

Estudo do efeito de extratos do *Ginkgo biloba* e da quercetina no ducto deferente de camundongo

Study of the effect of *Ginkgo biloba* and quercetin extracts on the mouse vas deferens

Estudio del efecto de los extractos de *Ginkgo biloba* y quercetina en el conducto deferente del ratón

Recebido: 27/07/2022 | Revisado: 18/08/2022 | Aceito: 31/08/2022 | Publicado: 07/09/2022

Victória Bessa Alvarenga Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9118-4869>

Universidade Federal de São João del-Rei, Brasil

E-mail: vitorialvarengalima@hotmail.com

Joaquim Maurício Duarte Almeida

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5737-6963>

Universidade Federal de São João del-Rei, Brasil

E-mail: maudall@ufsj.edu.br

Priscila Totarelli Monteforte

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9949-5602>

Universidade Federal de São João del-Rei, Brasil

E-mail: pris.farm@ufsj.edu.br

Resumo

O extrato de *Ginkgo biloba* (GBE) possui ação antioxidante, anti-inflamatória, neuroprotetora, além de ter efeito relaxante em órgãos de musculatura lisa. O ducto deferente (DD) conduz os espermatozoides durante a ejaculação pela contração de sua musculatura, e alterações nessa contração podem levar a distúrbios como a ejaculação precoce (EP). A EP é a ejaculação que sempre ou quase sempre ocorre antes ou cerca de 1 minuto após a penetração vaginal. Assim, nosso objetivo foi estudar o efeito do GBE sob a contração do DD de camundongos. O efeito do GBE, aqui denominado GB2, ou quercetina, foi testado frente a contração com cloreto de potássio. O efeito destas substâncias foi testado na presença da nifedipina. Demonstramos que GB2, quercetina e nifedipina são capazes de inibir os componentes fásico e tônico da contração. O efeito de GB2, sob o componente tônico, foi potencializado, na presença da quercetina. Comparando o componente tônico entre os grupos GB2, Nifedipina+GB2 e Quercetina+GB2, observamos que, na presença da nifedipina ou da quercetina, o efeito de GB2 foi potencializado. Na comparação dos grupos Quercetina e Nifedipina+Quercetina, a nifedipina potencializou o efeito da quercetina sob ambos os componentes. Esses resultados indicam que GB2 e a quercetina são capazes de inibir algum mecanismo envolvido com a geração da contração do DD, e que esse efeito não é dependente exclusivamente da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente. Estes achados apontam que o GBE e quercetina, podem ser estratégias farmacológicas para o tratamento de EP.

Palavras-chave: Fitoterápicos; Ejaculação precoce; *Ginkgo biloba*; Quercetina; Ducto deferente.

Abstract

Ginkgo biloba extract (GBE) has antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective actions, and has a relaxing effect on smooth muscle organs. The vas deferens (DD) conducts the spermatozoa during ejaculation by the contraction of its muscles, and changes in this contraction can lead to disorders such as premature ejaculation (PE). PE is ejaculation that always or almost always occurs before or about 1 minute after vaginal penetration. Thus, our aim was to study the effect of GBE under the contraction of the DD of mice. The effect of GBE, here called GB2, or quercetin, was tested against contraction with potassium chloride. The effect of these substances was tested in the presence of nifedipine. We demonstrate that GB2, quercetin and nifedipine are able to inhibit the phasic and tonic components of the contraction. The effect of GB2 on the tonic component was enhanced in the presence of quercetin. Comparing the tonic component between GB2, Nifedipine+GB2 and Quercetin+GB2 groups, we observed that in the presence of nifedipine or quercetin, the effect of GB2 was potentiated. In the comparison of the Quercetin and Nifedipine+Quercetin groups, nifedipine potentiated the effect of quercetin under both components. These results indicate that GB2 and quercetin are able to inhibit some mechanism involved with the generation of DD contraction, and that this effect is not solely dependent on voltage-dependent calcium channel inhibition. These findings point out that GBE and quercetin, may be pharmacological strategies for the treatment of PE.

Keywords: Herbal medicines; Premature ejaculation; *Ginkgo biloba*; Quercetin; Vas deferens.

Resumen

El extracto de *Ginkgo biloba* (GBE) tiene acción antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora, además de tener un efecto relajante sobre los órganos musculares lisos. El conducto deferente (DD) conduce los espermatozoides durante la eyaculación mediante la contracción de sus músculos, y las alteraciones de esta contracción pueden provocar trastornos como la eyaculación precoz (EP). La EP es una eyaculación que siempre o casi siempre se produce antes o aproximadamente un minuto después de la penetración vaginal. Por lo tanto, nuestro objetivo era estudiar el efecto de la GBE en la contracción del DD de los ratones. El efecto del GBE, aquí denominado GB2, o quercetina, se probó contra la contracción con cloruro de potasio. El efecto de estas sustancias se probó en presencia de nifedipina. Demostramos que el GB2, la quercetina y el nifedipino son capaces de inhibir los componentes fásicos y tónicos de la contracción. El efecto del GB2 sobre el componente tónico se potenció en presencia de quercetina. Al comparar el componente tónico entre los grupos GB2, Nifedipino+GB2 y Quercetina+GB2, observamos que, en presencia de nifedipino o quercetina, el efecto del GB2 se potenciaba. En la comparación de los grupos de quercetina y nifedipino+quercetina, el nifedipino potenció el efecto de la quercetina en ambos componentes. Estos resultados indican que el GB2 y la quercetina son capaces de inhibir algún mecanismo implicado en la generación de la contracción DD, y que este efecto no depende únicamente de la inhibición del canal de calcio dependiente de voltaje. Estos hallazgos señalan que el GBE y la quercetina, pueden ser estrategias farmacológicas para el tratamiento de la EP.

Palabras clave: Hierbas medicinales; Eyaculación precoz; *Ginkgo biloba*; Quercetina; Conductos deferentes.

1. Introdução

As disfunções sexuais têm grande impacto na qualidade de vida dos afetados. Entre as disfunções, podemos citar como exemplo a ejaculação precoce (EP), que é bastante recorrente entre os homens e considerado o distúrbio sexual mais comum na população masculina (Francischi et al., 2011; Brasil, 2018) com uma estimativa de acometimento de 20% a 30% dos homens de qualquer idade em algum momento da vida (Ministério da saúde, 2018). Segundo o *Committee for Definition of Premature Ejaculation of the International Society for Sexual Medicine*, essa patologia é caracterizada pela ejaculação que sempre ou quase sempre ocorre antes ou cerca de 1 minuto após a penetração vaginal e a incapacidade de retardar a ejaculação em todas ou quase todas as penetrações vaginais, acompanhada por consequências pessoais negativas, como sofrimento, aborrecimento, frustração e/ou evitação da intimidade sexual (McMahon et al., 2008).

O tratamento da EP pode ser feito com anestésicos tópicos, com creme de lidocaína ou prilocaína, com medicamentos orais, sendo eles: antidepressivos (paroxetina e fluoxetina), analgésicos (tramadol) e inibidores da fosfodiesterase-5 (sildenafil e tadalafil) (Waldinger, 2018). Apesar de se ter mais de uma opção de fármaco para o tratamento da EP, eles apresentam uma eficácia limitada, assim encontrar alternativas terapêuticas é muito importante. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos é uma prática milenar difundida mundialmente, e que têm sido utilizada com o intuito de obterem-se novas alternativas terapêuticas – visando sustentabilidade científica, além de menores efeitos adversos para os pacientes e, melhores preços para a população (Luz, 1997, apud Mattos et al., 2018; Del-Vechio-Vieira et al., 2016).

