tornando o diagnóstico difícil. Além disso, o diagnóstico depende parcialmente da interpretação e/ou da reação do animal descrita pelo proprietário durante o episódio de prurido (REEDY, 1984). O tratamento ideal contra o prurido é a identificação e a remoção da causa a qual, usualmente, pode ser detectada com uma anamnese completa, exame físico e exames diagnósticos complementares (PARADIS et al., 1991).

Como em cães, doenças alérgicas de pele são também a causa mais comum de prurido em gatos, sendo a razão mais freqüente pela qual estes animais são apresentados aos veterinários para diagnóstico dermatológico. Entretanto, investigações clínicas destinadas ao uso de agentes antipruriginosos não esteroidais em gatos tem sido limitadas (SCOTT; MILLER JÚNIOR, 1994).

2.2 Anti-histamínicos

Definição – Segundo Rocha Júnior (2002), os fármacos que inibem os efeitos farmacológicos da histamina são classificados em bloqueadores de receptores H₁, H₂ e H₃. São utilizados para bloquear os receptores histamínicos ou histaminérgicos ou, ainda, para bloquear a liberação de histamina endógena. Têm utilidade terapêutica em inúmeros quadros clínicos resultantes de liberação exacerbada de histamina como, por exemplo, na asma felina e quadros pruriginosos.

O mesmo autor afirma que a grande maioria dos produtos classificados como anti-histamínicos tem certa semelhança estrutural com a histamina. Essa semelhança consiste na presença de um grupamento etilamina como parte integrante da molécula, seja como cadeia aberta, seja como parte de um anel. Os bloqueadores dos receptores H₁ são convencionalmente classificados de acordo com a natureza do grupo conectado ao

grupamento etilamina, o qual pode ser: carbono, oxigênio, nitrogênio, núcleo piperazina, entre outros, dando origem às diferentes classes de anti-histamínicos.

Histórico - Quando se descobriu que a histamina era importante mediador químico das reações alérgicas, a procura de substâncias que agissem como seus antagonistas específicos despertou grande interesse (ROCHA JÚNIOR, 2002). Segundo Brow e Roberts (2003), a atividade bloqueadora da histamina foi detectada pela primeira vez por Bovet e Staub em 1937. Foi utilizada a substância 2-isopropil-5-metilfenoxietildietilamina, a qual protegeu os cobaios contra doses letais de histamina, antagonizando o espasmo induzido por histamina de vários músculos lisos e diminuindo os sintomas do choque anafilático. Em 1944, Bovet e colaboradores descreveram o maleato de pirilamina, que continua sendo um dos antagonistas mais específicos e eficazes da histamina dessa categoria. A clemastina só foi descoberta mais tarde, no ano de 1963.

Mecanismo de Ação e Destino - Segundo Rocha e Silva (1969), a histamina pode ser antagonizada de várias maneiras, sendo que o antagonismo competitivo é feito pelos bloqueadores. Este é o tipo de antagonismo mais desejável do ponto de vista terapêutico, porque o bloqueio da ação farmacológica do mediador se faz ao nível dos receptores, sem que o antagonista por si mesmo produza efeitos farmacológicos opostos. Em muitos casos, o antagonista é praticamente inativo, funcionando como “falsa droga”, isto é, introduzindo-se nos receptores destinados ao agonista impedindo a fixação deste último aos seus próprios receptores.

Os anti-histamínicos são mais provavelmente eficazes não no bloqueio da liberação de histamina dos mastócitos, mas sim no antagonismo nos receptores cutâneos após sua liberação (PATERSON, 1995).

Esses bloqueadores inibem a maioria das respostas à histamina, pois as ações desta são especialmente intensas sobre os músculos lisos, contraindo uns (músculos lisos dos brônquios e intestinos) e relaxando outros (vasos sanguíneos) (ROCHA JÚNIOR, 2002). Alguns bloqueadores H_1 também dificultam a ação da acetilcolina nos receptores muscarínicos, causando ações semelhantes às da atropina, as quais constituem efeitos adversos (WANNMACHER, 1992).

Uma particularidade importante dos anti-histamínicos é o fato de que algumas ações farmacológicas da histamina são bloqueadas mais prontamente do que outras. Assim, por exemplo, a pirilamina e a prometazina bloqueiam totalmente a ação da histamina sobre a musculatura lisa do íleo e dos brônquios do cobaio, impedindo a morte do mesmo, em concentração relativamente baixa. Ao contrário, o efeito hipotensor da histamina, no cão e no gato, dificilmente pode ser abolido pela injeção de fortes doses de anti-histamínicos (ROCHA E SILVA, 1969).

Os antagonistas H₁ são, em geral, bem absorvidos por vias oral e parenteral. A maior parte do fármaco é biotransformada no fígado e excretada pela urina e bile como produtos de degradação. Experimentalmente, os bloqueadores H₁ estimulam as enzimas microsomais hepáticas envolvidas no metabolismo de vários fármacos como fenobarbital e vários anticoagulantes, podendo reduzir a duração da ação dessas substâncias (ROCHA JÚNIOR, 2002).

Utilização Terapêutica - Os anti-histamínicos H₁ são amplamente utilizados em terapia dermatológica para o alívio sintomático de manifestações cutâneas de uma variedade de distúrbios alérgicos (MERK; BICKERS, 1992 apud MERK, 2001). São a primeira escolha para o tratamento das condições alérgicas, estando eles entre as medicações mais freqüentemente utilizadas nos Estados Unidos, com suas vendas aumentando em 16% só em 2001 (BENDER et al., 2003).

Segundo Andrade (2002), esses agentes podem ser classificados em muitos grupos, como os listados na Tabela 1. Em geral, eles têm propriedades similares e a escolha de um agente vai depender de outros fatores além da eficácia farmacológica, incluindo efeitos adversos e custo. Os efeitos dos anti-histamínicos em urticária tem sido demonstrados em numerosos estudos clínicos (SIM; GRANT, 1996; SIMONS, 2000; SIMPSON; JARVIS, 2000; THARP, 2000 apud MERK, 2001).

Tabela 1 - Grupos químicos e características dos anti-histamínicos.

Grupo	Características	Exemplo(s)
Alquilaminas	Provocam pouca sedação.	clorfeniramina
Etanolaminas	Atividade antimuscarínica significativa e tendência acentuada para produzir sedação.	difenidramina (Figura 2), clemastina (Figura 3)
Etilenodiaminas	Efeitos centrais brandos.	pirilamina (Figura 4)
Fenotiazinas	Possuem atividade anticolinérgica, antiemética, anticinetose e efeito sedativo proeminente.	prometazina
Piperazinas	A hidroxizina possui ação prolongada com pronunciada atividade antipruriginosa.	hidroxizina
Piperidinas	Isentos de ações anticolinérgicas significativas.	terfenadina

Os fármacos cuja estrutura são apresentadas em figuras foram avaliados no presente trabalho.

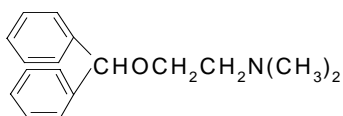


Figura 2 - Estrutura química da difenidramina.

Os receptores H_1 são encontrados em todo o SNC e estão densamente concentrados no hipotálamo. A histamina aumenta o estado de vigília através dos receptores H_1 (MONTI, 1993 apud BROW; ROBERTS, 2003), explicando o potencial de sedação dos anti-histamínicos clássicos.

Efeitos Causados por Anti-histamínicos em Cães e Gatos – Conforme Rocha Júnior (2002), os anti-histamínicos bloqueadores dos receptores H_1 encontram sua maior utilidade terapêutica no tratamento sintomático das reações alérgicas, pois nessa condição, o prurido induzido pela histamina tem papel preponderante.

Dermatites alérgicas são processos de hipersensibilidade a determinados antígenos e que têm o prurido como o ponto comum, independente da causa. São freqüentes nos cães e gatos chegando a totalizar 15% das principais doenças cutâneas. O prurido é uma das queixas mais freqüentes à apresentação do animal ao veterinário, sendo sua presença ou ausência um dos mais importantes fatos clínicos no diagnóstico diferencial das dermatoses. A dermatite alérgica à picada de pulgas é a que mais ocorre na clínica dermatológica. A

atopia ocupa o segundo lugar em frequência e é caracterizada pelo aparecimento do prurido sem lesão prévia na pele. A dermatite alérgica de origem alimentar é uma alteração pápulo-pruriginosa crônica, geralmente pouco responsiva à terapia com esteróides (MULLER et al., 1985).

Em cães e gatos, antagonistas de receptores H₁ têm sido usados no tratamento de urticária, atopia e outras doenças de pele que causam prurido (MERCHANT; TABOADA, 1989). Nessas espécies animais, o sucesso obtido no alívio do prurido tem permanecido controverso, com informações de raros efeitos até efeitos benéficos seletivos. Devido à disponibilidade de várias classes de antagonistas de receptores H₁ e à variação das respostas dos animais aos diferentes anti-histamínicos, pode ser necessário testar diversas dessas substâncias antes de se obter uma resposta clínica efetiva.

Segundo Shaw e Kelly (2001), a resposta individual a anti-histamínicos é variável, e deve-se avaliar o efeito após o tratamento terapêutico por duas semanas.

Como os anti-histamínicos são frequentemente usados por longos períodos, o anti-histamínico ideal contra a urticária deve demonstrar alta eficácia, sem causar taquifilaxia, e um bom perfil de segurança, sem efeitos cardiotoxicos e sem interações significativas com outros medicamentos (TIMMERMAN, 2000 apud MERK, 2001).

Os anti-histamínicos são largamente utilizados em medicina veterinária para o tratamento de dermatite atópica canina (HANSSON et al., 2004). Sua administração também tem sido reportada como reduzindo a dose de glicocorticóides sistêmicos necessários para o controle do prurido em muitos cães.

A tradicional conduta medicamentosa de doenças de pele tem sido acompanhada mais frequente e satisfatoriamente com glicocorticóides sistêmicos (SCOTT; MILLER JÚNIOR, 1994). Segundo Paradis et al. (1991), os glicocorticóides têm potentes propriedades antipruriginosas e antiinflamatórias e continuam sendo os medicamentos mais amplamente utilizados (e abusados) em dermatopatias veterinárias. Entretanto, os efeitos adversos desse tipo de tratamento podem ser devastadores, e métodos alternativos para o tratamento são constantemente pesquisados. Agentes antiinflamatórios não esteroidais, especialmente anti-histamínicos e produtos contendo ácido eicosapentanóico, recentemente têm recebido atenção considerável para suas funções em processos inflamatórios e alérgicos.

Em veterinária esses fármacos também são utilizados no transporte de pequenos animais, para combater a cinetose e provocar sedação (ADAMS, 1992). Devem ser administrados uma hora ou mais antes do movimento previsto, pois sua administração após o início das náuseas e dos vômitos raramente é benéfica (BROW; ROBERTS, 2003).



