Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Paula Benvindo Ferreira

Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a reatividade uterina de ratas Wistar e efeito preventivo da S*pirulina platensis*

João Pessoa-PB
2019

Paula Benvindo Ferreira

Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a reatividade uterina de ratas Wistar e efeito preventivo da *Spirulina platensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de Concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva

João Pessoa-PB
2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383a Ferreira, Paula Benvindo.
Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a reatividade uterina de ratas Wistar e efeito preventivo da Spirulina platensis / Paula Benvindo Ferreira. - João Pessoa, 2019.
212 f. : il.

Orientação: Bagnólia Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Arthospira platensis. 2. Treinamento de força. 3. Reatividade uterina. 4. Estresse oxidativo. 5. Alterações morfológicas. I. Silva, Bagnólia. II. Título.

UFPB/BC

Paula Benvindo Ferreira

Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a reatividade uterina de ratas wistar e efeito preventivo da *Spirulina platensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de Concentração: **Farmacologia**.

Aprovada em 11/04/2019.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora

Prof. Dr. Vinícius José Baccin Martins
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Morais Gomes
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo

Prof. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna

Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna

“... E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
das lições diárias de outras tantas pessoas.

É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá.
É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho
Por mais que pense estar...”

(Caminhos do coração – Gonzaguinha.)

Dedicatórias

Aos meus pais,
Almir da Costa Ferreira e Ana Cristina Benvindo e Sousa Ferreira, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Essa conquista é nossa! Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação de vocês. Obrigada pelo incentivo para trilhar meus próprios caminhos, por me ensinarem a agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Gratidão pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada. À vocês, todo o meu amor e gratidão.

Aos meus irmãos,
Pablo Benvindo Ferreira, Siluana Benvindo Ferreira e Sávio Benvindo Ferreira, pela amizade, carinho e companheirismo; por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Amo vocês.

A toda minha família,
Por toda compreensão, apoio, orações e amor.

Agradecimentos

A presente tese de doutorado é oriunda da dedicação conjunta de uma equipe, na qual foi necessário auxílio, dedicação, confiança e apoio de muitos. Assim, desejo enredar meus mais sinceros e nostálgicos agradecimentos aos que ajudaram na composição desse trabalho.

À minha orientadora, Prof. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, pelos inúmeros ensinamentos acadêmicos e de vida, pela amizade, por seu exemplo de dedicação profissional, sua solidariedade em compartilhar sempre os seus valiosos conhecimentos; por acreditar e valorizar a profissão farmacêutica e de professor. Agradeço imensamente pela oportunidade de vê-la fazer o que costumo intitular de mágica transformadora, capaz de tornar trabalhos acadêmicos em verdadeiros espetáculos e expandir a confiança e capacidade de seus alunos. Minha eterna gratidão às suas orientações que possibilitaram as conquistas profissionais que tive até aqui e as próximas que hei de alcançar. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Sérgio Silva, pela disponibilidade em sempre ajudar, por todo auxílio sempre que eu os requisitei, por ter aberto o seu laboratório para a realização dos experimentos bioquímicos e por todas as correções. Agradeço imensamente pelo incentivo e pela valorização do meu trabalho que foram essenciais em momentos difíceis da minha trajetória. Espero continuar a parceria e estou à disposição para o que senhor precisar.

À Prof. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pela postura de responsabilidade que sempre demonstra, por auxiliar na coordenação do laboratório, pela disposição em sempre ajudar, pelos conselhos e diversas situações que contribuíram para o meu amadurecimento e crescimento pessoal.

À Profa. Dra. Carla Roberta de Oliveira Costa do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), e sua aluna Dra. Layanne Cabral da Cunha Araujo, pela colaboração nos experimentos moleculares de *western blot*.

Ao Prof. Dr. Adriano Francisco Alves, pela colaboração no processamento das amostras para a análise histológica que enriqueceu grandemente o nosso trabalho.

Aos Professores doutores Vinicius José Baccin Martins do Departamento de Fisiologia e Patologia da UFPB e Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do CCS da UFPB, membros titulares da banca de defesa da tese, Enéas Ricardo de Morais Gomes e Josiane de Campos Cruz, ambos do Departamento de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB, titulares da banca de defesa de Tese; Marianna Vieira Sobral do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, membro suplente da banca de defesa de Tese; Amilton da Cruz Santos, do departamento de Educação Física do CCS da UFPB, titular do exame de qualificação e suplente da banca de defesa de tese; por aceitarem o convite em participar da avaliação desse trabalho; à Maria do Socorro de França Falcão do CBiotec, titular da banca de qualificação e Hemerson Yuri Ferreira Magalhães do DCF do CCS da UFPB, suplente do exame de qualificação, pela disponibilidade em participar da avaliação desse trabalho, pelas suas contribuições, assim como a participação nessa etapa da minha formação acadêmica.

À Prof. Dra. Aline de Freitas Brito, minha amiga e afilhada, pela introdução no laboratório do modelo de exercício e da droga-teste utilizados nesse trabalho, por ter possibilitado acompanhar os experimentos da sua tese e me encantar por essa linha de pesquisa. Pelas dicas científicas e por todos os momentos bons e difíceis que compartilhamos ao longo dos anos, muito obrigada!

À Prof. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, como reitora da UFPB, pela medida de incentivo à publicação essencial para propiciar maior qualidade das nossas publicações e pelo auxílio financeiro ao nosso laboratório no momento político crítico que estamos passando.

Aos alunos de iniciação científica Thiago Afonso Rodrigues Melo e Francisco Lacerda Júnior, alunos diretamente envolvidos na obtenção dos resultados desse trabalho, por todo auxílio na parte experimental que foi essencial para a execução desse projeto. Minha eterna gratidão pelo apoio, pela amizade construída, pela confiança estabelecida, pelos momentos de descontração e por me permitirem acompanhar e aprender tanto com vocês. Esse projeto não teria sido executado sem essa ajuda. Muito obrigada!

À Dra. Glêbia Alexa Cardoso, por me acompanhar nos numerosos experimentos bioquímicos com tanto compromisso e disposição. Obrigada pela ótima companhia e torcida de sempre.

Ao Ms. Anderson Fellyp Avelino Diniz, pela amizade, cumplicidade, disponibilidade e carinho. Obrigada por nunca negar ajuda em tudo, desde o auxílio na execução de experimentos e confecção do material escrito e palavras de conforto nos momentos mais estressantes. Você é um ser de luz e é muito bom trabalhar com você. Obrigada por tudo.

À Dra. Maria Conceição Correia da Silva, pelos ensinamentos na bancada, auxílio nas análises estatísticas e na elaboração da tese. Obrigada por ser uma pessoa tão prestativa, compromissada e disponível à todos. Obrigada pela parceria do último ano, por todas as conversas sobre as dúvidas do futuro e as dificuldades do presente. Minha eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique, pela ajuda nas análises estatísticas e discussão de parte do trabalho. Além disso, agradeço pela convivência e auxílio nos anos que compartilhamos no laboratório, pela evolução que tivemos na nossa relação e pela torcida e amizade.

A todos os integrantes do LFF que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Alana Cristina Costa, Ana Carolina de Carvalho Correia, Ana Caroline de Lima Silva, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva, Bárbara Cavalcanti Barros, Elba dos Santos Ferreira, Eurípedes Targino Linhares Neto, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Gleice Rayanne da Silva, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iana Vitória Souza Oliveira, Iara Leão Luna de Souza, Indyra Duarte Alencar Figueiredo, João Pedro de Moura Lima, Kimã Barbosa Meira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Layanne Cabral da Cunha Araujo, Luan Diniz Pessoa, Manoel Vieira Duvirgens, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Petruska Pessoa da Silva Souza, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayanne Fernandes Pessoa, Sarah Rebeca Dantas Ferreira pela ajuda, boa convivência e pelo apoio característico desta equipe.

Aos amigos que fiz/conheci no laboratório de Farmacologia Funcional: Italo Rossi Roseno Martins, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques

Galvão, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva, Millena de Melo Medeiros, Renata de Souza Sampaio, por todo auxílio enquanto companheiros de laboratório e pela amizade, torcida e companheirismo da vida. Amo vocês.

Aos amigos que fiz na pós-graduação: Danilo Duarte, Danilo Lemos, Leônidas das Graças, Luciano Leite, Ryldene Marques, Rayssa Marques, Rodrigo Formiga, Tassiana Dantas, Talissa Mozzini, Tatianne Mota, Thâmara Melo, Viviane Mendes, Yuri Mangueira os meus agradecimentos por toda torcida, carinho, amizade e momentos de descontração.

À todos os funcionários e alunos do Centro de Biotecnologia da UFPB, por todo auxílio e compreensão durante a minha estadia como professora substituta, em especial ao Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, chefe do departamento de Biotecnologia do CBiotec/UFPB por toda ajuda e paciência com a minha inexperiência.

Ao Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos pelo apoio, torcida, conversas científicas e não-científicas e amizade que cultivamos desde que cheguei na Paraíba. Você é muito especial e nunca esqueça disso.

Ao Prof. Dr. Rivelilson Mendes dos Santos (*in memoriam*) pela oportunidade de ter contato com a pesquisa e a paciência com a qual me fez dar os primeiros passos que determinaram e inspiraram a minha escolha de fazer pós-graduação. Seu legado efêmero e brilhante será sempre lembrado e eternizado. Muito obrigada!

Aos meus amigos farmacêuticos Handerson Lima, Maria Mendes e Paôlla Policarpo por todo carinho, torcida e amizade mesmo estando separados fisicamente. Os nossos reencontros são sempre motivadores e revigorantes. Obrigada por tudo!

À minha família no Piauí, pela torcida e admiração que sentem por mim. Por transbordar os sentimentos sempre que nos encontramos e por dar apoio aos meus pais na nossa ausência. Minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Luís Eduardo Quindere de A. Madureira, por ter sido uma grata surpresa que tive durante o doutorado. Agradeço por você ter me provado que eu tinha tempo para namorar e que você iria me ajudar nesse processo. Com você,

me tornei uma pessoa mais madura e feliz. Obrigada pelo seu altruísmo em fazer o que estiver ao seu alcance para me ajudar em qualquer coisa, por me acompanhar nas madrugadas e finais de semana de experimentos, pela compreensão nessa reta final, pelo carinho, amizade e amor.

Aos amigos que a Paraíba me deu: Alaneya Rejane, Cleber Malta, Elaine Cristina, Elisdagila Silva, Edgard Júnior, Ilmara Cristina e Richard Couras pela imprescindível amizade extra-UFPB tão importante para me dar energia e descarregar parte da carga diária.

À família Ribeiro Viana que me adotaram como membro, pela torcida e apoio de sempre. Pelos nossos encontros anuais marcados sempre por muitas risadas, aperreios e comida. Amo vocês!

A todos os colegas das turmas de Doutorado do PgPNSB, pelos bons momentos e pelo crescimento acadêmico e pessoal compartilhado.

À todos os professores do PgPNSB, com os quais tive a oportunidade de aprender, aperfeiçoar conhecimentos e me inspirar.

Ao coordenador do PPgPNSB, Prof. Dr. Josean Fechine Tavares, pela competência, esforço e entusiasmo com que coordena esse Programa.

À Caroline Mangueira e Nilmar Nincia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, pela disponibilidade, paciência e dedicação com que conduzem seu trabalho.

Ao José Crispim Duarte e à Roberta Nunes Parentoni, pela condução da Unidade de Produção Animal (UPA) e pelo auxílio técnico ao LFF, sempre que solicitado.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado na UPA e pela prestatividade no cuidado com os animais.

À Mônica Rodrigues da Silva, pela execução sempre bem feita do seu trabalho na limpeza, contribuindo para manter o nosso local de trabalho em boas condições, pela alegria, bom humor e prestatividade de sempre.

À Sra. Maria Lusinete Santos do Nascimento, pelo trabalho na limpeza dos materiais do laboratório.

Ao Professor e Conselheiro Federal de Farmácia, José Samuel de Moraes Meira, pelo apoio financeiro concedido fundamental para participação em congressos e eventos científicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e a à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico por meio do Portal Periódicos Capes.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, programa no qual fiz mestrado e finalizo o doutorado na área de concentração de farmacologia, bem como a todos os professores pertencentes a este, que contribuíram com seus ensinamentos e me instigaram a ser uma profissional melhor, além de contribuírem para o meu crescimento pessoal e cientifico.

À Universidade Federal da Paraíba, por todo apoio institucional.

À todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, bem como, para a produção dessa Tese de Doutorado, o meu muitíssimo obrigada!

Meu muito obrigado

Paula Benvindo Ferreira

Resumo

Os benefícios do exercício na saúde física e mental são bem estabelecidos como uma alternativa para a manutenção do bem-estar e como um meio para reduzir o risco de várias doenças crônicas. Entretanto, quando não é prescrito da forma correta, está associado ao estresse oxidativo, envolvido na fisiopatologia de desordens no sistema reprodutor feminino. Nesse contexto, *Spirulina platensis*, uma alga com potencial antioxidante, promoveu efeitos benéficos em modelos de músculo liso. Dessa forma, visando a busca por novas alternativas terapêuticas, avaliou-se os efeitos do exercício de força agudo e crônico e um possível efeito preventivo da *S. platensis* sobre o útero de rata. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela CEUA/UFPB (certidão 0211/14). Os animais foram divididos em grupos salina (GS) e suplementados com *S. platensis* nas doses de 50 (GSP50) e 100 mg/kg (GSP100), grupo somente adaptado (GC, controle), grupos exercitados e eutanasiados imediatamente (GO), 12 horas (G12) e 24 horas após a sessão de exercício físico (G24), grupo treinado por 8 semanas (GT) e suplementados com a alga na dose de 50 (GT50) e 100 mg/kg (GT100). Foi avaliada a reatividade contrátil e relaxante do útero, o balanço estresse oxidativo/defesas antioxidantes sistêmicas e teciduais, a modulação da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e parâmetros histomorfométricos do útero e da glândula adrenal. Observou-se que uma única sessão de exercício de força aumentou a reatividade contrátil, diminuiu a reatividade relaxante uterina, sem alterar o estresse oxidativo tecidual nem a via das MAPK, diminuiu o número de eosinófilos, aumentou a vascularização e a área da camada muscular uterina, contribuindo para o aumento da reatividade contrátil, além de um aumento da área cortical da adrenal, sugestiva de aumento da produção de hormônios catabólicos, como o cortisol. Tendo em vista as diferenças entre as respostas fisiológicas agudas e crônicas do exercício e que o treinamento de força induz um aumento de estresse oxidativo, nos últimos anos, observa-se o aumento do consumo de suplementos antioxidantes como uma ferramenta não invasiva útil para diminuir o dano muscular, melhorar o desempenho no exercício, prevenir ou reduzir o estresse oxidativo. Assim, hipotetizamos que o treinamento de força induziria alterações na reatividade uterina por meio do aumento do estresse oxidativo e que a suplementação com a alga preveniria esses efeitos. Observou-se que o treinamento de força aumenta a eficácia contrátil, diminui a potência relaxante e que esses efeitos são previnidos pela suplementação alimentar com *S. platensis*, por meio da inibição da via das ciclooxigenase, aumento na biodisponibilidade de NO e espécies reativas de oxigênio; además, previne a diminuição da expressão de JNK, sugerindo um papel anti-inflamatório tanto do exercício quanto da suplementação com *S.platensis* e aumenta a vascularização e a área vascular e previne a redução da espessura do miométrio, além de previnir parcialmente o aumento da área fasciculada e de degeneração lipídica, demonstrando um papel protetor frente a liberação de hormônios catabólicos como o cortisol. Portanto, ressalta-se o útero como um órgão-alvo para o exercício, bem como se demonstra que o exercício de força agudo e crônico alteram a reatividade uterina e a suplementação alimentar com a alga previne os danos associados ao treinamento de força revelando o potencial promissor da suplementação alimentar com *S. platensis* em processos fisiopatológicos que envolvem a desregulações na homeostase contrátil uterina e como preventiva para mulheres que praticam atividade física de maneira intensa.

Palavras-chave: 1. *Arthospira platensis*. 2. Treinamento de força. 3. Reatividade uterina. 4. Estresse oxidativo. 5. Alterações morfológicas.

Abstract

The benefits of exercise in physical and mental health are well established as an alternative to maintaining well-being and as a means to reduce the risk of various chronic diseases. However, when it is not prescribed correctly, it is associated with oxidative stress, involved in the pathophysiology of disorders in the female reproductive system. In this context, *Spirulina platensis*, an algae with antioxidant potential, promoted beneficial effects in smooth muscle models. Thus, aiming at the search for new therapeutic alternatives, we evaluated the effects of acute and chronic strength exercise and a possible preventive effect of *S. platensis* on the rat uterus. The experimental procedures were approved by CEUA/UFPB (certificate 0211/14). The animals were divided into saline (GS) and supplemented with *S. platensis* at doses of 50 (GSP50) and 100 mg / kg (GSP100), only adapted group (CG, control), exercised groups and euthanized immediately (GO), 12 hours (G12) and 24 hours after exercise (G24), group trained for 8 weeks (GT) and supplemented with algae at the dose of 50 (GT50) and 100 mg / kg (GT100). The contractile and relaxing reactivity of the uterus, the oxidative stress balance / systemic and tissue antioxidant defenses, the pathway modulation of the mitogen activated proteins kinases (MAPK) and the histomorphometric parameters of the uterus and adrenal gland were evaluated. It was observed that a single strength exercise session increased contractile reactivity, decreased uterine relaxant reactivity, without altering tissue oxidative stress or MAPK pathway, decreased eosinophil number, increased vascularity and area of the uterine muscular layer, contributing to the increase of the contractile reactivity, besides an increase of the cortical area of the adrenal, suggestive of increased production of catabolic hormones, such as cortisol. Considering the differences between the acute and chronic physiological responses of exercise and that strength training induces an increase in oxidative stress, in recent years the consumption of antioxidant supplements has been shown to be a useful non-invasive tool to decrease the muscle damage, improve exercise performance, prevent or reduce oxidative stress. Thus, we hypothesized that strength training would induce changes in uterine reactivity through increased oxidative stress and that algae supplementation would prevent such effects. It has been observed that strength training increases the contractile efficacy, decreases the relaxing potency and that these effects are prevented by dietary supplementation with *S. platensis*, by inhibition of cyclooxygenase pathway, increase in NO bioavailability and reactive oxygen species ; In addition, it prevents the decrease of JNK expression, suggesting an anti-inflammatory role of both exercise and supplementation with *S.platensis* and increases vascularization and vascular area and prevents the reduction of myometrial thickness, besides partially preventing the increase of fasciculated area and lipid degeneration, demonstrating a protective role against the release of catabolic hormones such as cortisol. Therefore, the uterus is highlighted as a target organ for the exercise, as well as showing that the exercise of acute and chronic strength alter uterine reactivity and food supplementation with algae prevents the damages associated with strength training revealing the potential promising dietary supplementation with *S. platensis* in pathophysiological processes that involve deregulation in contractile uterine homeostasis and as a preventive for women who practice intense physical activity.

Keywords: 1. *Arthrospira platensis*. 2. Strength training. 3. Uterine Reactivity. 4. Oxidative stress. 5. Morphological changes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de contração uterina induzida pela ativação do receptor de ocitocina.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 2 - Reações e transformações do ânion superóxido.....

Figura 3 - Efeito de uma sessão aguda de exercício de força sobre a morfologia uterina nos grupos GC, G0, G12 and G24 em ratas.....91

Figura 4 - Efeito do exercício agudo de força sobre a morfologia da glândula adrenal nos grupos GC, G0, G12 e G24 em ratas.....94

Figura 5 - Efeito da suplementação alimentar com Spirulina platensis sobre o útero de ratas dos grupos GS, GSP50 e GSP100.....144

Figura 6 - Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com Spirulina platensis sobre o útero de ratas dos grupos GC, GT, GT50 e GT100146

Figura 7 - Efeito da suplementação alimentar com Spirulina platensis sobre a glândula adrenal de ratas dos grupos GS, GSP50 e GSP100.....150

Figura 8 - Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com Spirulina platensis sobre a glândula adrenal de ratas dos grupos GC, GT, GT50 e GT10.....153

Figura10 - Mapa conceitual dos efeitos preventivo de *S. platensis* em útero de ratas submetidas ao treinamento de força.....181

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil do KCl, nos grupos GC (●), G0 (○), G12 (□) e G24 (■) em útero de rata.....73

Gráfico 2 - Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil da ocitocina, nos grupos GC (●), G0 (○), G12 (□) e G24 (■) em útero de rata.....75

Gráfico 3 - Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante do nifedipino, nos grupos GC (●), G0 (○), G12 (□) e G24 (■) em útero de rata.....77

Gráfico 4 - Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante da isoprenalina, nos grupos GC (●), G0 (○), G12 (□) e G24 (■) em útero de rata.....79

Gráfico 5 - Concentração de MDA em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GC, G0, G12 e G24.....81

Gráfico 6 - Percentual da inibição da oxidação em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GC, G0, G12, G24.....83

Gráfico 7 - Expressão proteica de JNK em útero de rata dos grupos GC, G0, G12, G24.....85

Gráfico 8 - Expressão proteica de ERK1/2 em útero de rata dos grupos GC, G0, G12, G24.....87

Gráfico 9 - Expressão proteica de SOD em útero de rata dos grupos GC, G0, G12, G24.....89

Gráfico 10 - Efeito do exercício de força agudo sobre o número de eosinófilos **(A)**, vasos sanguíneos **(B)**, área vascular **(C)** e muscular **(D)**.....92

Gráfico 11 - Efeito do exercício de força agudo sobre as áreas das camadas glomerulosa **(A)**, fasciculada **(B)**, reticulada **(C)**, medula **(D)** e do número de vacúolos **(E)**, nos grupos GC, G0, G12 e G24 em ratas.....95

Gráfico 12A - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl dos grupos GS (•), GSP100 (○), GSP50 (▲) em útero isolado de rata.....111

Gráfico 13A - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl dos grupos GS (•), GSP100 (○), GSP50 (▲) em útero isolado de rata.....114
Gráfico 14A - Curvas concentrações-resposta cumulativas ao nifedipino dos grupos GS (•), GSP100 (○), GSP50 (▲) em útero isolado de rato pré-contraído com ocitocina.....117
Gráfico 15A - Curvas concentrações-resposta cumulativas à isoprenalina dos grupos GS (•), GSP100 (○), GSP50 (▲) em útero isolado de rato pré-contraído com ocitocina.....120
Gráfico 16 - Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença do Y27632.....123
Gráfico 17 - Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença de apocinina ou de tempol.....125
Gráfico 18 - Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de L-NAME ou indometacina.....128
Gráfico 19 - Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de catalase.....131
Gráfico 20 - Concentração de MDA em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GS, GSP50 e GSP100.....133
Gráfico 21 - Concentração de MDA em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GC, GT, GT50 e GT100.....**Erro! Indicador não definido.**
Gráfico 22 - Percentual da inibição da oxidação em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GS, GSP50 e GSP100.....135
Gráfico 23 - Percentual da inibição da oxidação em plasma **(A)** e em útero **(B)** de rata dos grupos GS, GT, GT50 e GT100.....

Gráfico 24 - Expressão da proteína SOD em útero de ratas suplementadas com S.platensis **(A)** e em ratas treinandas e suplementadas com S.platensis **(B)**.....137
Gráfico 25 - Expressão proteica de JNK em útero de ratas suplementadas c *S.platensis* **(A)** e em ratas treinadas e suplementadas com *S.platensis* **(B)**.....139
Gráfico 26 - Expressão da proteína ERK1/2 em útero de ratas suplementadas com *S.platensis* **(A)** e em ratas treinandas e suplementadas com S.platensis **(B)**.....141
Gráfico 27 - Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o número de eosinófilos **(A)**, vasos sanguíneos **(B)**, área vascular **(C)** e muscular **(D).....**.....145
Gráfico 28 - Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com Spirulina platensis sobre o número de eosinófilos **(A)**, vasos sanguíneos **(B)**, área vascular **(C)** e muscular **(D)** no útero de ratas dos grupos GC, GT, GT50 e GT100.....147
Gráfico 29 - Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as áreas das camadas glomerulosa **(A)**, fasciculada **(B)**, reticulada **(C)**, medula **(D)** e do número de vacúolos **(E)**, nos grupos GS, GSP50 e GSP100 em ratas.....151
Gráfico 30 - Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as áreas das camadas glomerulosa **(A)**, fasciculada **(B)**, reticulada **(C)**, medula **(D)** e do número de vacúolos **(E)**, nos grupos GC, GT, GT50 e GT100 em ratas.....154

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]$	Concentração de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_c$	Concentração de Ca^{2+} citosólico
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração intracelular de Ca^{2+}
$[K^+]_e$	Concentração extracelular de K^+
$4Ca^{2+}$-CaM	Complexo 4 íons cálcio-calmodulina
5-HT7	Receptores de 5-hidroxitriptamina
AA	Acido araquidônico
AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Catalase
Ca_V	Canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_V1	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_V2	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
CPI-17	Proteína inibitória de 17 kDa
DAG	Diacilglicerol
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidrazil
DTT	Ditiotreitol
e.p.m.	Erro padrão da média
EDHF	Fator de hiperpolarizaçao derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

E_{max}	Efeito máximo
ERK	Cinase sensível a estímulos externos
ERNs	Especies reativas de nitrogênio
ET-1	Endotelina
FEN	Fenilefrina
G0	Grupo de animais eutanasiados imediatamente após a sessão de exercício
G12	Grupo de animais eutanasiados 12 horas após a sessão de exercício
G24	Grupo de animais eutanasiados 24 horas após a sessão de exercício
$G_{12/13}$	Proteína G_{12} ou proteína G_{13}
GC	Grupo somente adaptado (controle)
GDP	Difosfato de guanosina
GMP	Monofosfato de guanosina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
$G_{q/11}$	Proteína G_q ou proteína G_{11}
GS	Grupo sedentário
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GST	Glutationa S-transferase
GSH	Glutationa redutase
GSP50	Grupo sedentário 50
GSP100	Grupo sedentário 100
GT	Grupo treinado por 8 semanas
GT50	Grupo treinado 50
GT100	Grupo treinado 100
GTP	Trifosfato de guanosina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCLO	Ácido hipocloroso
$HO^{\bullet}$	Radical hidroxila
$HO_2^{\bullet}$	Radical peridroxila
l**PeFarm**	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

IP_3	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP_3 R	Receptor de IP_3
KCl	Cloreto de potássio
M	Concentração molar (mol/L)
MDA	Malondialdeído
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
MYPT1	Subunidade 1 de ligação da fosfatase da miosina
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NO	Óxido nítrico
NO_2	Dióxido de nitrogênio
ONO_2^-	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
$^1O_2$	Oxigênio singleto
$O_2^{-\bullet}$	Ânion superóxido
O_3	Ozônio
OT	Ocitocina
OTR	Receptor de ocitocina
pCE_{50}	Logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
PG	Prostaglandina
PGE_2	Prostaglandina E_2
PGI	Prostaciclina
PI3K	cinase-3 de Fosfatidilinositol
PIP_2	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PIP_3	3,4,5-trisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKB	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase G
PMCA	Ca^{2+}-ATPase da membrana plasmática

PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa
RhoA	Proteína monomérica da família Rho tipo A
RhoGAP	Proteína ativadora de GTPase da Rho
RhoGEF	Fator de troca de nucleotídeo guanina da RhoA
RL	Radicais livres
RO$^{\bullet}$	Radical alcoxila
ROO$^{\bullet}$	Radical peroxila
ROOH$^{\bullet}$	Radical hidroxiperoxila
ROCK	Proteína cinase associada à Rho
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SERCA	Ca^{2+}-ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de produção animal

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritos no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29
2 REFERENCIAL TEÓRICO 33
2.1 Exercício físico: respostas adaptativas e implicações na saúde 34
2.1.1 Exercício de força 36
2.1.2 Exercício e o sistema reprodutor feminino 38
2.2 Fisiologia uterina 40
2.3 Estresse oxidativo 44
2.3.1 Estresse oxidativo e exercício físico 48
2.4 Produtos naturais marinhos 51
3 Objetivos 57
3.1 Objetivo geral 58
3.2 Objetivos específicos 58
Capítulo I: O útero de rata como alvo para os efeitos agudos induzidos pelo exercício de força 60
4 Metodologia 60
4.1 Material 60
4.1.1 Animais 60
4.1.2 Substâncias e reagentes 61
4.1.3 Programa de Exercício de Força 62
4.1.4 Soluções 63
4.1.5 Aparelhos 63
4.2 Métodos 64
4.2.1 Grupos experimentais 65
4.2.2 Obtenção dos órgãos para os protocolos funcionais e bioquímicos 65
4.2.3 Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil induzida por KCl ou ocitocina em útero de rata. 65
4.2.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina ou nifedipino em útero de rata 66
4.2.5 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas 66
4.2.5 1 Obtenção do plasma 66
4.2.5.2 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino 67
4.2.5.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no plasma e no tecido muscular uterino 67

4.2.6 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a expressão de proteínas das vias de sinalização da proliferação muscular lisa e das defesas antioxidantes 68

4.2.6.1 Análise dos níveis de superóxido dismutase (SOD), Janus cinase (JNK), proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) no tecido uterino 68

4.2.6.1.1 Extração do tecido uterino e corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 68

4.2.6.1.2 *Western blot* 68

4.2.7 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a morfologia uterina e da glândula adrenal de ratas 69

4.2.8 Análise estatística 70

4.2.1 Efeito do exercício de força agudo sobre as respostas contrátil e relaxante em útero de rata 72

4.2.1.1 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta contrátil induzida por KCl72

4.2.1.2 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina 74

4.2.1.3 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta relaxante induzida por nifedipino 76

4.2.1.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta relaxante induzida por isoprenalina 78

4.2.2 Efeito do exercício de força agudo sobre a concentração de MDA no plasma e no útero de rata 80

4.2.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de JNK em útero de rata 84

4.2.5 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de ERK1/2 em útero de rata 86

4.2.6 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de SOD em útero de rata dos 88

4.2.7 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a morfologia uterina e da adrenal em rata 90

4.2.7.1 Análise histomorfométrica em útero de rata 90

4.2.7.1.1 Efeito do exercício de força agudo sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular 90

4.2.7.2 Análise histomorfométrica da glândula adrenal em ratas 93

4.2.7.2.1 Efeito do exercício agudo de força sobre as áreas das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular e do número de vacúolos da glândula adrenal em rata 93

Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* sobre as alterações induzidas pelo treinamento de força em útero de rata 97
5.1 Metodologia 97
5.1 1 Material 97
5.1.1.1 Produto-teste 97
5.1.1.2Animais 97
5.1.1.3Substâncias e reagentes 97
5.1.1.4 Programa de Treinamento de Força 98
5.1.1.5 Soluções 100
5.1.1.6 Aparelhos 100
5.1.2 Métodos 101
5.1.2.1 Grupos experimentais 101
5.1.2.2 Preparo e administração da *S. platensis* 102
5.1.2.3 Obtenção dos órgãos para os protocolos funcionais e bioquímicos 102
5.1.2.4 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a reatividade contrátil induzida por KCl ou ocitocina em útero de rata. 103
5.1.2.5 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina ou nifedipino em útero de rata 103
5.1.2.6 Investigação do mecanismo de ação envolvido nas alterações induzidas pelo treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* 104
5.1.2.6.1 Investigação da participação da via da Rho/ROCK e das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e superóxido dismutase (SOD). 104
5.1.2.6.1.1 Obtenção de curvas cumulativas concentrações-resposta à ocitocina, na ausência e na presença da apocinina, do tempol ou da catalase em útero de rata dos grupos GC, GT, GT100 104
5.1.2.6.2 Investigação da participação da via das COX, do NO e da catalase. 104
5.1.2.6.2.1 Obtenção de curvas cumulativas concentrações-resposta à isoprenalina, na ausência e na presença da indometacina, L-NAME ou catalase, em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina nos grupos GC, GT e GT100 104
5.1.2.7 Avaliação dos efeitos do treinamento de força sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas 105
5.1.2.7 1 Obtenção do plasma 105
5.1.2.7.2 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino 105

5.1.2.7.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no plasma e no tecido muscular uterino 105

5.1.2.8 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a expressão de proteínas das vias de sinalização da proliferação muscular lisa e das defesas antioxidantes 107

5.1.2.8.1 Análise dos níveis de superóxido dismutase (SOD), Janus cinase (JNK) e proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) no tecido uterino 107

5.1.2.8.1.1 Extração do tecido uterino e corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida 107

5.1.2.8.1.2 *Western blot* 107

5.1.2.9 Avaliação dos efeitos do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a sobre a morfologia uterina e da adrenal de ratas 108

Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* sobre as alterações induzidas pelo treinamento de força em útero de rata 110

5.2 Resultados 110

5.2.1 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre as respostas contrátil e relaxante em útero de rata 110

5.2.1.1 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por KCl 110

5.2.2 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina 113

5.2.3 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta relaxante induzida por nifedipino 116

5.2.4 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta relaxante induzida por isoprenalina 119

5.2.5 Avaliação do mecanismo de ação preventivo da *S. platensis* em útero de rata submetida a treinamento de força 122

5.2.5.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina, na ausência e na presença de Y-27632 122

5.2.5.2 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina, na ausência e na presença de apocinina ou de tempol 124

5.2.5.3 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de L-NAME ou indometacina. 127

5.2.5.4 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de catalase 130

5.2.6 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a concentração de MDA no plasma e no útero de rata 132

5.2.7 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre o percentual de inibição da oxidação no plasma e no útero de rata 134

5.2.8 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de SOD em útero de rata 136

5.2.9 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de JNK no útero de rata 138

5.2.10 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de ERK1/2 no útero de rata 140

5.2.11 Avaliação dos efeitos do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre a morfologia uterina e da adrenal em rata 142

5.2.11.1 Análise histomorfométrica em útero de rata 142

5.2.11.1.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular 142

5.2.11.2 Análise histomorfométrica da glândula adrenal de ratas 148

5.2.11.2.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre as áreas das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular e do número de vacúolos da glândula adrenal em rata 148

6 DISCUSSÃO 156

7 CONCLUSÕES 179

REFERÊNCIAS 181

ANEXOS 200

Anexo 1: Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais. 201

Anexo 2: Certificado de análise da *Spirulina platensis.* 202

Anexo 3: Certificado de análise do pó de *Spirulina platensis.* 204

Anexo 4 : Artigo publicado durante o doutorado na revista *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health*, FI: 1,83, em 2015. 205

Anexo 5: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Current Pharmaceutical* 206

Anexo 6: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Fundamental & Clinical Pharmacology*, FI: 2,349, em 2018. 207

Anexo 7: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Current Topics Medicinal Chemistry*, FI: 3,402, em 2018. 208

Anexo 8: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Frontiers in Physiology*, FI: 3,394, em 2018. 209

1 INTRODUÇÃO

Os benefícios do exercício na saúde física e mental são bem documentados na literatura científica como um meio para a manutenção do bem-estar e na redução do risco de várias doenças crônicas (HSU et al., 2014; STANTON; HANDY; MESTON, 2018). Diretrizes do “American College of Obstetricians and Gynecologists” recomendam exercício regular para mulheres por seus benefícios gerais para a saúde (BARAKAT et al., 2014).