Entre os diversos fitoterápicos conhecidos, destacamos o *Ginkgo biloba* (GB). Originária da China e cultivada em todo mundo, o GB é uma das espécies de árvores mais antigas do mundo. É utilizada na medicina tradicional chinesa há cerca de 5000 anos por apresentar diferentes funções terapêuticas (Singh et al., 2019). Em um estudo randomizado, controlado por placebo, duplo-cego e multicêntrico foi demonstrado que o extrato de *Ginkgo biloba* (GBE) melhorou o desempenho cognitivo de pacientes com comprometimento cognitivo leve (Gavrilova et al., 2014). A propriedade antioxidante do GBE já foi demonstrada sobre a toxicidade reprodutiva mediada por cisplatina em ratos machos (Amin et al., 2012). No trabalho de Nunez e colaboradores (1986) foi testado os efeitos do GBE na agregação de plaquetas humanas, induzida pelo fator de ativação plaquetária e demonstrado que o GBE inibe competitivamente a agregação plaquetária de maneira dependente da concentração. Também foi descrito que o GBE exerceu um papel protetor no coração e no cérebro, diminuindo a inflamação cardíaca e o estresse oxidativo cerebral em ratos (Zhang et al., 2022). Os principais componentes do GB são os flavonoides e as lactonas terpênicas (Amin et al., 2012). Estes são sugeridos como constituintes farmacologicamente ativos do GBE (Smith et al., 1996; Shi et al., 2009). Entre os flavonoides presentes no *Ginkgo*, podemos destacar a quercetina, que possui diversas

propriedades farmacológicas (Balanz & Leon, 1994; Rivera et al., 2008; Sakanashi et al., 2008; modzelewska et al., 2021). Sakanashi e colaboradores (2008), demonstraram ação antioxidante da quercetina em tímócitos de ratos. A ação neuroprotetora foi demonstrada em tecido cerebral de humanos com Alzheimer (Balanz & Leon, 1994), e a administração crônica da quercetina também melhorou a síndrome metabólica e o estado inflamatório em ratos obesos (Rivera et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado o efeito do GBE e da quercetina na atividade contrátil muscular. A quercetina causou relaxamento do músculo liso uterino de suínos (Zygmuntowicz et al., 2021), da musculatura gástrica humana (Modzelewska et al., 2021), bem como da contração por estimulação elétrica do ducto deferente (Capasso et al., 2006). O GBE provocou relaxamento em aorta isolada de coelho (Delaflotte et al., 1984), em anéis aórticos de ratos machos (Kubota et al., 2001) e artérias basilares suínas (Chen, et al., 1997), além de ter sido demonstrado o seu efeito relaxante em tecidos do corpo cavernoso (Kim et al., 2011).

A partir das evidências científicas dos efeitos de *Ginkgo biloba* em inibir a contração de órgãos de musculatura lisa, surge a necessidade de se conhecer o efeito em demais órgãos formados por musculatura lisa, como por exemplo, ducto deferente.

O ducto deferente (DD) conduz os espermatozoides armazenados no epidídimo, para estes serem então, ejaculados (Bruschini et al., 1977; Kierszenbaum, 2008). Essa condução se dá através das contrações peristálticas realizadas pelas células musculares lisas do DD (Westfall et al., 1978; Kierszenbaum, 2008). A ejaculação é composta por duas fases: emissão e expulsão, sendo que as contrações do DD são responsáveis pela fase de emissão (Giuliano, 2011; Kiguti & Pupo, 2012). Dessa maneira, a inibição da contração desse órgão representa um efeito clínico desejável, podendo ser uma estratégia farmacológica para o tratamento da ejaculação precoce.

A contração do ducto deferente é caracterizada por uma resposta contrátil bifásica clássica, composta por uma contração transitória inicial, rápida, denominada como componente “fásico”, seguida de uma contração secundária sustentada, mais lenta, conhecida como componente “tônico”. Em um registro típico de força, as contrações fásicas surgem como picos rápidos, enquanto as contrações tônicas causam alterações graduais na força que sustentam a contração por um tempo maior, sendo representadas por uma linha contínua horizontal (Lipskaia et al., 2012; Wallace et al., 2015). Esta contração pode ser desencadeada por cloreto de potássio (KCl) que é um agente despolarizante (Guo et al., 2014) que induz a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) do tipo L e conseqüentemente o influxo de Ca^{2+} . Estes canais podem ser inibidos pela nifedipina e assim induzir o relaxamento (Moynihan; et al., 2008).

Infelizmente, as terapias e os medicamentos utilizados para tratar EP ainda apresentam limitações e pouca efetividade (Gillman & Gillman, 2019) por isso, faz-se necessário conhecer substâncias, como por exemplo, plantas medicinais e fitoterápicos, que tenham efeitos positivos na função sexual dos homens, e que possam ser utilizadas para tratar a EP, como medicamentos complementares ou até mesmo único no tratamento. Assim, por não existir uma terapia totalmente eficaz para tratar a EP e tendo em vista que o DD participa do processo de ejaculação, nosso objetivo foi verificar o efeito do extrato de GB sobre a contração induzida por KCl em ducto deferente de camundongo.

2. Metodologia

2.1 Extratos vegetais e preparação das amostras de *Ginkgo biloba*

As amostras de *Ginkgo biloba* (GB) utilizadas neste estudo foram produzidas com material vegetal adquirido em farmácia de manipulação. O material vegetal foi devidamente registrado no SISBIO (A731577). A preparação das amostras foi realizada por Extração Assistida por Ultrassom (EAU). As amostras assim obtidas foram reunidas e armazenadas para análises posteriores. O extrato foi denominado **GB2**, e avaliado quanto ao seu perfil cromatográfico por cromatografia em camada

delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e teores de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico.

Os teores de flavonoides totais foram avaliados pelo método do cloreto de alumínio, presente na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010) com algumas modificações. Quercetina (0,1 mg.mL⁻¹) foi utilizada para a confecção de uma curva analítica. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg, equivalentes a quercetina por grama (mg EQ g⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata. Desta forma, a amostra GB2 apresentou concentração de 21,00 mg EQ/mL.

2.2 Animais

Para a realização do presente trabalho, foram utilizados camundongos machos, da linhagem Swiss provenientes do Núcleo de criação de animais de laboratório, da Universidade Federal de São João del-Rei (NUCAL/UFSJ).

Os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSJ sob protocolo de nº 9414240521. O manejo dos animais durante todo o período experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos e de bem estar recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais receberam água e ração comercial balanceada (Nuvilab®) autoclavadas ad libitum e foram submetidos ao controle artificial de ciclos de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro), além de temperatura controlada (21°C) e exaustão de ar. Após atingirem 60 dias de vida, os camundongos foram eutanasiados com isoflurano e em seguida foi realizado o isolamento dos ductos deferentes para a realização dos experimentos.

2.3 Isolamento do ducto deferente

Depois de isolados os ductos deferentes foram imediatamente imersos em solução nutritiva (LNV) conforme descrito por Picarelli et al. (1962), com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5,7; CaCl₂ 1,8; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 15 glicose 5,5 (pH 7,4 a 30°C). Posteriormente foi realizada a dissecação dos ductos deferentes e os mesmos foram lavados internamente com a mesma solução nutritiva.