Efeitos Adversos – Os anti-histamínicos podem causar diferentes tipos de efeitos adversos, os quais podem estar relacionados: (1) ao SNC, ocasionando sedação ou excitação, tontura, zumbido, cansaço e fadiga; (2) a perturbações gastrintestinais, como anorexia, náuseas, vômitos, constipação ou diarreia, quando a administração é por via oral; e (3) à ação parassimpática, causando boca seca, dilatação pupilar e taquicardia (ANDRADE, 2002). Nas doses recomendadas são praticamente atóxicos. Na superdosagem ou em associação com substâncias potenciadoras, podem provocar hipersensibilidade e até convulsões.

O que é considerado “indesejável” irá depender, até certo ponto, da finalidade para a qual o fármaco está sendo utilizado. Quando antagonistas de receptores H_1 são utilizados por suas ações estritamente periféricas, todos os efeitos sobre o SNC são indesejáveis. Quando administrados tendo em vista as suas ações sedativas ou antieméticas, são indesejáveis alguns efeitos sobre o SNC, como tonteira e fadiga. As ações anticolinérgicas periféricas geralmente são indesejáveis (RANG et al., 2001).

2.2.1 Clemastina

A clemastina é um anti-histamínico do grupo das etanolaminas (Figura 3). Como outros anti-histamínicos, atua competindo com a histamina pelos receptores H_1 . É apresentada como fumarato de clemastina, também conhecido como fumarato de meclastina ou de mecloprodina (PLUMB, 1999). É um pó cristalino, inodoro, e levemente amarelado. Pouco solúvel em água e escassamente solúvel em álcool (THE INDEX MERCK, 1996). É um dos anti-histamínicos comumente recomendado para o manejo da doença atópica canina. Pertence à classe dos anti-histamínicos de primeira geração. A sua farmacologia em cães não é muito conhecida (HANSSON et al., 2004).

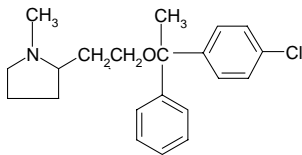


Figura 3 - Estrutura química da clemastina.

No mercado de produtos veterinários para pequenos animais, cães e gatos, o fumarato de clemastina é comercializado sob a forma de comprimidos com a denominação de Allergovet C[®], nas apresentações de 0,7 e 1,4 mg. Segundo o fabricante (Coveli Ind. e Com. Ltda, Rio de Janeiro, Brasil), a dose média recomendada é de 0,07 mg de clemastina por kg de massa corporal, podendo ser dividida em duas vezes e administrada a cada 12 horas. Já a dosagem terapêutica indicada para tratamento em cães, conforme Hansson et al. (2004), varia consideravelmente entre 0,05 a 0,1 mg/kg, duas vezes ao dia. Em alguns estudos há ainda a recomendação de 0,5 a 1,5 mg/kg. A dose para humanos é 0,025 mg/kg. Bonamin e Abel (2002) indicam dosagem terapêutica para cães variando entre 0,05-0,1 mg/kg, PO, a cada 12 horas.

Um estudo em cães apresentando dermatopatias com prurido demonstrou que mais de 60% dos animais foram beneficiados com tratamento anti-histamínico e poucos efeitos adversos foram notados (PATERSON, 1994). Dentre os medicamentos utilizados estava a clemastina, em doses variando de acordo com o porte do animal.

A clemastina é aprovada para uso em medicina humana desde a década de 60. Apesar disso, publicações sobre sua segurança e eficácia são escassas (TÖRNEKE et al., 2003). Em humanos a clemastina é quase completamente absorvida do trato gastrointestinal e apresenta uma duração de ação de cerca de 12 horas (MILLER JÚNIOR; SCOTT, 1994). Por muitos anos, os anti-histamínicos foram considerados pouco eficazes em doenças de pele com prurido em cães, entretanto, em um estudo sobre o uso de agentes antiinflamatórios em cães apresentando prurido associado a alterações dermatológicas, entre seis substâncias testadas, a clemastina demonstrou controle satisfatório do prurido em 30% dos cães, obtendo a mais alta taxa de sucesso geralmente relatada para anti-histamínicos utilizados em cães alérgicos (PARADIS et al., 1991).

Na Suécia, um estudo realizado em cães da raça Beagle utilizou fumarato de clemastina, IV, na dosagem de 0,1 mg/kg e PO na dosagem de 0,5 mg/kg, sendo que nenhum cão demonstrou sinais clínicos de efeitos adversos (HANSSON et al., 2004).

A clemastina deve ser empregada com cautela em pacientes com hipertrofia prostática, obstrução do colo vesical, insuficiência cardíaca grave, glaucoma de ângulo estreito e obstrução pieloduodenal. Testada em animais de laboratório gestantes, em dosagens até 312 vezes a terapêutica recomendada, não produziu efeitos prejudiciais em fetos, mas, como sua segurança não foi estabelecida em outras espécies, seu emprego durante a gestação deve ser cuidadosamente avaliado (PLUMB, 1999), considerando que a clemastina é excretada pelo leite. Os principais efeitos adversos incluem depressão do SNC (sedação) e efeitos anticolinérgicos, como xerostomia. A clemastina potencializa o efeito de outros depressores do SNC, como barbituratos e tranqüilizantes.

2.2.2 Pirilamina

A pirilamina ou mepiramina é um anti-histamínico do grupo das etilenodiaminas (Figura 4). Considerada um dos mais específicos antagonistas da histamina, não possui atividade atropínica significativa (BEVAN, 1979), isto é, não bloqueia as ações parassimpaticomiméticas da acetilcolina, enquanto bloqueia totalmente a ação da histamina sobre a musculatura lisa e protege o cobaio contra 80 vezes a dose letal de histamina (ROCHA E SILVA, 1969). É um antagonista H₁ competitivo (não evita a liberação de histamina) causando inibição da atividade constritora da histamina sobre a musculatura lisa não vascular, por antagonismo competitivo. Segundo Bonamin e Abel (2002), a pirilamina é o fármaco que apresenta o maior grau de especificidade sobre receptores H₁.

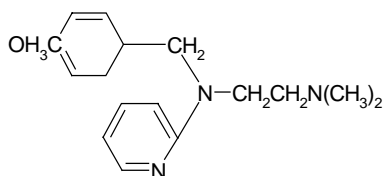


Figura 4 - Estrutura química da pirilamina.

A pirilamina é apresentada na forma de maleato de pirilamina. É um pó branco, cristalino, e solúvel na proporção de um grama para 0,5 ml de água. É encontrada no mercado de produtos veterinários com o nome comercial de Allergovet[®] (comprimidos de 50 mg), sendo que a orientação fornecida pelo fabricante (Coveli Ind. e Com. Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) é de 10 mg/kg, podendo ser a dose dividida em duas vezes e administrada via oral a cada 12 horas. Os efeitos são esperados em 20 a 45 minutos após a administração oral e a duração varia de 3 a 12 horas. Segundo Adams (1992), a dosagem terapêutica indicada para o tratamento de cães e gatos é de 1-2 mg/kg. Swinyard (1975, apud PLUMB, 1999) indica para cães a dose de 12,5 a 25 mg PO quatro vezes ao dia e 25 a 125 mg IM. O maleato de pirilamina é facilmente absorvido do trato gastrointestinal, não sendo degradado pela flora bacteriana. Seus efeitos duram de 3 a 6 horas (BONAMIN; ABEL, 2002).

Os efeitos adversos são os usuais para fármacos anti-histamínicos: depressão do SNC (sedação, potencialização de outros depressores) ou estimulação (intranquilidade, insônia, convulsões, ataxia). O tratamento consiste na suspensão do fármaco ou reajuste da dosagem, tratamento de apoio e sintomático (PLUMB, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Contribuir com conhecimentos sobre clemastina e pirilamina, fármacos utilizados como anti-histamínicos na Medicina Veterinária, visando racionalizar a escolha terapêutica.

3.2 Específicos

Comparar os dois fármacos utilizados em tratamentos anti-alérgicos através da:

- avaliação da eficácia e potência da clemastina em íleo isolado de cobaio;
- avaliação da eficácia e potência da pirilamina em íleo isolado de cobaio;
- comparação da eficácia e potência da clemastina e pirilamina com a da difenidramina, utilizada como controle, em íleo isolado de cobaio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 12 animais, machos e fêmeas, adultos, com massa corporal entre 300 e 500g, originários do Laboratório Regional de Apoio Animal – RS (LARA do MAPA). Os animais permaneceram em caixas plásticas localizadas em uma sala do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), recebendo água potável e ração comercial *ad libitum* durante o período de adaptação (7 dias). A alimentação foi suplementada com vegetais verdes, com o objetivo de suprir vitamina C, uma vez que esses animais são dependentes de fontes exógenas de ácido ascórbico (COUTO, 2002).

Antes do experimento, os animais foram submetidos a um jejum sólido de 12 horas.

4.2 Materiais e Equipamentos

Na realização dos experimentos foram empregadas as seguintes substâncias: maleato de pirilamina (Siddharth International, Mumbai, Índia; massa molecular = 401,38), fumarato de clemastina (Daiichi Pure Chemicals CO. Ltd., Tóquio, Japão; massa molecular = 443,50) fornecidas pelo Laboratório Coveli Ind. e Com. Ltda., cloridratos de histamina, difenidramina e de acetilcolina (Sigma Chemical CO). Para preparação da solução nutritiva foram usados sais PA de diversas procedências (J.T.Baker, E. Merck, Quimis e Reagen).

As soluções estoques de histamina (10^{-1} mol/L), difenidramina (10^{-2} mol/L) e acetilcolina (1 mol/L) foram preparadas mediante adição de água destilada, sendo que nas soluções de pirilamina (10^{-2} mol/L) e clemastina (10^{-3} mol/L) houve acidificação com HCl 0,01 N. Todas as soluções estoque foram conservadas em baixa temperatura (-18°C) e descongeladas à temperatura ambiente imediatamente antes dos experimentos. As diluições adicionais foram feitas em água destilada.

Como equipamentos, utilizou-se: banho-maria, bomba de circulação de água, bomba de aeração de aquário e quimógrafo DTF.

4.3 Solução Nutritiva

Foi usada solução nutritiva de Tyrode composta de: NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; CaCl₂ 0,2 g; NaH₂PO₄ 0,15 g; NaHCO₃ 1 g; MgCl₂ 0,2 g e glicose 1 g, dissolvidos em um litro de água destilada (STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY UNIVERSITY OF EDINBURGH, 1970). Esta foi preparada imediatamente antes dos experimentos.