No entanto, a essa prática está relacionado a alteração do balanço redox do organismo que pode levar ao estresse oxidativo, condição associada com a fisiopatologia de várias doenças, a citar inflamação, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e câncer (PINGITORE et al., 2015). O efeito do exercício sobre o equilíbrio redox é complexo e dependente da idade, sexo, intensidade e duração do exercício (GARBER et al., 2011).

A prática de exercício, como o exercício de força, está associada ao excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), permanecendo assim, a necessidade de elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos e das condutas adequadas para o uso destas atividades (FULLE et al., 2004). Por outro lado, mecanismos compensatórios são responsáveis por promoverem adaptações por meio do estímulo à atividade antioxidante, anti-inflamatória e redução da atividade simpática (MARCUS et al., 2000).

O aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) associado ao desequilíbrio das defesas antioxidantes implicam no estresse oxidativo, condição relacionada a inúmeras doenças como câncer, diabetes e doenças neurológicas (CECI et al., 2014), pólipos e miomas (KASAPOVIC et al., 2008), endometriose, pré-eclampsia e aborto (AGARWAL et al., 2012). Uma vez que altos níveis de EROs podem ser prejudiciais por promoverem a oxidação de importantes componentes celulares, como proteínas, DNA e lipídios (CECI et al., 2014), a modalidade adequada e a intensidade do exercício devem ser ajustadas, a fim de alcançar um equilíbrio entre a melhoria nos parâmetros relacionados à saúde, a indução do aumento da capacidade antioxidante e a produção de EROs (PINGITORE et al., 2015).

O estresse oxidativo tem sido amplamente estudado no âmbito do exercício aeróbio, entretanto, as respostas ao exercício anaeróbico, como o exercício de

força, ainda são pouco exploradas, concentrando-se majoritariamente nos músculos envolvidos com o exercício, negligenciando as consequências para os outros tipos de músculos. Assim, o interesse em se investigar as alterações que a prática do exercício físico possa causar na musculatura lisa é demasiadamente importante, já que esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos ocos dos sistemas do corpo e suas células estão presentes nas paredes dos vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, vias aéreas e útero (WEBB, 2003). Adicionalmente, a regulação da contração desse músculo apresenta um papel fundamental nos processos fisiológicos do organismo, associando-se a condições patológicas, como a hipertensão arterial, vasoespasmos cerebrais e coronarianos, asma brônquica, disfunção erétil, dispepsia, diarreia, cólica intestinal e uterina, além de possíveis complicações no trabalho de parto (WEBB, 2003).

Considerando a importante participação do estresse oxidativo na etiologia de diversas doenças, incluindo algumas desordens uterinas, e que cargas de treino mal orientadas podem promover estresse oxidativo, nos últimos anos, observa-se o aumento do consumo de nutrientes que podem atuar beneficamente de forma isolada ou associada ao treinamento físico, para melhorar o balanço redox (BENTLEY et al., 2015). A ingestão de alimentos ou suplementos antioxidantes são utilizadas como uma ferramenta não invasiva útil para diminuir o dano muscular, melhorar o desempenho no exercício, prevenir ou reduzir o estresse oxidativo e melhorar o tempo de vida com menores riscos específicos que o exercício extenuante produz em atletas (PETERNELJ; COOMBES, 2011; BRISSWALTER; LOUIS, 2014).

Nesse contexto, os organismos marinhos têm desempenhado um papel relevante entre os produtos naturais, pois fornecem metabólitos secundários com grande diversidade química, destacando-se entre eles os compostos derivados de algas (DE ALMEIDA et al., 2011). Um dos organismos marinhos que merece destaque é a *Spirulina platensis* (Oscillatoriaceae), alga azul-esverdeada que vem ganhando mais atenção devido as suas propriedades medicinais e nutricionais, graças às suas propriedades antioxidantes (SHARMA et al., 2007) e seus efeitos sobre a musculatura lisa de aorta (BRITO, 2014), traqueia (BRITO et al., 2015), íleo (FERREIRA, 2018) e corpo cavernoso (SOUZA, 2018; DINIZ, 2019)

Diante desse cenário, destaca-se que o número de pesquisas relacionadas com a prática de exercício, em especial com o exercício de força, em mulheres ainda é reduzido. Além disso, a intersecção da *Spirulina platensis* e do treinamento físico merece ser investigada. Assim, hipotetisamos que o exercício de força altera a homeostase uterina por meio de aumento no estresse oxidativo, o qual pode trazer danos ao sistema reprodutos feminino e que esses podem ser prevenidos pela suplementação alimentar com *S. platensis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Exercício físico: respostas adaptativas e implicações na saúde

A atividade física e o exercício físico estão associados à numerosos benefícios de saúde física e mental em homens e mulheres, sendo recomendado para a manutenção do bem-estar e como um meio para reduzir o risco de várias doenças crônicas incluindo doença cardíaca coronária, hipertensão, diabetes mellitus tipo II, osteoporose, câncer de cólon, e ansiedade e depressão (PATE et al., 1995; McKINNEY et al., 2016).

Atividade física (AF) pode ser definida como qualquer movimento corporal produzido pela contração do músculo esquelético com ativação de mecanismos de mobilização de substratos energéticos e variam desde atividades com base em interesses pessoais até por necessidades tais como caminhadas, jardinagem e dança e têm como elemento comum o gasto energético, embora a intensidade e duração possam varia consideravelmente. Dessa forma, não pode ser considerado um sinônimo de exercício físico ou treinamento físico, que é definido como toda AF planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo a melhoria e a manutenção de um ou mais componentes da aptidão física (HOWLEY, 2001; NOAKES, 2007; TEIXEIRA, 2010).

Existem consideráveis diferenças interindividuais nas respostas aos programas de exercícios estruturados que podem ser classificadas como agudas ou crônicas. Efeitos ou respostas agudas para a saúde são as mudanças relacionadas à saúde que ocorrem nas horas após uma sessão de atividade física e visam ajustar o organismo à condição desafiadora do exercício. Já os efeitos crônicos (treinamento) ocorrem ao longo do tempo devido a alterações na estrutura ou função de vários sistemas, independente de efeitos agudos. Assim como nas respostas agudas tardias, as respostas crônicas são associadas à melhoria dos sistemas fisiológicos (HOWLEY, 2001).

O treinamento regular exerce inúmeros efeitos benéficos à saúde humana por meio da indução de adaptações homeostáticas nos diversos sistemas fisiológicos como, por exemplo, o cardiorrespiratório e o muscular. (COGGAN; WILLIAMS, 1995). As respostas regulatórias desses sistemas perante o treinamento físico variam conforme a intensidade, duração, tipo de exercício e progressões empregadas.

Nesse contexto, a edição atual de diretrizes para prescrição de exercícios do “American College of Sports Medicine” (ACSM) ajudaram a esclarecer as recomendações de atividade física para a saúde ao fornecer recomendações científicas baseadas em evidências para saúde e condicionamento físico, destinadas à profissionais no desenvolvimento de prescrições de exercício de forma individualizado prescrições para adultos saudáveis de todas as idades (GARBER et al., 2011).

Assim, a magnitude do efeito de um regime de treinamento específico pode variar significativamente entre os indivíduos, bem como os indivíduos submetidos ao treinamento que podem não responder como esperado (GARBER et al., 2011). Múltiplos fatores estão associados à variação nos efeitos do treinamento entre indivíduos, incluindo as características do regime de treinamento, condições ambientais e numerosos fatores individuais, tais como atividade física habitual, nível de aptidão física prévio, genética, e fatores psicológicos, idade e sexo (MARCUS et al., 2000).

O exercício pode se apresentar em diferentes formas, sendo conveniente sistematizar algumas formas de classificação. Inicialmente, tendo como pressuposto a via metabólica predominante, o exercício pode ser classificado como aeróbicos e anaeróbicos. O modelo de exercício aeróbico está envolvido em diversos grupos musculares, por meio de atividades dinâmicas que aumentam a frequência cardíaca e o gasto de energia significativamente, como, por exemplo, caminhada, corrida e ciclismo. A realização constante desse tipo de exercício está associada a melhorias no sistema cardiovascular e nos músculos esqueléticos. Em contrapartida, os exercícios do tipo anaeróbico, como os exercícios de força, são realizados com intensidades elevadas e a maior parte da energia é obtida da glicólise ou da fosfocreatina armazenada (GASTIN, 2001).

Diante disso, têm se investigado cada vez mais a forma pela qual o exercício físico atua e interage de maneira a induzir as adaptações estruturais e funcionais que aprimorem o desempenho físico e propiciem resultados desejáveis à aquisição e manutenção de bons níveis de aptidão física, relacionada à saúde (TEIXEIRA, 2010). Nesse cenário, a ciência busca constantemente aprimorar o conhecimento dos eventos ligados à prática constante de AF.

Com o intuito de contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas ao treinamento físico, as pesquisas farmacológicas se mostram como uma importante ferramenta e os estudos de reatividade são utilizados para explicar alterações promovidas pelo exercício em vários processos importantes, como hipertensão (FARIA et al., 2010), melhoria na ereção peniana (CLAUDINO et al., 2010), diarreia e sangramento intestinal (PEDERSEN et al., 1998) e desordens nas funções reprodutivas como disfunções no ciclo menstrual (WARREN; PERLROTH, 2001).

Estudos realizados demonstram que o exercício aeróbico crônico de natação altera a reatividade contrátil do íleo de rato ao KCl e ao carbacol, diminuindo a amplitude da contração intestinal e promovendo alterações em nível tecidual para estabelecer uma adaptação do órgão ao exercício (ARAUJO et al., 2015). Outros achados revelaram que exercício agudo de natação promoveu uma diminuição da reatividade relaxante e um aumento da reatividade contrátil da aorta de rato, seguido por um aumento na peroxidação lipídica em aorta e coração de rato; além disso, potencializou a reatividade contrátil e diminuiu a reatividade relaxante em traqueia de rato, acompanhado de um aumento da peroxidação lipídica (BRITO et al., 2015).

2.1.1 Exercício de força

Até o início do século XX, os programas de exercícios para promoção da saúde eram baseados, essencialmente, em exercícios aeróbicos e dinâmicos para membros inferiores, como corrida, caminhada e ciclismo. Isso porque a “American Heart Association” e a ACSM não recomendavam o exercício de força ou resistido, porque se acreditava que este era limitado ao aumento de massa muscular (ROBBINS; O'CONEELL, 1998; STANTON; HANDY; MESTON, 2018). Todavia, o número de estudos que corroboram os benefícios do exercício resistido têm aumentarado (POLLOCK et al., 2000).

O treinamento com exercícios resistidos é uma atividade na qual as características força, resistência e massa muscular são desenvolvidas e mantidas, ocasionando mudanças para o organismo, principalmente em aspectos relacionados com regulação metabólica, hipertrofia e coordenação motora, além de melhorar aspectos funcionais das atividades de vida diária (NOBREGA et al., 1999).

Dentre os diversos benefícios do treinamento resistido destacam-se os efeitos positivos sobre as dinâmicas que controlam a homeostasia da musculatura esquelética, melhoria na síntese proteica e promoção de hipertrofia das fibras e do aumento na força muscular (JOZSI et al., 1999). Para suprir a demanda metabólica promovida pela atividade física constante, são necessárias adaptações fisiológicas de todos os sistemas (ZANCHI et al., 2010), gerando alterações expressivas em outros órgãos não relacionados diretamente com o exercício.

O exercício de força realizado de maneira crônica, possui propriedades imunomoduladoras, aumenta os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α), cortisol em homens destreinados (GORZI et al, 2012) e alterações na reatividade relaxante e aumento da peroxidação lipídica (COSTA et al., 2014). A prática dessa modalidade de exercício físico, requer uma alta demanda de energia, o que pode impor um forte estresse sobre a homeostase do corpo, levando às alterações hormonais como a liberação de cortisol, o hormônio catabólico no sangue, o que por sua vez, pode causar distúrbios no sistema reprodutivo feminino (WARREN; PERLROTH, 2001).

Apesar das alterações na responsividade em resposta ao exercício de força estar sendo investigada, os protocolos de treinamento são bastante distintos e distantes do que poderia ser extrapolado para humanos. Em nosso estudo, além de avaliar a reatividade relaxante e contrátil, o protocolo de treinamento utilizado foi baseado em um praticado por humanos em condições reais de atividade física, com exercícios de saltos, simulando o exercício de agachamento. O protocolo era constituído por 4 séries de 10 repetições, com carga progressiva partindo de 50% até 80% de 1 RM por um período de 8 semanas, cumprindo com as premissas adequadas para prescrição de exercício para humanos (GARBER et al., 2011; MARQUETI et al., 2006).

Este protocolo já havia sido proposto em um estudo para induzir hipertrofia muscular em ratos (MARQUETI et al., 2006) e foi evidenciado que o efeito de melhoria relaxante e redução da resposta contrátil já consolidado na literatura para o treinamento aeróbico também é observado para o treinamento de força adotado nesse estudo com características mais próximos das adotadas por humanos. Além disso, os resultados demonstram então uma melhor resposta vasodilatadora e uma inibição vasoconstritora poderiam explicar a redução da pressão arterial que tem

sido observada em humanos que se submetem a programas de treinamento de força, como já bem descrito em artigos (LIMA et al., 2013; BRITO et al., 2014) e metanálises publicadas (CARDOSO et al., 2010; ANUNCIAÇÃO; POLITO, 2011).

De maneira geral, o número de estudos correlacionando o treinamento de força e a reatividade de modelos de músculo liso ainda são bastante reduzidos, sendo realizados em sua maioria em leitos vasculares. Diante disso, há uma necessidade da ampliação dessas investigações, principalmente porque as características mecânicas entre o exercício aeróbio e o exercício de força são diferenciadas. Como o exercício aeróbio demanda um período de trabalho muscular prolongado, e no exercício de força o trabalho muscular é de natureza descontínua, há diferenças no padrão do fluxo sanguíneo periférico, de modo que as funções vascular, intestinal, respiratória e uterina podem apresentar comportamento bastante distinto, fenômeno este que necessita ser mais explorado.

2.1.2 Exercício e o sistema reprodutor feminino

Nas últimas décadas, as mulheres tornaram-se cada vez mais ativas fisicamente e evidências demonstram que o treinamento físico pode aumentar autoestima, aptidão cardiorrespiratória, ovulação, regularidade menstrual, enquanto diminui a resistência à insulina e gordura corporal (BANTING et al., 2014). Apesar disso, vários estudos relataram que o sistema reprodutor feminino é altamente sensível ao estresse fisiológico e mulheres praticantes cargas excessivas de treinamento físico podem ser acometidas de osteoporose e de distúrbios reprodutivos, incluindo menarca tardia, amenorreia primária e secundária e a oligomenorreia que ocorrem em 6 a 79% das mulheres envolvidas em atividades atléticas (WARREN; PERLROTH, 2001; SOUZA; WILLIAMS, 2004).

Quando a prática do exercício está associado a baixa ingestão calórica com ou sem comportamento de desordem alimentar, relaciona-se a alterações endócrinas que levam a disfunções menstruais, além de comprometimento do desempenho, problemas gastrointestinais e aumento do risco de lesões (BURKE, et al., 2018).

Adicionalmente, o exercício também está associado a um conjunto de riscos para a atleta feminina entre eles, alteração no eixo hipotálamo-hipófise-ovário

resultando em disfunção hipotalâmica com consequente a alteração da liberação do GnRH. Alto nível de cortisol sérico resultante do estresse fisiológico induzido pelo exercício somado a baixa disponibilidade de energia resultante são fatores relacionados a supressão da liberação de gonadotrofina e hipoestrogenismo observados em mulheres atletas (MORAVAT et al., 2014).

No sistema reprodutor feminino, o exercício induz eventos de isquemia/reperfusão que podem ser associados com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) devido ao desvio do débito cardíaco para o músculo esquelético em atividade e para a pele, resultando na em isquemia na região pélvica, eventualmente causando estresse oxidativo durante a reperfusão no período da recuperação. O exercício físico agudo pode ser considerado como um estressor, com potencial para aumentar as EROs, principalmente por meio da produção mitocondrial de superóxido e de peróxido de hidrogênio, mas também através de outros mecanismos, como isquemia-reperfusão, auto-oxidação de catecolaminas e ativação de neutrófilos (JI., 1996). Disfunções no hipotálamo e alterações na secreção do hormônio regulador da liberação de gonadotrofina (GnRH), resultando em menarca tardia, amenorreia, oligomenorreia, redução da fase lútea e não ovulação (DADGOSTAR et al., 2009). Quando associado com uma baixa ingestão nutricional, o exercício pode causar estados patológicos, tais como transtornos alimentares e osteoporose (WEIMANN, 2002).

No entanto, informações acerca dos efeitos do treinamento na função uterina são vagas e na ausência de dados sobre o tipo de exercício, intensidade ou duração que gere benefícios para mulheres, o uso desse meio como alternativa para a saúde se torna um implemento desafiador. Assim, é relevante destacar que estudos que demonstrem as alterações que a prática de exercício intenso, como o exercício de força, exercem em tecidos não diretamente envolvidos com o movimento, tais como o sistema reprodutor feminino, se fazem necessários a fim de fornecer as informações necessárias para os profissionais de saúde que o recomendam como uma ferramenta terapêutica, deixando-os cientes da influência positiva ou negativa do exercício de força sobre a fisiologia uterina, bem como da sua relevância como terapia adjuvante em desordens uterinas como dismenorreia, prevenção do aborto, entre outras.

2.2 Fisiologia uterina

O músculo liso uterino pode geralmente ser delineado em duas camadas situadas entre o revestimento do útero (endométrio) e a camadas de proteção externa (perimétrio) (YOUNG, 2007; ARROWSMITH et al., 2014). Em espécies não-primatas, o miométrio é formado por duas camadas distintas: uma camada longitudinal exterior e uma camada circular interna, acomodadas de forma perpendicular umas às outras, sendo esta a maior camada que compõe o útero. No entanto, no ser humano, a subestrutura do miométrio não é tão bem definida (HUSZAR; NAFTOLIN, 1984). A espessura do miométrio é composta de feixes musculares entrelaçados que frequentemente envolvem numerosos vasos sanguíneos. Este arranjo histológico é fundamental para caracterizar a formação da placenta hemocorial característica de primatas (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

As forças contráteis deste órgão podem ocorrer em qualquer direção que o permite assumir praticamente qualquer forma, assim atribuindo ao útero a capacidade de realizar suas funções fisiológicas, como, propiciar um ambiente protetor para o desenvolvimento do feto, que se dá através do crescimento e estiramento durante a gravidez. Já nos mecanismos do trabalho de parto, ele se contrai ritmicamente para expulsar o feto e a placenta, além de contrair-se também para renovar as células do endométrio (SOSA-STANLEY; BHIMJI, 2017; GRUBER, 2011).

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

O miométrio é um tecido excitável, ou seja, aciona potenciais de ação e possui um potencial de repouso de membrana significativamente negativo (WRAY et al. 2001). Além disso, pode ser considerado miogênico, cujo potenciais de ação são produzidos pelas células musculares sem a necessidade de estímulos extrínsecos (nervoso, hormonal, mecânico) (WRAY, 2003). O controle de um músculo miogenicamente ativo, como o miométrio, está intimamente relacionado à expressão de canais iônicos e suas propriedades e níveis de expressão que irão conduzir ou amortecer o disparo de potenciais de ação e, portanto, as mudanças de cálcio e

ciclagem de pontes cruzadas de actina e miosina (WRAY et al., 2015), por meio da ligação cíclica da porção globular da miosina com a actina, seguida por uma mudança do ângulo de orientação do complexo actina-miosina, permitindo o deslizamento de um filamento sobre o outro (HUXLEY; NIEDERGERKE, 1954).

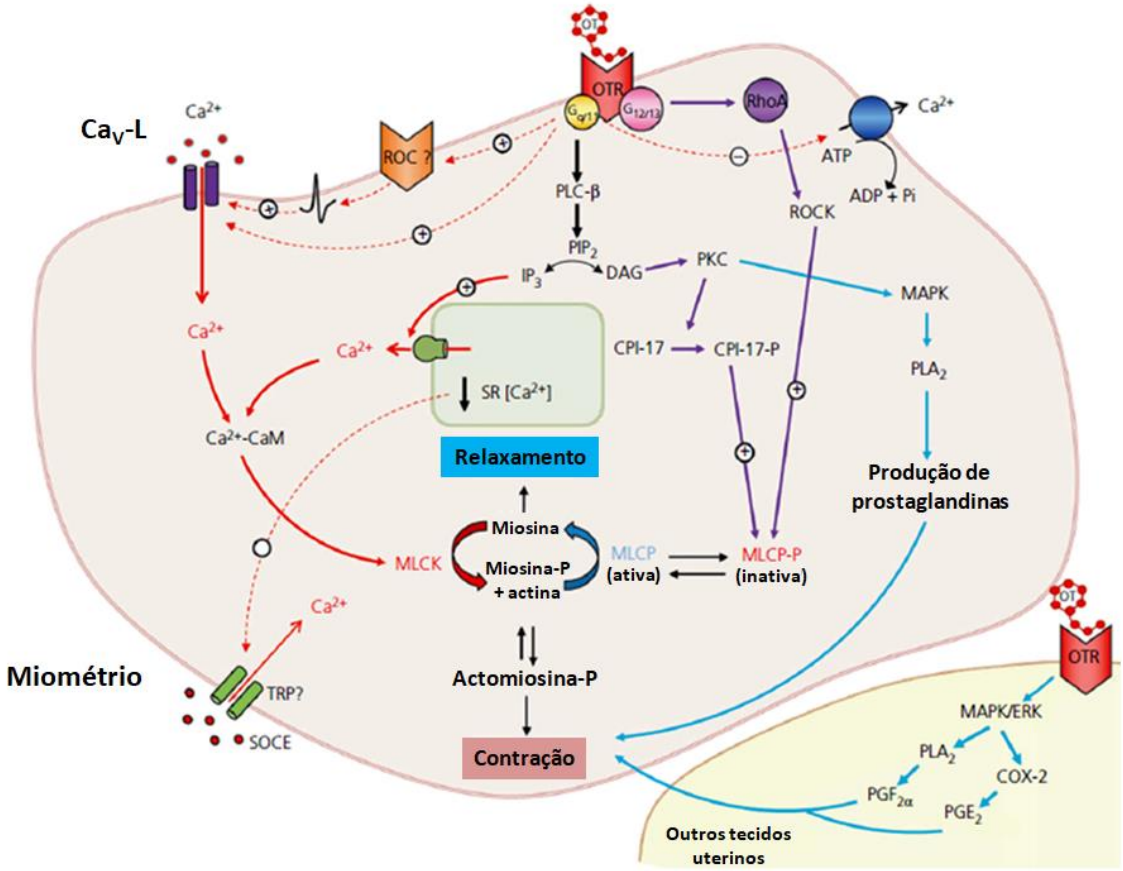
Nas células musculares lisas uterinas, a força de contração depende do equilíbrio entre as atividades da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) porque estes ditam a extensão da fosforilação da miosina e, portanto, a contração. A fosforilação das cadeias leves por MLCK é responsável por causar contração e a desfosforilação pela MLCP provoca relaxamento (Figura 1).

As contrações uterinas acontecem pelo acoplamento farmacomecânico e eletromecânico, que se dão predominantemente, por aumento na concentração de cálcio citosólica ($[Ca^{2+}]_c$) (AGUILAR; MITCHELL, 2010), sendo o acoplamento farmacomecânico induzido pela liberação de cálcio (Ca^{2+}) dos estoques intracelulares mediados por 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e o acoplamento eletromecânico de contração relaciona-se com a mudança no potencial de repouso promovendo a despolarização da membrana, desencadeando o influxo de Ca^{2+} pelos canais de cácio dependentes de voltagem (Ca_v) e, consequentemente, uma resposta contrátil. Essa despolarização está, geralmente, associada diretamente a um aumento da concentração extracelular do íon potássio ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ação de agonistas que possuem acoplamentos mistos (eletro e farmamecânico) (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

A atividade uterina pode ser modulada por diversos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Por exemplo, os receptores acoplados a $G_{q/11}$, como os de ocitocina (OT), de prostanoides (FP e TP), da endotelina (ET-A e ET-B) ativam a cascata do inositol, mediando a produção de IP_3 e estimulando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). Os agonistas contráteis também podem elevar a $[Ca^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do RS e estimular o influxo desse íon pelos múltiplos tipos de canais, incluindo canais de Ca^{2+} operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; MCFADZEAN; GIBSON, 2002). O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ favorece a ligação do Ca^{2+} à calmodulina (CaM) e este complexo ativa a MLCK para fosforilar a cadeia leve da

miosina (MLC) e promover a interação de miosina com actina, levando a contração (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989) (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismo de contração uterina induzida pela ativação do receptor de ocitocina.



A ligação de ocitocina ao seu receptor (OT), ativa $G_{\alpha q/11}$, que ativa PCLβ, que hidrolisa PIP_2 em IP_3 e DAG. IP_3 ativa seus receptores no RS e libera Ca^{2+}, enquanto o ativa a PKC. A ativação de $G_{\alpha q/11}$ promove a abertura de Ca_V e a entrada de Ca^{2+}, direta ou indiretamente, por um mecanismo ainda não bem esclarecido. Além disso, $G_{\alpha q/11}$ inibe a PMCA, aumentando a $[Ca^{2+}]_c$. O aumento de Ca^{2+} forma o complexo $4Ca^{2+}$-CaM que ativa a MLCK, resultando na interação actina-miosina e contração do músculo liso do miométrio. Em adição, a ativação de PKC pelo DAG resulta em ativação da CPI-17 e da MAPK, que ativa PLA_2, contribuindo para produção de prostaglandinas contráteis. A ativação de OTR também ativa $G_{12/13}$, que ativa RhoA e ROCK. Tanto ROCK como CPI-17, inibem MLCP, levando ao aumento da fosforilação da MLC em um mecanismo conhecido com via de sensibilização ao Ca^{2+}. A ativação de OT também aumenta a produção de prostaglandinas em outros tecidos uterinos, que atuam como sinalizadoras parácrinas no miométrio. As setas vermelhas indicam a influência direta sobre a $[Ca^{2+}]_c$, enquanto as setas púrpuras e azuis indicam as vias de sinalização independentes de Ca^{2+} para a contração do miométrio.

Fonte: Adaptado de ARROWSMITH; WRAY, 2014.

A ocitocina, parte integrante do trabalho de parto em mamíferos, permanece o hormônio melhor estudado em relação aos efeitos sobre a excitabilidade uterina e exerce efeito pró-contratilidade na condução do trabalho de parto, uma vez que

aumenta a duração potenciais de ação e aumenta sua freqüência (NAKAO et al., 1997). A ligação da ocitocina ao seu receptor também leva a ativação de proteínas Rho (uma família de proteínas de homologia Ras) regulam as interações actina-miosina e a sensibilidade ao Ca^{2+} nas proteínas contráteis do músculo liso. No miométrio, RhoA é ativada principalmente via ativação de proteínas $Gq_{12/13}$, que por sua ativa a Rho cinase (ROCK). ROCK então inibe MLCP por fosforilação de sua subunidade de ligação a miosina (MYPT1), inibindo assim a desfosforilação da cadeia leve da miosina. Isso produz um maior nível de fosforilação da cadeia leve da miosina, sendo esse processo de manutenção da contração também conhecido como via de sensibilização ao Ca^{2+} (Figura 1).

Após a ativação do receptor de ocitocina, a proteína cinase C (PKC) ativado pelo diacilglicerol também pode afetar a atividade da MLCP, quer pela fosforilação da fosfatase diretamente, ou via peptídio inibidor de fosfatase ativada por PKC, de 17 kDa (CPI-17), um inibidor específico da MLCP do músculo liso (ARROWSMITH et al., 2014). Estes efeitos da ocitocina podem ser parcialmente explicados por suas ações nos mecanismos de influxo e efluxo de Ca^{2+} e também através de canais Ca^{2+} operados por estoque (WRAY et al., 2015) (Figura 1).

Além das influências diretas da ocitocina na relação força-cálcio no miométrio, esse homônio pode ter outras funções que modulam a contração miometrial independente do aparelho contrátil, tais como: aumentando a expressão de conexina no corpo lúteo facilitando a coordenação e a sincronicidade das contrações do miométrio;sinalização do receptor OT em tecidos como amniôn e descídua; nas células do epitélio amniótico humano foi evidenciado por Terdizou e colaboradores um aumento nas concentrações de RNAm para OTR no início do trabalho de parto, e a incubação dessas células com a ocitocina mimetizou uma ativação da ciclo-oxigenase do tipo 2 e síntese da prostaglandina E_2 e F_{2a}, que, via ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) pela PKC, medeia alterações contráteis no útero (ZINGG; LAPORTE, 2003; WRZAL et al., 2012). (Figura 1).