2.4 Montagem da preparação biológica e aparelhagem

Os experimentos foram realizados em um sistema de banho de órgãos, formado por cubas de vidro tendo capacidade para 10 mL de solução nutritiva. O ducto deferente foi amarrado, em suas extremidades, com fio de algodão e montado na cuba fixando-se uma das extremidades (porção prostática) em uma haste de vidro de sustentação, sendo a outra extremidade (porção epididimária) ligada ao transdutor isométrico (ADIstruments, Sydney, Austrália). A aeração da solução nutritiva ocorreu pelo interior da haste de vidro. As contrações foram registradas pelo hardware PowerLab e analisadas pelo software LabChart (ADIstruments, Sydney, Austrália).

2.5 Inibição da contração muscular

Após a fixação do órgão ao sistema de registro, o tecido foi deixado em repouso por 30 minutos, mergulhado em solução LNV, para a estabilização da preparação. Feito isso, foi adicionado ao banho KCl 80 mM por 5 minutos. Após o tempo de estimulação, foram realizadas lavagens sucessivas com solução nutritiva. Posteriormente a este processo, o órgão foi deixado em repouso por 30 minutos. Este procedimento repetiu-se por três vezes. No 27º minuto de repouso, entre a terceira e a quarta curva foi adicionado ao banho a primeira concentração do extrato de GB2 ou quercetina. Após 3 minutos (no 30º minuto) um novo estímulo contrátil foi aplicado, tanto na cuba com GB como na cuba controle. Este protocolo foi repetido com doses crescentes de GB ou quercetina até a obtenção da inibição máxima da contração. A contração que antecede a incubação do órgão com o extrato, foi considerada a curva controle para aquele órgão.

Em outro protocolo experimental, testamos o efeito de GB2 ou quercetina na presença de nifedipina e o efeito de GB2 na presença da quercetina.

2.6 Parâmetros farmacológicos para avaliar a contratilidade do ducto deferente

As respostas contráteis foram medidas considerando as amplitudes de contração dos componentes fásico e tônico induzido por KCl, na presença e na ausência de GB e/ou quercetina. As medidas foram realizadas em gramas de tensão e transformadas em porcentagem em relação a um valor de referência, que foi considerado como 100% da amplitude de contração do componente correspondente (fásico ou tônico). O valor referência foi obtido a partir da análise da última curva (3ª curva) que antecedeu a incubação com GB e/ou com quercetina. A partir desses dados foram construídos gráficos com as curvas concentração-efeito inibitórias.

O efeito das substâncias estudadas foi analisado pelo parâmetro farmacológico IC_{50} (logaritmo negativo da concentração molar da droga que produz 50% do efeito inibitório máximo).

2.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). O método de Kolmogorov e Smirnov foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por teste t de Student pareado ou não pareado dependendo da análise, ou ANOVA one-way e pós teste de Dunnett para múltiplas comparações. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa Prism 7, versão 7.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3. Resultados

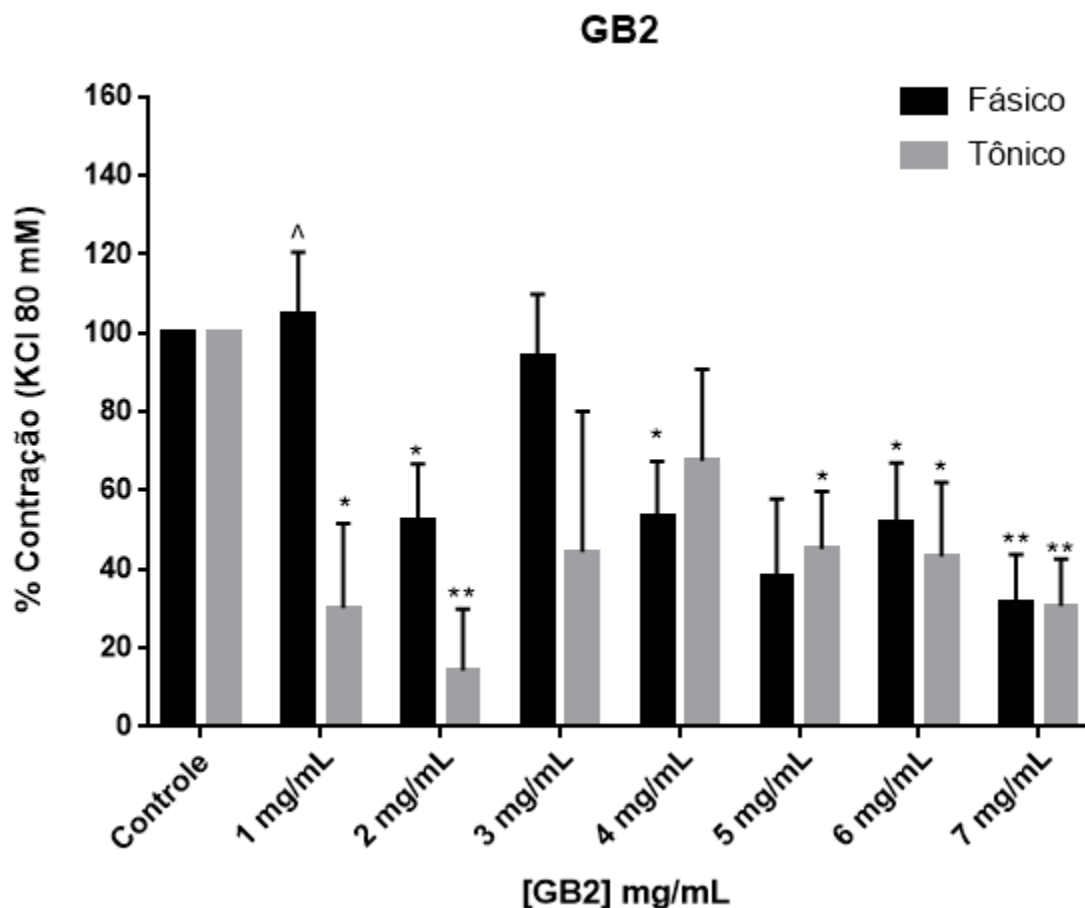
3.1 Avaliação fitoquímica dos extratos vegetais

Nos experimentos realizados com CCD, observamos que os compostos Ginkgoflavonoides característicos da espécie estão presentes no GB2. Na avaliação por cromatografia líquida foi possível observar a presença dos compostos fenólicos característicos para esse extrato, quercetina, kaempferol e isorhamnetina. A presença desses compostos, comprova a autenticidade e qualidade do extrato preparado para os testes biológicos. Os teores dos compostos fenólicos também foram avaliados para padronização dos extratos.

3.2 Relaxamento, dos componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, induzido por GB2 ou quercetina

O GB2, independentemente da concentração utilizada, inibiu a contração induzida por KCl. Ao compararmos o componente fásico e o tônico da contração com seus respectivos controles (ausência de GB2), observamos que há diferenças estatísticas. No componente fásico, há diferença nas seguintes concentrações: 2; 4; 6 ou 7 mg/mL. E no componente tônico nas concentrações de 1; 2; 5; 6 ou 7 mg/mL. Além disso, também há diferença estatística quando comparamos os componentes, fásico e tônico, entre si, na concentração de 1 mg/mL (Figura 1).

Figura 1 - Efeito inibitório de concentrações crescentes de GB2, sob os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl (80mM). Componente fásico (barra preta) e componente tônico (barra cinza).



Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 6 experimentos. Inibições estatisticamente significativas em relação ao respectivo controle (*). Inibição estatisticamente significativa entre o componente fásico e o tônico na mesma concentração de GB2 (^). Fonte: Autores.

Assim como, o GB2, a quercetina também foi capaz de inibir a contração. Quando comparamos o efeito da quercetina (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M) sob o componente fásico com seu correspondente controle (na ausência da quercetina), observamos que independente da concentração, há diferença estatística. A mesma comparação foi feita para o componente tônico e também foi possível observar diferenças estatísticas, porém somente nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Além disso, também há diferença estatística quando comparamos fásico e tônico, entre si, na concentração de 10^{-3} M.

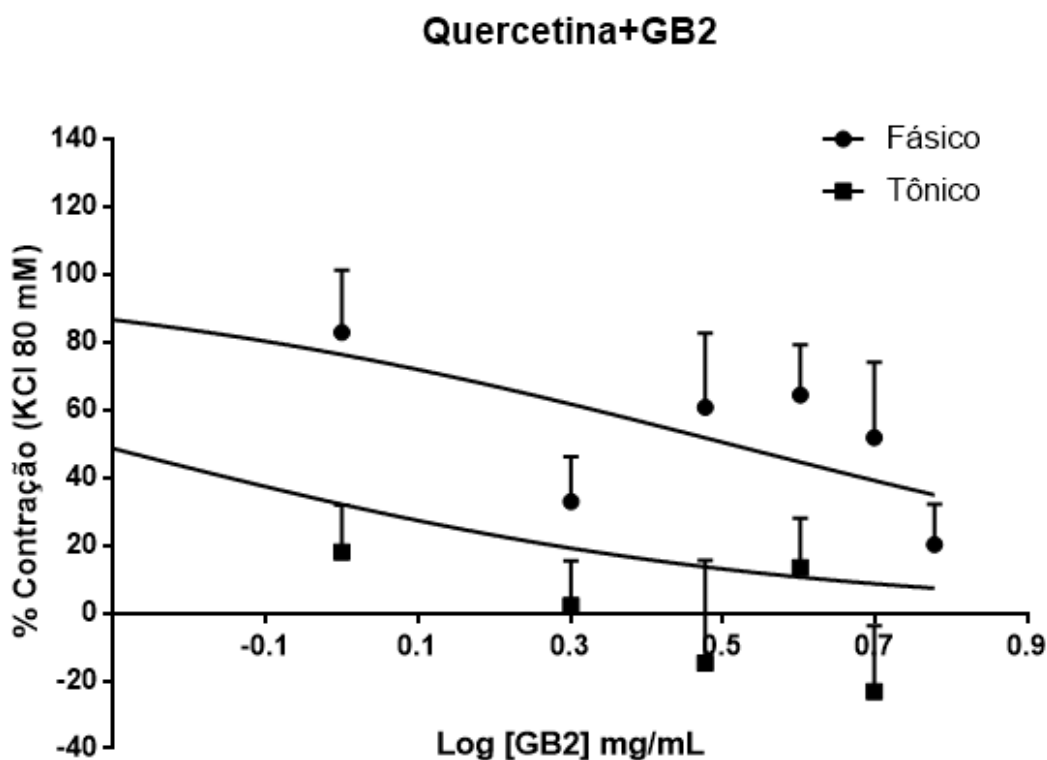
3.3 Efeito de GB2 ou quercetina na presença de nifedipina

A nifedipina é uma substância capaz de inibir os canais de cálcio voltagem dependente do tipo L. A partir dos valores das médias de pIC_{50} , concluímos que a nifedipina inibiu igualmente os componentes fásico (-5.282) e tônico (-5.711) da contração induzida pelo KCl. Quando avaliamos o efeito de GB2 ou quercetina na presença de nifedipina, observamos que em ambos os protocolos, o efeito inibitório, sob os componentes da contração foi mantido e ao comparamos os valores das médias de pIC_{50} entre os componentes fásico Nif+GB2 (0,2533) e tônico Nif+GB2 (-0,3058), assim como fásico Nif+quercetina (-8,044) e tônico Nif+quercetina (-8,416), não observamos diferença estatística entre eles.

3.4 Efeito do GB2 na presença da quercetina

A Figura 2 mostra o efeito inibitório, de GB2 na presença da quercetina, sob os componentes, fásico e tônico, na contração induzida por KCl. A comparação dos valores das médias de pIC_{50} demonstrou que o componente tônico (-0,3003) é estatisticamente mais sensível que o componente fásico (0,4619).

Figura 2 - Efeito de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,85) de GB2, na presença da quercetina (10^{-7} M) sob os componentes fásico (círculo) e tônico (quadrado) da contração induzida por KCl (80mM).



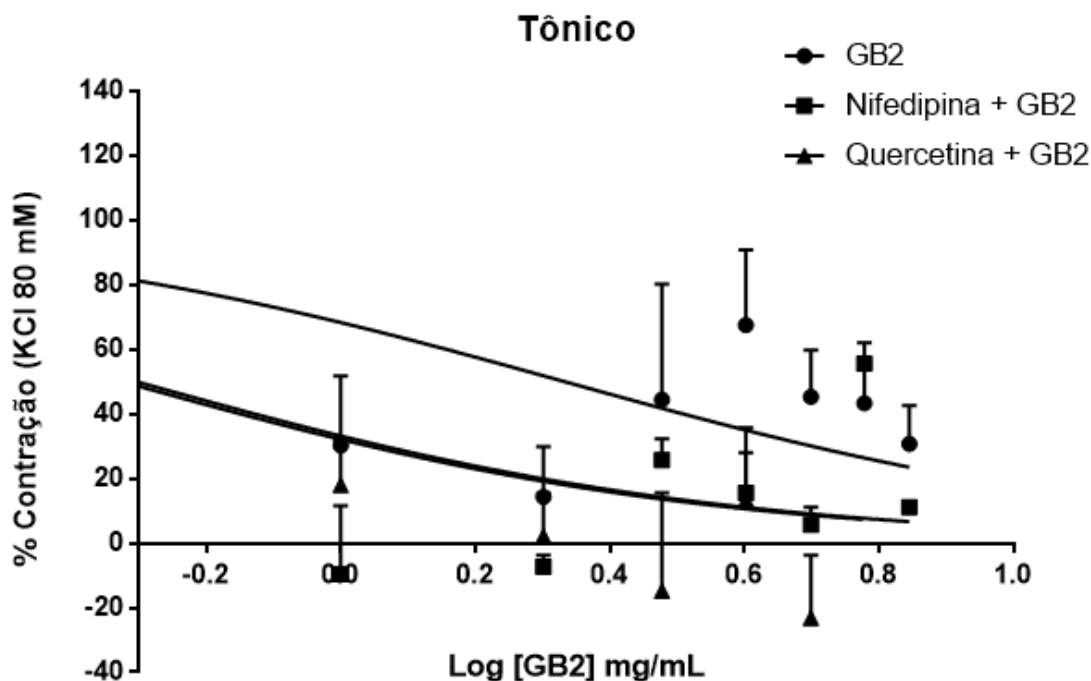
Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 9 experimentos. Fonte: Autores.

3.5 Comparação do efeito inibitório, induzido por GB2, na presença ou na ausência da nifedipina ou da quercetina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

Ao compararmos os valores das médias de pIC_{50} do componente fásico dos diferentes grupos experimentais GB2 (0,8348), Nifedipina+GB2 (0,2533) e Quercetina+GB2 (0,4788), observamos que não há diferença significativa entre estes grupos experimentais.