4.4 Aparelhagem e Registro das Contrações Isotônicas

O equipamento utilizado para realização dos experimentos com órgão isolado está esquematizado na Figura 5. Consiste de uma cuba de vidro de parede dupla, no interior da qual está localizada a câmara muscular, com capacidade de 10 ml, sendo conectada a uma serpentina helicoidal por onde desloca-se a solução nutritiva. Esta serpentina helicoidal permanece banhada com água aquecida a 37°C (banho-maria equipado com termostato), a qual circula impulsionada por uma bomba de circulação. Um tubo de vidro dobrado em “L” conectado com uma bomba de ar proporciona aeração da solução nutritiva e a fixação do órgão isolado no fundo da câmara muscular. A outra extremidade do órgão é fixada a uma alavanca isotônica interfixa por meio de um fio de algodão, permitindo o registro das contrações manifestadas pelo órgão no papel esfumado fixo ao cilindro de um quimógrafo. Os braços da alavanca são ajustados a fim de obter uma ampliação de 6 vezes (18 x 3 cm) e submeter o órgão a uma tensão de 1 g. A solução nutritiva depositada em um frasco de Mariotte alcança a câmara muscular através de uma mangueira de silicone e da serpentina helicoidal que propicia o seu aquecimento a temperatura desejada (STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY UNIVERSITY OF EDINBURGH, 1970).

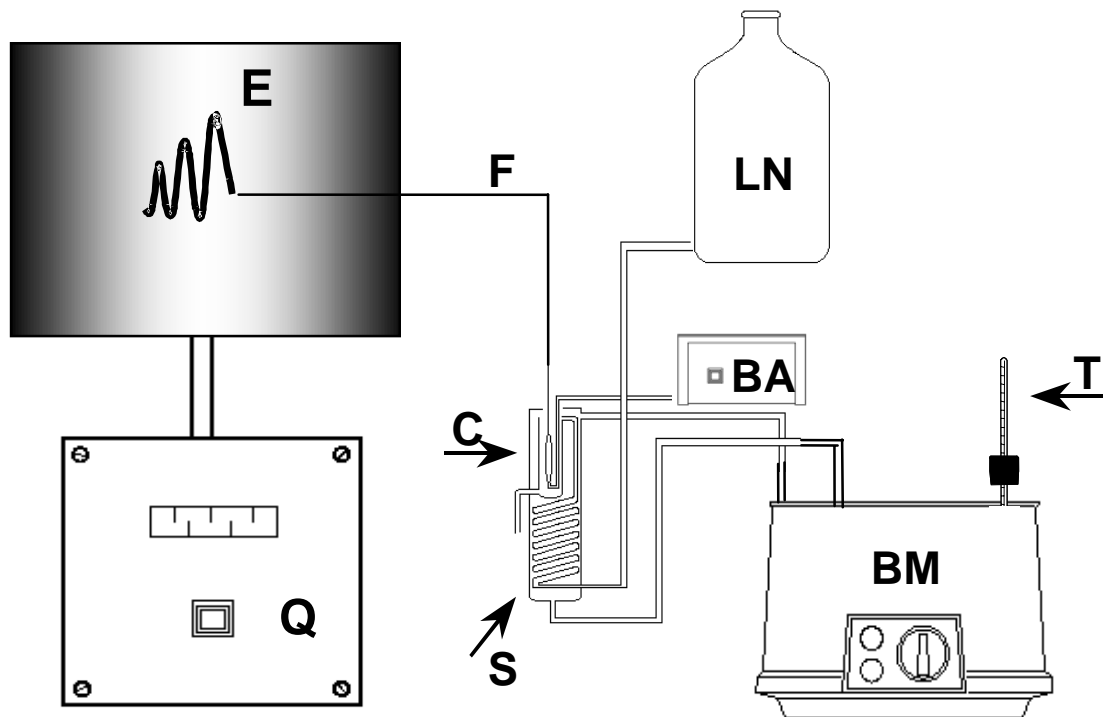


Figura 5. Representação esquemática da aparelhagem usada na experimentação farmacológica com músculo liso isolado. LN= frasco de Mariotte contendo a solução nutritiva, BA = bomba de ar, BM = banho maria com termostato, T = termômetro, S = serpentina, C = cuba de vidro. O registro das contrações foi feito por meio de uma alavanca de inscrição tangencial (F) em papel esfumado (E), fixado em cilindro de quimógrafo (Q) (DA SILVA, 1999).

4.5 Isolamento e Montagem dos Órgãos

Após sacrifício dos animais por concussão cervical seguida de exangüinação por seccionamento dos vasos cervicais (HARKNESS; WAGNER, 1993), através de ampla abertura da cavidade abdominal, procedeu-se à identificação, isolamento e retirada de aproximadamente 10 cm da porção distal do íleo, tomando-se cuidado para não ocorrer demasiada distensão do mesmo (CARLINI, 1973). Este segmento foi transferido imediatamente para um recipiente contendo solução nutritiva aquecida a 37°C, realizando-se a dissecação para remover o mesentério adjacente. O segmento retirado foi lavado

internamente com uma pipeta volumétrica de 10 ml contendo Tyrode aquecido a 37°C (as extremidades manipuladas foram desprezadas). Selecionou-se um segmento menor, de dois ou três cm de comprimento, e, com o auxílio de agulha cirúrgica curva, atraumática, redonda e fina amarrou-se um fio de algodão em cada extremidade, tomando-se cuidado para que cada nó abrangesse as duas paredes do intestino. Durante a manipulação evitou-se distender o íleo e foi necessário mantê-lo sempre úmido com Tyrode. Um dos fios serviu para fixar o íleo no fundo da cuba, preso à haste de vidro, e o fio da outra extremidade foi amarrado à alavanca destinada a registrar as contrações musculares.

Decorridos 20 minutos, tempo necessário para o relaxamento e a estabilização do íleo na solução nutritiva, iniciou-se o desenvolvimento do protocolo experimental.

4.6 Curvas Concentração–Efeito Obtidas pelo Método das Doses Cumulativas

A técnica foi descrita por van Rossum e van den Brink (1963). Consiste em adicionar cumulativamente a(s) substância(s) à câmara muscular, isto é, adicionar doses crescentes (usualmente se utiliza o fator 3,3) (Tabela 2), iniciando com uma concentração que não produza contração e continuando até alcançar o efeito máximo (quando o efeito contrátil adicional for desprezível em relação à quantidade de substância adicionada) sem lavar o órgão. Neste momento o quimógrafo é desligado e a solução nutritiva em contato com a preparação é imediatamente substituída (lavagem da preparação). Durante o experimento é importante manter regularidade no tempo de repouso do órgão (tempo entre a construção de cada curva concentração-efeito - CCE) e no número de trocas da solução nutritiva (a lavagem deve ser repetida em número constante de vezes).

Os resultados das CCE são expressos em valores de afinidade relativa de agonista (pD_2) e efeito máximo ($E_{máx}$).

Tabela 2 – Exemplo do cálculo da concentração do fármaco em experimento hipotético.

Concentração do fármaco no tubo de ensaio (mol/L)	Volume pipetado (ml)	Concentração no banho (mol/L)	Concentração final (mol/L)	-(log dose)
10^{-5}	0,01	10^{-8}	10^{-8}	8,0
	0,02	$2 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$	7,5
	0,07	$7 \cdot 10^{-8}$	$10 \cdot 10^{-8} = 10^{-7}$	7,02
10^{-4}	0,02	$2 \cdot 10^{-7}$	$3 \cdot 10^{-7}$	6,5
	0,07	$7 \cdot 10^{-7}$	$10 \cdot 10^{-7} = 10^{-6}$	6,0

Os volumes pipetados (ml) de cada tubo permitem as concentrações crescentes no banho.

4.7 Método dos Parênteses (*bracketing*)

Esta técnica designa um dos métodos empregados no estudo do mecanismo de ação de fármacos para minimizar as diferenças entre agonistas, decorrentes de eventuais alterações de sensibilidade da preparação farmacológica no decorrer do experimento (FURCHGOTT, 1967). Consiste na alternância de CCE dos dois agonistas na mesma preparação. Assim, as CCE obtidas ficam precedidas e sucedidas de curvas do mesmo agonista.

4.8 Protocolo Experimental

A sensibilidade das preparações foi medida através de CCE cumulativas para histamina e acetilcolina, repetidas em intervalos regulares de 20 minutos.

O órgão foi montado e deixado em repouso por vinte minutos, para estabilização e relaxamento. A próxima etapa envolveu a obtenção de duas CCE completas para acetilcolina (ACh) e histamina, em intervalos de 20 minutos, sendo realizadas três lavagens do órgão com a solução de Tyrode durante estes intervalos. Quando as curvas eram semelhantes entre si em relação à afinidade e ao efeito máximo, passava-se a obter as CCE experimentais. Neste caso, acrescentava-se ao banho as soluções de maleato de pirilamina, fumarato de clemastina ou cloridrato de difenidramina na menor concentração (escolhida previamente em experimento piloto), e deixava-se incubado por 20 minutos. Após este

intervalo, obtinha-se CCE para cada um dos agonistas na presença do antagonista. Foram usadas pelo menos três concentrações de antagonista em cada preparação.

As contrações produzidas foram medidas pela amplitude em milímetros (mm) em cada ensaio e calculadas as CCE médias na ausência (controle) e na presença de cada concentração de cada anti-histamínico, sendo construídos gráficos relacionando as concentrações do agonista nas abcissas e as contrações obtidas (em mm ou em % do $E_{m\acute{a}x}$ da CCE controle) nas ordenadas para a visualização da influência dos anti-histamínicos H_1 sobre a contração do órgão.

4.9 Variáveis Farmacológicas Avaliadas

Foram avaliados o efeito máximo em milímetros ($E_{m\acute{a}x}$), dose eficaz 50 (CE_{50}), afinidade intrínseca dos agonistas (pD_2), afinidade antagonista competitiva (pA_2) e afinidade relativa do antagonista não-competitivo (pD'_2).

4.10 Determinação da Concentração Eficaz 50 (CE_{50})

A CE_{50} é definida como a concentração que provoca 50% do efeito máximo da preparação para o agonista em estudo. A CE_{50} foi determinada graficamente, através da interseção no eixo das abcissas, da perpendicular a esse eixo que corta a curva no ponto correspondente a metade do efeito máximo. Para determinar a CE_{50} foi calculado o antilogaritmo do pD_2 .

4.11 Determinação da Afinidade do Agonista (pD_2)

O pD_2 corresponde ao logaritmo negativo da concentração que produz 50% do efeito máximo (CE_{50}), calculado pela equação:

$$pD_2 = \frac{1}{\log CE_{50}} = -\log CE_{50}$$

No presente trabalho, o valor de pD_2 foi obtido através do método gráfico a partir da concentração do agonista que produziu 50% do efeito máximo (CE_{50}) para cada curva experimental. Para isso, foram construídas CCE lançando-se, na ordenada, os valores de

efeito (em milímetros ou percentual de efeito máximo) e, na abcissa, os logaritmos das concentrações. Para determinar o pD_2 foi preciso: (a) construir a CCE experimental completa, (b) traçar os gráficos em papel milimetrado, relacionando, na abcissa o logaritmo das concentrações e, na ordenada, o efeito, e (c) calcular o pD_2 pela intersecção, no eixo das abcissas, da perpendicular tirada da curva no ponto correspondente à metade do efeito máximo.