As prostaglandinas (PGs) são ramificações de uma grande família de compostos endógenos biologicamente ativos (PAYTON; BRUCKER, 1999), membros da família dos eicosanoides, derivados do ácido araquidônico (AA) por meio da conversão do AA pela enzima ciclo-oxigenase (COX). As PGs são moduladoras - chave da contração do miométrio e a dismenorreia primária está

relacionada com um elevado nível de prostaglandina no período da menstruação (CHWALISZ; GARFIELD, 2000).

O relaxamento uterino é mediado pela ativação de receptores acoplados a proteína Gs como os β_2-adrenérgicos, prostanoides (EP_2 e IP), receptores de 5-hidroxitriptamina ($5\text{-}HT_7$) que aumenta os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) do miométrio. Além disso, os receptores acoplados a Gi/o, como os α_2-adrenérgicos, os receptores M_2 da acetilcolina e o $5\text{-}HT_1$ da serotonina potencializam a contratilidade por inibir a produção de cAMP (BERNAL, 2003). A regulação fisiológica do miométrio uterino também é modulada pelo óxido nítrico (NO), um conhecido indutor de apoptose, que pode participar na iniciação e controle do sangramento menstrual (JOHNSON et al., 2004) e a liberação basal de NO está envolvida na síntese de prostaglandinas, especialmente de PGE_2, resultando no relaxamento do útero não-grávido (SIEMIENIUCH et al., 2009).

Sabendo-se que essas vias de sinalização estão presentes e são importantes na regulação da contratilidade muscular lisa do útero, sendo os prováveis alvos para o exercício e a para a suplementação alimentar com *S. platensis*, pretende-se investigar o mecanismo de ação preventivo da alga no útero de ratas submetidas ao exercício agudo de força, além de compreender os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos nas alterações causadas pelo exercício no sistema reprodutor feminino, sendo esse um fator imprescindível para o acompanhamento e prescrição do exercício físico.

2.3 Estresse oxidativo

A geração excessiva de EROs leva a morte celular morte por apoptose ou necrose, entretanto, os níveis homeostáticos e fisiológicos das EROs são indispensáveis na regulação de diversos processos celulares, incluindo função de canal iônico/transportador, produção de “spikes” de Ca^{2+}, ativação de proteínas cinase/fosfatase e expressão gênica (WANG et al., 2008; ZHAO et al., 2013).

As EROs se referem tanto aos radicais derivados do metabolismo do O_2, como também a derivados “não radical reativo ao O_2 (por exemplo, peróxido de hidrogênio), assim como o termo espécies reativas de nitrogênio (ERNs) referem-se aos radicais de nitrogênio reativos a outras moléculas em que o centro reativo é o

nitrogênio (POWERS; JACKSON, 2008). As EROs e ERNs mais comuns, na ordem de capacidade reativa, são: ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), oxigênio singleto ($^1O_2$), radical peroxila ($HO_2^{\bullet}$), óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e peroxinitrito ($ONOO^-$), radical peridroxila ($HO_2^{\bullet}$), radical hidroperoxila ($ROOH^{\bullet}$), ácido hipocloroso (HCLO), ozônio (O_3) e dióxido nítrico (NO_2) (POWERS; JACKSON, 2008).

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal via para a geração de radical em sistemas biológicos que envolve o transporte de elétrons mitocondrial, onde o oxigênio é utilizado para a produção de ATP. O complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH) inicia a cascata de reações oxidativas ao produzir o O^{2-} (LIU et al., 2016; SILVA et al., 2013). Em seguida, o O^{2-} é dismutado a H_2O_2, através de reações espontâneas ou catalizadas enzimaticamente. Ambos O^{2-} e H_2O_2 podem reagir, na presença de ferro ou outros metais, para formar o radical OH^- (BRUNORI; ROTILIO, 1984) (Figura 2).

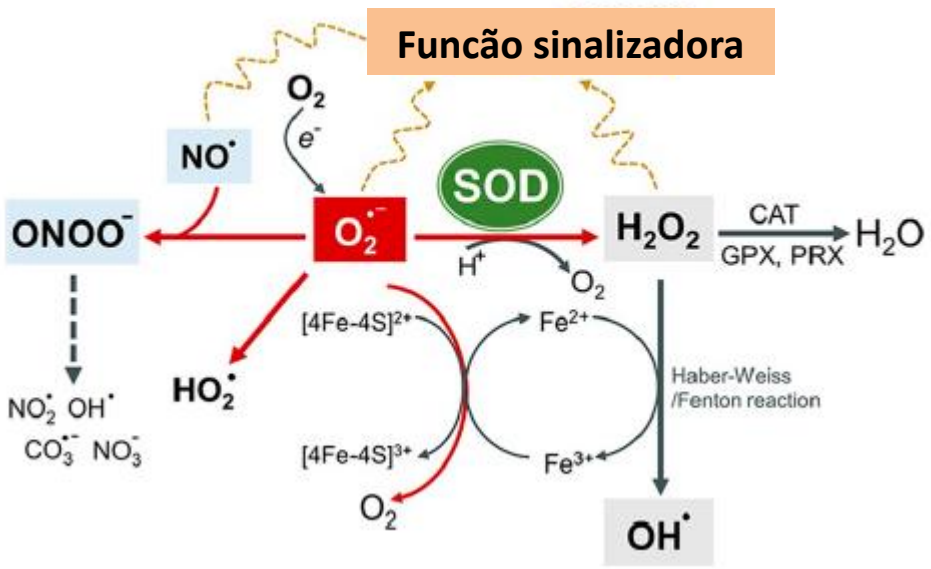
Sob condições fisiológicas, a maior parte do oxigênio consumido pelas células é reduzida à água na mitocôndria por meio de uma série de reduções de unielétrons através da ação do complexo citocromo oxidase. No entanto, 1-5% da passagem de oxigênio ao longo da cadeia respiratória pode dar origem ao $O_2^{-\bullet}$, que conduz a outras espécies não radicalares (H_2O_2) e radicais ($HO^{\bullet}$). No entanto, pode haver outros locais de geração de espécies reativas na cadeia de transporte de elétrons (SUGAMURA; KEANEY, 2011). As mitocôndrias também geram o óxido nítrico, que pode reagir com $O_2^{-\bullet}$ para formar peroxinitrito $ONOO^-$, um potente oxidante (GIULIVI, 1998) (Figura 2).

Además, outros meios importantes para produção dos radicais livres englobam microssomos e diversas enzimas, destacando-se a xantina oxidase, a mono-oxigenase P450, a ciclo-oxigenase, a lipoxigenase, a indolamina dioxigenase e a monoamina oxidase (MATSUZAWA-NAGATA et al., 2014; MATSUDA; SHIMOMURA, 2013).

Quando as EROs se apresentam em concentrações fisiológicas, desempenham um importante papel na modulação da expressão de genes e na sinalização das vias de transdução celulares (SEN; PACKER, 1996; FINKEL, 2003). No entanto, quando são produzidas em excesso por um tempo considerável, elas podem atacar macromoléculas como as proteínas celulares, lipídios de membrana e

DNA, além de aumento nas respostas pró-inflamatórias (XU et al., 2006; EMERIT et al., 2004).

Figura 2 - Reações e transformações do ânion superóxido.



SOD são enzimas que catalisam a dismutação do superóxido ($O_2^{-\bullet}$), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A catalase (CAT), glutationa peroxidases (GPXs) e as peroxiredoxinas PRXs convertem H_2O_2 em água. H_2O_2 pode reagir com metais ativos redox (por exemplo, ferro) para gerar o radical hidroxi (OH $^{\bullet}$) através da reação de Fenton / Haber-Weiss. A reação entre o $O_2^{-\bullet}$ e óxido nítrico (NO $^{\bullet}$) produz $ONOO^-$, cuja decomposição, por sua vez, dá origem a alguns intermediários altamente oxidantes incluindo $NO_2^{\bullet}$, OH $^{\bullet}$ e $CO_3^{\bullet}$ e NO^{3-}. Assim sendo, quando os níveis de $O_2^{-\bullet}$ aumentam, pode diminuir a biodisponibilidade de NO $^{\bullet}$ e gerar $ONOO^-$. $O_2^{-\bullet}$ por si só pode reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}) ao ferro ferroso (Fe^{2+}) no centros ferro-enxofre de proteínas, levando à inativação enzimática e concomitante perda de Fe^{2+} das enzimas, que por sua vez alimenta a protonação de $O_2^{-\bullet}$ que pode formar o radical hidroperoxil mais reativo ($HO_2^{\bullet}$).

Os alvos relativamente bem reconhecidos da sinalização de EROs incluem proteínas fosfatases (PTPs), proteínas tirosina cinase não receptoras (PTKs), proteína cinase C (PKC), proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e fatores transcricionais (TFs) (WHANG et al., 2018) e se dá principalmente pela ação potencialmente tóxica do $O_2^{-\bullet}$ que pode oxidar aglomerados de ferro-enxofre nas proteínas (por exemplo, o ciclo de Krebs e a enzima citosólica aconitase), resultando em perda da atividade enzimática. Além disso, o átomo de ferro liberado neste processo pode reduzir diretamente o H_2O_2 e gerar radicais altamente tóxico (LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999; IMLAY, 2003).

As células produzem continuamente espécies reativas como parte dos processos metabólicos. Estes radicais livres são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante que são agrupados em sistemas enzimáticos (são os primeiros a agir) e não enzimáticos. Enzimas antioxidantes principais incluem a SOD, a CAT e as enzimas dependentes da glutationa, como a glutationa peroxidase (GSH-Px), a glutationa S-transferase (GST), a glutationa redutase (GSH) e a glutationa sintetase (RAHA; ROBINSON, 2000; POWERS; JACKSON, 2008).

O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Um segundo mecanismo é através da interceptação de radicais livres, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA. Antioxidantes obtidos da dieta são extremamente importantes na intercepção. Outro mecanismo é o reparo das lesões através da remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (BLOOMER, 2008).

A SOD existe em três isoformas, duas das quais que são intracelulares: SOD1, responsável por aproximadamente 90% da SOD total e existe no citoplasma e combina com cobre ou zinco para formar um dímero; e SOD2, um indutível enzima mitocondrial que combina com manganês para formar um tetrâmero. SOD3 existe no espaço extracelular e combina com cobre ou zinco para formar um tetrâmero (ZHAO et al., 2013).

Estudos demonstraram que a perda da atividade da SOD está associada a níveis aumentados de dano oxidativo como peroxidação lipídica da membrana, carbonilação de proteínas e quebra de DNA, sugerindo que a remoção insuficiente do $O_2^{-\bullet}$ produzido endogenamente é deletério para a célula (VAN REMMEN et al., 2003; ELCHURI et al., 2005; YANG et al., 2007). Além disso, a decomposição do $ONOO^-$ (formado a partir do $O_2^{-\bullet}$) também resulta na formação de algumas espécies reativas como $OH^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$ e $CO_3^{\bullet}$ (THARMALINGAM et al., 2017) e as SODs são as únicas enzimas que podem prevenir essa formação

Dessa forma, constata-se o papel fundamental dessa enzima antioxidante e sua perda pode induzir potencialmente um aumento do estresse oxidativo e nitrosativo, além do mais, também pode ser tóxica por perturbar a sinalização de EROs diminuindo a concentração de H_2O_2. De fato, os mais conhecidos

mecanismos de como as EROs agem como moléculas sinalizadoras consistem na oxidação pelo H_2O_2 de grupos tiol presentes nos resíduos de cisteínas de proteínas-chaves com funções reguladoras (FINKEL, 2001). A oxidação dos resíduos reativos de cisteínas pode resultar em uma ampla gama de modificações pós-traducionais resultando em alteração da função da proteína, estabilidade e localização subcelular (RHEE, 2006).

Uma classe amplamente estudada de alvos da regulação redox é a família da proteína tirosina fosfatase (PTPs), que juntamente com receptores de tirosina cinases, desempenham um papel regulador em muitas funções celulares (TRACHOOTHAM et al., 2008). O H_2O_2 também mostrou desempenhar um papel na ativação da via de sinalização da tirosina cinase intracelular e proteínas cinases específicas de serina/treonina (MAPK e Akt) (NAKASHIMA et al., 2002; CORCORAN; COTTER, 2013).

O estresse oxidativo produz radicais livres que podem atacar ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular levando a uma cadeia de reações químicas chamadas peroxidação lipídica. A maioria dos estudos tem utilizado o malonilaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, como uma medida do estresse oxidativo imposto pelo exercício. O MDA pode ser medido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectrofotometria ou espectrofluorescência tanto em tecidos como no plasma ou sangue (URSO; CLARKSON, 2003).

2.3.1 Estresse oxidativo e exercício físico

Apesar dos benefícios atrelados a prática regular de AF, um número considerável de estudos demonstrou que o estresse oxidativo pode ocorrer durante e após uma sessão de exercício (DEATON; MARLIN, 2003). Exercício físico pode aumentar o consumo sistêmico de oxigênio, causando a geração excessiva de EROs que, por sua vez, provocam reações de estresse oxidativo, sendo o dano oxidativo muscular, a mais comum dessas reações (ZHAO et al., 2013). Ele ocorre através da geração de radicais livres de várias maneiras: por um aumento de 2 a 5% do consumo de oxigênio na forma de radicais livres; à medida que a fosforilação oxidativa aumenta em resposta ao exercício, haverá um concomitante aumento de

radicais livres. A outra maneira é pela liberação de catecolaminas durante o exercício que pode levar a produção de radicais livres (COOPER et al., 2002).

É bem aceito na literatura que o exercício exaustivo aumenta bruscamente as EROs, o que é deletério, causando lesões, envelhecimento e morte celular (GOMEZCABRERA; DOMENECH; VIÑA, 2008). Assim, os benefícios do exercício diminuem nas atividades exaustivas, especialmente quando esporádica, pois esta causa prejuízo às células musculares e reações inflamatórias dentro do músculo através do aumento da atividade plasmática de enzimas citosólicas, sarcolema e ruptura da linha Z (ARMSTRONG; OGILVIE; SCHWANE, 1983). No entanto, a realização de um treinamento físico crônico bem estruturado desencadeia adaptações fisiológicas, que reduzem a susceptibilidade dos músculos aos radicais livres e induzem o aumento das enzimas antioxidantes (BLOOMER, 2008).

Há uma interação complexa dos pró-oxidantes e antioxidantes, resultando na manutenção da homeostase intracelular. Sempre que houver um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e antioxidantes, um estado de estresse oxidativo é iniciado e esse evento repercute em todo o organismo (BRITO, 2014). Tais condições estão relacionadas com a fadiga muscular (DAVIES et al., 1982), diabetes (KARASU, 2000), hipertensão arterial (LACY; O'CONNOR, 1998) e isquemia intermitente induzida por contrações miometriais que restringem o fluxo sanguíneo para o útero, causando um estado de reperfusão/isquemia (NAKAI et al., 2000; WARREN et al., 2005).

Portanto, no momento em que o exercício físico não é prescrito corretamente, as EROs podem induzir a peroxidação lipídica conduzindo a problemas como a inativação de enzimas da membrana celular, necrose das fibras musculares, liberação de enzimas celulares para o sangue, diminuição da efetividade do sistema imune e alteração da função mitocondrial, levando à diminuição do desempenho muscular, *overtraining* e prejudicando importantes adaptações ao treinamento (POWERS; JACKSON, 2008).

Diferentes etapas dos mecanismos moleculares relacionadas com a contração muscular demonstraram ser suscetíveis à modulação redox, entre elas a regulação de canais de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e a sensibilidade miofibrilar ao Ca^{2+} (WILSON et al., 1991; AGHDASI et al., 1997; ANDRADE et al., 1998).

A SOD é a primeira linha enzimática antioxidante e foi considerada capaz de proteger de forma eficaz o estresse oxidativo muscular induzido pelo exercício. O H_2O_2 pode atuar nos músculos lisos como um agente contrátil e relaxante, podendo agir de maneira dual em alguns casos (GAO et al., 2003; WARREN et al., 2005; APPIAH et al., 2009). O relaxamento induzido por H_2O_2 envolve vários mecanismos e podem aumentam os níveis de produção de óxido nítrico (NO) por meio do aumento da expressão endotelial da sintase de NO (DRUMMOND et al., 2000) e ativação aguda da enzima por meio do aumento da fosforilação pós-traducional (THOMAS et al., 2002) e como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) via ativação de canais de potássio (K^+) (BARLOW et al., 2000; GAO et al., 2003; ROGERS et al., 2007).

Diferentes relatos demonstram que o exercício altera a dinâmica muscular, tais como o exercício agudo de natação que promoveu uma diminuição da reatividade relaxante e um aumento da reatividade contrátil da aorta de rato, seguido por um aumento na peroxidação lipídica em aorta e coração de rato; além disso, potencializou a reatividade contrátil e diminuiu a reatividade relaxante em traqueia de rato, acompanhado de um aumento da peroxidação lipídica (BRITO et al., 2015). Outros achados mostraram também que o exercício aeróbico crônico de natação altera a reatividade contrátil do íleo de rato ao KCl e ao carbacol, diminuindo a amplitude da contração intestinal e promovendo alterações em nível tecidual para estabelecer uma adaptação do órgão ao exercício (ARAUJO et al., 2015).

No sistema reprodutor feminino, o exercício induz eventos de isquemia/reperfusão gerando situações de hipóxia que podem ser associados com o aumento da produção de EROs devido ao desvio do débito cardíaco para o músculo esquelético em atividade e para a pele, causando isquemia na região pélvica, eventualmente causando estresse oxidativo durante a reperfusão no período da recuperação. Esse último pode danificar membrana e/ou macromoléculas celulares, tais como enzimas, canais iônicos e proteínas receptoras, modificando a sinalização dos mecanismos de transdução, além de frequentemente relacionado a desordens como pólipos, miomas, hiperplasia e adenocarcinoma (ALESSIO, 1993; KASAPOVIC et al., 2008).

Assim como citado acima, os radicais livres têm um papel dual no sistema reprodutor. Eles também são moléculas-chave de sinalização que modulam várias

funções reprodutoras e podem influenciar diretamente a qualidade dos ovócitos, a interação ovócito-espermatozóide, o implante e desenvolvimento embrionário inicial em seus microambientes, fatores esses determinantes para a manutenção de um ambiente celular redox que é crítico para a reprodução e, consequentemente, uma gravidez bem-sucedida (AGARWAL et al.,2006). Assim, o útero deve ser, definitivamente, considerado um órgão importante, sendo um alvo atraente para o exercício.

Diante do exposto, a realização de estudos que avaliem a ação de novos antioxidantes é necessária, pois alterações destas funções, caracterizadas por um aumento na produção das EROS, em detrimento da redução das enzimas antioxidantes, estão associadas com os fatores de riscos cardiovasculares (VIRDIS et al., 2013), patologias como pólipos e miomas (KASAPOVIC et al., 2008), endometriose, pré-eclampsia e aborto (AGARWAL et al., 2012).

2.4 Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais são considerados como uma biblioteca natural de química combinatória que pode proporcionar substâncias com diversidade química e farmacológica (WANG et al., 2014). Vários destes são de origem aquática e recebem destaque em pesquisas farmacológicas, uma vez que o ambiente aquático é considerado rico em recursos naturais e em muitos compostos biologicamente ativos (ASMATHUNISHA; KATHIRESAN, 2012).

Os oceanos se apresentam como uma importante fonte de organismos, e já que correspondem a mais de 70% da superfície terrestre, exibem uma fonte rica para a descoberta de novos agentes terapêuticos. Nesse contexto, entre 1977 e 1997, foram relatados em torno de 2.500 metabólitos isolados a partir de organismos marinhos (BLUNT et al., 2014) e mais de 840 novas estruturas descritas provenientes do ecossistema marinho (FAULKNER, 2000)

.Nos últimos anos, pesquisadores têm se atentado ao enorme potencial que as microalgas possuem para se tornar uma nova fonte de moléculas bioativas. A grande parte das investigações sugere que as microalgas podem ser utilizadas para produzir uma ampla gama de metabólitos primário e secundário (RASTOGI; SINHA, 2009).

As microalgas já são usadas como fonte de proteínas para consumo humano há séculos, com relatórios sobre o consumo de espécies tais como *Spirulina platensis, Nostoc e Aphanizomenon* por tribos indígenas. Entretanto, o cultivo de microalgas começou há apenas algumas décadas com o intuito de diversificar as fontes de proteínas na alimentação de humanos e animais, visto que o crescimento exponencial da população mundial e possível falta de alimentos implica na necessidade de diversificar as fontes de proteínas, além de desenvolver novas fontes não convencionais.

Além da possibilidade de utilização como fonte de nutrientes na alimentação de humanos e animais, as microalgas são consideradas uma matéria-prima versátil sendo utilizada também para produção de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol, biogás e bio-hidrogênio.

Algumas microalgas demonstram atividade na musculatura lisa intestinal como a Caulerpina, alcaloide indólico obtido de alga do gênero Caulerpa, em íleo de cobaia (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013). No entanto, em comparação às plantas, o potencial farmacêutico de metabólitos secundários derivados de algas tem sido relativamente negligenciado (DUVAL et al., 1999) e embora tenham sido sugeridas como uma potencial fonte de antioxidantes naturais, poucos estudos investigam as possíveis atividades biológicas de microalgas (HAJIMAHMOODI et al., 2010).

No contexto dos organismos aquáticos marinhos, tem-se destacado, devido as suas diversas atividades biológicas, as algas do gênero *Spirulina*, da divisão filogenética das eubactérias, classificada por Bergey (1989) como Cianobactérias, da ordem Oscillariales e gênero *Spirulina* (BROCK; MADIGAN, 1991). São algas microscópicas e filamentosas, formato helicoidal, com comprimento de 0,2 a 0,5 mm, sendo cultivada em larga escala em muitos países para fins comerciais (PARK et al., 2008). Possuem um longo histórico de uso como alimento, sendo fonte de vitaminas, especialmente a vitamina B_{12} e a pró-vitamina A, minerais, pigmentos como a ficocianina, beta caroteno e xantofila, alfa tocoferol e compostos fenólicos responsáveis pelas atividades antioxidantes (SENGUPTA; BHOWAL, 2017a, 2017b; LIU et al., 2016), com segurança para consumo humano já estabelecido através de numerosos estudos toxicológicos (PARK et al., 2008).

Relatos datados desde a pré-história, mostram que a *Spirulina* tem sido utilizada como fonte alimentar por tribos de caçadores que coletavam massas

gelatinosas de algas verde-azuladas para comê-las cruas ou cozidas (RICHMOND, 1990; AMBROSI et al, 2008), era consumida pelos astecas no México e têm sido colhidas, secas e consumidas pelo antigo povo Kanembu na região de Lake Chad na África ao longo dos séculos (GERSHWIN; BELAY, 2007).

Conhecida por ser fonte rica de nutrientes, a *Spirulina* é um dos alimentos mais bem pesquisados como alimento funcional no mercado bilionário da suplementação alimentar (GERSHWIN; BELAY, 2007), e em alguns países da Europa, no Japão e nos Estados Unidos, é autorizada como complemento alimentar visto que não se evidenciou relatos de toxicidade com o seu uso (BELAY et al, 1993; VON DER WEID; DILLON; FALQUET, 2000). No Brasil, sua comercialização é permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) cuja regulamentação para registro de novos alimentos foi aprovada em 1999, por meio de Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) que estabelece as diretrizes básicas para o registro de alimentos e/ou novos ingredientes (RDC n°16/99) (BRASIL, 1999a) e para avaliação do risco e segurança dos alimentos (RDC n°17/99) (BRASIL, 1999b). No ano de 2013, a *S. platensis* foi classificada pela ANVISA como novo alimento e, em julho de 2017, listada como constituinte autorizado para a utilização como suplemento alimentar, com base em estudos que relatavam segurança para uso comprovadas e citadas pela OMS (BRASIL, 2013; BRASIL, 2017a; OMS, 2017b).

Apesar de, à princípio, o interesse pelo consumo da alga ser principalmente devido seu valor nutritivo, estudos têm demonstrado a eficácia e as potenciais aplicações clínicas da *S. platensis* no tratamento e prevenção de doenças (KARKOS et al., 2008), fazendo com que ela se destaque no mundo científico. Tendo em vista o seu conteúdo nutricional e as grandes concentrações de proteína, a *S. platensis*, a pode ser utilizada como produtos nutracêuticos ou ser incluído como alimentos funcionais, para combater e prevenir lesões em células/tecidos (PARK et al., 2008)e aminoácidos presentes são constituintes de biocompostos, como hormônios e enzimas que, juntamente com as proteínas auxiliam na substituição de tecidos danificados (DE JESUS RAPOSO et al., 2013).

Sobre as enzimas, *S. platensis* contém principalmente a SOD, que é uma metaloenzima oxidorredutase, constituída de ferro, cobre/zinco ou manganês na sua estrutura, servindo como meio de transporte de elétrons, a fim de atuar como antioxidante contra o ânion superóxido. A anidrase carbônica é outra metaloenzima

que está presente no sangue e é responsável pela catálise da reação que converte CO_2 em ácido carbônico e íons de bicarbonato nas células. Por fim, encontra-se a lisozima, que apresenta ação antimicrobiana (DE JESUS RAPOSO et al., 2013).

Acerca dos ácidos graxos poli-insaturados, sabe-se que os humanos necessitam de alguns ácidos graxos essenciais, como o ômega-3, ômega-6, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico e o ácido γ-linolênico e o consumo de *S. platensis* fornece grandes quantidades de ácido γ-linolênico e ômega 3, fundamentais para o sistema imunológico e a regeneração de tecidos, respectivamente (DE JESUS RAPOSO et al., 2013). Além disso, o ácido γ-linolênico atua como um precursor das prostaglandinas da membrana celular, como o ácido araquidônico (AA) e via ciclooxigenase (COX), aumenta a produção das prostaglandinas E_1 e E_2 e reduz a produção sérica de tromboxano A_2 (QUOC; PASCAUD, 1996).

Dentre os constituintes dessa alga, destacam–se os pigmentos fotossintéticos ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) (HERRERO et al., 2004; ASMATHUNISHA; KATHIRESAN, 2012; KU et al., 2013). Mas a ficocianina, é o pigmento mais abundante sendo responsável por cerca de 20% do seu peso seco (KU et al., 2013; KUDDUS et al., 2013) e destaca-se por sua alta capacidade, antioxidante como sequestradora de radicais livres devido a sua estabilidade (BHAT et al., 2000), inibidora na formação de radicais superóxido por redução da expressão da subunidade $p22^{phox}$ da nicotinamida adenina dinucleotídio fostato (NADPH) oxidase (MCCARTY et al., 2007; KUDDUS et al., 2013), além da modulação positiva no sistema imunológico, visto que atua reduzindo a liberação da lactato desidrogenase LDH, e a expressão da sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), da ciclooxigenase 2 (COX-2), do fator de necrose tumoral (TNF-α), e da interleucina-6 (IL-6) (REDDY et al., 2003; SHIH et al., 2009; CHEN et al., 2012). Mais recentemente, Ichimura et al. (2013), através de uma análise imuno-histoquímica, relataram que a ficocianina aumentou significativamente a expressão da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) em aorta de rato, e consequentemente, observou a redução da pressão arterial sistêmica através da maior biodisponibilidade de óxido nítrico (NO).

Diferentes atividades biológicas já foram descritas para a *Spirulina*, como, por exemplo, imunomoduladora (HAYASHI et al., 1993), antioxidante (ESTRADA et al.,

2001), anti-inflamatória e para o tratamento da anemia, da hepatotoxicidade, da hiperglicemia e da hiperlipidemia (CHAMORRO et al., 2002), anti-hipertensiva e anti-tumoral (HE et al., 2007; LU et al., 2010; WANG; ZHANG, 2016). Além disso, diversos estudos relatam que a ingestão de *S. platensis* pode promover a diminuição na concentração plasmática de triacilgliceróis (MAZOKOPAKIS et al., 2014); redução de rinites alérgicas (KULSHRESHTHA et al., 2008); ação anti-inflamatória (KU et al., 2013); inibição do apetite e redução da massa corporal em indivíduos obesos (BECKER et al.,1986; ZEINALIAN et al., 2017); preservação da microbiota intestinal saudável por favorecer o crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (KULSHRESHTHA et al., 2008); atividade antifúngica contra *Aspergillus orizae* (BIERHALS et al., 2009); atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (PARISI et al., 2009); atividade antioxidante, atribuída a inibição da peroxidação lipídica promovida pela ficocianina (BASHANDY et al., 2016); atividade anti-inflamatória, por reduzir a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos (KU et al., 2013; PHAM; PARK; LEE, 2016)

Em modelos de musculo liso, a *S. platensis,* também conhecida como *Arthrospira platensis*, já demonstrou atividade em aorta de ratos saudáveis, com diminuição da reatividade contrátil à fenilefrina e aumento na atividade relaxante à ACh, por modulação positiva da via do NO (BRITO et al., 2018), restauração da reatividade contrátil intestinal em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica (FERREIRA, 2017) e potencialização da resposta relaxante do corpo cavernoso de ratos saudáveis e redução da reatividade contrátil cavernosa e potencialização da responsividade relaxante de corpos cavernosos de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (SOUZA, 2017) e diminuiu a reatividade contrátil e aumentou a reatividade relaxante em aorta e traqueia de ratos treinados (BRITO, 2014). A *S. platensis* ainda retarda a fadiga durante exercício de resistência em humanos (LU et al., 2006), reduz a lesão muscular induzida por exercício físico em ratos, melhora a reatividade relaxante da aorta de ratos diabéticos (HUANG et al., 2005).

Diante do exposto, demonstra-se um papel promissor para a *S. platensis* na melhora da reatividade muscular lisa vascular e intestinal, da disfunção endotelial e do estresse oxidativo. Apesar disso, não há relatos da aplicabilidade da utilização da alga na prevenção de problemas relacionados a alterações da contratilidade uterina,

promovida ou não pelo exercício físico, sendo necessários estudos para evidenciar um possível efeito protetor da *S. platensis* sobre as alterações no sistema reprodutor.