O inverso foi encontrado quando comparamos o componente tônico dos diferentes grupos experimentais GB2 (0,3019), Nifedipina+GB2 (-0,3058) e Quercetina+GB2 (-0,2877) (Figura 3), ou seja, o componente tônico dos grupos Nifedipina+GB2 e Quercetina+GB2 é mais sensível do que o componente tônico do grupo GB2.

Figura 3 - Componente tônico da contração induzida por KCl (80mM), na presença de concentrações crescentes (1; 2; 3; 4; 5; 6 e 7 mg/mL, que corresponde às seguintes concentrações em log: 0; 0,3; 0,48; 0,6; 0,7; 0,78 e 0,8) de GB2 (círculo) e de GB2 na pr presença da pré-incubação de nifedipina (10^{-5} M) (quadrado) ou da quercetina (10^{-7} M) (triângulo).



Cada ponto é a média \pm erro de pelo menos 7 experimentos. Fonte: Autores.

3.6 Comparação do efeito inibitório, induzido pela quercetina, na presença ou na ausência da nifedipina, nos componentes fásico ou tônico da contração induzida por KCl

Ao compararmos os valores das médias de pIC_{50} no componente fásico da Quercetina (-5,098) e Nifedipina+Quercetina (-8,044), assim como no componente tônico Quercetina (-6,848) e Nifedipina+Quercetina (-8,416), observamos que na presença da nifedipina o efeito inibitório da quercetina foi potencializado em ambos os componentes.

4. Discussão

Nossos resultados mostram que o extrato de *Ginkgo biloba*, GB2, tal como um composto flavonoide isolado, a quercetina, são capazes de induzir o relaxamento da contração induzida por KCl, no ducto deferente de camundongo. Este relaxamento foi observado tanto no componente fásico quanto no componente tônico da contração. O componente tônico foi mais sensível que o componente fásico no grupo Quercetina+GB2. Na comparação dos efeitos inibitórios em cada componente, analisados separadamente, demonstramos dois resultados: na presença da nifedipina ou da quercetina, a inibição causada por GB2 foi potencializada quando comparamos com a inibição que ocorre na presença somente de GB2, apenas no componente tônico; já a inibição causada pela quercetina na presença da nifedipina foi potencializada em ambos os componentes.

4.1 Avaliação fitoquímica

Os extratos de *Ginkgo biloba* são reconhecidos por possuírem compostos que podem desempenhar atividades biológicas, tais como antioxidantes, anti-hipertensivas e neuroprotetivas. Além disso, estão incluídos entre os produtos naturais utilizados como suplementos dietéticos para disfunção erétil (Wu et al., 2015). Entre os flavonoides encontrados no extrato

GB2 utilizado neste estudo, estão kaempferol, quercetina e isoquercetina. Os gincoflavonoides e as terpenolactonas são reconhecidos como os marcadores de qualidade dos extratos (Amin et al., 2012; Gachowska et al., 2021). Os flavonoides são substâncias fenólicas estáveis por ressonância e possuem grande número de grupos funcionais hidroxila redutores nos flavonoides, que podem prevenir e inibir a toxicidade dos radicais livres de oxigênio, reduzindo os danos da peroxidação de lipídios e outros danos patológicos ao corpo humano (Zhang et al., 2021). Estes compostos também podem atuar inibindo ou modulando diversos receptores devido às suas características moleculares similares a muitas substâncias endógenas ou sintéticas (Fernandes et al., 2017). Os extratos de *Ginkgo biloba*, assim como alguns flavonoides isolados, como a quercetina, podem interagir com a nifedipina, pois ambos são metabolizados pela enzima CYP3A (Yoshioka et al., 2004).

4.2 Relaxamento, dos componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl, causado por GB2 ou quercetina

No presente estudo, a contração do ducto deferente foi caracterizada por dois componentes distintos, gerando uma resposta bifásica, sendo uma contração inicial e rápida, denominada componente fásico, sucedida por uma contração sustentada, denominada componente tônico. Este tipo de contração está de acordo com o que já foi descrito na literatura (Hay & Wadsworth, 1982; Langton & Huddart, 1988; Jurkiewicz, et al. 1994; Lafayette et al., 2008).

Os nossos resultados demonstram que tanto o extrato GB2, como a quercetina são capazes de induzir o relaxamento da musculatura lisa do ducto deferente, uma vez que comparamos o efeito de diferentes concentrações destas substâncias sob os componentes fásico e tônico, com seus respectivos controles e observamos diferença estatística na maioria delas.

Até onde foi possível pesquisar, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito do extrato de *Ginkgo biloba* no ducto deferente. Na literatura, há trabalhos que demonstram o efeito relaxante do GBE em órgãos de musculatura lisa (Delaflotte et al., 1984; Chen, et al., 1997; Kubota et al., 2001; Kim et al., 2011), mas não em ducto deferente. O extrato de GB, de maneira concentração-dependente, provocou relaxamento dependente do endotélio pela via do óxido nítrico (NO) tanto em aorta isolada de coelho pré contraída com fenilefrina (Delaflotte et al., 1984), quanto em artérias basilares suínas seguidas da estimulação nervosa transmural (Chen, et al., 1997). Kim e colaboradores (2011) demonstraram que o GBE desempenhou efeito relaxante em células musculares lisas do corpo cavernoso de coelho, pré contraídas, com norepinefrina, de uma maneira dependente da concentração. Além disso, também demonstraram que o efeito relaxante do GBE foi potencializado em combinação com o mirodenafil, um inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5). Os inibidores da PDE-5 são prescritos como tratamento de primeira linha para disfunção erétil (DE), assim, segundo os autores, a terapia de combinação de GBE com inibidores de PDE-5 podem ser de grande valia para tratamento de DE (Dell'agli et al., 2006; Saponara & Bosisio, 1998, apud Kim et al., 2011). Também foi descrito que o GBE produziu um relaxamento concentração-dependente em anéis aórticos, de ratos machos pré-contraído com noradrenalina (Kubota et al., 2001). Assim, a análise destes trabalhos indica que independente do agente indutor da contração, o GBE é capaz de inibir a contração muscular.

Em relação ao efeito da quercetina, os nossos achados estão de acordo com o que já vem sendo descrito na literatura (Kubota et al., 2001; Capasso et al., 2006; Luo et al., 2018; Modzelewska et al., 2021; Zygumtowitz et al., 2021), inclusive, Capasso e colaboradores (2006) já demonstraram o efeito inibitório da quercetina na contração por estimulação elétrica no DD. Estes autores avaliaram a atividade de dez flavonoides sobre a inibição das contrações do DD e concluíram que a potência do efeito estava relacionada com a estrutura química e o número de hidroxilas fenólicas existentes nos compostos testados. No trabalho de Kubota e colaboradores (2001), além de descreverem o relaxamento causado pelo GBE, também demonstraram que a quercetina induz relaxamento no modelo experimental previamente citado e que este relaxamento foi revertido pelo L-NAME, sugerindo um efeito dependente da produção de NO. Luo e colaboradores (2018), demonstraram que a quercetina inibiu a pré-contração por acetilcolina em vias aéreas de camundongos, sendo proposto pelos autores que essa inibição pode ser por meio da inibição de canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, já que a quercetina bloqueou completamente as

correntes mediadas por estes canais. A quercetina também induziu um relaxamento dependente da concentração em tiras gástricas humanas tratadas com carbacol, sendo essa inibição dependente dos canais K_{ATP} pois seu efeito foi revertido na presença de glibenclamida (Modzelewska et al., 2021). Zygmuntowicz e colaboradores (2021), relataram que a quercetina causou relaxamento do músculo liso uterino de suínos estimulados com acetilcolina. Os autores sugerem que este efeito é dependente da condição fisiológica da fêmea, já que o efeito inibitório foi maior nas fêmeas cíclicas e gestantes quando comparado com as imaturas.