4.12 Determinação da Afinidade do Antagonista (pA_2)

O valor de pA_2 é a concentração molar de antagonista que desloca a CCE para a direita em um fator 2 e representa a afinidade intrínseca relativa do antagonista. O valor de pA_2 foi determinado através da análise de regressão linear a partir dos dados obtidos nas CCE através do gráfico de Schild, de acordo com a equação:

$$\log (DR-1) = \log [B] - \log K_B$$

onde DR é a relação potência que corresponde à diferença entre os valores de pD_2 antes e após incubação com as soluções ($DR = 10^{(pD_2 \text{ c/ antagonista} - pD_2 \text{ controle})}$), respectivamente; [B] é a concentração molar do antagonista em equilíbrio com o receptor; K_B é a constante de dissociação do complexo antagonista-receptor. Quando a relação de potência (DR) for igual a duas unidades tem-se: $\log [B] = -\log K_B$. Este último, por definição, constitui o pA_2 .

Lançando-se em gráfico cartesiano os valores de $\log (DR-1)$ na ordenada e $-\log K_B$ na abcissa, os pontos distribuem-se ao longo de uma reta cuja inclinação deve ser próxima a 1,0 se o antagonismo for do tipo competitivo (FURCHGOTT, 1972).

4.13 Determinação da Afinidade do Antagonista não-competitivo (pD'_2)

Se o antagonismo é do tipo não-competitivo, as CCE apresentam diminuição do efeito máximo, porém, não há deslocamento para a direita. O pD'_2 corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que produz uma redução de 50% do efeito máximo.

O valor de pD'_2 pode ser determinado através de modificação no gráfico de Schild. A modificação consiste em relacionar o $\log (ER-1)$ na ordenada, onde ER é a relação dos

efeitos máximos obtidos na ausência e na presença do antagonista ($ER = E_{máx}controla/E_{máx}antagonista$), respectivamente. Pode ser expressa através da equação:

$$\text{Log}(ER-1) = \log[B'] - \log K'_B$$

Nesta equação B' representa a concentração molar do antagonista não-competitivo e K'_B a constante de dissociação deste antagonista não-competitivo. Este último corresponde ao pD'_2 .

4.14 Análise Estatística

A análise estatística das variáveis farmacológicas foi feita com auxílio do teste ANOVA de uma via no programa SPSS 8.0 da Microsoft[®], seguido de teste de Bonferroni. Foram consideradas significativas diferenças com $P < 0,05$. Os cálculos das retas de regressão, coeficientes de correlação e demais variáveis foram feitos com auxílio do programa Microsoft[®] Excel 97[®].

5 RESULTADOS

5.1 Clemastina

As curvas concentração-efeito (CCE) de histamina obtidas na presença de clemastina foram deslocadas para a direita de forma concentração dependente, mas não as da ACh (Figura 6). As concentrações de clemastina 10^{-7} e 10^{-6} mol/L reduziram significativamente ($P < 0,05$; ANOVA, Bonferroni) o efeito máximo e deslocaram as CCE da histamina para a direita, resultando na diminuição do valor de pD_2 (Tabela 3). As concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} mol/L não alteraram significativamente ($P > 0,05$; ANOVA, Bonferroni) as CCE de acetilcolina ($E_{máx}$ e pD_2), mas a concentração de 10^{-6} reduziu o $E_{máx}$ e o valor de pD_2 (Tabela 3). A diminuição do pD_2 da histamina alcançou 1,05 unidades correspondendo a dessensibilização de 11,2 vezes e de 1,19 unidades de pD_2 da ACh equivalente a dessensibilização de 15,5 vezes. A clemastina reduziu o $E_{máx}$ da histamina e na concentração de 10^{-6} mol/L também reduziu o $E_{máx}$ da ACh. As variáveis pA_2 e pD'_2 expressam numericamente a afinidade do antagonista em deslocar as CCE para a direita ou reduzir o seu efeito máximo, respectivamente (pA_2 equivale a concentração de antagonista competitivo em mol/L necessária para deslocar a CCE do agonista num fator 2 para a direita - na prática significa que para obter o mesmo efeito é necessário o dobro da quantidade de agonista; pD'_2 equivale a concentração de antagonista necessária para reduzir a metade o $E_{máx}$ do agonista). O cálculo de pA_2 é realizado por meio do método de Schild e o cálculo do pD'_2 pelo método de Schild-modificado. A Figura 7 apresenta a aplicação destes dois métodos às CCE obtidas com histamina e ACh representadas na Figura 6. No gráfico de Schild verifica-se uma boa relação entre os aumentos nas concentrações de clemastina e o fator $\log(DR-1)$ para ambos os agonistas (fator de correlação r^2 de 0,9455 contra a histamina e 0,9989 contra a ACh). O cálculo do valor de pA_2 revela que a clemastina foi um antagonista competitivo ligeiramente mais potente contra a histamina (o pA_2 calculado a partir da reta de regressão $y = 1,2775x + 10,596$ foi de 8,63) do que contra a ACh ($pA_2 = 7,48$). Esta diferença de 1,15 unidades entre os valores de pA_2 permite concluir que a clemastina é pelo menos 14 vezes mais potente contra a histamina do que contra a ACh no antagonismo competitivo (Tabela 4). Como a clemastina também reduziu o $E_{máx}$ (Figura 6), pode-se calcular o pD'_2 pelo método de Schild-modificado (Figura 7). Os valores calculados a partir das equações representadas na

Figura 7 para histamina e ACh são respectivamente 7,87 e 5,66, uma diferença de 2,21 unidades de pD'_2 equivalendo a uma diferença de potência de 162 vezes (Tabela 4).

Tabela 3 - Valores médios de $E_{máx}$ e de $pD_2 \pm epm$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de clemastina. Média de 5 experimentos, no mínimo.

Agonista	Concentração de clemastina (mol/L)	Efeito máximo (mm)	pD_2
Histamina	0 (controle)	80,8 ± 9,5	6,31 ± 0,57
	10 ⁻⁸	60,6 ± 8,4	5,93 ± 0,74
	10 ⁻⁷	39,0* ± 10,2	5,52* ± 0,53
	10 ⁻⁶	9,9* ± 6,6	5,26* ± 0,57
Acetilcolina	0 (controle)	87,4 ± 8,2	7,44 ± 0,12
	10 ⁻⁸	85,9 ± 8,1	7,24 ± 0,12
	10 ⁻⁷	85,2 ± 11,0	7,23 ± 0,25
	10 ⁻⁶	56,3* ± 10,5	6,25* ± 0,22

* $P < 0,05$ ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni (diferença significativa em relação ao grupo controle).

Tabela 4 - Valores de pA_2 e pD'_2 de clemastina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 7 e respectivas relações de potência entre as variáveis calculadas.

	pA_2	Relação de potência	pD'_2	Relação de eficácia
Histamina	8,63	14,1	7,87	162,2
Acetilcolina	7,48	1	5,66	1

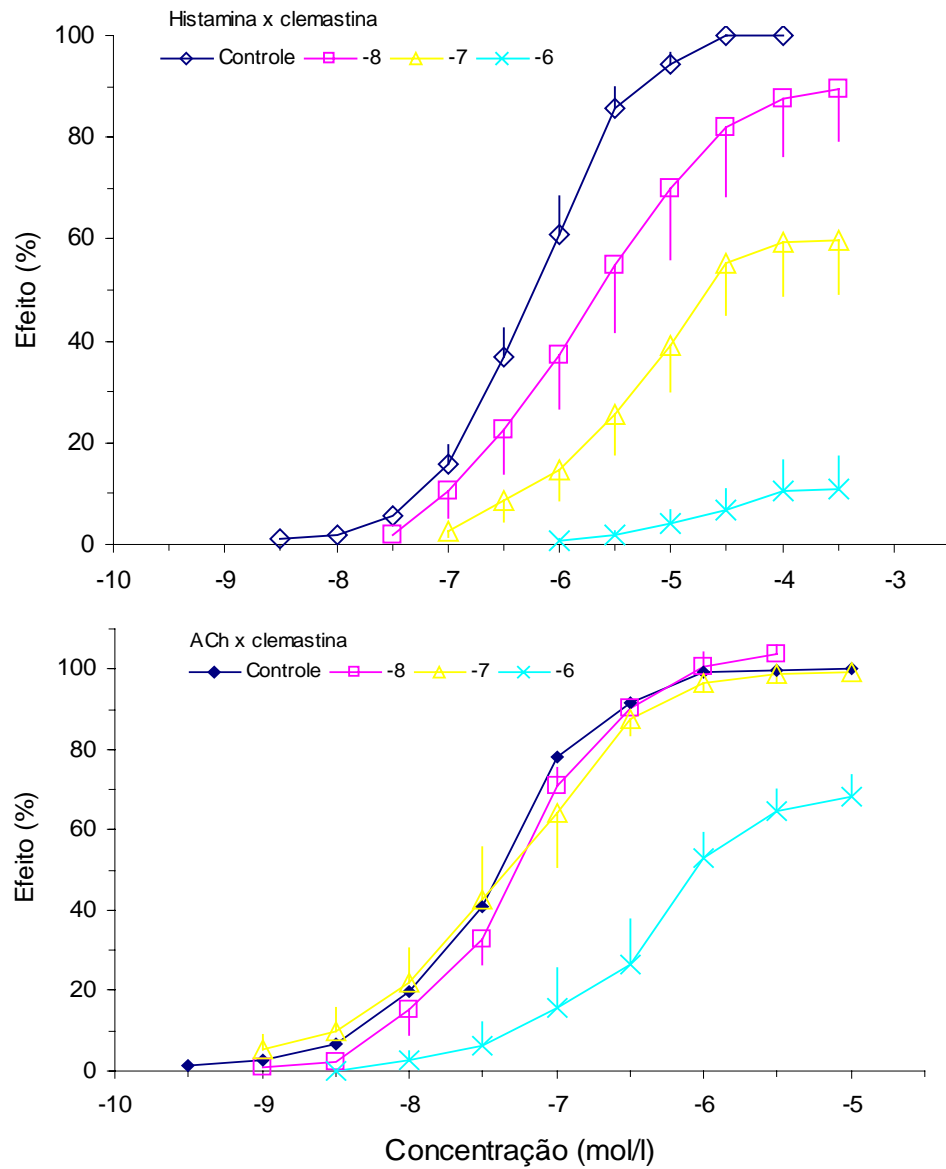


Figura 6 - CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de clemastina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm.