Analisando os pontos apresentados, modelos experimentais de treinamento de força se apresentam como uma forma viável de se investigar disfunções orgânicas induzidas pelo exercício sobre a contratilidade uterina, e partindo do pressuposto que a alga promove efeitos benéficos em modelos de músculo liso intestinal e vascular de animais submetidos a treinamento intenso de força, levantou-se a hipótese de que o exercício intenso de força altera a reatividade contrátil e relaxante de útero de rata Wistar, e que a suplementação alimentar com *S. platensis* previne as disfunções uterinas causadas pelo exercício.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre o útero de rata, sistema redox e mecanismos moduladores envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do exercício de força agudo em ratas Wistar, avaliando:
  - A eficácia e a potência contrátil dos agentes KCl e ocitocina na reatividade uterina;
  - A eficácia e a potência relaxantes dos agentes nifedipino e isoprenalina na reatividade uterina;
  - Os níveis de malondialdeído, da capacidade antioxidante no plasma e no útero e da expressão da SOD em útero;
  - A modulação da via das MAPK
  - Parâmetros hismorfométricos do útero e da glândula adrenal

- Avaliar o efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* em ratas Wistar sobre:
  - A reatividade contrátil de útero de rata
    - O envolvimento das vias da Rho e das EROs na resposta contrátil uterina
  - A reatividade relaxante de útero de rata
    - O envolvimento das COXs, NO e EROs na resposta relaxante uterina
- Os níveis de malondialdeído, da capacidade antioxidante no plasma e no útero e da expressão da SOD em útero;
- A modulação da via das MAPK
- Parâmetros hismorfométricos do útero e da glândula adrenal

4 Capítulo I

Capítulo I: O útero de rata como alvo para os efeitos agudos induzidos pelo exercício de força

4 Metodologia

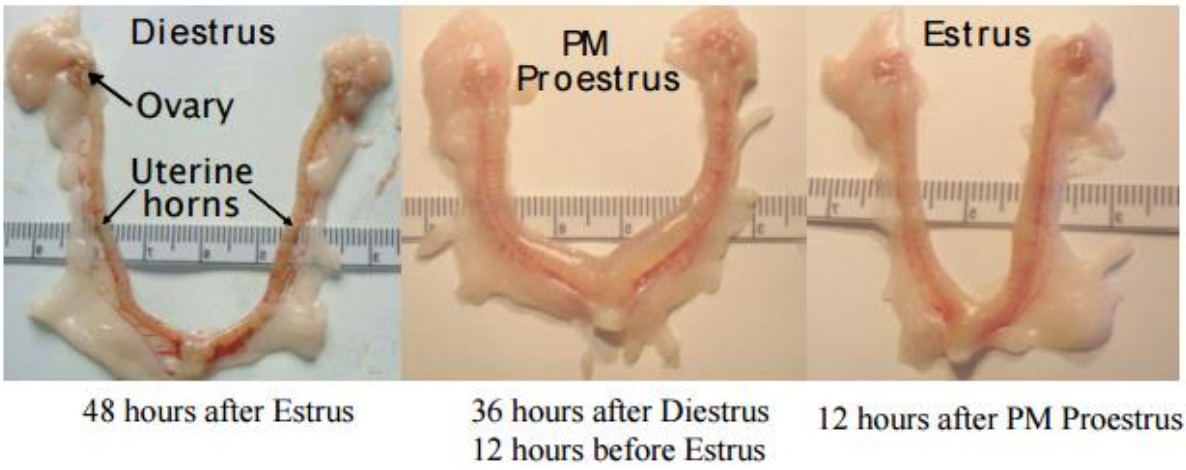
4.1 Material

4.1.1 Animais

As ratas Wistar (*Rattus norvegicus)* virgens, com oito semanas de idade e pesando entre 150 e 200 g, eram adquiridos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Os animais tiveram acesso a água ad libitum e eram mantidos sob ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6 às 18h00. As ratas eram tratadas 24 h antes da eutanásia com dietilestilbestrol (1 mg/kg, s.c.) para indução do estro. O efeito da indução do estro era observado pelo aspecto hiperplásico observado no útero. A fisiologia do trato reprodutivo muda drasticamente através do ciclo hormonal (estro) das ratas. Os cornos uterinos bicornados estão inflamados na noite do proestro (proestro PM) durante a receptividade sexual. Na ausência de um sinal copulatório, os cornos uterinos sofrem uma redução na retenção e no tamanho do fluido luminal pela manhã do estro, fase essa observada na dissecação após eutanásia (Figura 3)

A eutanásia das ratas era realizada no período claro desse ciclo, entre 8 e 9 h. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais *Guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies* (SHERWIN et al., 2003) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016), submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB, certidão 0211/2014.

Figura 3 - Trato reprodutivo de ratas nas diferentes fases do ciclo hormonal.



Fonte: BRADSHAW, HB , ALLARD , C., 2011

4.1.2 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($CaCl_2.2H_2O$), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$), a glicose ($C_6H_{12}O_6$) e o formaldeído foram adquiridos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foi adquirido da Fmaia (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que era mantida sob refrigeração. O formaldeído foi utilizado para conservar as amostras de tecidos utilizadas para cortes histológicos.

O MDA, o 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), o metano hidroximetilamina (tris), o fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF), a aprotinina, o ditiotreitol (DTT), o tween 20 e a albumina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil). As substâncias utilizadas nos experimentos funcionais eram dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto a indometacina, a apocinina e o Y27632 que eram dissolvidos em álcool absoluto (96 °GL) para obtenção de cada solução-estoque, as quais eram mantidas a 4 ou -20 °C.

Todos os reagentes utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), o reagente de Bradford, o tampão de Laemmli, o triton X-100, o pirofosfato de sódio, o fluoreto de sódio e o

ortovanadato de sódio foram adquiridos da Bio-Rad (EUA). A membrana de nitrocelulose e os *kits* para detecção de quimioluminescência foram adquiridos da Amersham (GB). O anticorpo anti-ERK (K-23, sc-94) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (EUA) e o anticorpo secundário biotinilado de cabra anticoelho foi adquirido da Vector Laboratories (EUA).

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

4.1.3 Programa de Exercício de Força

Os animais exercitados eram submetidos a um programa específico de saltos em um cilindro de PVC, com 30 cm de diâmetro e 70 cm de comprimento, contendo água. A profundidade da água contida nos tanques era de 50 cm, sendo aproximadamente equivalente ao dobro do comprimento da rata para limitar a alternativa do subir até se agarrar na borda do cilindro. Antes de iniciar o exercício, a água era aquecida à uma temperatura em torno de 32°C, por ser considerada neutra em relação à temperatura corporal do rato (MARQUETI et al., 2006).

O exercício de força era baseado no protocolo de saltos em meio líquido, desenvolvido por Marqueti et al., (2006). O protocolo era constituído por 4 séries de 10 repetições, com intervalo de 30 segundos entre as séries com uma sobrecarga de acordo com o peso do animal. A sobrecarga era aplicada ao tórax dos animais por meio de um colete especial que permitiu a execução dos saltos sem que a carga desconectasse do corpo ou impedisse seus movimentos. O peso do colete quando molhado (25 g), era considerada e debitada da carga específica correspondente à massa corporal do animal para uma melhor precisão do treinamento.

O exercício de força era desenvolvido da seguinte forma:

Semana de adaptação: a primeira semana de treinamento será destinada à adaptação dos animais, para isso, os animais realizarão três sessões alternadas de exercício, com uma sobrecarga equivalente a 50% da massa corporal do animal, com o número de séries e repetições ajustada diariamente e um intervalo de 30 segundos de repouso entre as séries: 1° dia: 2 séries x 5 saltos; 2° dia: 4 séries x 5 saltos; 3° dia: 4 séries x 9 saltos.

Sessão de exercício agudo: Os animais que eram submetidos ao exercício agudo de força realizaram uma única sessão de treinamento, na qual executaram 4 séries

de 10 saltos cada, com repouso de 30 segundos entre as séries e sobrecarga 70% do peso corporal.

A avaliação da eficiência do protocolo foi comprovada por meio do tempo de execução de cada série, onde foi avaliado durante cada série de exercício da sessão aguda realizada, o tempo que o animal despendeu para executar a mesma. Durante a sessão de exercício, foi observada um aumento significativo na média do tempo de execução de cada série na 3ª (25s) e 4ª (28s) séries de exercício quando comparadas com a 1ª (21,5s) e 2ª (24s) séries, respectivamente.

Os animais foram eutanasiados em diferentes momentos após a sessão aguda de exercício.

4.1.4 Soluções

Para a manutenção dos cornos uterinos, era utilizada a solução de Locke Ringer (ajustada ao pH 7,4 com NaOH ou HCl 1N), gaseificada com carbogênio e mantida à temperatura de 32° C, contendo a seguinte composição (mM): NaCl (154,0); KCl (5,6); $CaCl_2$ (2,2); $MgCl_2$ (2,1); Glicose (5,6); $NaHCO_3$ (6,0).

Para conservação das amostras para procedimentos histológicos, era utilizada solução de formaldeído tamponado 10% com a seguinte composição: formaldeído (1:10 v/v), NaH_2PO_4 (0,04:10 m/v), Na_2HPO_4 (0,005:10 m/v) e H_2O (9:10 v/v).

As amostras para separação em eletroforese eram extraídas em tampão contendo a seguinte composição: triton X-100 1%, tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL.

Para o bloqueio de ligações inespecíficas de proteínas à membrana de nitrocelulose era utilizada uma solução de bloqueio contendo leite desnatado Molico®, tris 10 mM, NaCl 150 mM e tween 20 0,02%.

4.1.5 Aparelhos

Para o registro das contrações isométricas, os cornos uterinos eram suspensos em cubas de banho (6 mL) para órgãos isolados, modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05, acoplados a um

amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital de dados com o software AQCAD versão 2.1.6, para aquisição dos dados, e ANCAD, para análise. O sistema continha uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Para a realização dos cortes histológicos, as amostras eram submetidas ao processador de tecidos modelo PT05 (LUPTEC, Brasil), seccionadas em micrótomo rotativo modelo RM 2125 RT (Leica, Alemanha), fotografadas em microscópio ótico com câmera acoplada modelo BX41 (Olympus, Formosa) e posteriormente analisadas por programa analisador de imagem (Leica Qwin 3.1).

O pH das soluções era aferido através de um pHmetro digital, modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 e os animais em balança semianalítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As amostras utilizadas foram centrifugadas em aparelho refrigerado, modelo VS-15000 CFN II (VISION, Coreia do Sul) e centrífuga de bancada, modelo NI 1811-A (NOVA instruments, SP, Brasil).

A leitura das absorbâncias para dosagem de MDA e o teste da capacidade antioxidante total (CAT) foi realizada no espectrofotômetro modelo SP-22 da Biospectro (Paraná, Brasil).

As medidas de absorbância eram feitas utilizando um espectrofotômetro ultravioleta modelo SP 22 (Bioespectro, Salvador, BA, Brasil).

O processamento das amostras para extração do conteúdo proteico era realizado com o auxílio do processador de tecidos do tipo Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, USA). Além disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) e transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada em equipamentos da Bio-Rad (Richmond, CA). Adicionalmente, a detecção da quimiluminescência foi realizada no leitor MF CHEMIBIS (Bio-Imaging Systems Ltda., Jerusalem, Israel) e a densitometria óptica foi quantificada no programa ImageJ 1.43u (National Institute of Health, USA).

4.2 Métodos

4.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos: animais submetidos a semana de adaptação (GC, controle), grupos exercitados e eutanasiados imediatamente após a sessão de exercício (GO), 12 horas após a sessão de exercício (G12) e 24 horas após a sessão de exercício físico (G24).

4.2.2 Obtenção dos órgãos para os protocolos funcionais e bioquímicos

As ratas eram tratadas 24 h antes da eutanásia com dietilestilbestrol (1 mg/kg, s.c.) para indução do estro. A cavidade abdominal era aberta, e o útero era dissecado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer, a 32° C, gaseificada com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente por linha de algodão em cubas para banhos de órgãos isolados (6 mL), sob tensão de 1 g e mantidos em repouso durante no mínimo 40 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos (REVUELTA et al., 1997).

Para as dosagens bioquímicas e moleculares, eram obtidos fragmentos do útero e plasma. Essas amostras eram removidas rapidamente e armazenados em um freezer à temperatura de -80 °C até o momento das análises.

4.2.3 Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil induzida por KCl ou ocitocina em útero de rata.

O útero foi montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. Decorrido 15 minutos, era induzida uma contração com concentrações cumulativas de ocitocina ou KCl. Os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero das ratas submetidas ao exercício de força agudo com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

A reatividade do útero de rata foi avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logarítmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}) da ocitocina ou do KCl,

para os grupos foram submetidas a exercício de força agudo com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

4.2.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina ou nifedipino em útero de rata

O útero foi montado conforme descrito no item 4.2.2 Em seguida, as preparações foram lavadas e, após 15 min, uma nova contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou com 60 mM de KCl foi induzida e durante o componente tônico da contração, a isoprenalina ou o nifedipino foram adicionados de maneira cumulativa à cuba em preparações de todos os grupos (HEYLEN et al., 2008).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por ocitocina ou KCl, e os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante do útero das ratas dos grupos submetidos ao exercício de força agudo com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

A reatividade do útero de rata foi avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logarítmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}) da isoprenalina ou do nifedipino, para os grupos submetidos ao exercício de força agudo com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

4.2.5 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas

4.2.5 1 Obtenção do plasma

Após a eutanásia dos animais, eram coletados sangue por meio de secção dos vasos cervicais, colocados imediatamente em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) e levados à centrifugação a 1.198 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante era então transferido para tubos Eppendorf® e refrigerado a -20 C até a análise (OKAFOR et al., 2011; SILVA et al., 2012).

4.2.5.2 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino

Após a eutanásia dos animais, os cornos uterinos e eram isolados e congelados a -20 °C até o preparo do homogenato. Para isso, o tecido era pesado, macerado e homogeneizado com KCl 10% na proporção de 1:1. Em seguida, as amostras eram centrifugadas (1.198 x *g*/10 min) e o sobrenadante era separado para análise posterior.

4.2.5.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no plasma e no tecido muscular uterino

A medida da produção de MDA era feita por meio do método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Após a obtenção do plasma e do homogenato uterino, alíquotas de 250 µL eram incubadas a 37 °C em banho-maria por 60 minutos. Depois, as amostras eram precipitadas com 400 µL de ácido perclórico 35% e centrifugadas a 16.851 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante era transferido para tubos Eppendorf®, 400 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% eram adicionados às amostras e incubadas à temperatura de 95-100 °C por 1 h. Em seguida, após o resfriamento, as amostras eram lidas em espectrofotômetro a 532 nm. As amostras turvas após o banho-maria eram centrifugadas novamente a 1.198 x *g* por 10 minutos antes da leitura. A determinação dos níveis de MDA (µmol/L de amostra) nas amostras era feita substituindo os valores de absorbância na curva-padrão de MDA obtida para a solução padrão (1 µL de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em 70 mL de água destilada, diluída em séries de 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750 e 3000 µL de água destilada).

A medida da capacidade antioxidante total (CAT) era feita utilizando o método de DPPH descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Em tubos apropriados para centrífuga, eram adicionados 50 µL do plasma ou do homogenato pulmonar e 2 mL da solução de DPPH dissolvido em etanol absoluto (0,012 g/L) e protegido da luz; em seguida, os tubos eram agitados em vórtex por 10 segundos e, então, mantidos em repouso por 30 minutos. A seguir, as amostras eram centrifugadas a 7.489 x *g* por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante era lido em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados eram expressos como percentual de inibição da oxidação, através da seguinte equação: CAT = 100-([DPPH·R] x

T)/([DPPH·R] x B) x 100; sendo [DPPH·R] x T e [DPPH·R] x B correspondentes à concentração de DPPH· remanescente após 30 minutos, avaliados na amostra (T) e no branco (B) preparado com água destilada.

As análises eram feitas comparando-se os níveis de MDA (µmol/L de amostra) ou da CAT (%) entre os grupos GC, G0, G12, G24.

4.2.6 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a expressão de proteínas das vias de sinalização da proliferação muscular lisa e das defesas antioxidantes

4.2.6.1 Análise dos níveis de superóxido dismutase (SOD), Janus cinase (JNK), proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) no tecido uterino

4.2.6.1.1 Extração do tecido uterino e corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a eutanásia das ratas, os cornos uterinos eram isolado da cavidade abdominal e rapidamente congelado em N_2 líquido. Os órgão eram mantidos sob congelamento a -80 °C até as análises. Os cornos eram homogeneizados em tampão de extração, cuja composição está descrita no item 4.1.4, utilizando um processador de tecidos do tipo Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, EUA). Em seguida, os extratos teciduais eram centrifugados a 17.530 *g* a 4 °C por 20 minutos. Após esse processo, o conteúdo proteico das amostras era quantificado no sobrenadante utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA), e as amostras eram conservadas pela adição do tampão de Laemmli (Bio-Rad, Richmond, CA) (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM (4:1 v/v). Posteriormente, 50 a 100 µg de proteínas totais eram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE 15% em aparelho de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Em cada gel era adicionado um marcador com peso molecular com valores conhecidos (Bio-Rad, Richmond, CA).

4.2.6.1.2 *Western blot*

Após a separação, as proteínas eram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por estimulação elétrica a 120 V por 2 h (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1992). Em seguida, a ligação inespecífica de proteínas à membrana de nitrocelulose era reduzida pela incubação com uma solução de bloqueio, cuja composição está descrita no item XXX, em temperatura ambiente durante 2 h sob leve agitação.

Subsequentemente, as membranas de nitrocelulose eram incubadas com os anticorpos anti-SOD, JNK e ERK1/2, preparados em solução bloqueadora (substituindo o leite pela albumina na sua composição), pernoite à temperatura de 4 °C, sob leve agitação. Após esse período, as membranas eram lavadas com esta solução decrescida de leite ou albumina por 30 minutos e então o anticorpo secundário anticoelho conjugado com peroxidase era incubado por 1 h à temperatura ambiente.

Para a revelação das membranas, era adicionada uma solução para detecção por quimioluminescência conforme descrito no *kit* comercial. Nesse protocolo, a emissão da luz era detectada pelo sistema de detecção MF-CHEMIBIS (Bio-Imaging Systems Ltda., Jerusalem, Israel) e a determinação da intensidade das bandas reveladas era realizada pela leitura da densitometria óptica das imagens analisadas no programa ImageJ 1.43u (National Institute of Health, EUA).

4.2.7 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a morfologia uterina e da glândula adrenal de ratas

As amostras de útero e a glândula adrenal eram isolados e fixados em solução de formaldeído tamponado 10% e incluídos em parafina. Posteriormente, foram cortadas em micrótomo na espessura de 3 µm, montadas em laminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destiladas por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e, posteriormente também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos. Finalmente as laminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan□□

Os aspectos avaliados nos cortes histológicos uterinos foram o número de eosinófilos, número e diâmetro dos vasos e espessura do miométrio, e nos cortes da glândula adrenal, observou-se a área das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular, além do número de vacúolos. As fotomicrografias das lâminas foram capturadas através de câmera acoplada a um microscópio óptico. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari (1997).

4.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e foram analisados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way seguido do pós-teste de *Tukey*, para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Como parâmetro de potência foi utilizado o pCE_{50}, calculado por regressão não linear, e como parâmetro de eficácia o E_{max} (NEUBIG et al., 2003).

Os valores de CE_{50} (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados, usando a seguinte equação:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogCE50 - X)\,.\,HillSlope}}$$

Onde:

Y = resposta da substância testada em porcentagem.

X = Logaritmo na base 10 da concentração do agonista.

Bottom = menor efeito assumido para “Y”.

Top = maior efeito assumido para “Y”.

$LogCE_{50}$ = logaritmo na base 10 da concentração da substância teste que produz 50% do seu efeito máximo.

HillSlope = valor da constante de Hill.

Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

A hipótese nula foi rejeitada quando os valores de $p < 0,05$.

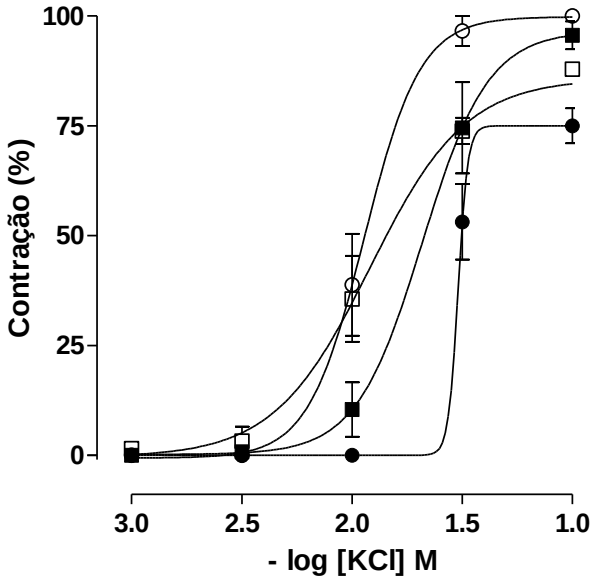
4.2 Resultados

4.2.1 Efeito do exercício de força agudo sobre as respostas contrátil e relaxante em útero de rata

4.2.1.1 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta contrátil induzida por KCl

Pode-se verificar que, em relação ao GC (E_{max} = 100%; pCE_{50} = 2,0 ± 0,07), a sessão de exercício de força agudo alterou a potência contrátil ao KCl (E_{max} = 75,0 ± 4,0%; pCE_{50} = 1,6 ± 0,07) imediatamente após o exercício (G0), entretanto, diminuiu a eficácia a esse agente contrátil. 12 horas (G12) após a sessão aguda de exercício de força, a potência contrátil, mas não a eficácia contrátil ao KCl foi restaurada (E_{max} = 78,6 ± 2,8%; pCE_{50} = 2,0 ± 0,08) e 24 horas (G24) após (E_{max} = 95,6 ± 3,1%; pCE_{50} = 1,8 ± 0,1), ambas a eficácia e a potência foram restauradas (Gráfico 1 e Tabela 1).

Gráfico 1 – Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil ao KCl em útero de rata, nos GC (○), G0 (●), G12 (□) e G24 (■).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 1 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil ao KCl em útero isolado de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	2,0 ± 0,07
G0	75,0 ± 4,0*	1,6 ± 0,07*
G12	78,6 ± 2,8*	2,0 ± 0,08
G24	95,6 ± 3,1	1,8 ± 0,1

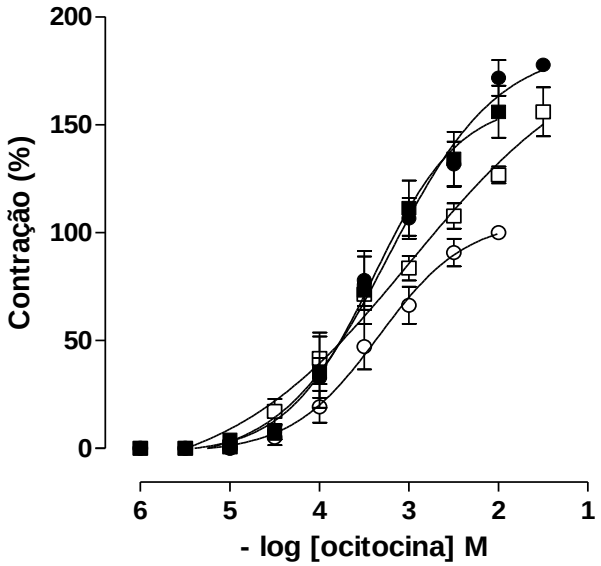
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *$p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC); (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.1.2 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina

Em relação ao GC (pCE_{50} = 3,4 ± 0,1), a sessão de exercício de força agudo não alterou a potência contrátil à ocitocina em nenhum dos tempos analisados G0 (pCE_{50} = 3,4 ± 0,2), G12 (pCE_{50} = 3,2 ± 0,2) e G24 (pCE_{50} = 3,4 ± 0,1). Entretanto, em relação à eficácia contrátil a esse agonista, observou-se que a sessão de exercício de força agudo aumentou o E_{max} de 100% em todos os tempos, para G0 (E_{max} = 164,1 ± 8,9%), G12 (E_{max} = 152,2 ± 9,5%) e G24 (E_{max} = 156,0 ± 12,0%), respectivamente (Gráfico 2 e Tabela 2).

Gráfico 2 – Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade contrátil à ocitocina em útero de rata, nos GC (○), G0 (●), G12 (□) e G24 (■).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 2 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil à ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,4 ± 0,1
G0	164,1 ± 8,9*	3,4 ± 0,2
G12	152,2 ± 9,5*	3,2 ± 0,2
G24	156,0 ± 12,0*	3,4 ± 0,1

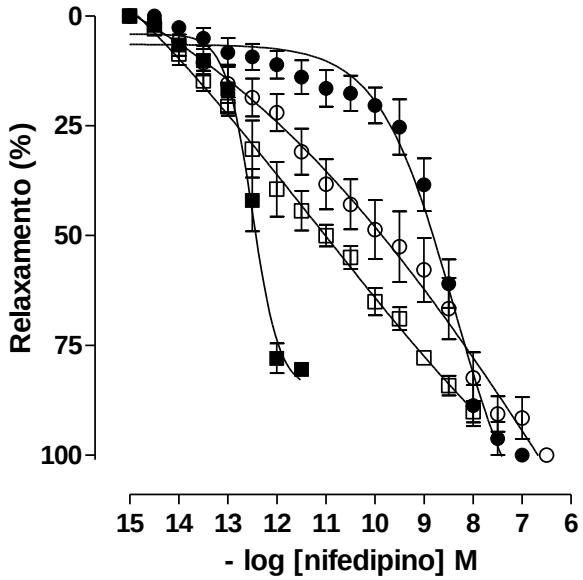
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (G0, G12 e G24 *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.1.3 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta relaxante induzida por nifedipino

A sessão de exercício de força agudo alterou a reatividade relaxante ao nifedipino (E_{max} = 100%; pCE_{50} = 9,0 ± 0,2) imediatamente após a sessão de exercício agudo (G0), diminuindo a potência relaxante ao nifedipino em relação ao GC (E_{max} = 100%; pCE_{50} = 10,0 ± 0,4). 12 horas (G12) após a sessão de exercício (E_{max} = 90,1 ± 2,4%; pCE_{50} = 11,4 ± 0,2), observou-se uma diminuição na eficácia e um aumento da potência relaxante do nifedipino, tanto em relação ao GC como ao G0. De maneira mais acentuada, no G24 (E_{max} = 80,5 ± 1,5%; pCE_{50} = 12,6 ± 0,1), a curva controle foi desviada para esquerda, com aumento da potência relaxante ao nifedipino, sendo a eficácia diminuída em comparação a todos os outros grupos (Gráfico 3 e Tabela 3).

Gráfico 3 – Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante do nifedipino em útero de rata, nos GC (○), G0 (●), G12 (□) e G24 (■).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 3 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante do nifedipino em útero de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	10,0 ± 0,4
G0	100	9,0 ± 0,2*
G12	90,1 ± 2,4*	11,4 ± 0,2*
G24	80,5 ± 1,5*	12,6 ± 0,1*

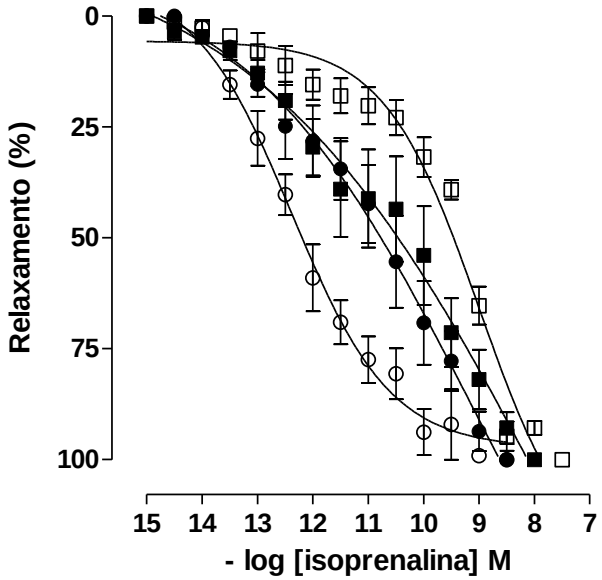
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (G0, G12 e G24 *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.1.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a resposta relaxante induzida por isoprenalina

A sessão de exercício físico agudo não alterou a eficácia relaxante da isoprenalina em nenhum dos grupos, em comparação ao GC (E_{max} = 100%); entretanto, diminuiu a potência relaxante à isoprenalina para o G0 (pCE_{50} = 10,9 ± 0,3), G12 (pCE_{50} = 9,6 ± 0,1) e G24 (pCE_{50} = 10,7 ± 0,4), quando comparado ao controle (pCE_{50} = 12,1 ± 0,2) (Gráfico 4 e Tabela 4).

Gráfico 4 – Efeito do exercício de força agudo sobre a reatividade relaxante da isoprenalina em útero de rata, nos GC (○), G0 (●), G12 (□) e G24 (■).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 4 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante da isoprenalina em útero isolado de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	12,1 ± 0,2
G0	100	10,9 ± 0,3*
G12	100	9,6 ± 0,1*
G24	100	10,7 ± 0,4*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *$p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

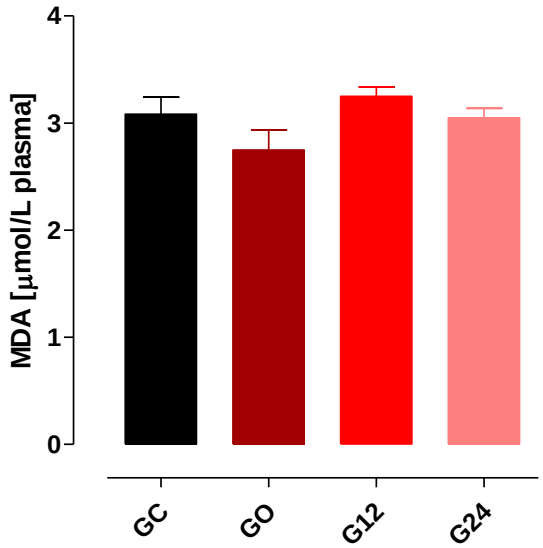
Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.2 Efeito do exercício de força agudo sobre a concentração de MDA no plasma e no útero de rata

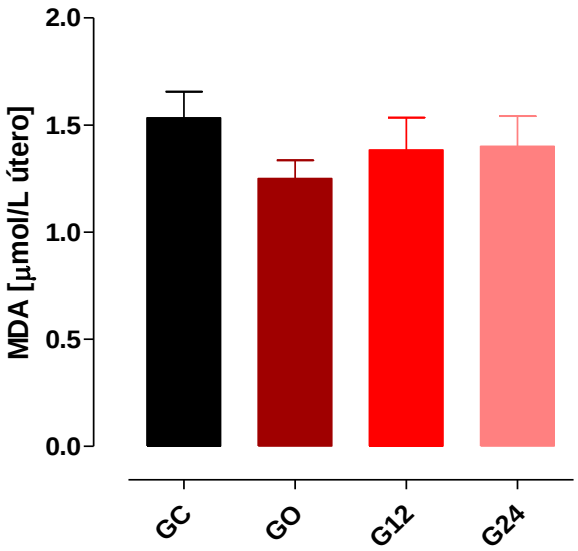
Nas ratas submetidas à sessão de exercício agudo de força, não foi observada diferença na concentração de MDA no plasma dos GC (3,1 ± 0,2 µmol/L), G0 (2,8 ± 0,2 µmol/L), G12 (3,2 ± 0,1 µmol/L) e G24 (3,0 ± 0,1 µmol/L) (Gráfico 5A, n = 5). De maneira semelhante, a concentração de MDA no útero não diferiu entre as ratas dos GC (1,5 ± 0,1 µmol/L), G0 (1,2 ± 0,1 µmol/L), G12 (1,4 ± 0,2 µmol/L) e G24 (1,4 ± 0,1 µmol/L) (Gráfico 5B, n = 5).

Gráfico 5 – Efeito do exercício de força agudo sobre a concentração de MDA no plasma (**A**) e no útero (**B**) de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

A



B



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

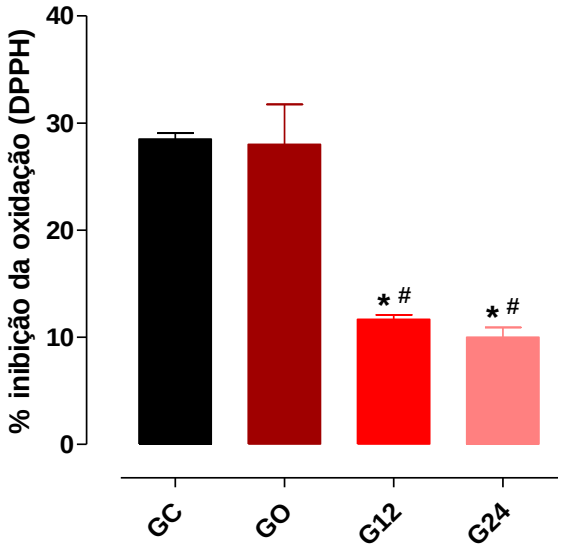
4.2.3 Efeito do exercício de força agudo sobre o percentual de inibição da oxidação no plasma e no útero de rata

Nas ratas submetidas à sessão de exercício de força agudo, não foi observada diferença no percentual de inibição da oxidação no plasma do G0 (27,2 ± 4,5%) em relação ao GC (28,6 ± 0,8%). Entretanto, os G12 (11,8 ± 0,5%) e G24 (9,8 ± 1,1%) apresentaram uma diminuição no percentual de oxidação no plasma em relação ao GC (Gráfico 6A, n = 5).