4.3 Comparação entre os componentes da contração na presença do GB2 ou da quercetina

É sabido que o influxo de cálcio é extremamente importante para o mecanismo de acoplamento excitação-contração induzido por KCl. Alguns trabalhos demonstraram que os componentes fásico e tônico da contração induzida por KCl são dependentes do influxo de cálcio, e isso se dá por meio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) que ativam-se pela despolarização da membrana (Cheng, 1976; Huddart et al., 1984). De acordo com a literatura, podemos destacar dois tipos de canais de cálcio dependente de voltagem, os canais do tipo L e do tipo T. Os canais de cálcio ativados por alta voltagem, sensíveis à dihidropiridinas (nifedipina) e que são inativados lentamente, são os do tipo L ($Ca_v1.x$); já os canais de cálcio que são ativados por baixa voltagem e que são inativados rapidamente, são os do tipo T ($Ca_v3.x$) (Catterall et al., 2005; Catterall et al., 2020). No trabalho de Garcia-Pascual e colaboradores (1991), os autores sugeriram que na uretra de cordeiro o componente fásico depende da ativação de canais de Ca^{2+} de inativação rápida (tipo T), enquanto o componente tônico depende da ativação de canais de Ca^{2+} de inativação lenta (tipo L). Esses resultados são apoiados pelo trabalho de Langton e Huddart (1987), que concluíram que no ducto deferente de rato, o componente fásico dependia da ativação de canais de cálcio rápidos que eram prontamente inativados por voltagem, os canais tipo T, enquanto a resposta mantida do componente tônico dependia da ativação de canais lentos dependentes de voltagem, tipo L, que não foram prontamente inativados. Esses resultados indicam que há a participação de diferentes subtipos de Ca_v na contração induzida por KCl

Apesar da literatura descrever a participação de diferentes tipos de canais de cálcio no componente fásico e tônico da contração induzida por KCl, quando comparamos os diferentes componentes da contração entre si, só observamos diferença estatística na concentração de 1 mg/mL para GB2 e na concentração de 10^{-3} M para a quercetina. Assim, nossos resultados sugerem que independente da sinalização envolvida na geração tanto do componente fásico quanto do componente tônico, o GB2 e a quercetina foram capazes de inibir igualmente esses componentes.

4.4 Efeito da nifedipina na contração induzida por KCl

Como citado anteriormente, a contração de células musculares depende da disponibilidade de íons cálcio, e modificações nessas concentrações e alterações funcionais dos canais de cálcio podem interferir na resposta à contração (Duarte, 1993).

A nifedipina que é um bloqueador clássico dos canais de cálcio dependentes de voltagem, foi utilizada a fim de avaliar a participação desses canais na contração induzida por KCl. Nossos resultados mostram que a nifedipina é capaz de inibir de maneira concentração dependente tanto o componente fásico quanto o tônico da contração induzida por KCl, confirmando a participação destes canais em ambos os componentes da contração. Estes resultados vão ao encontro do que já foi reportado na literatura, sobre trabalhos que utilizam a nifedipina na inibição das contrações geradas pelo KCl no ducto deferente (Hay & Wadsworth, 1982a; Hay & Wadsworth, 1982b; Hoy, et al., 1986; Langton & Huddart, 1988; Shibata et al., 1991). Porém, quando comparamos o efeito da nifedipina entre os componentes da contração, demonstramos que não houve diferença significativa entre eles, indicando que há participação de Ca_v -L em ambos os componentes da contração, sendo este

nosso resultado, contrário ao que foi observado por alguns autores que demonstraram que o componente tônico é mais sensível à ação da nifedipina (Hay & Wadsworth, 1982b; Hoy, et al., 1986).

4.5 Efeitos de GB2 e da quercetina na presença da nifedipina

Quando comparamos o efeito inibitório do extrato GB2 ou da quercetina, na presença da nifedipina, observamos que não há diferenças estatísticas entre os componentes fásico e tônico. Sugerindo que tanto o GB2, como a quercetina não atuam exclusivamente por bloqueio de Ca_v-L , já que a resposta causada por cada um deles não foi revertida na presença da nifedipina.

Ao comparamos o efeito de GB2 ou da quercetina, na ausência e na presença da nifedipina, sob os componentes, fásico e tônico, separadamente, observamos dois cenários diferentes.

Na presença da nifedipina, o efeito do GB2 foi potencializado no componente tônico quando comparamos com o efeito somente de GB2, sugerindo que no componente tônico de Nifedipina+GB2 há um mecanismo de relaxamento muscular além da inibição de canais de cálcio voltagem dependente. Enquanto, o efeito da quercetina foi potencializado em ambos os componentes, fásico e tônico, na presença da nifedipina, propondo que a inibição causada pela quercetina não depende unicamente de canais de cálcio dependentes de voltagem.

Nossos achados são contrários aos resultados demonstrados por Rotondo e colaboradores (2009). Estes autores demonstraram que na presença da nifedipina, o efeito inibitório da quercetina sobre a contração gástrica, foi parcialmente revertido, sugerindo assim que a quercetina atua nos canais Ca_v-L , embora não exclusivamente.

4.6 Efeito do GB2 na presença da quercetina

Quando avaliamos o efeito de GB2 na presença da quercetina observamos que o componente tônico foi significativamente mais sensível do que o componente fásico. Esta diferença nos sugere que no componente tônico o GB2 esteja atuando em um mecanismo de inibição adicional ao mecanismo de ação da quercetina. Além disso, em ambos os componentes, também podemos inferir que o GB2 está atuando em um local de ação diferente do local da quercetina, tendo em vista que seu efeito não foi revertido pela mesma. Na comparação do componente tônico entre os grupos GB2 e Quercetina+GB2, observamos que na presença da quercetina, o efeito do GB2 foi potencializado, sugerindo que as substâncias atuam em locais diferentes porém com a mesma função de inibição da contração nesse componente.

Como discutido anteriormente, há na literatura trabalhos que explicam os possíveis mecanismos de ação do GBE e da quercetina, porém não há trabalhos que tenham associado estas duas substâncias. Dessa maneira, até onde foi possível pesquisar, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito da associação de GBE com quercetina.

5. Conclusão

Nossos resultados indicam que GB2 e a quercetina são capazes de inibir algum mecanismo que pode estar envolvido com a geração da contração induzida por KCl em ducto deferente de camundongo. Além disso, também sugerem que este efeito inibitório, de ambas as substâncias, não é dependente exclusivamente da inibição dos canais de cálcio voltagem dependente. Assim, estes achados apontam que o GBE, bem como a quercetina, podem ser estratégias farmacológicas para o tratamento de EP.

Em nossos próximos trabalhos iremos tentar elucidar o mecanismo de ação do *Ginkgo biloba*, assim como da quercetina, uma vez que no presente trabalho demonstramos que as substâncias não estão atuando unicamente pelos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L.