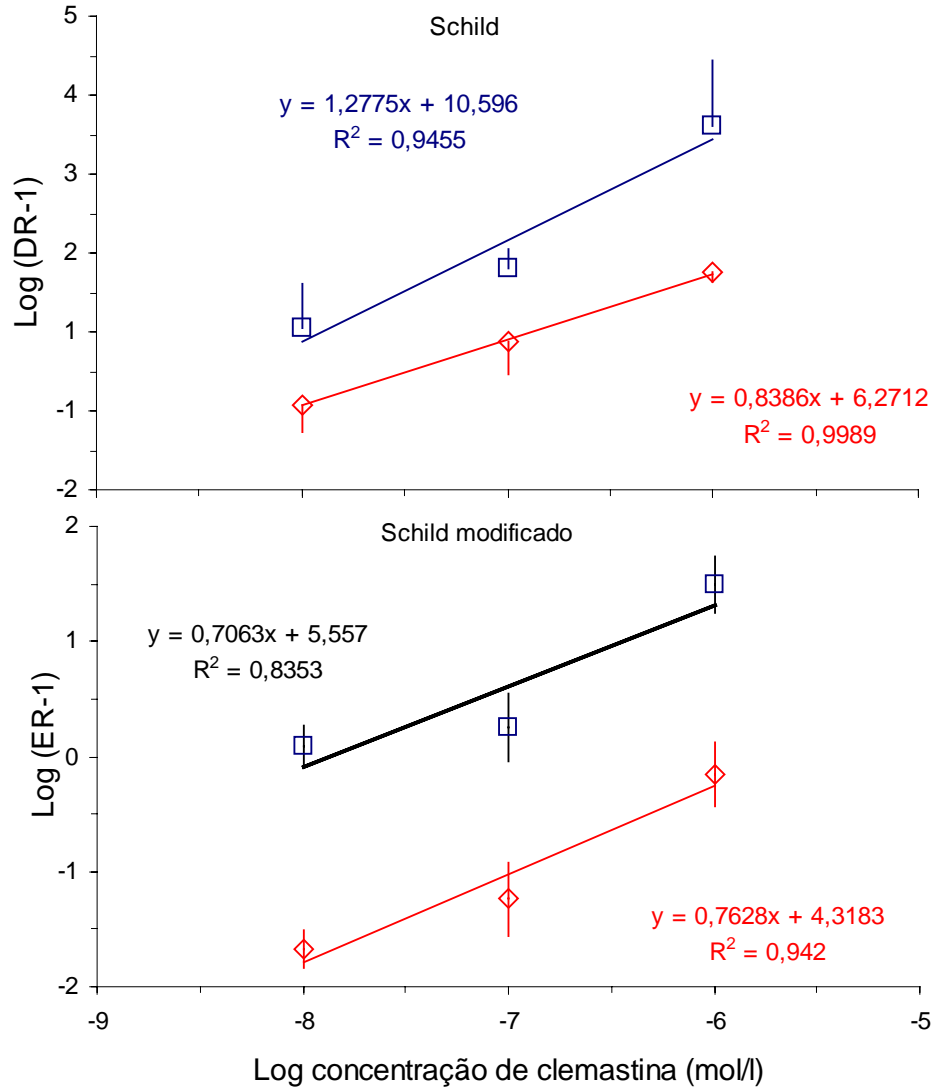


Figura 7 - Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de clemastina, representadas na Figura 6. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. Em ambos os gráficos os pontos obtidos para histamina e acetilcolina mostram correlações positivas, sugerindo que a clemastina atua como antagonista contra ambos os agonistas, mas as posições relativas das retas merecem uma análise mais pormenorizada (vide texto).

5.2 Pirilamina

As curvas concentração-efeito (CCE) obtidas com histamina na presença de pirilamina foram deslocadas para a direita de forma concentração dependente, sendo que as concentrações de pirilamina de 10^{-8} e 10^{-7} mol/L não alteraram significativamente o efeito máximo (Tabela 5; Figura 8). As concentrações de 10^{-6} e 10^{-5} mol/L produziram redução significativa ($P < 0,05$; ANOVA, Bonferroni) (Tabela 5). Todas as concentrações usadas reduziram o valor de pD_2 (Tabela 5), mas a redução só alcançou significado estatístico na concentração de 10^{-5} mol/L. O $E_{máx}$ das CCE de acetilcolina não foram afetadas significativamente pela pirilamina até a concentração de 10^{-6} mol/L, sendo que não houve alteração de pD_2 (Tabela 5). A diferença de 1,48 unidades entre os valores de pD_2 da histamina controle (6,85) e o obtido na presença de 10^{-5} mol/L de pirilamina (5,37) indica uma dessensibilização de 30,2 vezes (antilog de 1,48). Os valores de pD_2 da ACh não foram afetados significativamente pela pirilamina. Apesar da concentração de 10^{-6} mol/L de pirilamina não ter afetado o $E_{máx}$ da ACh, ela foi capaz de reduzir em quase 50% o $E_{máx}$ da histamina. A concentração de 10^{-5} mol/L de pirilamina reduziu o $E_{máx}$ de ambos os agonistas testados.

A Figura 9 apresenta os gráficos de Schild e Schild-modificado para as CCE de histamina e ACh frente a pirilamina. No gráfico de Schild verifica-se uma boa relação entre os aumentos nas concentrações de pirilamina e o fator log (DR-1) quando o agonista é a histamina resultando num fator de correlação r^2 de 0,7799, mas não para a ACh ($r^2 = 0,1218$) confirmando a especificidade da pirilamina contra a histamina. O cálculo do valor de pA_2 com a equação interpolada para os resultados da histamina revela o valor de 7,61, o que indica que esta concentração em mol/L é a necessária para reduzir à metade a sensibilidade dos receptores histamínicos no íleo nas condições experimentais usadas. No gráfico de Schild-modificado não se observaram diferenças do efeito da pirilamina contra os dois agonistas: as regressões são equivalentes e os valores de pD'_2 calculados são semelhantes: 5,61 (para histamina) e 5,36 (para acetilcolina). Relação de potência só pode ser calculada para o componente não competitivo (Tabela 6).

Tabela 5 - Valores médios de $E_{\text{máx}}$ e de $pD_2 \pm \text{epm}$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de pirilamina. Média de 5 experimentos, no mínimo.

Agonista	Concentração de pirilamina (mol/L)	Efeito máximo (mm)	pD_2
Histamina	0 (controle)	76,1 ± 14,2	6,85 ± 1,13
	10 ⁻⁸	86,5 ± 10,7	6,43 ± 0,74
	10 ⁻⁷	75,3 ± 12,3	5,59 ± 0,78
	10 ⁻⁶	48,1* ± 10,0	5,53 ± 0,65
	10 ⁻⁵	32,0* ± 8,1	5,37* ± 0,91
ACh	0 (controle)	86,0 ± 11,1	7,31 ± 0,15
	10 ⁻⁸	78,0 ± 11,1	7,37 ± 0,16
	10 ⁻⁷	90,7 ± 13,3	7,36 ± 0,22
	10 ⁻⁶	77,8 ± 12,7	7,54 ± 0,22
	10 ⁻⁵	32,4* ± 8,3	7,57 ± 0,25

* $P < 0,05$ ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni (diferença significativa em relação ao grupo controle).

Tabela 6 - Valores de pA_2 e pD'_2 de pirilamina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 9 e relação de potência entre os pD'_2 .

	pA_2	Relação de potência	pD'_2	Relação de eficácia
Histamina	7,61		5,61	1,78
Acetilcolina	(1)		5,36	1

(1) O valor de pA_2 da ACh não pode ser calculado pela inexistência de correlação significativa.

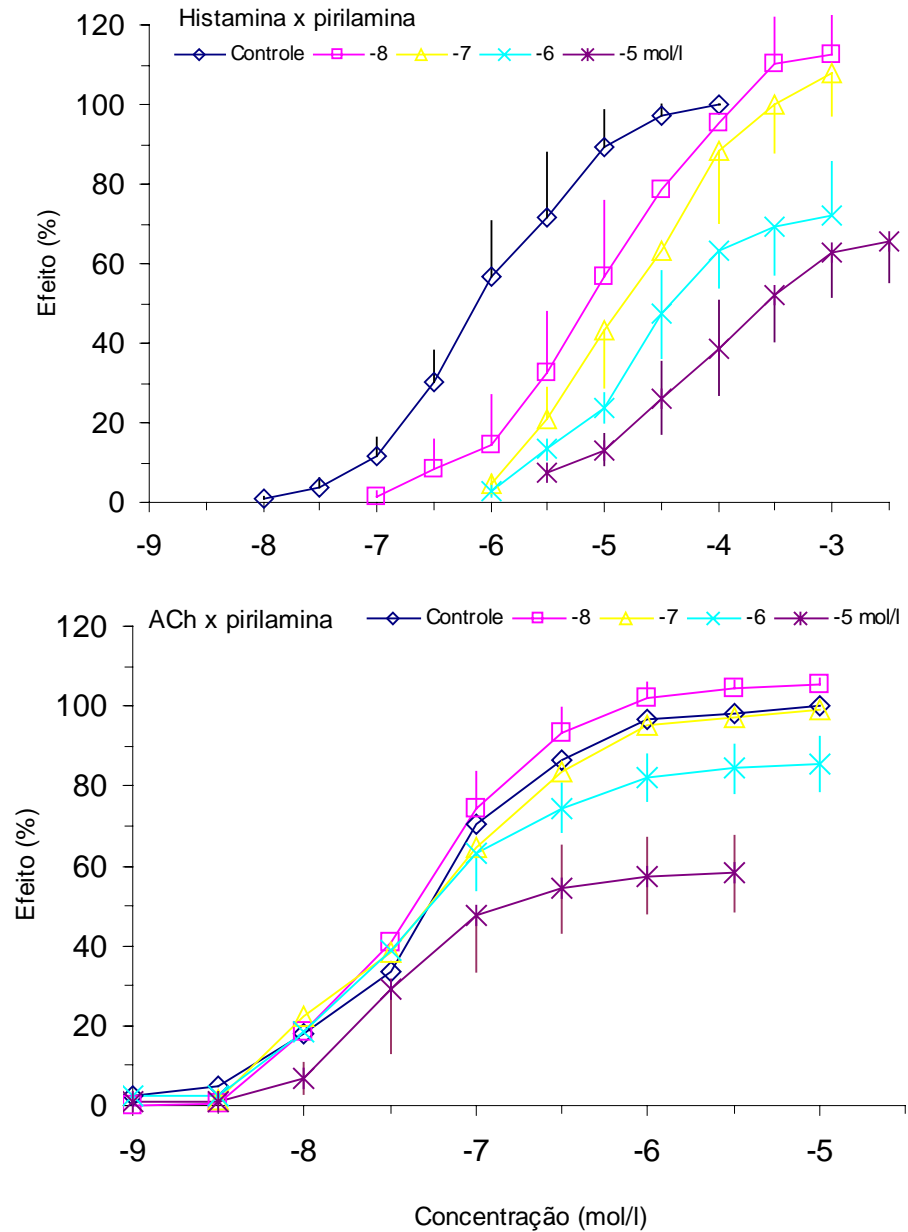


Figura 8 - CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de pirilamina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm.