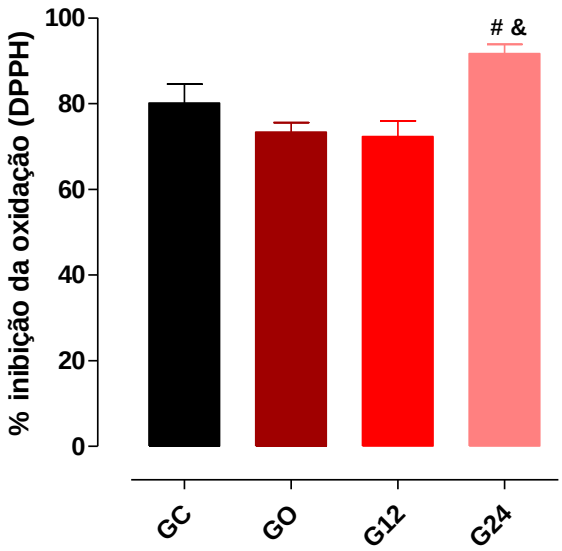
No tecido uterino, o percentual de oxidação não diferiu entre os grupos submetidos à sessão de exercício agudo, G0 (76,0 ± 3,4%), G12 (75,2 ± 5,0%) e G24 (92,4 ± 2,5%) em relação ao GC (80,0 ± 5,4%) (Gráfico 6B, n = 5).

Gráfico 6 – Efeito do exercício de força agudo sobre o percentual de inibição da oxidação no plasma (**A**) e no útero (**B**) de rata, nos GC, G0, G12 e G24.

A



B



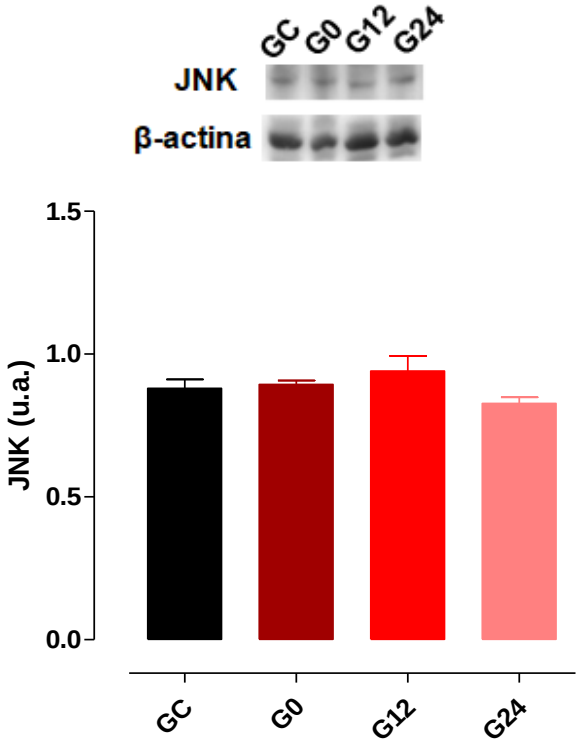
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{*}p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC); $^{\#}p < 0,05$ (G12 e G24 *vs.* G0) e $^{\&}p < 0,05$ (G24 *vs.* G0), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.4 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de JNK em útero de rata

Na avaliação da expressão proteica da JNK no útero de ratas foi observada uma semelhança entre as ratas submetidas a exercício de força agudo dos G0 (0,89 ± 0,01), G12 (0,94 ± 0,05) e G24 (0,83 ± 0,02) em comparação ao GC (0,88 ± 0,03) (Gráfico 7, n = 5).

Gráfico 7 – Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de JNK em útero de rata, nos GC, G0, G12 e G24.



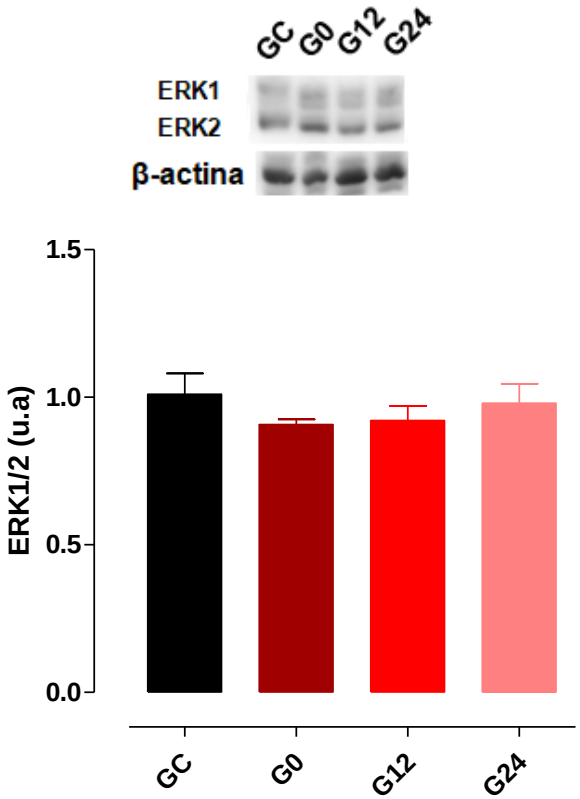
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.5 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de ERK1/2 em útero de rata

Na avaliação da expressão proteica da ERK1/2 em útero de rata foi observada a semelhança entre as ratas submetidas ao exercício de força agudo dos G0 (0,91 ± 0,02), G12 (0,92 ± 0,05) e G24 (0,98 ± 0,07) em comparação ao GC (1,01 ± 0,07) (Gráfico 8, n = 5).

Gráfico 8 – Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de ERK1/2 em útero de rata, nos GC, G0, G12 e G24.



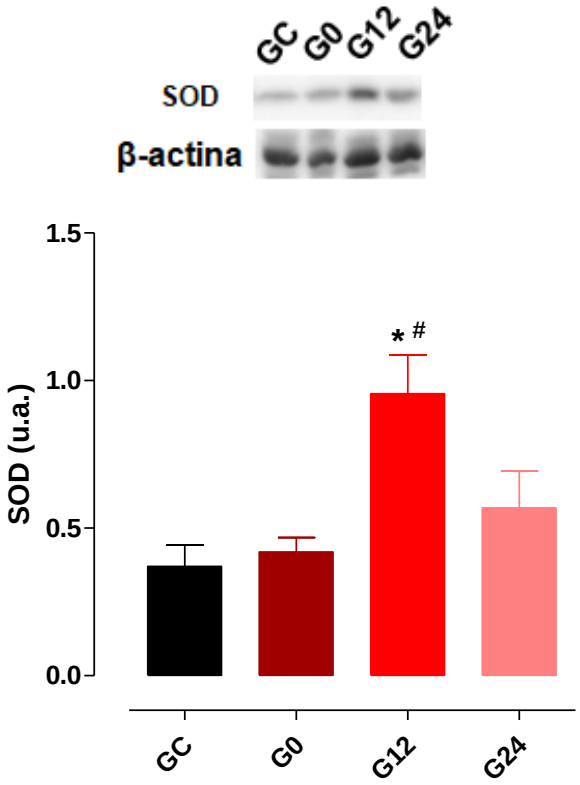
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.6 Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de SOD em útero de rata dos

Ao avaliar a expressão de SOD em útero de ratas submetidas ao exercício de força agudo, observou-se um aumento na expressão em G12 (0,96 ± 0,13), comparado com GC (0,37 ± 0,07); entretanto, no G0 (0,42 ± 0,05) e no G24 (0,57 ± 0,12), os níveis de SOD não difeririam do controle (Gráfico 9, n = 5).

Gráfico 9 – Efeito do exercício de força agudo sobre a expressão proteica de SOD em útero de rata dos GC, G0, G12 e G24.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{*}p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC) e $^{\#}p < 0,05$ (G12 *vs.* G0), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.7 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo sobre a morfologia uterina e da adrenal em rata

4.2.7.1 Análise histomorfométrica em útero de rata

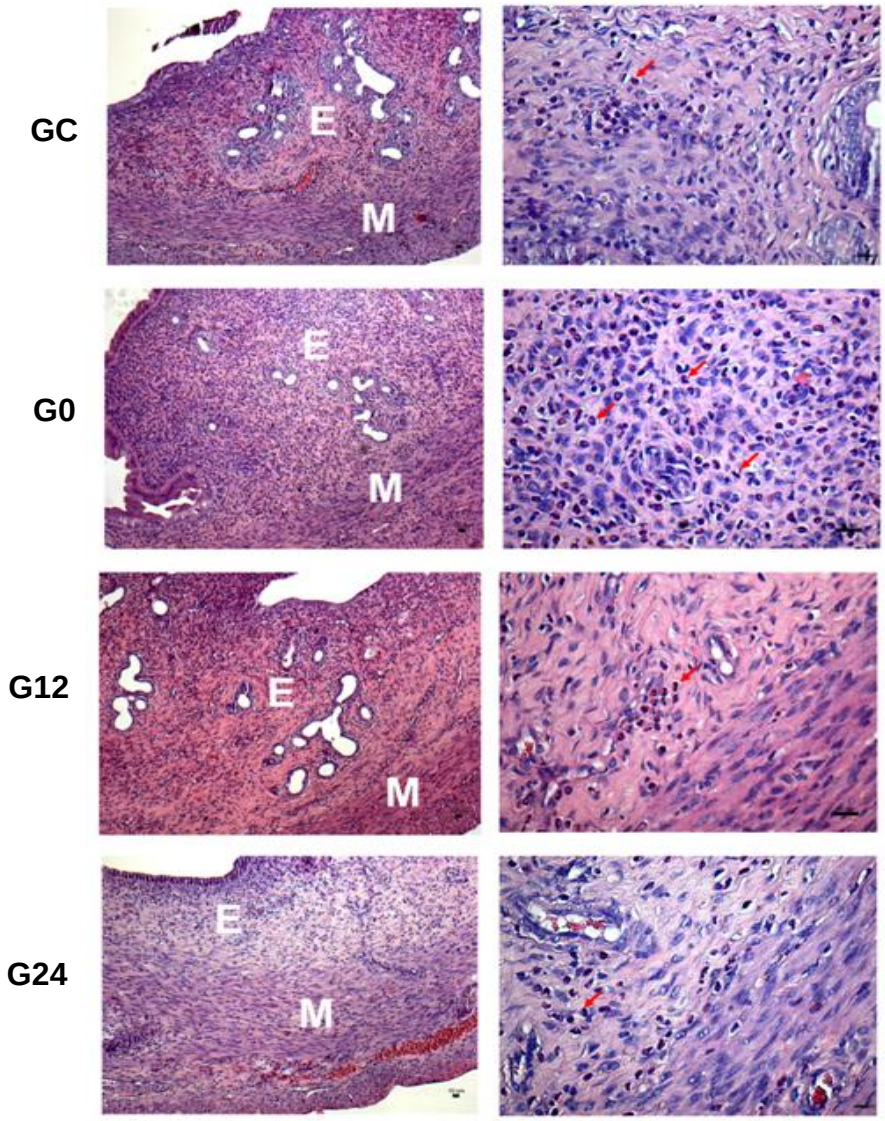
4.2.7.1.1 Efeito do exercício de força agudo sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular

Nas ratas submetidas à sessão de exercício de força agudo, foi observado no GC a presença de eosinófilos tanto no endométrio quanto no miométrio (seta amarela; Figura 3). Essas células também apareceram nas demais condições experimentais. Na análise morfométrica, o G0 (44,2 ± 1,1) apresentou aumento do número de eosinófilos em relação ao grupo controle (39,8 ± 1,9), no entanto, os G12 (26,0 ± 1,7) e G24 (22,5 ± 1,0) apresentaram redução em relação ao GC (Gráfico 10A).

Além disso, foi observado no grupo controle a presença de vasos dilatados especialmente no endométrio. Após isso, foi quantificado o número de vasos e a área vascular em cada situação experimental. Em relação ao GC (5,8 ± 0,2), imediatamente após o exercício de força agudo (G0 = 3,5 ± 0,6) houve uma diminuição do número vascular, enquanto que no G12 (6,2 ± 0,2) e no G24(11,0 ± 0,4) houve aumento desse parâmetro em relação ao GC (Figura 3; Gráfico 10B). Quando quantificada a área vascular, observou-se em relação ao GC (0,13 ± 0,05 μm^2) um aumento em todos os grupos (G0 = 0,16 ± 0,02; G12 = 0,24 ± 0,04 e G24 = 0,86 ± 0,04 μm^2), respectivamente (Figura 3; Gráfico 10C).

Em relação à área do miométrio, foi observada em comparação ao GC (0,5 ± 0,07 μm^2) uma manutenção da espessura dessa camada tanto em G0 (0,45 ± 0,03 μm^2) como G12 (0,46 ± 0,05 μm^2). No entanto, em G24 (0,86 ± 0,05 μm^2) foi observada hipertrofia e hiperplasia muscular. A hiperplasia é vista pela presença de nucléolos múltiplos e evidentes além da hipercromasia nuclear seguido de cariomegalia (Figura 3; Gráfico 10D).

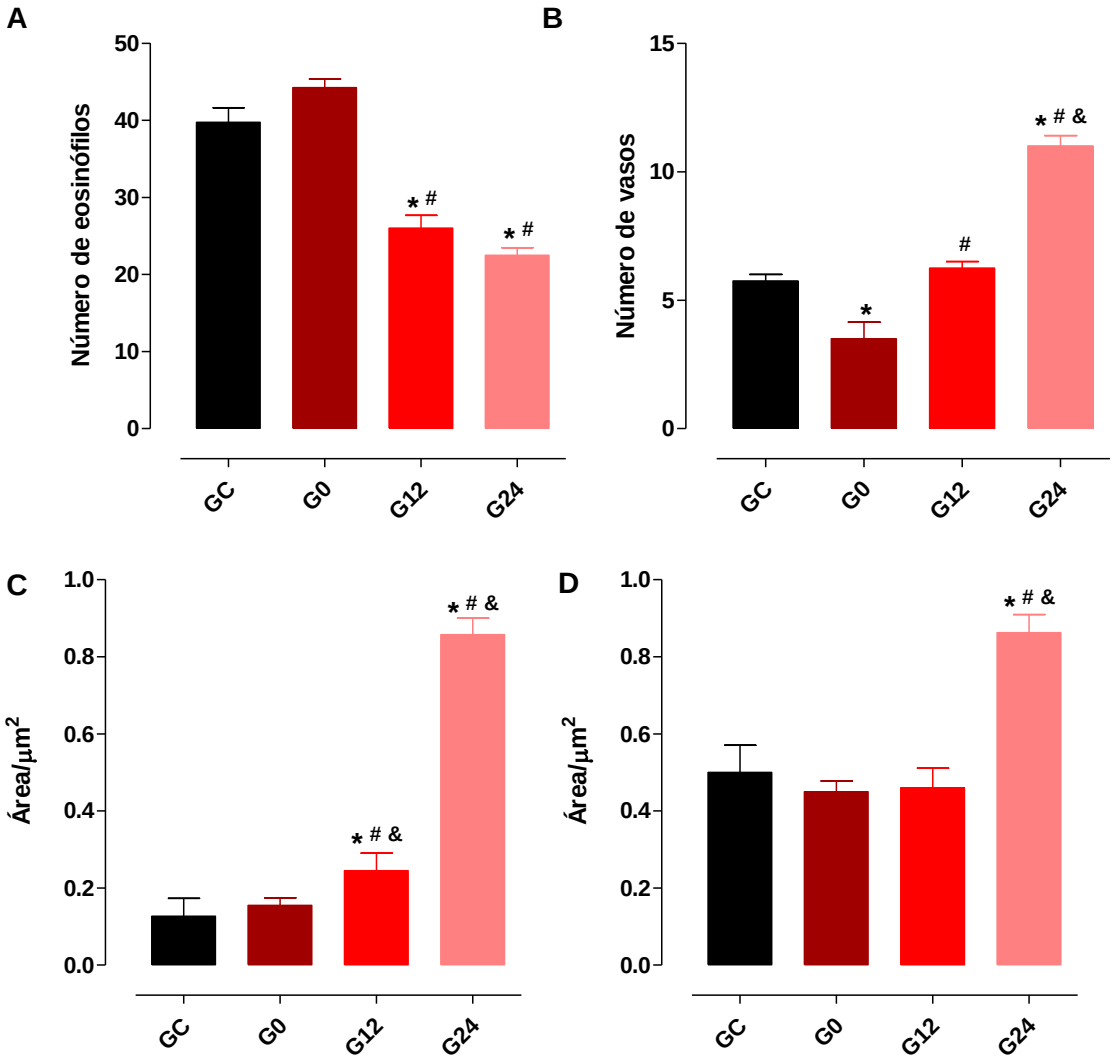
Figura 1 – Efeito do exercício de força agudo sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular em útero de rata, nos GC, G0, G12 e G24.



Fotomicrografia de útero de rata em GC, G0, G12 e G24. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita). Setas em vermelho indicam células em divisão. E = endométrio; M = miométrio; GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 10 – Efeito do exercício de força agudo sobre o número de eosinófilos (**A**) e de vasos sanguíneos (**B**) e sobre a área vascular (**C**) e muscular (**D**) em útero de rata, nos GC, G0, G12 e G24.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{*}p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC); $^{\#}p < 0,05$ (G12 e G24 *vs.* G0) e $^{\&}p < 0,05$ (G24 *vs.* G12), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

4.2.7.2 Análise histomorfométrica da glândula adrenal em ratas

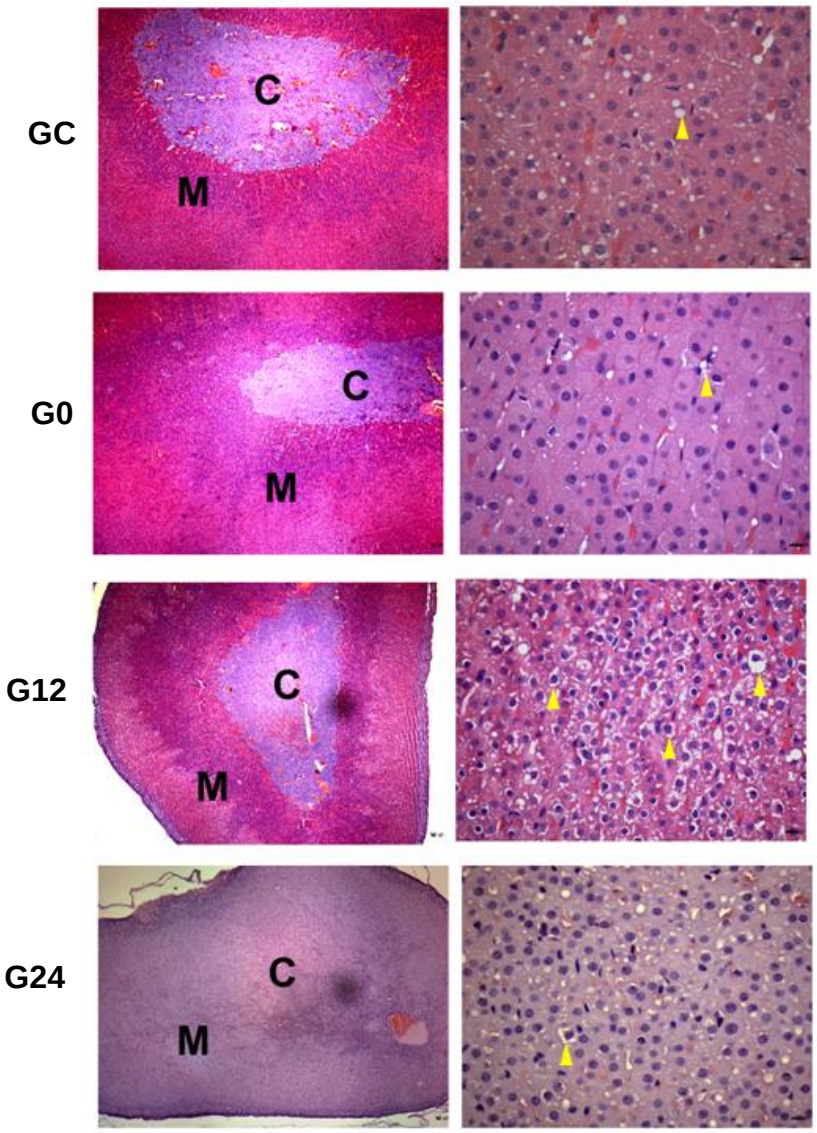
4.2.7.2.1 Efeito do exercício agudo de força sobre as áreas das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular e do número de vacúolos da glândula adrenal em rata

Para esta análise, foi observado no córtex da glândula adrenal, as camadas glomerulosa, fasciculada e reticulada além da sua camada medular (Figura 4). Nas ratas submetidas à sessão de exercício de força agudo, não foi observada diferença na área da camada glomerulosa no G0 (0,16 ± 0,01 μm^2) e no G12 (0,16 ± 0,01 μm^2) em relação ao GC (0,17 ± 0,01 μm^2). Já para o G24 (0,23 ± 0,02 μm^2) foi observado um aumento dessa área (Figura 4; Gráfico 11A).

De forma semelhante, em relação à área da camada fasciculada, houve aumento somente no G24 (3,7 ± 0,1 μm^2) em relação aos demais grupos (GC = 2,1 ± 0,04; G0 = 2,4 ± 0,1 e G12 = 1,7 ± 0,2 μm^2), respectivamente (Figura 4; Gráfico 11B). Quando avaliada, ainda nessa mesma camada, a área de degeneração lipídica, sugestiva da presença de cortisol, pode-se notar que houve uma redução dessa área no G0 (6,2 ± 1,0). No entanto, no G12 (38,2 ± 0,8) e no G24 (23,5 ± 1,0) foi observado um aumento dessa área quando comparados ao GC (17,8 ± 1,0) (Figura 4; Gráfico 11E).

Na camada reticulada, houve uma diminuição no G24 (0,38 ± 0,03 μm^2) quando comparado aos demais grupos (GC = 0,86 ± 0,04; G0 = 0,74 ± 0,08 e G12 = 0,96 ± 0,02 μm^2), respectivamente (Figura 4; Gráfico 11C). Ao avaliar a área medular, não foi observada diferenças entre o GC (2,3 ± 0,2 μm^2) e o G12 (2,8 ± 0,2 μm^2). Já no G0 (1,7 ± 0,1 μm^2) e G24 (1,0 ± 0,01 μm^2) se notou uma redução quando comparado ao GC (Figura 4; Gráfico 11D).

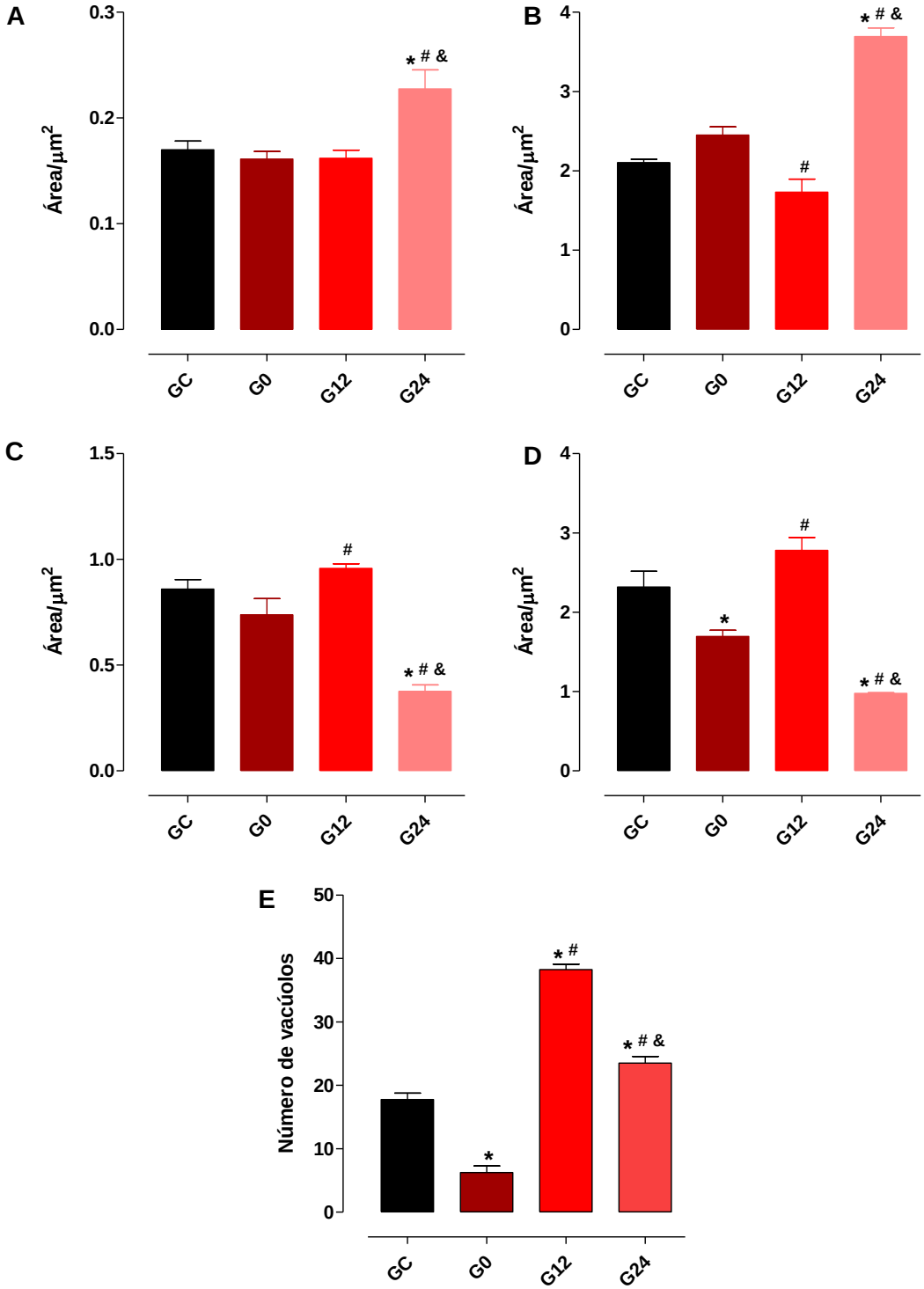
Figura 2 – Efeito do exercício de força agudo sobre a morfologia da glândula adrenal em rata, nos GC, G0, G12 e G24.



Fotomicrografia da glândula adrenal de ratas no GC, G0, G12 e G24. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita). Setas amarelas indicativas de vacúolos lipídicos na camada fasciculada. C = cortex; M = medulla; GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 11 – Efeito do exercício de força agudo sobre as áreas das camadas glomerulosa (**A**), fasciculada (**B**), reticulada (**C**) e medular (**D**) e do número de vacúolos (**E**) em rata, nos GC, G0, G12 e G24.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{*}p < 0,05$ (G0, G12 e G24 *vs.* GC); $^{\#}p < 0,05$ (G12 e G24 *vs.* G0) e $^{\&}p < 0,05$ (G24 *vs.* G12), (n = 5). GC = grupo controle; G0 = grupo eutanasiado imediatamente após o treinamento; G12 = grupo eutanasiado 12 horas após o treinamento; G24 = grupo eutanasiado 24 horas após o treinamento.

Fonte: Ferreira, 2019.

5 Capítulo II

Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* sobre as alterações induzidas pelo treinamento de força em útero de rata

5.1 Metodologia

5.1 1 Material

5.1.1.1 Produto-teste

A *Spirulina platensis* na forma de pó foi adquirida do laboratório INFINITY Pharma. (HONG KONG - China) (lote n° 17J11-B004-025041, Anexo A). Uma amostra foi analisada e manipulada pela Farmácia de Manipulação Roval (João Pessoa-PB) (lote n° 20121025). As soluções para administração foram diluídas com soro fisiológico.

5.1.1.2Animais

As ratas Wistar (*Rattus norvegicus)* virgens, com oito semanas de idade e pesando entre 150 e 250 g, eram adquiridos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM). Os animais tiveram acesso a água ad libitum e eram mantidos sob ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6 às 18h00. As ratas eram tratadas 24 h antes da eutanásia com dietilestilbestrol (1 mg/kg, s.c.) para indução do estro. Os experimentos eram realizados no período das 7 às 23h00. A eutanásia das ratas era realizada no período claro desse ciclo. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais *Guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies* (SHERWIN et al., 2003) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2016), submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB, certidão 0211/2014.

5.1.1.3Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl2.2H2O), o sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$), a glicose ($C_6H_{12}O_6$) e o formaldeído foram adquiridos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) foi adquirido da Fmaia (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). O fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o bicarbonato de sódio e o cloreto de sódio eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que era mantida sob refrigeração. O formaldeído foi utilizado para conservar as amostras de tecidos utilizadas para cortes histológicos.

O MDA, o 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), o metano hidroximetilamina (tris), o fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF), a aprotinina, o ditiotreitol (DTT), o tween 20 e a albumina foram adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil). As substâncias utilizadas nos experimentos funcionais eram dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto a indometacina, a apocinina e o Y27632 que eram dissolvidos em álcool absoluto (96 °GL) para obtenção de cada solução-estoque, as quais eram mantidas a 4 ou -20 °C.

Todos os reagentes utilizados na eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), o reagente de Bradford, o tampão de Laemmli, o triton X-100, o pirofosfato de sódio, o fluoreto de sódio e o ortovanadato de sódio foram adquiridos da Bio-Rad (EUA). A membrana de nitrocelulose e os *kits* para detecção de quimioluminescência foram adquiridos da Amersham (GB). O anticorpo anti-ERK (K-23, sc-94) foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (EUA) e o anticorpo secundário biotinilado de cabra anticoelho foi adquirido da Vector Laboratories (EUA).

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

5.1.1.4 Programa de Treinamento de Força

Os animais do grupo de treinamento de força eram submetidos a um programa específico de saltos em um cilindro de PVC, com 30 cm de diâmetro e 70

cm de comprimento, contendo água. A profundidade da água contida nos tanques era de 50 cm, sendo aproximadamente equivalente ao dobro do comprimento da rata para limitar a alternativa do subir até se agarrar na borda do cilindro. Antes de iniciar o exercício a água era aquecida à uma temperatura em torno de 32°C, por ser considerada neutra em relação à temperatura corporal do rato (MARQUETI et al., 2006).

O treinamento de força era baseado no protocolo de saltos em meio líquido, desenvolvido por Marqueti et al., (2006). O protocolo era constituído por 4 séries de 10 a 12 repetições, com intervalo de 30 segundos entre as séries, sendo ajustada uma sobrecarga progressiva de acordo com o peso do animal. A sobrecarga era aplicada ao tórax dos animais por meio de um colete especial que permitiu a execução dos saltos sem que a carga desconectasse do corpo ou impedisse seus movimentos. Uma sobrecarga correspondente ao peso do colete quando molhado (25 g), era considerada e debitada da carga específica correspondente à massa corporal do animal para uma melhor precisão do treinamento.

O treinamento de força era desenvolvido da seguinte forma:

Semana de adaptação: a primeira semana de treinamento será destinada à adaptação dos animais, para isso, os animais realizarão três sessões alternadas de exercício, com uma sobrecarga equivalente a 50% da massa corporal do animal, com o número de séries e repetições ajustada diariamente e um intervalo de 30 segundos de repouso entre as séries: 1° dia: 2 séries x 5 saltos; 2° dia: 4 séries x 5 saltos; 3° dia: 4 séries x 9 saltos.

Os animais que pertenciam ao grupo de treinamento crônico seguiram o seguinte protocolo:

1ª e 2ª semanas: os animais realizaram 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de repouso entre as séries e sobrecarga equivalente a 50% do peso corporal do animal.

3ª e 4ª semanas: eram realizadas 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de intervalo entre as séries e sobrecarga de 60% do peso corporal.

5ª e 6ª semanas: permaneceram as 4 séries de 10 saltos, com 30 segundos de intervalo entre as séries, porém com sobrecarga de 80% do peso corporal do animal.

7ª e 8ª semanas: permaneceram as 4 séries, os segundos de intervalo entre as séries e sobrecarga de 80% do peso corporal do animal, mas com 12 saltos de execução.