Agradecimentos

Agradecemos imensamente a agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), que possibilitou a realização deste trabalho com o auxílio de uma bolsa de estudo.

Referências

- Amin, A., Abraham, C., Hamza, A. A., Abdalla, Z. A., Al-shamsi, S. B., Harethi, S. S., & Daoud, S. (2012). A standardized extract of *Ginkgo biloba* neutralizes cisplatin-mediated reproductive toxicity in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2012:362049.
- Balanz, L., & Leon, M. (1994). Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem Res.* 19(9): 1131–7.
- Brasil. Farmacopeia Brasileira. (2010). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. (5ª edição.) v. 10.
- Brasil (2006a). Ministério da Saúde Portaria no 971, de 03 de maio de 2006. Diário Oficial da União, Brasília (DF).
- Brasil. (2016). Ministério da Saúde. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília (DF).
- Brasil. (2018). Ministério da Saúde. Saúde Sexual e Saúde Reprodutiva: os homens como sujeitos de cuidado. Diário Oficial da União, Brasília (DF).
- Brasil. (2006b). Ministério da Saúde. Decreto nº 5.813. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília (DF)
- Bruschini, H., Schmidt, R. A., & Tanagho, E. A. (1977). Studies on the neurophysiology of the vas deferens. *Investigative Urology.* 15(2):112-6.
- Capasso, R., Fiorino, F., Ascione, V., Frecentese, F., & Borrelli, F. (2006). Inhibition of rat vas deferens contractions by flavonoids in-vitro. *J Pharm Pharmacol.* 58(3):381-4.
- Catterall, W. A., Lenaus, M. J., & El-din, T. M. G. (2020). Structure and Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 6:60:133-154.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., & Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews,* 57(4), 411–425.
- Chen, X., Salwinski, S., & Lee, T.J. (1997). Extracts of *Ginkgo biloba* and ginsenosides exert cerebral vasorelaxation via a nitric oxide pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 24(12):958-9.
- Cheng, J. T. (1976) Calcium-induced release of calcium in rectal smooth muscle of mice. *Jap. J. Pharmac.* 26, 73-78.
- Delaflotte, S., Auguet, M., Defeudis, F. V., Baranes, J., Clostre, F., Drieu, K., & Braquet, P. (1984). Endothelium-dependent relaxations of rabbit isolated aorta produced by carbachol and by *Ginkgo biloba* extract. *Biomed Biochim Acta.* 43: S212 - S216.
- Dell'agli, M., Galli, G. V., & Bosisio, E. (2006). Inhibition of cGMP-phosphodiesterase-5 by biflavones of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.* 72:468–70.
- Del-Vechio-Vieira, G., Santos, B. C. S., Alves, M. S., Araújo, A. L. A., Yamamoto, C. H., Pinto, M. A. O., Kaplan, M. A. C., & Sousa, O. V. (2016). Bioactivities of the ethanol extract from *Ageratum fastigiatum* branches: antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol.88 no.3.
- Duarte, J. A. R. (1993). *Lesões Celulares do Músculo Esquelético Induzidas pelo Exercício Físico*. Dissertação de doutorado, Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física, Porto, Portugal.
- Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & Freitas, V. (2017). Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules.* 14;22(2):292.
- Francischi, F. B., Ayres, D. C., Ito, R. E., Spessoto, L. C. F., Arruda, J. G. F., & Facio, F. N. (2011). Ejaculação precoce: existe terapia eficiente?. *Einstein (São Paulo),* 9(4), 545-549.
- Gachowska, M., Szlasa, W., Saczko, J., & Kulbacka, J. (2021). Neuroregulatory role of ginkgolides. *Mol Biol Rep.* 48(7):5689-5697.
- Garcia-Pascual, O. A., Costa G., Isla, M., Jimenez, E., & Garcia-Sacristan, A. (1991). Potassium-induced contraction in the lamb proximal urethra: involvement of norepinephrine and different calcium entry pathways, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics,* 256(1), 127–134.
- Gavrilova, S. I., Preuss, U. W., Wong, J. W., Hoerr, R., Kaschel, R., & Bachinskaya, N. (2014). Efficacy and safety of *Ginkgo biloba* extract EGB 761 in mild cognitive impairment with neuropsychiatric symptoms: a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center trial. *Int J Geriatr Psychiatry.* 29(10):1087-95.
- Gillman, N., & Gillman, M. (2019). Premature Ejaculation: Aetiology and Treatment Strategies. *Med Sci (Basel).* 25;7(11):102.
- Giuliano, F. (2011). Neurophysiology of Erection and Ejaculation. *The Journal of Sexual Medicine.* 8,310-315.
- Guo H., Zhang, J., Gao, W., Qu, Z., & Liu, C. (2014). Anti-diarrhoeal activity of methanol extract of *Santalum album L.* in mice and gastrointestinal effect on the contraction CROWof isolated jejunum in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 154(3), 704–710.
- Hay, D. W. P., & Wadsworth, R. M. (1982a). Effects of some organic calcium antagonists and other procedures affecting Ca²⁺ translocation on KCl-induced contractions in the rat vas deferens. *British Journal of Pharmacology.* 76; 1.103–113.