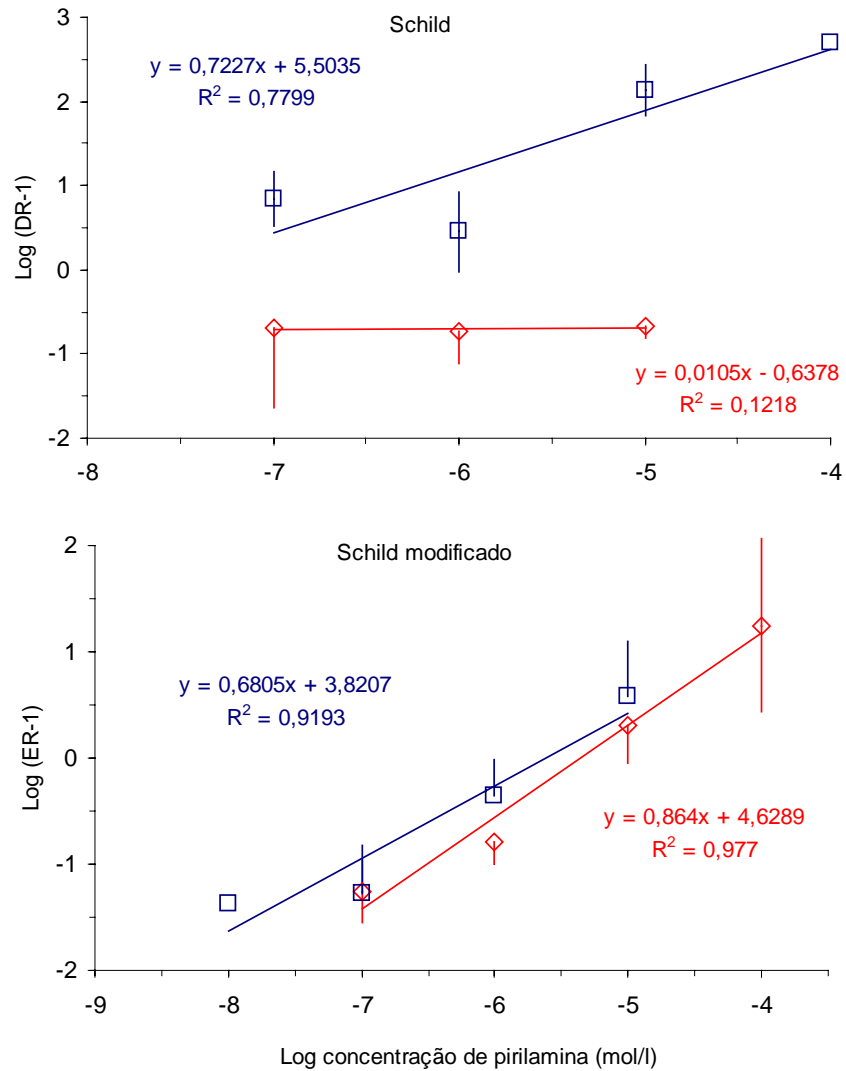


Figura 9 - Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de pirilamina, representadas na Figura 8. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. No gráfico de Schild os pontos obtidos para histamina mostram correlação positiva ($r^2 = 0,7799$), indicando que a pirilamina atua como antagonista competitivo contra este agonista, o que não se observa quando o agonista foi a acetilcolina.

5.3 Difenidramina

A difenidramina foi utilizada como um controle adicional do efeito de anti-histamínico sobre as CCE de ACh e histamina no íleo isolado de cobaio. As CCE de histamina obtidas na presença de difenidramina foram deslocadas para a direita gradualmente já a partir da concentração de 10^{-8} mol/L e progressivamente até a maior concentração usada, 10^{-5} mol/L (Figura 10). As CCE de ACh praticamente não foram afetadas pela presença de difenidramina nas concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} mol/L, revelando a menor suscetibilidade (Figura 10). A concentração de difenidramina de 10^{-6} mol/L deslocou a CCE de ACh numa proporção equivalente à metade do deslocamento produzido pela concentração de 10^{-8} mol/L na CCE de histamina (Figura 10). Estes deslocamentos podem ser quantificados a partir da análise da Tabela 7: mensurado pelas diferenças de pD_2 o deslocamento da histamina correspondeu a 0,95 unidades de pD_2 (6,79 – 5,84), estatisticamente significativo ($P < 0,05$; ANOVA, Bonferroni), enquanto o da ACh foi de 0,52 unidades (7,20 - 6,68; não significativo no mesmo teste estatístico). Estes valores correspondem a dessensibilizações de 8,9 e 3,3 vezes, respectivamente. Somente com concentração 1000 vezes maior (10^{-5} mol/L) é que a difenidramina começa a afetar significativamente o $E_{máx}$ das CCE de histamina e ACh (Tabela 7), isto é, passa a revelar um efeito não competitivo. Nesta concentração, 10^{-5} mol/L, o deslocamento da CCE da histamina alcança 2,5 unidades de pD_2 enquanto o da ACh alcança 0,94 unidades, equivalendo a dessensibilizações de 316 e 8,7 vezes respectivamente. Esta diferença na seletividade da difenidramina reflete-se nas representações gráficas de Schild e Schild-modificado (Figura 11). Os valores de pA_2 calculados para a histamina e ACh foram, respectivamente, 7,74 e 6,98 indicando que a difenidramina foi 5,8 vezes mais potente contra a histamina (Tabela 8). Os valores de pD'_2 foram de 5,78 e 4,60 respectivamente para histamina e ACh (Tabela 8).

Tabela 7 - Valores médios de $E_{\text{máx}}$ e de $pD_2 \pm \text{epm}$ calculados a partir de CCE cumulativas de histamina e acetilcolina obtidas em íleo isolado de cobaio pelo método dos parênteses a intervalos de 20 minutos na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de difenidramina. Média de 5 experimentos, no mínimo.

Agonista	Concentração de difenidramina (mol/L)	Efeito máximo (mm)	pD_2
Histamina	0 (controle)	84,2 ± 13,9	6,79 ± 0,35
	10 ⁻⁸	85,6 ± 10,8	5,84* ± 0,24
	10 ⁻⁷	91,2 ± 11,0	5,92 ± 0,52
	10 ⁻⁶	92,4 ± 16,0	4,74* ± 0,16
	10 ⁻⁵	42,3* ± 14,0	4,29* ± 0,05
ACh	0 (controle)	99,3 ± 8,0	7,20 ± 0,10
	10 ⁻⁸	95,2 ± 6,3	7,49 ± 0,22
	10 ⁻⁷	98,2 ± 7,6	7,31 ± 0,24
	10 ⁻⁶	92,8 ± 8,0	6,68 ± 0,21
	10 ⁻⁵	39,0* ± 3,0	6,26* ± 0,25

* $P < 0,05$ ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni (diferença significativa em relação ao grupo controle).

Tabela 8 - Valores de pA_2 e pD'_2 de difenidramina calculados das equações de Schild e Schild-modificado representadas na Figura 11 e respectivas relações de potência entre as variáveis calculadas.

	pA_2	Relação de potência	pD'_2	Relação de eficácia
Histamina	7,74	5,8	5,78	15,1
Acetilcolina	6,98	1	4,60	1

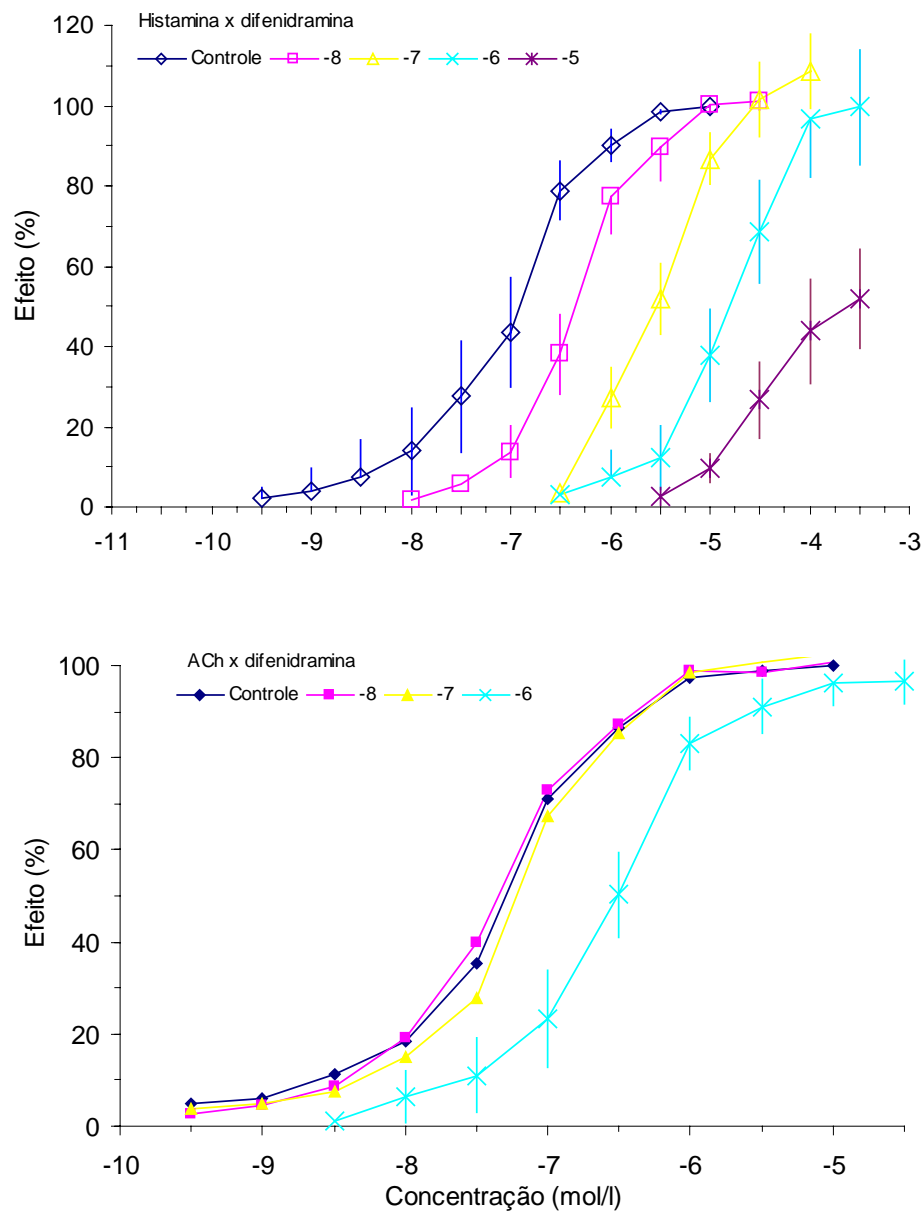


Figura 10 - CCE obtidas com histamina e acetilcolina pelo método das doses cumulativas em íleo isolado de cobaio na ausência (controle) e na presença de concentrações crescentes de difenidramina, conforme a legenda. As CCE de histamina são deslocadas para a direita de forma concentração dependente, o que não se observa nas CCE obtidas com acetilcolina. Média de 5 experimentos no mínimo. As linhas verticais nas CCE representam o epm.