Ao final dos protocolos de intervenção, os animais do grupo de treinamento crônico eram eutanasiados por decapitação em guilhotina, seguido de secção dos vasos cervicais, 48 horas após a última sessão de exercício, com objetivo de eliminar o efeito agudo do exercício sobre a reatividade (MOURA et al., 2012).

5.1.1.5 Soluções

Para a manutenção dos cornos uterinos, era utilizada a solução de Locke Ringer (ajustada ao pH 7,4 com NaOH ou HCl 1N), gaseificada com carbogênio e mantida à temperatura de 32° C, contendo a seguinte composição (mM): NaCl (154,0); KCl (5,6); $CaCl_2$ (2,2); $MgCl_2$ (2,1); Glicose (5,6); $NaHCO_3$ (6,0).

Para conservação das amostras para procedimentos histológicos, era utilizada solução de formaldeído tamponado 10% com a seguinte composição: formaldeído (1:10 v/v), NaH_2PO_4 (0,04:10 m/v), Na_2HPO_4 (0,005:10 m/v) e H_2O (9:10 v/v).

As amostras para separação em eletroforese eram extraídas em tampão contendo a seguinte composição: triton X-100 1%, tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/mL.

Para o bloqueio de ligações inespecíficas de proteínas à membrana de nitrocelulose era utilizada uma solução de bloqueio contendo leite desnatado Molico®, tris 10 mM, NaCl 150 mM e tween 20 0,02%.

5.1.1.6 Aparelhos

Para o registro das contrações isométricas, os cornos uterinos eram suspensos em cubas de banho (6 mL) para órgãos isolados, modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05, acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital de dados com o software AQCAD versão 2.1.6, para aquisição dos dados, e ANCAD, para análise. O sistema continha uma bomba termostática modelo

BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Para a realização dos cortes histológicos, as amostras eram submetidas ao processador de tecidos modelo PT05 (LUPTEC, Brasil), seccionadas em micrótomo rotativo modelo RM 2125 RT (Leica, Alemanha), fotografadas em microscópio ótico com câmera acoplada modelo BX41 (Olympus, Formosa) e posteriormente analisadas por programa analisador de imagem (Leica Qwin 3.1).

O pH das soluções era aferido através de um pHmetro digital, modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 e os animais em balança semianalítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As amostras utilizadas foram centrifugadas em aparelho refrigerado, modelo VS-15000 CFN II (VISION, Coreia do Sul) e centrífuga de bancada, modelo NI 1811-A (NOVA instruments, SP, Brasil).

A leitura das absorbâncias para dosagem de MDA e o teste da capacidade antioxidante total (CAT) foi realizada no espectrofotômetro modelo SP-22 da Biospectro (Paraná, Brasil).

As medidas de absorbância eram feitas utilizando um espectrofotômetro ultravioleta modelo SP 22 (Bioespectro, Salvador, BA, Brasil).

O processamento das amostras para extração do conteúdo proteico era realizado com o auxílio do processador de tecidos do tipo Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, USA). Além disso, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) e transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada em equipamentos da Bio-Rad (Richmond, CA). Adicionalmente, a detecção da quimiluminescência foi realizada no leitor MF CHEMIBIS (Bio-Imaging Systems Ltda., Jerusalem, Israel) e a densitometria óptica foi quantificada no programa ImageJ 1.43u (National Institute of Health, USA).

5.1.2 Métodos

5.1.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos sedentários, submetidos a protocolo de treinamento de força, suplementados com *S. platensis* (50 e 100 mg/kg) e treinados

e suplementados com *S. platensis* (50 e 100 mg/kg). Dessa forma, o trabalho era composto pelos seguintes grupos com 28 ratas cada: grupo sedentário (GS), grupo sedentário 50 (GSP50), grupo sedentário 100 (GSP100), grupo somente adaptado (GC, controle), grupo treinado por 8 semanas (GT), grupo treinado e suplementado com *S. platensis* 50 mg/kg (GT50) e grupo treinado e suplementado com *S. platensis* 100 mg/kg (GT100).

5.1.2.2 Preparo e administração da *S. platensis*

O pó de *S. platensis* era diariamente dissolvido em solução salina nas proporções de 0,005 e 0,010 g/mL para a preparação das doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente, que foram administradas aos animais ao fim da preparação. As suplementações foram realizadas por um período de oito semanas para todas as doses (50, 100 mg/kg/dia) (adaptado de JUÁREZ-OROPEZA et al., 2009). A administração era feita por via oral no período das 12 às 14 h, utilizando agulhas de aço inox para gavagem (BD-12, Insight, Ribeirão Preto, SP) e seringas descartáveis de 10 mL com precisão de 0,2 mL (BD, HIGILAB, João Pessoa, PB). Aos grupos submetidos ao treinamento de força, a suplementação era realizada 30 minutos antes da sessão de exercício (BRITO, 2014).

5.1.2.3 Obtenção dos órgãos para os protocolos funcionais e bioquímicos

As ratas eram tratadas 24 h antes da eutanásia com dietilestilbestrol (1 mg/kg, s.c.) para indução do estro. A cavidade abdominal era aberta, e o útero era dissecado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer, a 32° C, gaseificada com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente por linha de algodão em cubas para banhos de órgãos isolados (6 mL), sob tensão de 1 g e mantidos em repouso durante no mínimo 40 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos (REVUELTA et al., 1997).

Para as dosagens bioquímicas e moleculares, eram obtidos fragmentos do útero e o plasma. Essas amostras eram removidos rapidamente e armazenados em um freezer à temperatura de -80 °C até o momento das análises.

5.1.2.4 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a reatividade contrátil induzida por KCl ou ocitocina em útero de rata.

O útero foi montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. Decorrido 15 minuots, era induzida uma contração com concentrações cumulativas de ocitocina ou KCl. Os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero das ratas dos grupos que receberam a suplementação com *S. platensis* e/ou foram submetidas ao treinamento de força, com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

A reatividade do útero de rata foi avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logarítmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}) da ocitocina ou do KCl, para os grupos que receberam a suplementação com *S. platensis* e/ou foram submetidas ao treinamento de força, com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

5.1.2.5 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina ou nifedipino em útero de rata

O útero foi montado conforme descrito no item 4.2.3. Em seguida, as preparações foram lavadas e, após 15 min, uma nova contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou com 60 mM de KCl foi induzida e durante o componente tônico da contração, a isoprenalina ou o nifedipino foram adicionados de maneira cumulativa à cuba em preparações de todos os grupos (HEYLEN et al., 2008).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por ocitocina ou KCl, e os resultados foram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante do útero das ratas dos grupos que receberam a suplementação com *S. platensis* e/ou foram submetida ao treinamento de força, com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

A reatividade do útero de rata foi avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logarítmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}) da isoprenalina ou do nifedipino, para os grupos que receberam a suplementação com *S. platensis* e/ou foram submetidos ao treinamento de força, com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

5.1.2.6 Investigação do mecanismo de ação envolvido nas alterações induzidas pelo treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis*

5.1.2.6.1 Investigação da participação da via da Rho/ROCK e das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e superóxido dismutase (SOD).

5.1.2.6.1.1 Obtenção de curvas cumulativas concentrações-resposta à ocitocina, na ausência e na presença da apocinina, do tempol ou da catalase em útero de rata dos grupos GC, GT, GT100

O útero foi montado conforme descrito no item 4.2.3. Após o período de estabilização era incubada, por 20 minutos, a apocinina (10^{-4} M), inibidora da NADPH oxidase (CÔCO et al., 2016) ou o tempol (10^{-3} M), um mimético da SOD (PEIXOTO et al., 2009), em preparações distintas e, em seguida, era induzida uma contração com ocitocina (10^{-5} M) e após a formação do componente tônico, a ACh (10^{-11}-3 x 10^{-4} M) era adicionada à cuba de maneira cumulativa.

A resposta contrátil do útero na presença dos inibidores era calculada com base na amplitude média da curva obtida no grupo GC. A reatividade contrátil era avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina, na ausência e na presença dos inibidores, e comparada entre GC, GT e GT100.

5.1.2.6.2 Investigação da participação da via das COX, do NO e da catalase.

5.1.2.6.2.1 Obtenção de curvas cumulativas concentrações-resposta à isoprenalina, na ausência e na presença da indometacina, L-NAME ou catalase,

em útero de rata pré-contraído com 10^{-2} UI/mL de ocitocina nos grupos GC, GT e GT100

O útero foi montado conforme descrito no item 4.2.3. Após o período de estabilização, era incubada. por 20 minutos, a indometacina 10-5 M, bloqueadora não seletiva das COXs (CARTLEDGE; EARDLEY; MORRISON, 2000), o L-NAME (10^{-4} M), um inibidor não seletivo da NOS (VIGNOZZI et al., 2006) e a catalase (500 UI/ml), enzima que converte H_2O_2 em H_2O e O_2, em diferentes preparações.

A resposta relaxante era expressa como a percentagem reversa da contração inicial produzida pela ocitocina. As comparações eram realizadas entre GC, GT, GT100 com base nos valores de E_{max} e de pCE_{50} dos agentes relaxantes, calculados a partir das curvas concentrações-resposta cumulativas obtidas.

5.1.2.7 Avaliação dos efeitos do treinamento de força sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas

5.1.2.7 1 Obtenção do plasma

Após a eutanásia dos animais, eram coletados sangue por meio de secção dos vasos cervicais, colocados imediatamente em tubos de ensaio contendo anticoagulante (EDTA) e levados à centrifugação a 1.198 x *g* durante 10 minutos. O sobrenadante era então transferido para tubos Eppendorf® e refrigerado a -20 °C até a análise (OKAFOR et al., 2011; SILVA et al., 2012).

5.1.2.7.2 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino

Após a eutanásia dos animais, os cornos uterinos e eram isolados e congelados a -20 °C até o preparo do homogenato. Para isso, o tecido era pesado, macerado e homogeneizado com KCl 10% na proporção de 1:1. Em seguida, as amostras eram centrifugadas (1.198 x *g*/10 min) e o sobrenadante era separado para análise posterior.

5.1.2.7.3 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no plasma e no tecido muscular uterino

A medida da produção de MDA era feita por meio do método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Após a obtenção do plasma e do homogenato uterino, alíquotas de 250 µL eram incubadas a 37 °C em banho-maria por 60 minutos. Depois, as amostras eram precipitadas com 400 µL de ácido perclórico 35% e centrifugadas a 16.851 x *g* por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante era transferido para tubos Eppendorf®, 400 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% eram adicionados às amostras e incubadas à temperatura de 95-100 °C por 1 h. Em seguida, após o resfriamento, as amostras eram lidas em espectrofotômetro a 532 nm. As amostras turvas após o banho-maria eram centrifugadas novamente a 1.198 x *g* por 10 minutos antes da leitura. A determinação dos níveis de MDA (µmol/L de amostra) nas amostras era feita substituindo os valores de absorbância na curva-padrão de MDA obtida para a solução padrão (1 µL de 1,1,3,3-tetrametoxipropano em 70 mL de água destilada, diluída em séries de 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750 e 3000 µL de água destilada).

A medida da capacidade antioxidante total (CAT) era feita utilizando o método de DPPH descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). Em tubos apropriados para centrífuga, eram adicionados 50 µL do plasma ou do homogenato pulmonar e 2 mL da solução de DPPH dissolvido em etanol absoluto (0,012 g/L) e protegido da luz; em seguida, os tubos eram agitados em vórtex por 10 segundos e, então, mantidos em repouso por 30 minutos. A seguir, as amostras eram centrifugadas a 7.489 x *g* por 15 minutos a 20 °C. O sobrenadante era lido em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados eram expressos como percentual de inibição da oxidação, através da seguinte equação: CAT = 100-([DPPH·R] x T)/([DPPH·R] x B) x 100; sendo [DPPH·R] x T e [DPPH·R] x B correspondentes à concentração de DPPH· remanescente após 30 minutos, avaliados na amostra (T) e no branco (B) preparado com água destilada.

As análises eram feitas comparando-se os níveis de MDA (µmol/L de amostra) ou da CAT (%) entre os grupos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.

5.1.2.8 Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a expressão de proteínas das vias de sinalização da proliferação muscular lisa e das defesas antioxidantes

5.1.2.8.1 Análise dos níveis de superóxido dismutase (SOD), Janus cinase (JNK) e proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2) no tecido uterino

5.1.2.8.1.1 Extração do tecido uterino e corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a eutanásia das ratas, os cornos uterinos eram isolado da cavidade abdominal e rapidamente congelado em N_2 líquido. Os órgão eram mantidos sob congelamento a -80 °C até as análises. Os cornos eram homogeneizados em tampão de extração, cuja composição está descrita no item 4.1.4, utilizando um processador de tecidos do tipo Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments, EUA). Em seguida, os extratos teciduais eram centrifugados a 17.530 *g* a 4 °C por 20 minutos. Após esse processo, o conteúdo proteico das amostras era quantificado no sobrenadante utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA), e as amostras eram conservadas pela adição do tampão de Laemmli (Bio-Rad, Richmond, CA) (LAEMMLI, 1970), acrescido de DTT 200 mM (4:1 v/v). Posteriormente, 50 a 100 µg de proteínas totais eram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE 15% em aparelho de minigel (Bio-Rad, Richmond, CA). Em cada gel era adicionado um marcador com peso molecular com valores conhecidos (Bio-Rad, Richmond, CA).

5.1.2.8.1.2 *Western blot*

Após a separação, as proteínas eram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por estimulação elétrica a 120 V por 2 h (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1992). Em seguida, a ligação inespecífica de proteínas à membrana de nitrocelulose era reduzida pela incubação com uma solução de bloqueio, cuja composição está descrita no item XXX, em temperatura ambiente durante 2 h sob leve agitação.

Subsequentemente, as membranas de nitrocelulose eram incubadas com os anticorpos anti-PI3K, ERK1/2 e SOD, preparados em solução bloqueadora (substituindo o leite pela albumina na sua composição), pernoite à temperatura de 4 °C, sob leve agitação. Após esse período, as membranas eram lavadas com esta solução decrescida de leite ou albumina por 30 minutos e então o anticorpo secundário anticoelho conjugado com peroxidase era incubado por 1 h à temperatura ambiente.

Para a revelação das membranas, era adicionada uma solução para detecção por quimioluminescência conforme descrito no *kit* comercial. Nesse protocolo, a emissão da luz era detectada pelo sistema de detecção MF-CHEMIBIS (Bio-Imaging Systems Ltda., Jerusalem, Israel) e a determinação da intensidade das bandas reveladas era realizada pela leitura da densitometria óptica das imagens analisadas no programa ImageJ 1.43u (National Institute of Health, EUA).

5.1.2.9 Avaliação dos efeitos do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a sobre a morfologia uterina e da adrenal de ratas

As amostras de útero e a adrenal eram isolados e fixados em solução de formaldeído tamponado 10% e incluídos em parafina. Posteriormente, foram cortadas em micrótomo na espessura de 3μm, montadas em laminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então foram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destiladas por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e, posteriormente também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos. Finalmente as laminas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®.

Os aspectos avaliados nos cortes histológicos uterinos foram o número de eosinófilos, número e diâmetro dos vasos e espessura do miométrio, e nos cortes da glândula adrenal, observou-se a área das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular, além do número de vacúolos. As fotomicrografias das lâminas foram capturadas através de câmera acoplada a um microscópio óptico. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria é a descrita por Caliari (1997).

Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* sobre as alterações induzidas pelo treinamento de força em útero de rata

5.2 Resultados

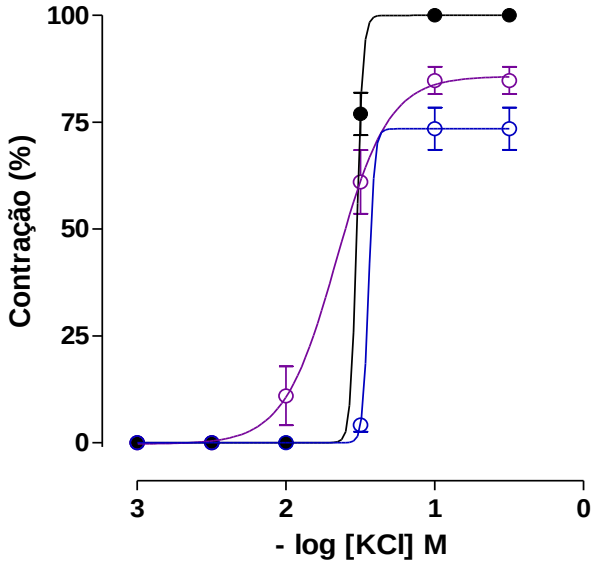
5.2.1 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre as respostas contrátil e relaxante em útero de rata

5.2.1.1 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por KCl

Nos grupos sedentários, a potência contrátil do KCl no GS (pCE_{50} = 1,5 ± 0,01) não foi alterada pela suplementação alimentar no GSP50 (pCE_{50} = 1,4 ± 0,01) e no GSP100 (pCE_{50} = 1,6 ± 0,08). Em relação à eficácia contrátil, observou-se que em comparação ao GS (E_{max} = 100%), a suplementação com *S. platensis* reduziu a eficácia contrátil ao KCl no GSP50 (E_{max} = 73,5 ± 4,9%) e no GSP100 (E_{max} = 84,8 ± 3,2%) de maneira equiparada (Gráfico 12A e Tabela 5).

No grupo submetido ao treinamento de força (GT), observou-se uma redução na potência e um aumento na eficácia contrátil ao KCl (pCE_{50} = 1,0 ± 0,03; E_{max} = 172,7 ± 8,1%) quando comparado ao GC (pCE_{50} = 2,0 ± 0,07; E_{max} = 100%). A suplementação com *S. platensis* no GT50 (pCE_{50} = 1,6 ± 0,02; E_{max} = 84,3 ± 8,8%) e no GT100 (pCE_{50} = 2,1 ± 0,05; E_{max} = 119,7 ± 9,1%) preveniu o aumento da eficácia e a redução da potência ao KCl (Gráfico 12B e Tabela 6).

Gráfico 12A – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl em útero isolado de rata, nos GS (●), GSP50 (○) e GSP100 (○).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

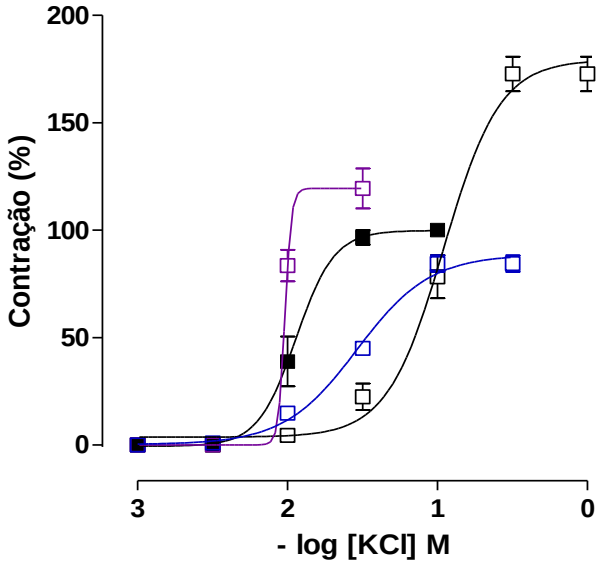
Tabela 5 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil ao KCl em útero isolado de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	1,53 ± 0,01
GSP50	73,5 ± 4,9*	1,4 ± 0,01
GSP100	84,8 ± 3,2*	1,6 ± 0,08

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GSP50 e GSP100 *vs.* GS), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 12B – Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl em útero isolado de rata, nos GC (■), GT (□), GT50 (□) e GT100 (□).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 6 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil ao KCl em útero isolado de rata, nos grupos GS, GC, GT, GT50 e GT100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	1,53 ± 0,01
GC	100	2,0 ± 0,07
GT	172,7 ± 8,1*	1,0 ± 0,03*
GT50	84,4 ± 3,8$^{\#}$	1,6 ± 0,02*$^{\#}$
GT100	119,7 ± 9,1$^{\#}$	2,0 ± 0,05$^{\#}$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT50 E GT100 *vs.* GC); $^{\#}p$ < 0,05 (GT50 E GT100 *vs.* GT), (n = 5). GS = grupo salina; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

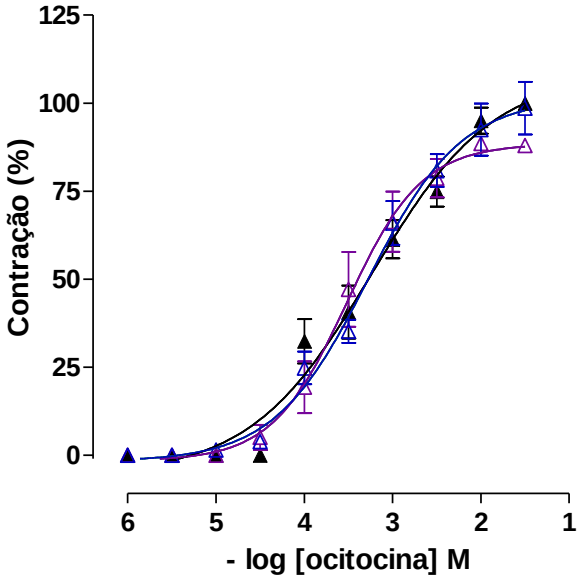
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.2 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina

A potência e a eficácia contrátil da ocitocina no GS (pCE_{50} = 3,3 ± 0,1; E_{max} = 100%) não foram alteradas pela suplementação com *S. platensis* no GSP50 (pCE_{50} = 3,3 ± 0,1; E_{max} = 98,6 ± 7,4%) e no GSP100 (pCE_{50} = 3,5 ± 0,2; E_{max} = 88,0 ± 1,0%) (Gráfico 13A e Tabela 7).

Nas ratas submetidas ao treinamento de força, observou-se um redução da potência e um aumento da eficácia contrátil da ocitocina (pCE_{50} = 2,1 ± 0,1; E_{max} = 222,0 ± 7,1%) comparado ao GC (pCE_{50} = 3,4 ± 0,2; E_{max} = 100,0%) e a suplementação alimentar com *S. platensis* no GT50 (pCE_{50} = 3,5 ± 0,1; E_{max} = 207,2 ± 15,0%) e no GT100 (pCE_{50} = 3,5 ± 0,1; E_{max} = 169,1 ± 7,7%) preveniu parcialmente o aumento da eficácia e da redução da potência desse agonista (Gráfico 13B e Tabela 8).

Gráfico 13A – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata, nos GS (▲), GSP50 (△) e GSP100 (△).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

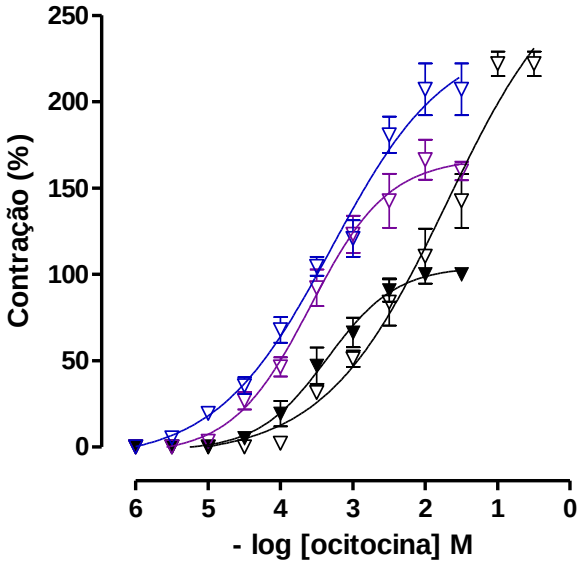
Tabela 7 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil à ocitocina em útero isolado de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	3,3 ± 0,1
GSP50	98,6 ± 7,4	3,3 ± 0,06
GSP100	88,0 ± 1,0	3,5 ± 0,2

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 13B – Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero de rata, nos GC (▼), GT (▽), GT50 (▽) e GT100 (▽).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 8 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade contrátil à ocitocina em útero isolado de rata, nos GS, GC, GT, GT50 e GT100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	3,3 ± 0,1
GC	100	3,4 ± 0,2
GT	222,0 ± 7,1*	2,1 ± 0,1*
GT50	207,2 ± 15,0*	3,51 ± 0,1
GT100	169,1 ± 7,7*	3,52 ± 0,1

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC), (n = 5). GS = grupo salina; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

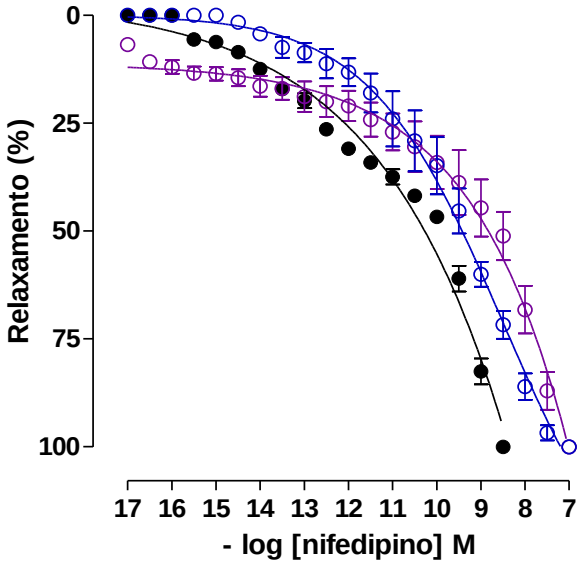
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.3 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta relaxante induzida por nifedipino

A potência relaxante do nifedipino GS (pCE_{50} = 10,0 ± 0,1) não foi alterada pela suplementação alimentar no GSP50 (pCE_{50} = 9,1 ± 0,2). Já a suplementação no GSP100 (pCE_{50} = 8,9 ± 0,4) atenuou a potência relaxante do nifedipino em relação ao controle. No entanto, a eficácia contrátil do nifedipino no GS (E_{max} = 100%) não foi alterada pela suplementação com *S. platensis* no GSP50 (E_{max} = 100%) e no GSP100 (E_{max} = 100%) (Gráfico 14A e Tabela 9).

O treinamento de força não alterou a potência nem a eficácia relaxante do nifedipino (pCE_{50} = 11,0 ± 0,2; E_{max} = 100%) em relação ao GC (pCE_{50} = 10,6 ± 0,08; E_{max} = 100%). Entretanto, a suplementação alimentar com a alga no GT50 (pCE_{50} = 8,8 ± 0,2; E_{max} = 100%) e no GT100 (pCE_{50} = 8,6 ± 0,2; E_{max} = 100,0%), diminuiu a potência relaxante do nifedipino, sem alteração da eficácia (Gráfico 14B e Tabela 10).

Gráfico 14A – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao nifedipino em útero isolado de rata pré-contraído com KCl, nos GS (●), GSP50 (○) e GSP100 (○).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

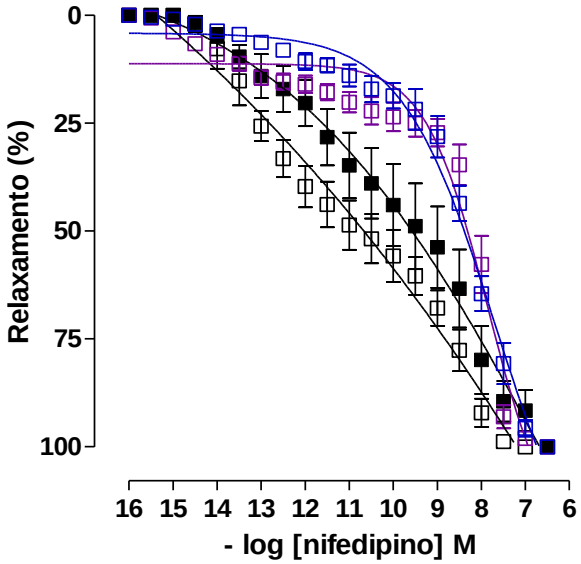
Tabela 9 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante ao nifedipino em útero isolado de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	10,0 ± 0,1
GSP50	100	9,1 ± 0,2
GSP100	100	8,9 ± 0,4*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GSP *vs.* GS), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 14B – Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao nifedipino em útero isolado de rata pré-contraído com KCl, nos GC (■), GT (□), GT50 (□) e GT100 (□).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 10 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante ao nifedipino em útero isolado de rata, nos GS, GC, GT, GT50 e GT100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	10,0 ± 0,1
GC	100	10,6 ± 0,08
GT	100	11,0 ± 0,2
GT50	100	8,8 ± 0,2*
GT100	100	8,6 ± 0,2*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT50 e GT100 *vs.* GC), (n = 5). GS = grupo salina; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

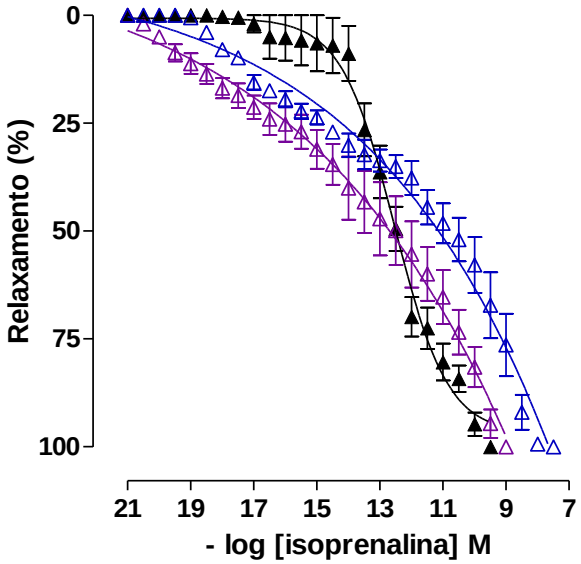
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.4 Efeito do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a resposta relaxante induzida por isoprenalina

A potência e a eficácia relaxante da isoprenalina no GS (pCE_{50} = 12,4 ± 0,1; E_{max} = 100%) não foram alteradas pela suplementação com *S. platensis* no GSP50 (pCE_{50} = 12,0 ± 0,2; E_{max} = 100%) e no GSP100 (pCE_{50}= 11,8 ± 0,9; E_{max} = 100%) (Gráfico 15A e Tabela 11).

O treinamento de força (E_{max} = 89,6 ± 3,6%) diminuiu a eficácia relaxante ao nifedipino em relação ao CG (E_{max} = 100%) e a suplementação com *S. platensis* nos GT50 e GT100 (E_{max} = 100%) previniu a diminuição de eficácia. Em relação à potência, o GT (pCE_{50} = 9,8 ± 0,3) diminuiu a potência relaxante ao nifedipino comparada com o GC (pCE_{50} = 12,0 ± 0,3); a suplementação alimentar com *S. platensis* preveniu essa redução em ambas as doses (GT50 – pCE_{50} = 12,0 ± 0,2; GT100 – 12,3 ± 0,2) (Gráfico 15B e Tabela 12).