- Hay, D. W. P., & Wadsworth, R. M. (1982b). KCl contractions in the rat intact and bisected vas deferens: contribution of endogenous noradrenaline release. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 10(1), 77–86.
- Hoy, W., Ashley, W., & Cameron, A. N. (1986). Effect of a Smooth Muscle Relaxant from the Stonefish, *Synanceia Trachynis*, on KCl-induced Responses in the Guinea-pig Vas Deferens. *European Journal of Pharmacology*. 129.1.105-12.
- Huddart, H., Langton, P. D., & Saad, K. H. (1984). Inhibition by papaverine of calcium movements and tension in the smooth muscles of rat vas deferens and urinary bladder. *The Journal of Physiology*. 349:1.183–194.
- Jurkiewicz, A., Lafayette, S. S., Nunes, S. H., Martini, L. C., Garcez-do-Carmo, L., & Wanderley, A. (1994). Decreased density of binding sites for the Ca²⁺ channel antagonist [³H]isradipine after denervation of rat vas deferens. *Eur J Pharmacol*. 256:329–333.
- Kierszenbaum, A. L. (2008). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. (2° edição): Elsevier.
- Kiguti, L. R. A., & Pupo, A. S. (2012). Investigation of the Effects of α 1-Adrenoceptor Antagonism and L-Type Calcium Channel Blockade on Ejaculation and Vas Deferens and Seminal Vesicle Contractility In Vitro. *Journal of Sexual Medicine*. 9:1.159-168.
- Kim, J. J., Han, D. H., Lim, S. H., Kim, T. H., Chae, M. R., Chung, K. J., Kam, S. C., Jeon, J. H., Park, J. K., & Lee, S. W. (2011). Effects of *Ginkgo biloba* extracts with mirodenafil on the relaxation of corpus cavernosal smooth muscle and the potassium channel activity of corporal smooth muscle cells. *Asian J Androl*. 13(5):742-6.
- Kubota, Y., Tanaka, N., Umegaki, K., Takenaka, H., Mizuno, H., Nakamura, K., Shinozuka, K., & Kunitomo, M. (2001). *Ginkgo biloba* extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level. *Life Sci*. 5;69(20):2327-36.
- Lafayette, S. S., Vladimirova, I., Garcez-do-carmo, L., Monteforte, P. T., Caricati neto, A., & Jurkiewicz, A. (2008). Evidence for the participation of calcium in non-genomic relaxations induced by androgenic steroids in rat vas deferens. *British journal of pharmacology*, 153(6), 1242–1250.
- Langton, P. D., & Huddart, H. (1987) The involvement of fast calcium channel activity in the selective activation of phasic contractions by partial depolarization in rat vas deferens smooth muscle. *Gen. Pharmac.* 18, 47-55.
- Langton, P. D., & Huddart, H. (1988). Voltage and time dependency of calcium mediated phasic and tonic responses in rat vas deferens smooth muscle—The effect of some calcium agonist and antagonist agents. *General pharmacology*, 19(6), 775–787.
- Lipskaia, L., Limon, I., Bobe, R., & Hajjar, R. (2012). Calcium cycling in synthetic and contractile phasic or tonic vascular smooth muscle cells. In: Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans. *Intech Publishers*. 2: 28–44.
- Luo, X., Xue, L., Xu, H., Zhao, Q. Y., Wang, Q., She, Y. S., Zang, D. A., Shen, J., Peng, Y. B., Zhao, P., Yu, M. F., Chen, W., Ma, L. Q., Chen, S., Chen, S., Fu, X., Hu, S., Nie, X., Shen, C., Zou, C., & Liu, Q. H. (2018). *Polygonum aviculare* L. extract and quercetin attenuate contraction in airway smooth muscle. *Scientific reports*, 8(1), 3114.
- Luz, M. T. (1997). Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no fim do século XX. *Physis*. 7(1):13-43
- Mattos, G., Camargo, A., Sousa, C. A., & Zeni, A. L. B. (2018). Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. *Ciência & Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 23(11), 3735-3744.
- McMahon, C. G., Althof, S. E., Waldinger, M. D., Porst, H., Dean, J., Sharlip, I. D., Adaihan, P. G., Becher, E., Broderick, G. A., Buvat, J., Dabeas, K., Giraldi, A., Giuliano, F., Hellstrom, W. J., Incrocci, L., Laan, E., Meuleman, E., Perelman, M. A., Rosen, R. C., Rowland, D. L., & Se Graves, R. (2008). An evidence-based definition of lifelong premature ejaculation: Report of the International Society for Sexual Medicine (ISSM) ad hoc committee for the definition of premature ejaculation. *J Sex Med*. 5:1590–606.
- Modzelewska, B., Drygalski, K., Kleszczewski, T., Chomentowski, A., Koryciński, K., Kielczewska, A., Pawluszewicz, P., & Razak, H. (2021). Quercetin relaxes human gastric smooth muscles directly through ATP-sensitive potassium channels and not depending on the nitric oxide pathway. *Neurogastroenterol Motil*. 33(7):e14093.
- Moynihan, A. T., Smith, T. J., & Morrison, J. J. (2008). The relaxant effect of nifedipine in human uterine smooth muscle and the BKCa channel. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(2), 237.e1–237.e2378
- Nunez, D., Chignard, M., Korth, R., Le couedic, J. P., Norel, X., Spinnewyn, B., Braquet, P., & Benveniste, J. (1986). Specific inhibition of PAF-acether-induced platelet activation by BN 52021 and comparison with the PAF-acether inhibitors kadsurenone and CV 3988. *Eur J Pharmacol*. 16;123(2):197-205.
- Picarelli, Z. P., Hyppolito, N., & Valle, J. R. (1962). Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats's seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 138, 354–363.
- Rivera, J. O., Hughes, H. W., & Stuart, A. G. (2004). Herbals and asthma: usage patterns among a border population. *Ann Pharmacother*. 38: 220–225.
- Rotondo, A., Serio, R., & Mulè, F. (2009). Gastric relaxation induced by apigenin and quercetin: Analysis of the mechanism of action. *Life Sciences*, 85(1-2), 85–90.
- Sakanashi, Y., Oyama, K., Matsui, H., Oyama, T. B., Oyama, T. M., Nishimura, Y., Sakai, H., & Oyama, Y. (2008). Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca²⁺: a model experiment. *Life Sciences*. 1;83(5-6):164-9.
- Saponara, R., & Bosisio, E. (1998). Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of *Ginkgo biloba* in rat adipose tissue. *J Nat Prod*. 61:1386–7.
- Shi, C., Zhao, L., Zhu, B., Li, Q., Yew, D. T., Yao, Z., & Xu, J. (2009). Protective effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against beta-amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact*. 181:115–123.

- Shibata, S., Satake, N., Morikawa, M., Kown, S. C., Karaki, H., Kurahashi, K., & Kodama, I. (1991). The inhibitory action of okadaic acid on mechanical responses in guinea-pig vas deferens. *European Journal of Pharmacology*, 193(1), 1–7.
- Singh, S. L., Srivastav, S., Castellani, R. J., Plascencia-villa, G., & Perry, G. (2019). Neuroprotective and Antioxidant Effect of *Ginkgo biloba* Extract Against AD and Other Neurological Disorders. *Neurotherapeutics*. 16(3):666-674.
- Smith, P. F., Maclennan, K., & Darlington, C. L. (1996). The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF) J. *Ethnopharmacol.* 50:131–139.
- Waldinger, M. D. (2018): Drug treatment options for premature ejaculation. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19:10, 1077-1085.
- Wallace, A., Gabriel, D., Mchale, N. G., Hollywood, M., Athornbury, K. D., & Gerard, P. S. (2015). Regulation of nerve-evoked contractions of rabbit vas deferens by acetylcholine. *Physiol Rep.* 3(9): e12520.
- Westfall, D. P., Stitzel, R. E., & Rowe, J. N. (1978) The postjunctional effects and neural release of purine compounds in the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 27–32.
- Wu, Y. N., Liao, C. H., Chen, K. C., Liu, S. P., & Chiang, H. S. (2015). Effect of *Ginkgo biloba* Extract (EGb-761) on Recovery of Erectile Dysfunction in Bilateral Cavernous Nerve Injury Rat Model. *Urology*, 85(5), 1214.e7–1214.e15.
- Yoshioka, M., Ohnishi, N., Sone, N., Egami, S., Takara, K., Yokoyama, T., & Kuroda, K. (2004). Studies on interactions between functional foods or dietary supplements and medicines. III. Effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on the pharmacokinetics of nifedipine in rats. *Biol Pharm Bull.* 27(12):2042-5.
- Zhang, L., Li, G., Tao, S., Xia, P., Chaudhry, N., Kaura, S., Stone, S. S., & Liu, M. (2022). *Ginkgo Biloba* Extract Reduces Cardiac and Brain Inflammation in Rats Fed a HFD and Exposed to Chronic Mental Stress through NF-κB Inhibition. *Mediators Inflamm.* 29;2022:2408598.
- Zhang, L., Zhang, X., Li, Q., Xiao, W., Su, E., Cao, F., & Zhao, L. (2021). Optimizing the Desorption Technology of Total Flavonoids of *Ginkgo Biloba* from Separating Materials of Activated Carbon. *ACS Omega.* 10;6(50):35002-35013.
- Zygmuntowicz, A., Markiewicz, W., Grabowski, T., Burmańczuk, A., Vyniarska, A., & Jaroszewski, J. J. (2021). Quercetin affects uterine smooth muscle contractile activity in gilts. *PLoS One.* 16;16(7):0252438. Colocar espaço entre uma referência e outra.