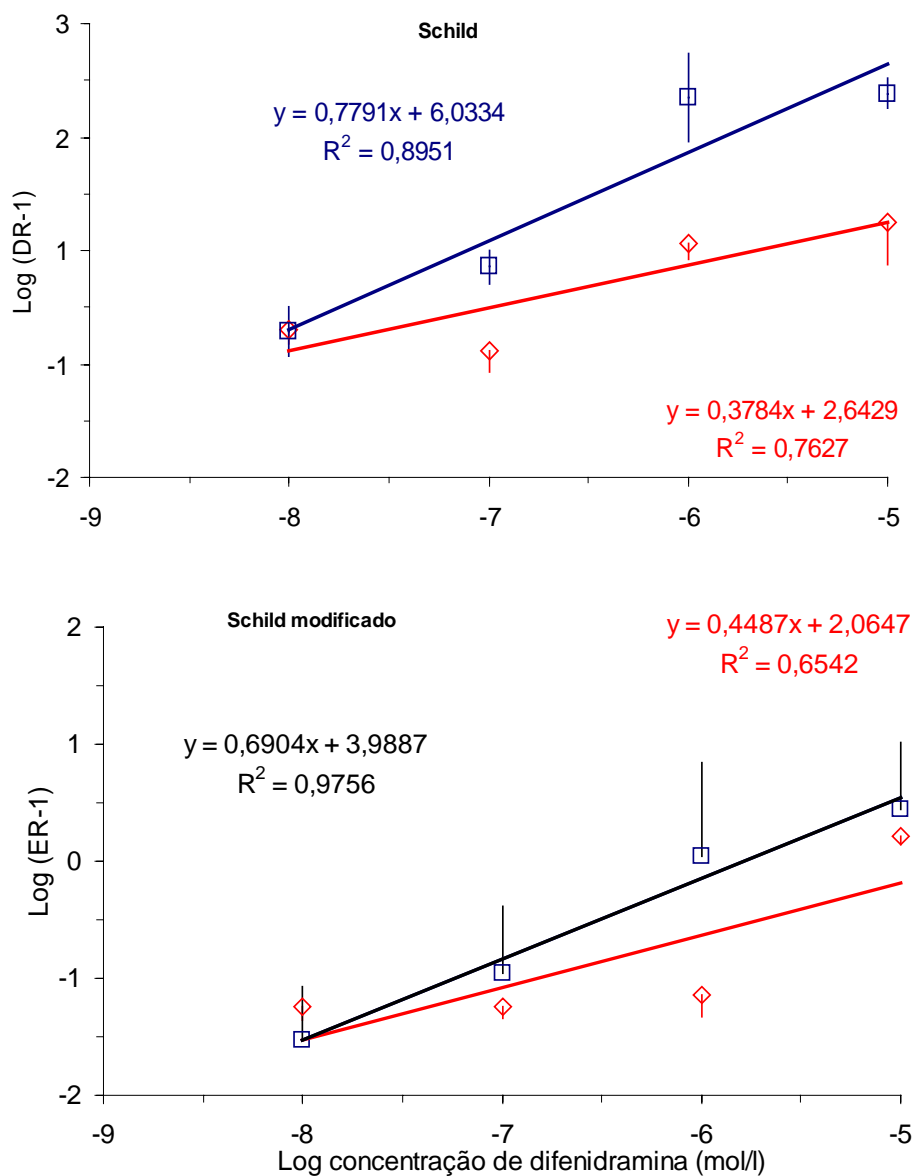


Figura 11 - Gráficos de Schild e Schild-modificado obtidos para as variáveis calculadas das CCE de histamina (□) e acetilcolina (◇) na presença de concentrações crescentes de difenidramina, representadas na Figura 10. As retas foram interpoladas pelo método dos mínimos quadrados no programa Excel/Microsoft com as equações que as descrevem apresentadas junto de cada reta. No gráfico de Schild os pontos obtidos para histamina mostram correlação positiva ($r^2 = 0,8951$), indicando que a difenidramina atua como antagonista competitivo contra este agonista, o que não se observa quando o agonista foi a acetilcolina.

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados deste trabalho confirmaram que pirilamina, clemastina e difenidramina (usada como controle) efetivamente atuam como anti-histamínicos no íleo isolado de cobaio. O efeito principal foi competitivo, mas nas maiores concentrações empregadas os três fármacos se revelaram também não competitivos. Dentre os resultados destaca-se a maior afinidade da clemastina ($pA_2 = 8,63$) contra os efeitos da histamina em comparação com os da pirilamina (7,61) e difenidramina (7,74). O mesmo antagonista também foi mais potente antagonista não-competitivo ($pD'_2 = 7,87$) contra a histamina do que pirilamina (5,61) e difenidramina (5,78).

A perda de especificidade como antagonista competitivo, tornando-se também não competitivo, ocorreu com os três fármacos nas concentrações mais elevadas. Estes também perderam a especificidade contra a histamina e terminaram por apresentar um significativo efeito contra a acetilcolina. Segundo Lülmann e Mohr (2004), esta redução na especificidade dos fármacos utilizados já era esperada, pois nenhum fármaco atua com total especificidade. Assim, os antagonistas da histamina – embora se possa demonstrar que tenham maior afinidade por receptores histamínicos do que por outros sítios – produzem numerosos efeitos, como sedação e prevenção de vômitos, que não parecem depender do antagonismo histamínico. Para Rang et al. (2001) quanto menor a potência de um fármaco e maior a dose necessária, maior será a probabilidade de que outros sítios de ação, que não o primário, tenham importância. Em termos clínicos, isto está freqüentemente associado ao aparecimento de efeitos adversos não desejados, dos quais nenhum fármaco está livre.

Além disso, os receptores H_1 e os receptores muscarínicos estão acoplados à proteína G e possuem em torno de 45% de semelhança na seqüência da proteína G acoplada, o que pode explicar os efeitos adversos colinérgicos de muitos anti-histamínicos (MERK, 2001), e conseqüentemente, esta perda de especificidade.

Em função da maior potência e eficácia atribuída a clemastina em relação a pirilamina e difenidramina, é possível confirmar a menor dosagem de clemastina utilizada na clínica veterinária em comparação a dosagem dos demais fármacos. A dosagem proposta pelo laboratório COVELI é de 0,07 mg/kg, PO, para a clemastina e 10 mg/kg, PO, para a pirilamina, o que corresponde a uma diferença de “potência” de 142,9 vezes. A diferença de dosagem destes dois anti-histamínicos segundo outros autores também é acentuada

(0,05-0,1 mg/kg de clemastina, PO, a cada 12 horas – BONAMIN; ABEL, 2002 e 1-2 mg/kg de pirilamina - ADAMS, 1992).

Entretanto, devemos considerar a baixa biodisponibilidade oral da clemastina, pois, segundo Hansson et al. (2004), a dosagem recomendada para se alcançar concentrações terapêuticas deste fármaco deveria ser de 1 mg/kg, duas vezes ao dia ou mais. Isto pode significar que a diferença entre as dosagens de clemastina e pirilamina para cães e gatos pode não estar relacionada com as diferenças de potência e eficácia detectadas neste trabalho, mas sim devido a diferenças nas taxas farmacocinéticas (absorção, distribuição, biotransformação e excreção).

O efeito competitivo caracteriza-se pelo deslocamento das curvas concentração-efeito (CCE) para a direita (ao longo do eixo das concentrações) sem comprometimento significativo do efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$), enquanto o efeito não competitivo é caracterizado pela diminuição do $E_{m\acute{a}x}$ sem deslocamento significativo das CCE (ROCHA E SILVA, 1969). Os três fármacos deslocaram as CCE de histamina para a direita. Comparando o deslocamento produzido por uma concentração equimolar (por exemplo, 10^{-6} mol/L) obteve-se 1,32 unidades de pD_2 para a pirilamina; 1,05 para a clemastina e 2,05 para a difenidramina. Transformando estas unidades em antilog obtém-se que a pirilamina produziu um antagonismo de 20,9 vezes; a clemastina de 11,2 e a difenidramina de 112 vezes. Este resultado poderia justificar porque a difenidramina ainda é o anti-histamínico de primeira geração mais comumente utilizado nos Estados Unidos. Além disso, apresenta baixo custo e é vendido sem prescrição médica (BENDER et al., 2003).

A mesma comparação, concentração equimolar 10^{-6} mol/L, feita para os deslocamentos provocados sobre as CCE de ACh revelou os valores: -0,23 para a pirilamina; 1,19 (15,5 vezes) para clemastina e 0,52 para difenidramina (3,3 vezes). Desta análise pode-se concluir que a difenidramina e a pirilamina foram os anti-histamínicos mais específicos (deslocaram muito mais as CCE de histamina do que as de ACh), enquanto a clemastina nesta dosagem, 10^{-6} mol/L, não foi seletiva. Entretanto, apesar da difenidramina ter provocado maiores deslocamentos das CCE de histamina, a clemastina foi mais potente e eficaz, o que poderia justificar sua recomendação usual no manejo da doença atópica canina (HANSSON et al., 2004).

A diferença de dessensibilização provocada pela pirilamina contra a histamina e ACh indicou que este antagonista foi mais específico contra o primeiro agonista, pelo menos quanto ao componente competitivo de sua ação: já houve deslocamento das CCE para a direita da ordem de 0,42 unidades de pD_2 (equivalendo a uma dessensibilização de 2,6 vezes), mesmo com uma concentração de 10^{-8} mol/L. A ACh não foi afetada nem com concentração 10^{-5} mol/L (1000 vezes maior). Quanto ao componente não competitivo (redução de $E_{m\acute{a}x}$) da ação da pirilamina a diferença foi menos significativa sendo cerca de 10 vezes mais potente contra histamina do que contra ACh.

A clemastina provocou praticamente o mesmo efeito dessensibilizante nas CCE de histamina e de ACh (11,2 X 15,5 vezes) na maior concentração usada (10^{-6} mol/L). A principal diferença na ação da clemastina contra a histamina e a ACh relacionou-se ao efeito gradual contra a histamina e ao efeito *tudo ou nada* contra a ACh: as concentrações de 10^{-8} e 10^{-7} mol/L de clemastina produziram uma redução proporcional do $E_{m\acute{a}x}$ e do pD_2 da histamina e não afetaram significativamente as variáveis da ACh. A concentração de 10^{-6} mol/L de clemastina reduziu dramaticamente o $E_{m\acute{a}x}$ da histamina e começou a afetar (reduzir) o $E_{m\acute{a}x}$ da ACh. Esta diferença no comportamento da clemastina contra os dois agonistas usados se revela de forma mais nítida no valor de pD'_2 , uma vez que esta variável revelou que a clemastina é cerca de 162 vezes mais eficaz em reduzir o $E_{m\acute{a}x}$ da histamina do que o da ACh. Revendo o gráfico de Schild-modificado (Figura 7) verifica-se que a reta de regressão representativa dos pontos obtidos com as variáveis da ACh se encontram no quadrante inferior, isto é, abaixo da linha “0”, enquanto os representativos da histamina estão no quadrante “normal”, isto é, no lado positivo da relação $\log (ER-1) \times \log$ da concentração. Ao analisar o componente competitivo (gráfico de Schild) observa-se que a diferença entre a suscetibilidade dos dois agonistas a clemastina não foi tão significativa, alcançando apenas cerca de 6,6 vezes, embora a análise das representações das CCE (Figura 6) sugira maior diferença em favor da suscetibilidade da histamina.