Gráfico 15A – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à isoprenalina em útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina, nos GS (▲), GSP50 (△) e GSP100 (△).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

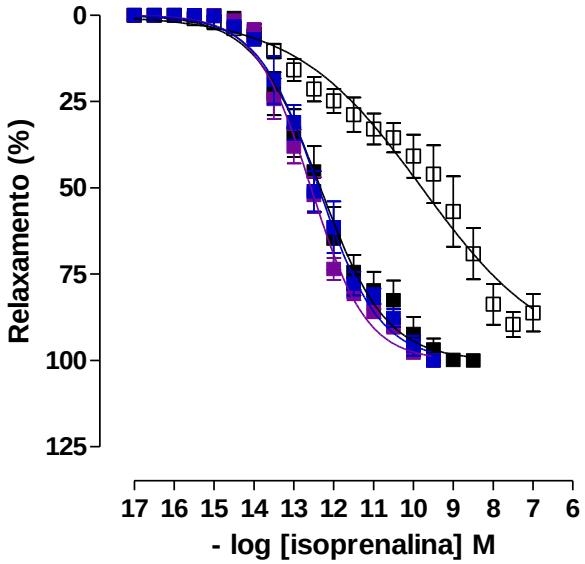
Tabela 11 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante à isoprenalina em útero isolado de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	12,6 ± 0,2
GSP50	100	11,5 ± 0,3
GSP100	100	13,1 ± 0,6

GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 15B – Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas a isoprenalina em útero de rata pré-contraído com ocitocina, nos GC (▼), GT (▽), GT50 (▽) e GT100 (▽).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 12 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da reatividade relaxante à isoprenalina em útero isolado de rata, nos GS, GC, GT, GT50 e GT100.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GS	100	12,6 ± 0,2
GC	100	12,0 ± 0,3
GT	89,6 ± 3,6*	9,8 ± 0,3*
GT50	100	12,0 ± 0,2*
GT100	100	12,3 ± 0,2*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC), (n = 5). GS = grupo salina; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

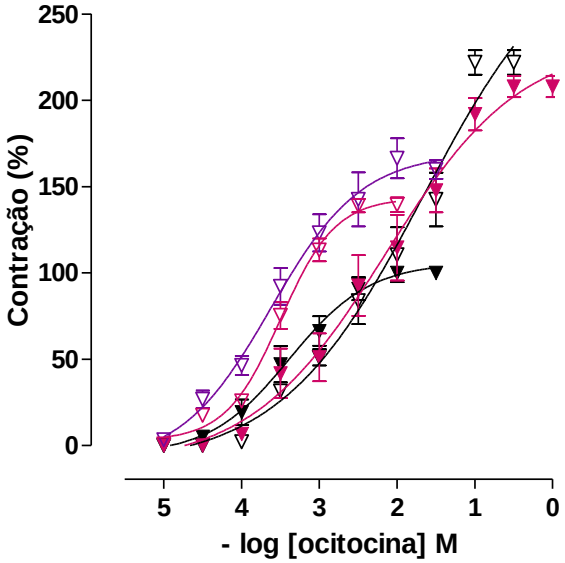
5.2.5 Avaliação do mecanismo de ação preventivo da *S. platensis* em útero de rata submetida a treinamento de força

5.2.5.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina, na ausência e na presença de Y-27632

Nas ratas submetidas ao treinamento de força, a eficácia contrátil da ocitocina não foi alterada na presença de Y-27632 (E_{max} = 208,1 ± 6,1%), um inibidor de ROCK, quando comparado a sua ausência no GT (E_{max} = 222,0 ± 7,1%). Adicionalmente, não houve alteração na potência contrátil do agonista na ausência (pCE_{50} = 2,3 ± 0,2) e na presença (pCE_{50} = 2,1 ± 0,1) de Y-27632 nesse grupo experimental (Gráfico 16 e Tabela 13, n = 5).

Nas ratas submetidas ao treinamento de força e que foram suplementadas com 100 mg/kg de *S. platensis*, evidenciou-se a redução do efeito máximo em (E_{max} = 139,5 ± 4,2%), na presença de Y-27632, quando comparado a ausência desse inibidor (E_{max} = 169,1 ± 7,1%), mas não foi observada alteração na curva cumulativa à ocitocina na presença do inibidor de ROCK (pCE_{50} = 3,55 ± 0,06) quando comparado a sua ausência (pCE_{50} = 3,51 ± 0,1) (Gráfico 16 e Tabela 13, n = 5).

Gráfico 16 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata, nos GC (▼), GT (▽), GT + Y-27632 (▼), GT100 (▽) e GT100 + Y-27632 (▽).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 13 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + Y-27632, GT100 e GT100 + Y-27632.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,4 ± 0,2
GT	222,0 ± 7,1*	2,1 ± 0,1*
GT + Y-27632	208,1 ± 6,1*	2,3 ± 0,2*
GT100	169,1 ± 7,7%*	3,51 ± 0,1*
GT100 + Y-27632	139,5 ± 4,2%*	3,55 ± 0,06*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT + Y-27632, GT100 e GT100 + Y-27632 *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + Y-27632 = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + Y27632 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.5.2 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a resposta contrátil induzida por ocitocina, na ausência e na presença de apocinina ou de tempol

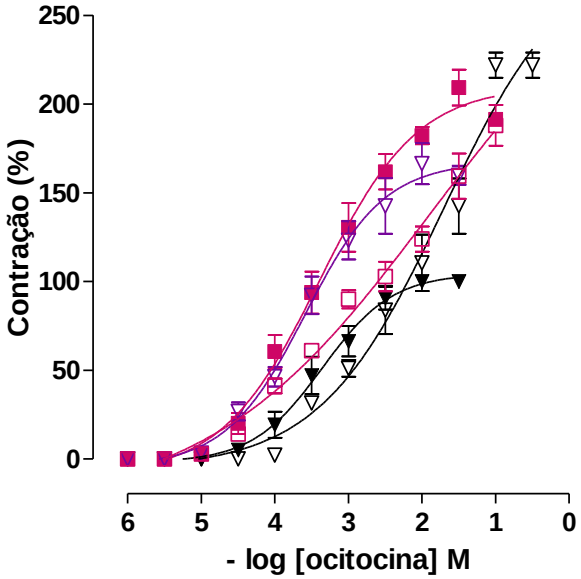
Na avaliação da curva da ocitocina na presença da apocinina, um inibidor do complexo NADPH oxidase, nas ratas submetidas ao treinamento de força, a eficácia contrátil da ocitocina foi reduzida (E_{max} = 212,6 ± 8,1%), quando comparado na ausência desse inibidor (E_{max} = 222,0 ± 7,1%). Em relação à potência, observou-se uma diminuição na potência contrátil do agonista na presença de apocinina (pCE_{50} = 3,3 ± 0,1) em comparação a ausência do inibidor (pCE_{50} = 2,1 ± 0,1) (Gráfico 17 e Tabela 14, n = 5).

Além disso, verificou-se que a eficácia contrátil da ocitocina foi aumentada na presença de apocinina (E_{max} = 188,0 ± 11,5%) nas ratas submetidas ao treinamento de força e suplementados com 100 mg/kg de *S. platensis*, em comparação a ausência desse inibidor (E_{max} = 169,1 ± 7,7%), bem como um aumento na potência contrátil na presença do inibidor (pCE_{50} = 2,8 ± 0,4) em comparação a ausência do mesmo (pCE_{50} = 3,5 ± 0,1) (Gráfico 17 e Tabela 14, n = 5).

Ao avaliar a curva da ocitocina na presença do tempol, um mimético da superóxido dismutase, nos animais submetidos ao treinamento de força, observou-se uma diminuição da eficácia contrátil (E_{max} = 203,0 ± 12,6%), quando comparado na ausência do mimético (E_{max} = 222,0 ± 7,1%). Assim como, na avaliação da potência, evidenciou-se uma diminuição da potência contrátil da ocitocina na presença do tempol (pCE_{50} = 3,0 ± 0,2) em comparação a ausência (pCE_{50} = 2,1 ± 0,1) (Gráfico 18 e Tabela 15, n = 5).

A suplementação com 100 mg/kg da alga nas ratas submetidas ao treinamento de força diminuiu a eficácia contrátil da ocitocina na presença do tempol (E_{max} = 169,1 ± 7,7%) em comparação com a ausência (E_{max} = 134,6 ± 4,8%), mas não alterou a curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina na presença desse mimético da SOD (pCE_{50} = 3,3 ± 0,1) quando comparado a sua ausência (pCE_{50} = 3,5 ± 0,1) (Gráfico 18 e Tabela 15, n = 5).

Gráfico 17 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata, nos GC (▼), GT (▽), GT + apocinina (■), GT100 (▽) e GT100 + apocinina (□).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

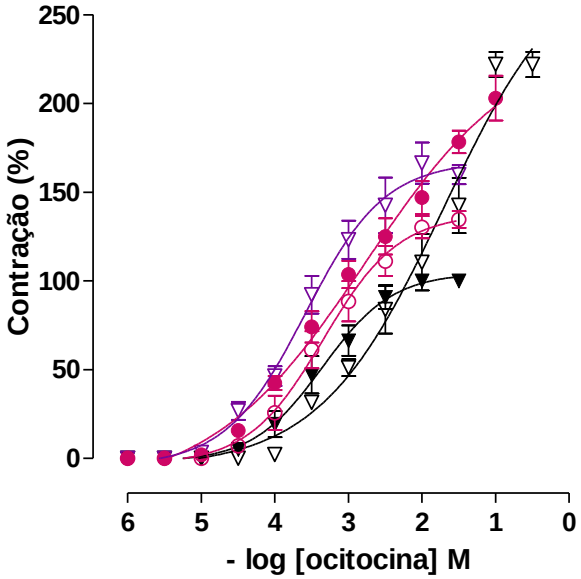
Tabela 14 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + apocinina, GT100 e GT100 + apocinina.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,4 ± 0,2
GT	222,0 ± 7,1*	2,1 ± 0,1*
GT + apocinina	212,6 ± 8,1*	3,3 ± 0,1
GT100	169,1 ± 7,7%*	3,51 ± 0,1*
GT100 + apocinina	188,0 ± 11,5%*	2,8 ± 0,4*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *$p < 0,05$ (GT, GT + apocinina, GT100 e GT100 + apocinina *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + apocinina = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + apocinina = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 18 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de rata, nos GC (▼), GT (▽), GT + tempol (●), GT100 (▽) e GT100 + tempol (○).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 15 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + tempol, GT100 e GT100 + tempol.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,4 ± 0,2
GT	222,0 ± 7,1*	2,1 ± 0,1*
GT + tempol	203,0 ± 12,6*	3,0 ± 0,2*
GT100	169,1 ± 7,7%*	3,51 ± 0,1*
GT100 + tempol	134,6 ± 4,8%*	3,3 ± 0,1*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *$p < 0,05$ (GT, GT + tempol, GT100 e GT100 + tempol *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + tempol = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + tempol = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.5.3 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de L-NAME ou indometacina.

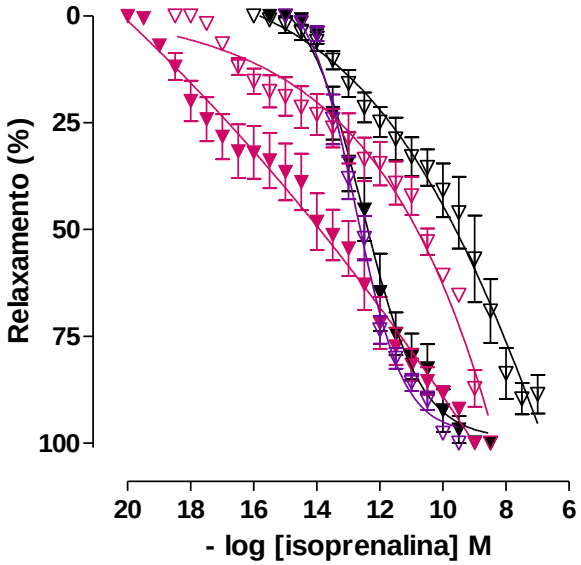
Foi observado que a curva da isoprenalina na presença do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME, nas ratas submetidas ao treinamento de força, foi deslocada para a esquerda com aumento da eficácia relaxante desse agonista (E_{max} = 100%) e potencialização do relaxamento da isoprenalina (pCE_{50} = 14,0 ± 0,5) quando comparado a curva na ausência desse inibidor (E_{max} = 89,6 ± 3,6%; pCE_{50} = 9,8 ± 0,3) (Gráfico 19 e Tabela 16, n = 5).

Nas ratas treinadas e suplementadas com 100 mg/kg da alga, a eficácia relaxante da isoprenalina não foi alterada na presença de L-NAME (E_{max} = 100%), entretanto, observou-se uma diminuição da potência relaxante (pCE_{50} = 11,2 ± 0,3) quando comparado a ausência desse inibidor (pCE_{50} = 12,3 ± 0,2; E_{max} = 100%) (Gráfico 19 e Tabela 16).

Ao analisar a curva da isoprenalina na presença da indometacina, um inibidor de ciclo-oxigenase, nas ratas submetidas ao treinamento de força, observou-se um deslocamento para a esquerda com aumento da eficácia relaxante (E_{max} = 100%) e potencialização do relaxamento da isoprenalina (pCE_{50} = 15,4 ± 0,4) quando comparado a curva na ausência desse inibidor (E_{max} = 89,6 ± 3,6%; pCE_{50} = 9,8 ± 0,3) (Gráfico 20 e Tabela 17, n = 5).

A suplementação com 100 mg/kg de *S. platensis* nas ratas submetidas ao treinamento de força não alterou a eficácia relaxante da isoprenalina na presença da indometacina (E_{max} = 100%), bem como observou-se um aumento da potência relaxante (pCE_{50} = 13,3 ± 0,2) quando comparado a ausência dessa substância (pCE_{50} = 12,3 ± 0,2; E_{max} = 100%) (Gráfico 20 e Tabela 17, n = 5).

Gráfico 19 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à isoprenalina em útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina, nos GC (▼), GT (▽), GT + L-NAME (▼), GT100 (▽) e GT100 + L-NAME (▽).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

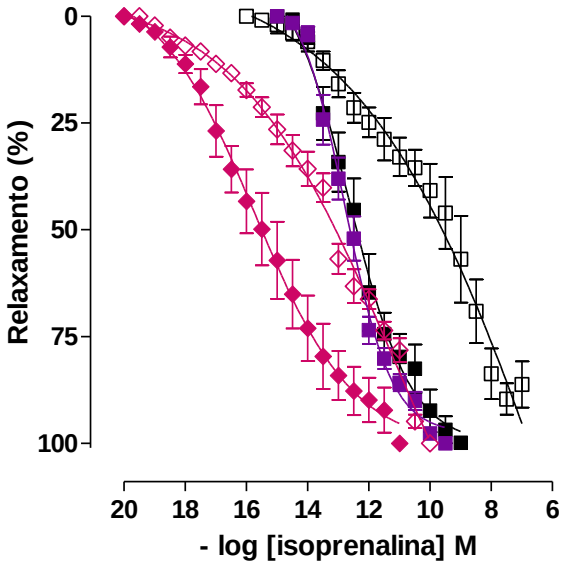
Tabela 16 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da isoprenalina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + L-NAME, GT100 e GT100 + L-NAME.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	12,0 ± 0,3
GT	89,6 ± 3,6*	9,8 ± 0,3*
GT + L-NAME	100	14,0 ± 0,5*
GT100	100*	12,3 ± 0,2*
GT100 + L-NAME	100	11,2 ± 0,3*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT + L-NAME, GT100 e GT100 + L-NAME *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + L-NAME = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + L-NAME = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 20 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à isoprenalina em útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina, nos GC (▼), GT (▽), GT + indometacina (◆), GT100 (▽) e GT100 + indometacina (◇).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 17 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da isoprenalina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + indometacina, GT100 e GT100 + indometacina.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	12,0 ± 0,3
GT	89,6 ± 3,6*	9,8 ± 0,3*
GT + indometacina	100	15,4 ± 0,4*
GT100	100*	12,3 ± 0,2*
GT100 + indometacina	100*	13,3 ± 0,2*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT + indometacina, GT100 e GT100 + indometacina *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + indometacina = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + indometacina = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

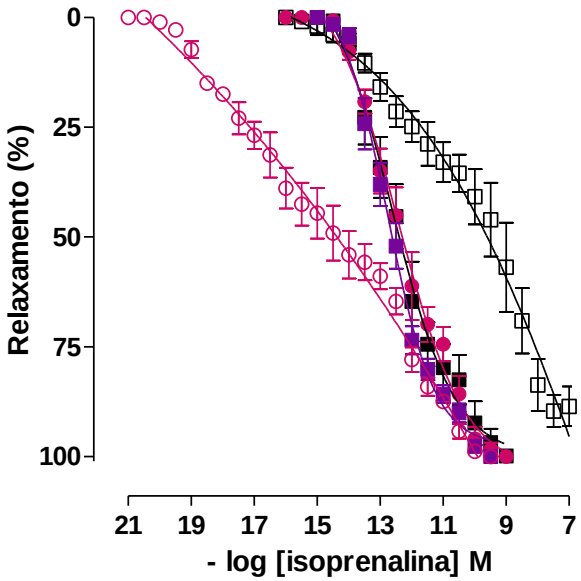
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.5.4 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de isoprenalina na ausência e na presença de catalase

Ao analisar a curva da isoprenalina na presença da catalase, nas ratas submetidas ao treinamento de força, observou-se aumento na eficácia relaxante desse agonista (E_{max} = 100%) e potencialização da resposta relaxante da isoprenalina (pCE_{50} = 12,3 ± 0,2) quando comparado a curva na ausência desse inibidor (E_{max} = 89,6 ± 3,6%; pCE_{50} = 9,8 ± 0,3) (Gráfico 21 e Tabela 18, n = 5).

A suplementação com 100 mg/kg da alga nas ratas submetidas ao treinamento de força não alterou a eficácia relaxante da isoprenalina na presença da catalase (E_{max} = 100%), mas, houve aumento da potência relaxante (pCE_{50} = 14,5 ± 0,3) quando comparado a ausência dessa substância (pCE_{50} = 12,3 ± 0,2; E_{max} = 100%) (Gráfico 21 e Tabela 18, n = 5).

Gráfico 21 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à isoprenalina em útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina, nos GC (▼), GT (▽), GT + catalase (●), GT100 (▽) e GT100 + catalase (○).



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

Fonte: Ferreira, 2019.

Tabela 18 – Valores de E_{max} e de pCE_{50} da isoprenalina em útero isolado de rata, nos GC, GT, GT + catalase, GT100 e GT100 + catalase.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	12,0 ± 0,3
GT	89,6 ± 3,6*	9,8 ± 0,3*
GT + catalase	100	12,3 ± 0,2
GT100	100*	12,3 ± 0,2*
GT100 + catalase	100*	14,5 ± 0,3*

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT100 e GT100 + catalase *vs.* GC), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT + catalase = grupo treinado na presença de inibidor; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GT100 + catalase = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg na presença de inibidor.

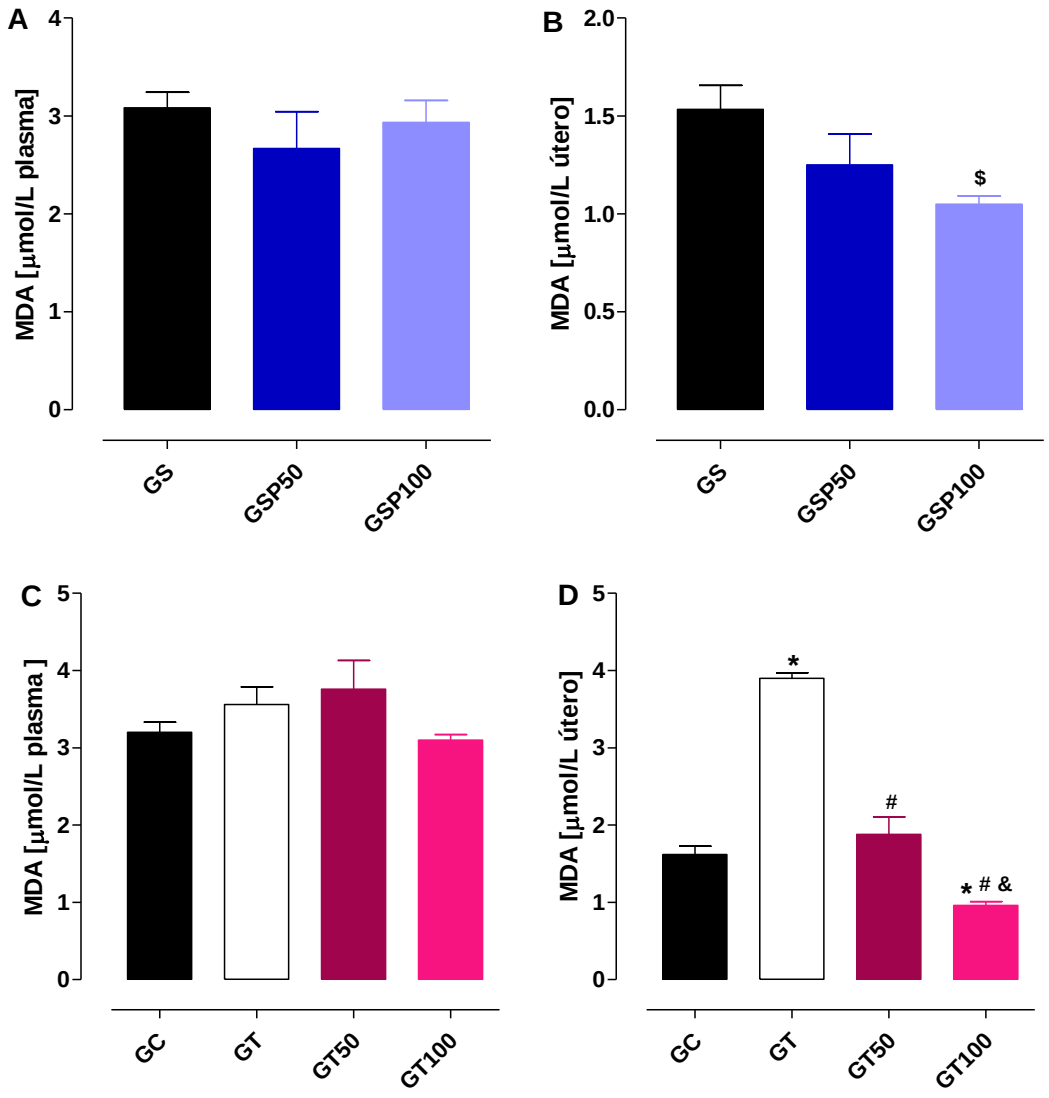
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.6 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a concentração de MDA no plasma e no útero de rata

Nas ratas suplementadas com *S. platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg, não foi observada diferença na concentração de MDA no plasma dos grupos GS (3,1 ± 0,2), GSP50 (2,7 ± 0,4), GSP100 (2,9 ± 0,2) (Gráfico 22A, n = 5). Ao analisar as amostras de tecido uterino, a concentração de MDA no útero não foi alterada nas ratas do grupo GSP50 (1,2 ± 0,2), mas diminuiu no grupo suplementado com a dose de 100 mg/kg (1,0 ± 0,04) (Gráfico 22B, n = 5).

Nas ratas submetidas a treinamento de força e suplementadas com *S. platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg, não foi observada diferença na concentração de MDA no plasma dos grupos GT (3,6 ± 0,2), GT50 (3,8 ± 0,4) e GT100 (3,1 ± 0,1) em comparação ao controle (3,2 ± 0,1) (Gráfico 22C, n = 5). Ao analisar as amostras de tecido uterino, a concentração de MDA no útero foi aumentada no grupo GT (3,9 ± 0,1) e esse aumento foi previnido pela suplementação com *S. platensis* nos grupos GT50 (1,9 ± 0,2) e de forma mais acentuada em GT100 (1,0 ± 0,05) em comparação com o controle (1,6 ± 0,1) (Gráfico 22D, n = 5).

Gráfico 22 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a concentração de MDA no plasma (**A** e **C**) e no útero (**B** e **D**) de rata, nos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP100 *vs.* GS); $^{*}p < 0,05$ (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC); $^{\#}p < 0,05$ (GT50 e GT100 *vs.* GT) e $^{\&}p < 0,05$ (GT100 *vs.* GT50), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

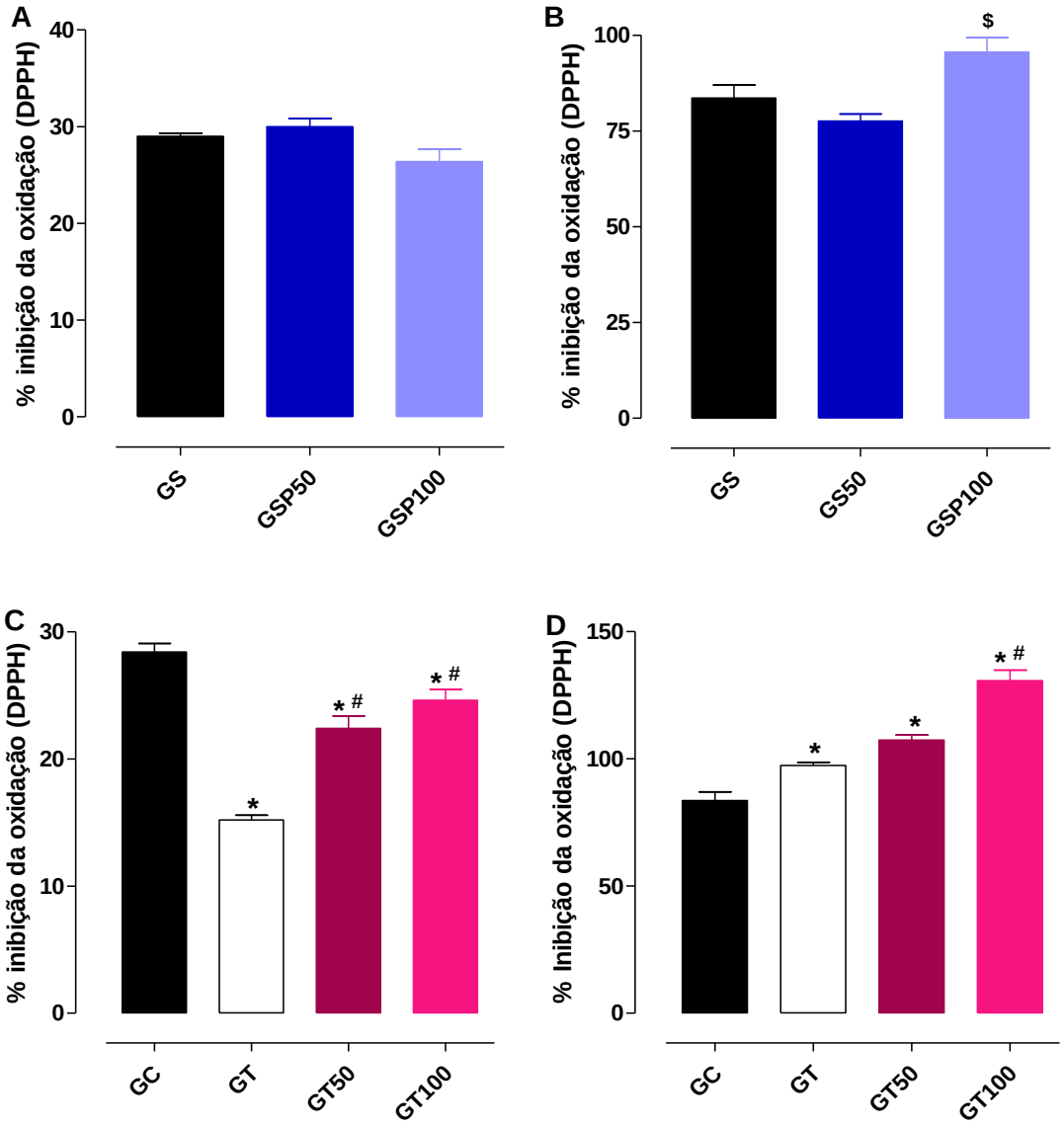
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.7 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre o percentual de inibição da oxidação no plasma e no útero de rata

Nas ratas suplementadas com *S. platensis*, não foi observada diferença no percentual de inibição da oxidação no plasma do grupo GS50 (30,0 ± 0,8%) e GS100 (26,4 ± 1,2%) em relação ao GS (29,0 ± 0.3%) (Gráfico 22A). No útero, o percentual de oxidação não diferiu entre o grupo GS (83,6 ± 3,4%) e GS50, mas aumentou em comparação ao GSP100 (95,6 ± 3,8% (Gráfico 22B).

Nas ratas treinadas e suplementadas com *S. platensis*, evidenciou-se que o treinamento de força diminuiu o percentual de inibição da oxidação no plasma (15,2 ± 0,4%) e que a suplementação com a alga em GT50 (22,4 ± 0,1%) e GT100 (24,6 ± 0,9%) atenuaram esse efeito em comparação a GC (28,4 ± 0,7%) (Gráfico 23A). No útero, o percentual de oxidação foi aumentado pelo treinamento de força GT (97,4 ± 1,3%) e pela suplementação com *S. platensis* em GT50 (107,4 ± 1,9%) sendo esse aumento acentuado em GT100 (130,8 ± 4,0%) em comparação ao GC (83,6 ± 3,4%) (Gráfico 23B).

Gráfico 23 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre o percentual de inibição da oxidação no plasma (**A** e **C**) e no útero (**B** e **D**) de rata, nos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP100 *vs.* GS); $^{*}p < 0,05$ (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC) e $^{\#}p < 0,05$ (GT50 e GT100 *vs.* GT), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

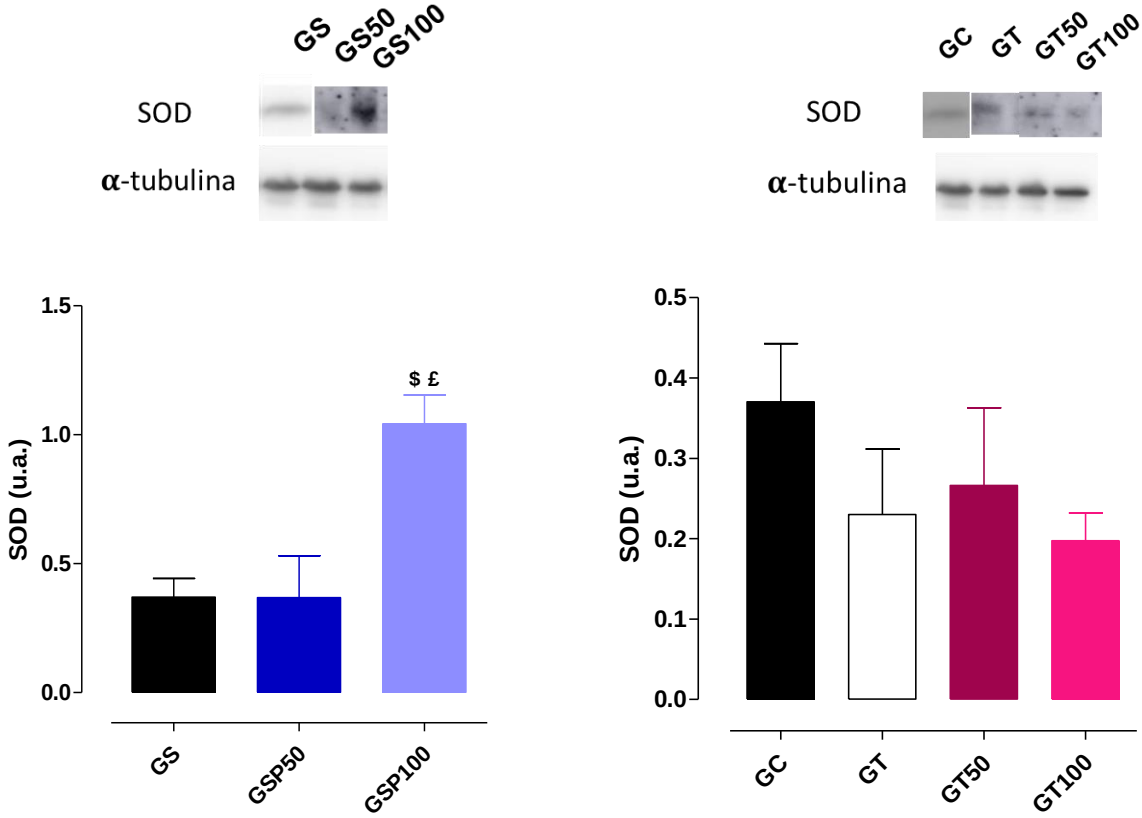
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.8 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de SOD em útero de rata

Nas ratas suplementadas com *S. platensis* observou-se um aumento da expressão da proteína SOD em GSP100 (1,04 ± 0,11) quando comparados com GS (0,37 ± 0,07) e GSP50 (0,37 ± 0,16) (Gráfico 24, n = 5).