De uma comparação mais ampla dos resultados obtidos com clemastina e os obtidos com pirilamina concluiu-se que a pirilamina foi mais específica contra a histamina do que a clemastina, pois é considerada um dos mais específicos antagonistas da histamina conhecido, não possuindo atividade antimuscarínica significativa (BEVAN, 1979). Dito de outra forma, se os efeitos obtidos com clemastina no íleo isolado também se observarem

quando ela for empregada na clínica de cães e gatos (*in vivo*), é de se esperar que apresente mais efeitos adversos do tipo anticolinérgico do que a pirilamina, conforme Miller et al. (1993).

Os resultados mostraram a clemastina como o anti-histamínico mais potente, contrariando o que foi dito por Bonamin e Abel (2002): a pirilamina é o fármaco que apresenta o maior grau de especificidade sobre receptores H₁, e concordando com Paradis et al. (1991): em um estudo com 30 cães, realizado no Canadá, a clemastina demonstrou controle satisfatório do prurido em 30% dos animais, o que significa a mais alta taxa de sucesso geralmente descrito para anti-histamínicos em processos alérgicos. Até o presente momento, a clemastina possui a maior eficácia já relatada (BOLETIM TÉCNICO COVELI).

Devemos levar em consideração que a resposta individual a anti-histamínicos é variável, devendo-se avaliar o efeito após a utilização terapêutica do fármaco por duas semanas (SHAW; KELLY, 2001).

Em virtude da menor incidência de efeitos adversos, a terapia anti-histamínica tem sido extensivamente estudada e, conseqüentemente, aplicada em tratamentos para controlar prurido nos animais. Esta terapia é uma alternativa ao uso dos glicocorticóides, utilizados tradicionalmente na conduta medicamentosa de doenças de pele (PARADIS et al., 1991).

Anti-histamínicos podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com glicocorticóides para controlar o prurido (SHAW; KELLY, 2001). Essa associação pode ser importante para que se possa reduzir a dose necessária do último grupo.

Na clínica, quando um animal está apresentando um processo alérgico, seja ele agudo ou crônico, o anti-histamínico empregado está atuando como antagonista competitivo ou não-competitivo. Diante do quadro clínico apresentado o que se quer é bloquear e reverter ou impedir sua evolução. Contudo, um antagonista competitivo específico apresenta vantagem sobre o inespecífico (competitivo e não-competitivo). Dos resultados apresentados pode verificar que os três anti-histamínicos utilizados são específicos nas concentrações mais baixas e perdem esta especificidade nas concentrações mais elevadas.

7 CONCLUSÕES

- A clemastina comportou-se como antagonista competitivo e não competitivo contra CCE de histamina e ACh em íleo isolado de cobaio: foi melhor antagonista competitivo (14,1 vezes mais) e não competitivo (162,2 vezes mais) contra histamina do que contra ACh.
- A pirilamina comportou-se como antagonista competitivo e não competitivo contra CCE de histamina. Contra a ACh, apresentou somente efeito antagonista não-competitivo, tendo sido 1,78 vezes menos potente contra este agonista.
- Em relação ao efeito competitivo, a clemastina foi 10 vezes mais potente do que a pirilamina em deslocar as CCE de histamina para a direita. Em relação ao efeito não-competitivo, a clemastina foi mais eficaz do que a pirilamina em reduzir o efeito máximo da histamina. Tanto clemastina quanto pirilamina foram mais potentes e eficazes sobre as CCE de histamina do que contra as de ACh.
- Comparada com difenidramina (anti-histamínico empregado como controle) a clemastina apresentou maior potência e eficácia, enquanto a pirilamina foi ligeiramente menos potente e eficaz.
- Em relação aos efeitos dos três fármacos diante da histamina, podemos estabelecer a seguinte ordem para eficácia e potência: clemastina, difenidramina e pirilamina. Já para seus efeitos anticolinérgicos temos clemastina, difenidramina e pirilamina, para potência e clemastina, pirilamina e difenidramina para eficácia.
- Fundamentados exclusivamente nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a clemastina é mais potente e eficaz, porém apresenta mais efeitos anticolinérgicos quando comparada com a pirilamina.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, X. Aminas Biogênicas. In: MARDONES, J. **Farmacología**. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica, 1976. cap. 19, p. 133-142.
- ADAMS, H. R. Histamina e Anti-histamínicos; Serotonina e Anti-serotonínicos. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 21, p. 349-357.
- ANDRADE, S.F. Terapêutica dos processos alérgicos. In: _____. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. cap. 10, p. 199-206.
- BENDER, B. G. et al. Sedation and performance impairment of diphenhydramine and second-generation antihistamines: A meta-analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 770-776, 2003.
- BEVAN, J.A. **Fundamentos de farmacologia**: introdução aos princípios de ação de drogas. 7.ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979. p. 589.
- BURKHALTER, A; JULIUS, D.J.; KATZUNG, B.G. Histamine, serotonin and the ergot alkaloids. In: KATZUNG, B.G. **Basic and clinical pharmacology**. 7. ed. Appleton and Lange, 1998. cap. 16, p.261-286.
- BOLETIM Técnico Coveli: compilação de estudos referentes ao uso da clemastina no tratamento e controle do prurido em cães e gatos. [s. n. t.]. Manual Técnico. 10 p.
- BONAMIM, L.V.; ABEL, M.N.C. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 18, p. 193-202.
- BROW, N. J.; ROBERTS, L. J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap. 25, p. 485-501.
- CARLINI, E.A. Histamina e anti-histamínicos. Aula prática 13: ações da histamina “in vitro”. In: CARLINI, E.A. **A farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1973. cap. V, p. 97-100.

COUTO, S. E. R. Criação e manejo de cobaias. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. cap. 10, p. 71-80.

DYER, D. D. Autacóides e seus antagonistas. In: AHRENS, F. A. **Farmacologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 3.

FURCHGOTT, R. F. The classification of adrenoceptor (Adrenergic receptors): an evaluation from the standpoint of receptor theory. In: **Catecholamines, Handbook Exp. Pharm. XXXIII**. Berlin: Blaschko & E. Muschol, 1972. cap. 9, p. 283-335.

FURCHGOTT, R. F. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 139, p.553-570, 1967.

GARRISON, J.C. Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine, and their antagonists. In: GILMAN, A. G. Et al. **The pharmacological basis of therapeutics**. 8. ed. Pergamon Press, 1990. cap. 23, p. 575-599.

HANSSON, H. et al. Clinical pharmacology of clemastine in healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 15, n. 3, p.152-158, 2004.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Procedimentos Clínicos. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1993. cap. 3, p. 57-85.

IZZO, A. A. et al. The Role of Histamine H₁, H₂ and H₃ receptors on enteric ascending synaptic transmission in the guinea pig ileum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 287, n. 3, p. 952-957, 1998.

LITTER, M. Histamina y antihistamínicos. Serotonina y antiserotonínicos. In: LITTER, M. **Compendio de farmacologia**. El Ateneo, 1973. cap. 19, p. 212-219.

LÜLLMANN, H; MOHR, K. **Farmacologia: texto e atlas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004. 381 p.

MERCHANT, S.R.; TABOADA, J. Antihistaminic drugs: H₁ – receptor antagonists in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 5, p. 647-649, Sept. 1989.

MERK, H. F. Standard treatment: The role of antihistamines. **JID Symposium Proceedings**, v. 6, p. 153-156, 2001.

MILLER JÚNIOR, W.H.; SCOTT, D.W. Clemastine fumarate as an antipruritic agent in pruritic cats: Results of an open clinical trial. **The Canadian Veterinary Journal**, v.35, n. 8, p. 502-504, Aug. 1994.

MILLER JÚNIOR W.H.; SCOTT, D. W.; WELLINGTON, J. R. A clinical trial on the efficacy of clemastine in the management of allergic pruritus in dogs. **Can. Vet. J. V.**, v. 34, p. 25-27, 1993.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. **Dermatologia dos pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1985.

PARADIS, M. LEMAY, S. SCOTT, D. W. The efficacy of clemastine (Tavist), a fatty acid-containing product (Derm Caps), and the combination of both products in the management of canine pruritus. **Veterinary Dermatology**, v. 2, p. 17-20, 1991.

PARADIS, M.; SCOTT, D. W.; GIROUX, D. Further investigations on the use of nonsteroidal and steroidal antiinflammatory agents in the management of canine pruritus. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.27, p.44-48, Jan./Feb. 1991.

PATERSON, S. Use os antihistamines to control pruritus in atopic dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 8, p. 412-419, 1994.

PATERSON, S. Additive benefits of EFAs in dogs with atopic dermatitis after partial response to antihistamine therapy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n. 9, p. 389-394, 1995.

PLUMB, D. C. **Veterinary drug handbook**. 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.143-144;555-556.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RÄNTFORS, J.; CASSUTO, J. Role of histamine receptors in the regulation of edema and circulation postburn. **Burns**, v. 29, p. 769-777, 2003.

REEDY, L. Pruritus in small animals. **Compendium on Continuing Education**. v. 6, 1984.

ROCHA E SILVA, M. Histamina e anti-histamínicos. Serotonina e antagonistas. In: **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. São Paulo: Edart, 1969. cap. 21, p. 180-204.

ROCHA JÚNIOR, M. A. Histamina e anti-histamínicos. In: SILVA, Penilson. **Farmacologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2002. cap. 57, p.566-578.

SCOTT, D. W.; MILLER JUNIOR, W. H. Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the management of canine allergic pruritus. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, p. 52-56, 1993.

SHAW, S.E.; KELLY, S.E. Dermatopatias caninas e felinas. In: DUNN, J.K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. cap. 47, p. 865-914.

SILVA, F. A. da. **Obtenção, caracterização e avaliação do extrato seco liofilizado de *Portulaca pilosa* L. (*Portulacaceae*) sobre a fertilidade e reatividade uterina de ratas Wistar**. 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

STAFF OF THE DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY UNIVERSITY OF EDINBURGH. **Pharmacological experiments on isolated preparations**. 2. ed. Edinburgh: E. & S. Livingstone, 1970. 163 p.

SZABUNIEWICZ, M.; McCRADY, J. D. Histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e fenômenos alérgicos e anafiláticos. In: JONES, L. M. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. cap. 21, p. 318-330.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 12th. ed. Whitehouse Station: Merck & CO., 1996. p. 396; 1372.

TORNEKE, K. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clemastine in healthy horses. **Journal Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 26, p. 151-157, 2003.

VAN ROSSUM, J.M.; DEN BRINK, F.G. Cumulative dose-response curves I: Introduction to the technique. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 143, n. 1-2, p. 240-46, 1963.

WANNMACHER, L. Autacóides. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 10, p. 83-93.

_____. Autacóides. In: _____. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 13, p. 105-113.