O treinamento de força e suplementação com *S. platensis* não alterou a expressão de SOD em útero de ratas GT (0,23 ± 0,08), GT50 (0,27 ± 0,09) e GT100 (0,20 ± 0,03), em comparação ao GC (0,37 ± 0,07) (Gráfico 24, n = 5).

Gráfico 24 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão da proteína SOD em útero de rata, nos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP100 *vs.* GS) e $^{£}p < 0,05$ (GSP100 *vs.* GSP50), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

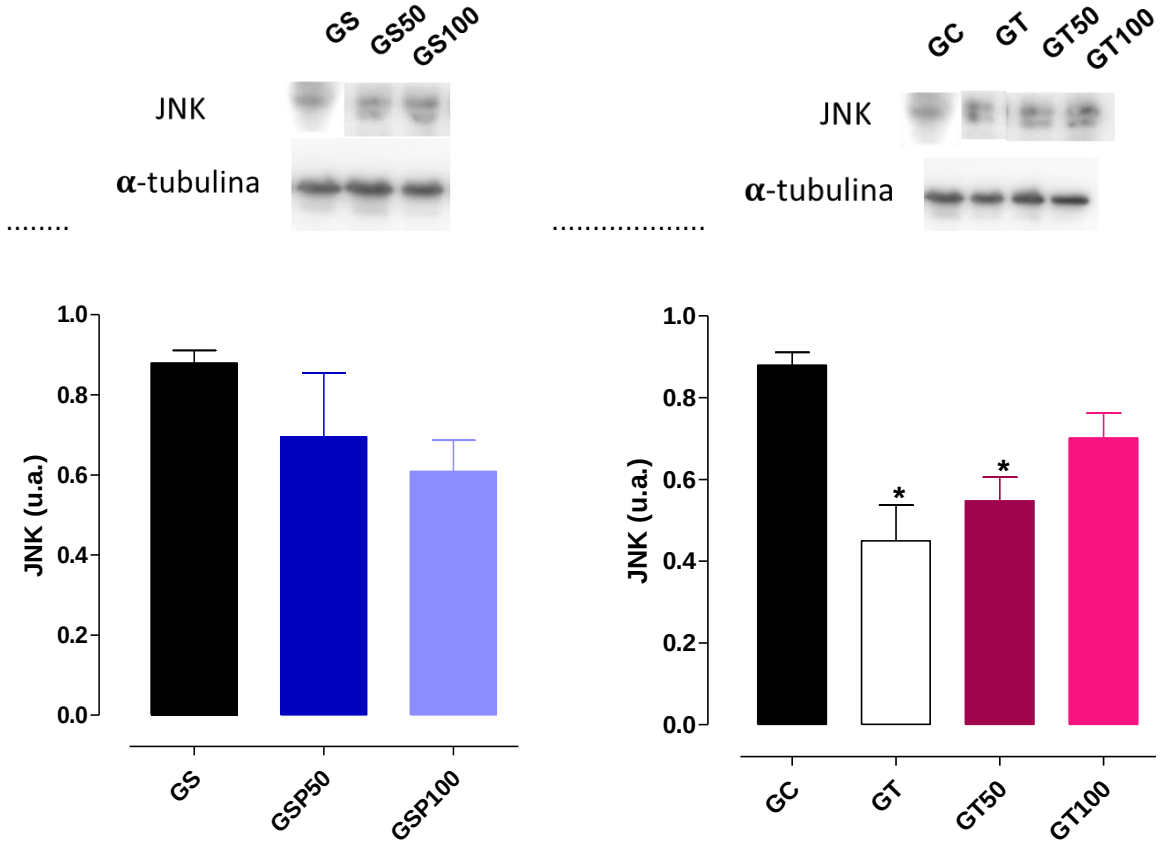
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.9 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de JNK no útero de rata

Nas ratas suplementadas com *S.platensis,* não foi observada diferença na expressão da proteína JNK entre os grupos suplementados com a alga em GSP50 (0,70 ± 0,16) e GSP100 (0,61 ± 0,08) quando comparados com GS (0,88 ± 0,03) (Gráfico 25, n = 5).

O treinamento de força e a suplementação com *S. platensis* diminuíram a expressão de JNK em útero de ratas GT (0,45 ± 0,09) e esse efeito foi parcialmente prevenido pela suplementação com *S. platensis* em GT50 (0,55 ± 0,06) e totalmente prevenido em GT100 (0,70 ± 0,06), quando comparados ao controle (0,88 ± 0,03) (Gráfico 25, n = 5).

Gráfico 25 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão da proteína JNK em útero de rata, nos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *$p < 0,05$ (GT e GT50 *vs.* GC), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

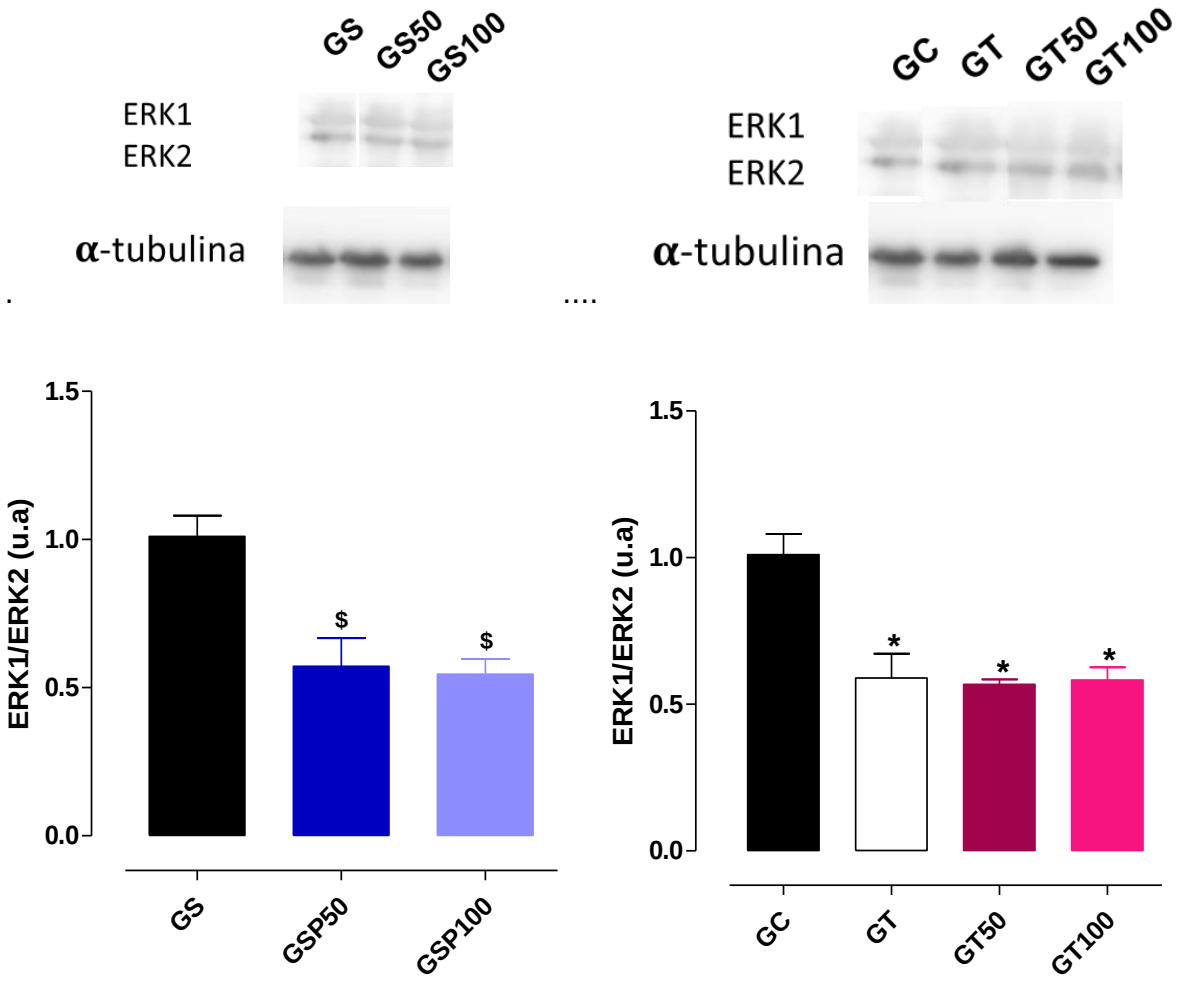
Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.10 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão proteica de ERK1/2 no útero de rata

Nas ratas suplementadas com *S.platensis* evidenciou-se uma diminuição da expressão da proteína ERK1/2 em GSP50 (0,57 ± 0,07) e GSP100 (0,54 ± 0,09) quando comparados com GS (1,0 ± 0,07) (Gráfico 26, n = 5).

O treinamento de força e suplementação com *S. platensis* diminuíram a expressão de ERK1/2 em útero de ratas GT (0,59 ± 0,08), GT50 (0,57 ± 0,01) e GT100 (0,58 ± 0,04), em comparação ao GC (1,0 ± 0,07) (Gráfico 26, n = 5).

Gráfico 26 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre a expressão das proteínas ERK1/2 em útero de rata, nos GS, GSP50, GSP100, GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP50 e GSP100 *vs.* GS) e $^{*}p < 0,05$ (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.11 Avaliação dos efeitos do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre a morfologia uterina e da adrenal em rata

5.2.11.1 Análise histomorfométrica em útero de rata

5.2.11.1.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular

Nas ratas suplementadas com *S. platensis* na dose de 50mg/kg (40,0 ± 2,9) e 100mg/kg (42,0 ± 1,8) não foi observado alteração do número de eosinófilos em relação ao grupo salina (39,75 ± 1,9) (Figura 5; Gráfico 27A).

Nas ratas submetidas ao treinamento de força (25,5 ± 0,9) foi observada uma diminuição do número de eosinófilos em comparação ao grupo controle (39,75 ± 1,9) e a suplementação alimentar com a alga na dose de 50mg/kg (21,9 ± 0,7) não alterou esse parâmetro quando comparado ao grupo treinado. Já nos animais treinados e suplementados na dose de 100mg/kg (32,8 ± 1,5) foi observado um aumento do número de eosinófilos em relação ao GT (Figura 6; Gráfico 27A).

Nas ratas suplementadas com *S. platensis* na dose de 50mg/kg (14,5 ± 1,0) e 100mg/kg (19,5 ± 1,0) observou-se um aumento, dependente de dose, do número de vasos em relação ao grupo controle (5,8 ± 0,2) (Figura 5; Gráfico 26B).

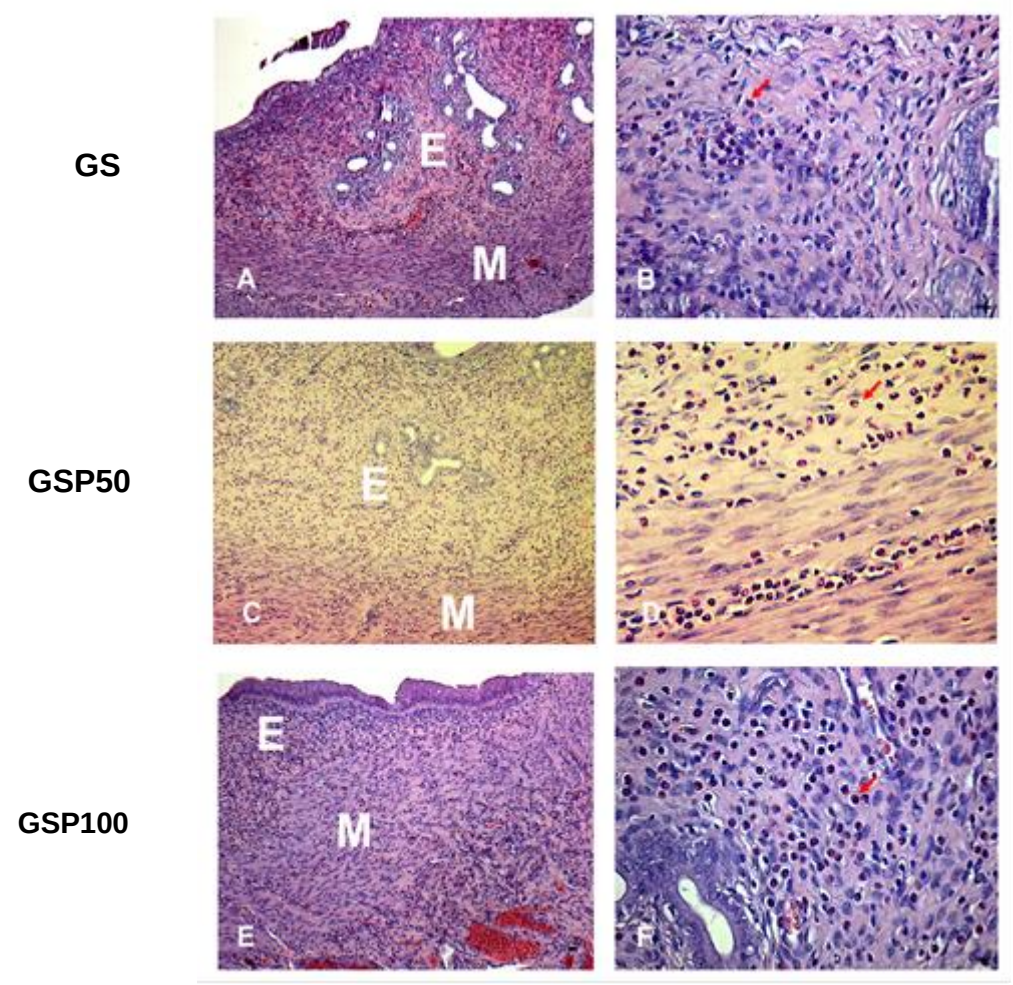
Nos animais submetidos ao treinamento de força (17,8 ± 1,1) foi visto um aumento do número de vasos em comparação ao grupo controle (5,8 ± 0,2). A suplementação alimentar com a *S. platensis* na dose de 50 mg/kg (14.2 ± 0,2) e 100mg/kg (17,8 ± 1,2) não alterou o número de vasos em relação ao grupo treinado (Figura 6; Gráfico 27B).

Quando quantificada a área vascular, observou que a suplementação com a alga aumentou a área vascular em GSP50 (0,8 ± 0,03) e GSP100 (0,89 ± 0,07) em comparação ao GS (0,13 ± 0,05) (Figura 5; Gráfico 26C).

O treinamento de força aumentou a área vascular em relação ao controle (0,13 ± 0,05) e a suplementação alimentar com a alga diminui a área vascular em GT50 (0,44 ± 0,03) e GT100 (0,34 ± 0,05) quando comparado à GT (0,81 ± 0,03) (Figura 6; Gráfico 27C).

Nas ratas sedentárias observou-se um aumento da área do miométrio em GSP50 (1,2 ± 0,5) e em GSP100 (1,1 ± 0,08) em comparação ao grupo salina (0,5 ± 0,07) (Figura 5; Gráfico 26D). Semelhantemente, nas ratas submetidas a treinamento de força (0,95 ± 0,06) observou-se um aumento da área muscular em relação ao controle (0,5 ± 0,07). A suplementação com a alga em GT50 (0,8 ± 0,03) não alterou esse parâmetro diferente do observado em GT100 (0,71 ± 0,05) onde constatou-se uma diminuição da área do miométrio em comparação ao controle (0,5 ± 0,07) (Figura 6; Gráfico 27D).

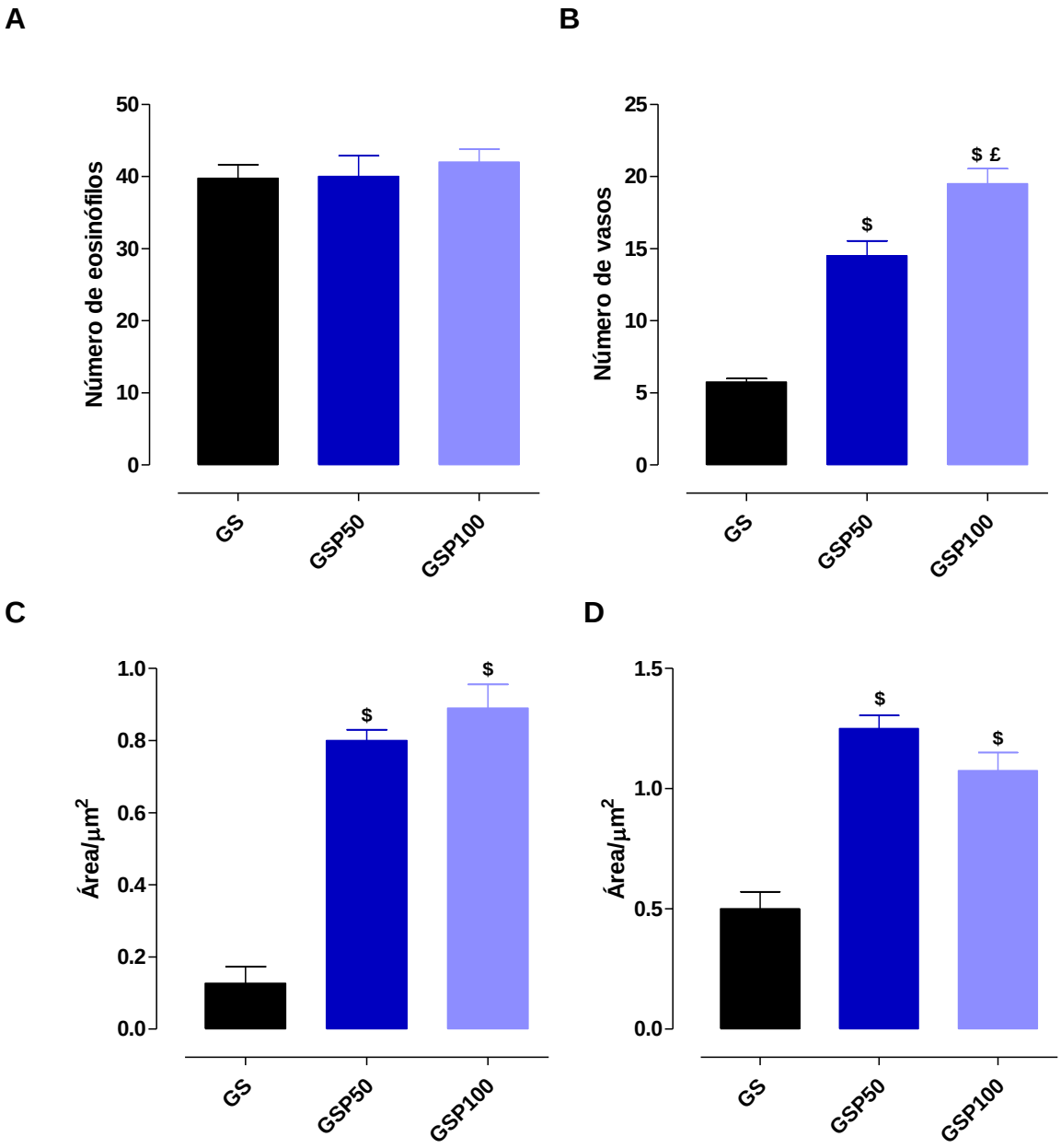
Figura 3 – Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular em útero de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.



Fotomicrografia de útero de rata em GS, GSP50 E GSP100. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita). Setas em vermelho indicam células em divisão. E = endométrio; M = miométrio; GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

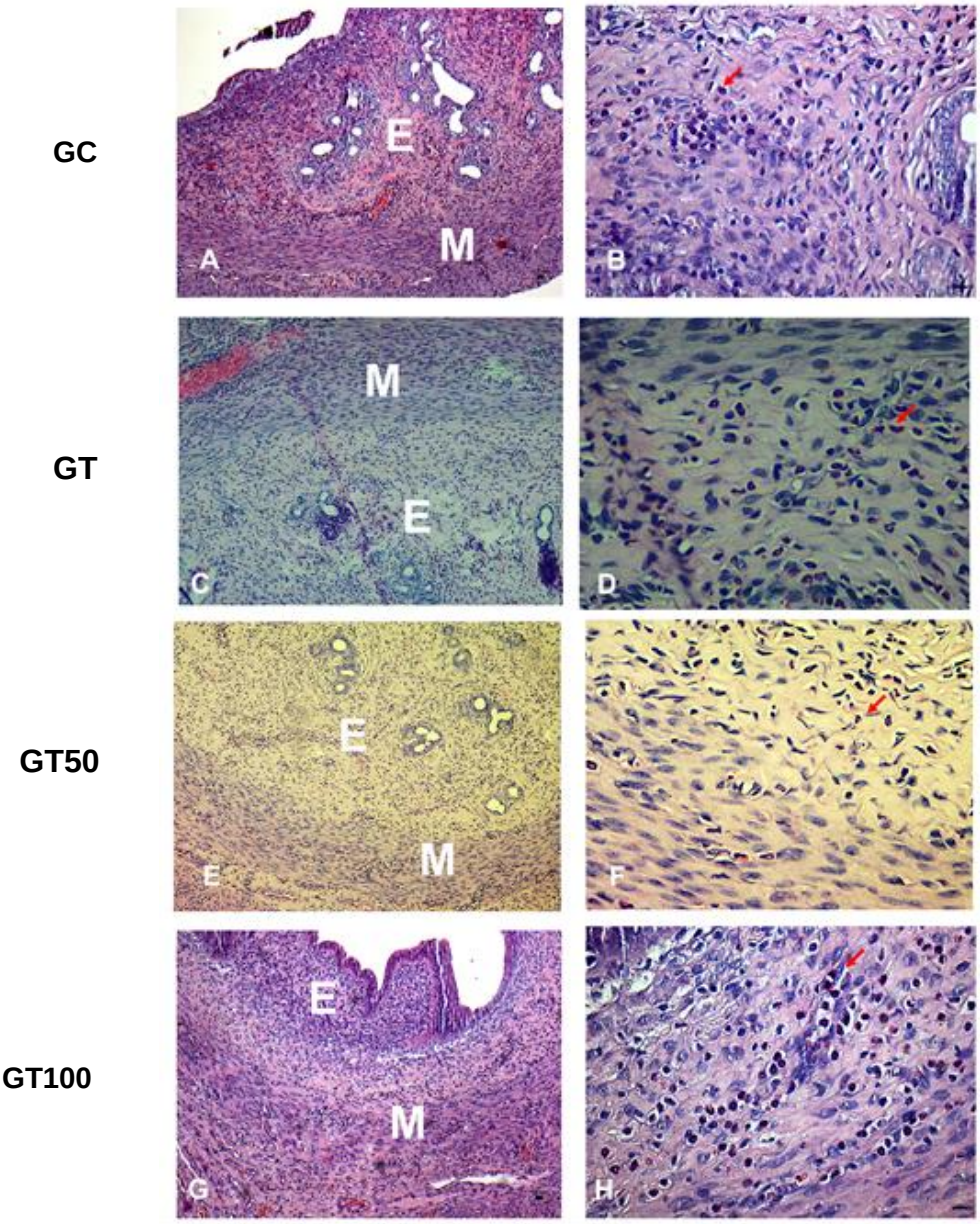
Gráfico 27 – Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o número de eosinófilos (**A**) e de vasos sanguíneos (**B**) e sobre a área vascular (**C**) e muscular (**D**) em útero de rata, nos GS, GSP50 e GSP100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP50 e GSP100 *vs.* GS) e $^{£}p < 0,05$ (GSP100 *vs.* GSP50), (n = 5). GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

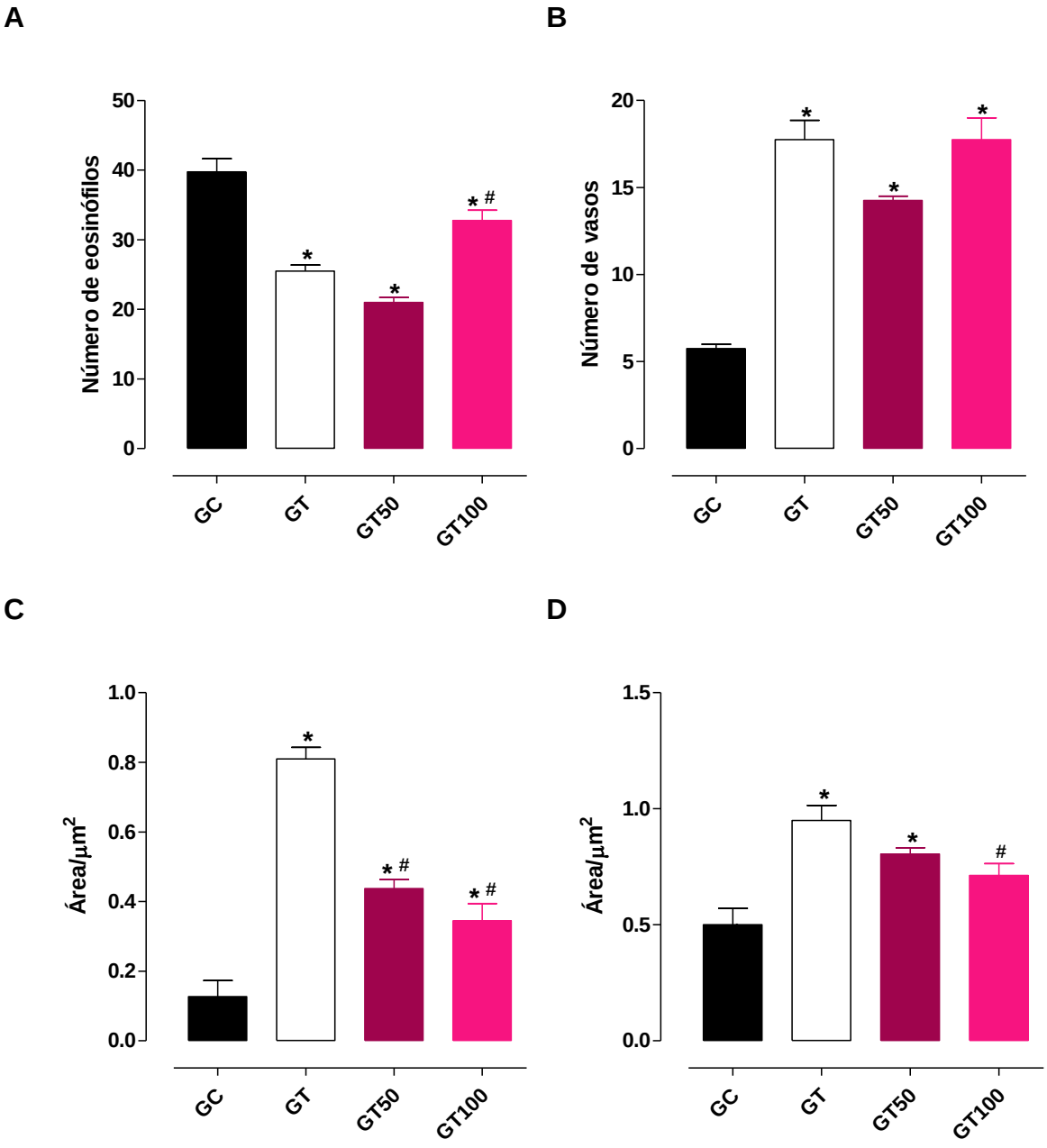
Figura 4 – Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o número de eosinófilos e de vasos sanguíneos e sobre a área vascular e muscular em útero de rata, nos GC, GT, GT50 e GT100.



Fotomicrografia de útero de rata em GC, GT, GT50 e GT100. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita). Setas em vermelho indicam células em divisão. E = endométrio; M = miométrio; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 28 – Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o número de eosinófilos (**A**) e de vasos sanguíneos (**B**) e sobre a área vascular (**C**) e muscular (**D**) em útero de rata, nos GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{*}p < 0,05$ (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC) e $^{\#}p < 0,05$ (GT50 e GT100 *vs.* GT), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

5.2.11.2 Análise histomorfométrica da glândula adrenal de ratas

5.2.11.2.1 Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre as áreas das camadas glomerulosa, fasciculada, reticulada e medular e do número de vacúolos da glândula adrenal em rata

Para esta análise, foi observado o córtex da glândula, as camadas glomerulosa, fasciculada e reticulada além da sua camada medular. Em relação à camada glomerulosa, foi observado que a suplementação em GSP50 (0,14 ± 0,01) e GSP100 (0,18 ± 0,02) não alterou a área da camada glomerulosa em comparação ao controle (0,17±0,008) (Figura 7, Gráfico 29A). Resultados similares foram observados nas ratas submetidas ao treinamento de força (0,18 ± 0,01) e suplementadas com a alga em GT50 (0,18 ± 0,02) e GT100 (0,12 ± 0,006) no qual não foi observado alteração desse parâmetro (Figura 8, Gráfico 30A).

A suplementação alimentar com a alga nas doses de 50 (2,0 ± 0,04) e 100mg/kg (2,4 ± 0,17) não alterou a área da camada fasciculada em relação ao controle (2,1 ± 0,04) (Figura 7, Gráfico 29B). O treinamento de força (2,6 ± 0,08) aumentou a área da camada fasciculada e a suplementação com a *S. platensis* nas doses de 50 (1,8 ± 0,02) e 100mg/kg (1,8 ± 0,1) diminuíram esse parâmetro (Figura 8, Gráfico 30B).

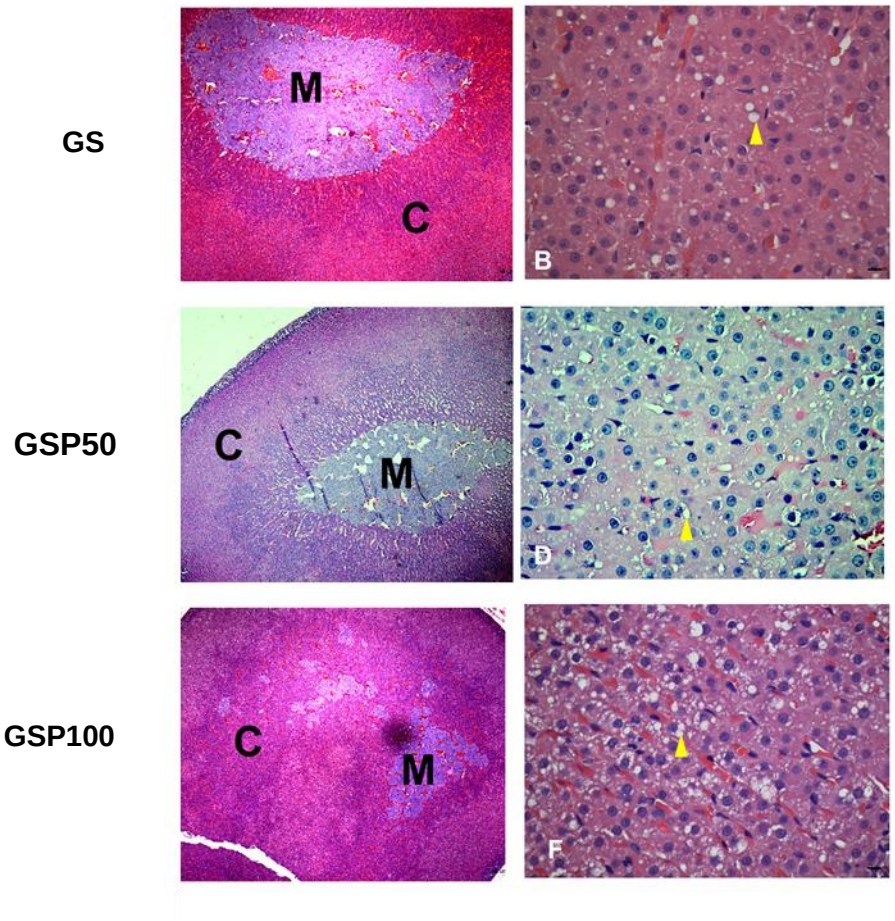
Quando avaliada ainda nessa mesma camada a área de degeneração lipídica, sugestiva da presença de cortisol, pode-se notar que a mesma não foi alterada na dose de 50mg/kg (15,2 ± 0,8) diferente do observado na dose de 100mg/kg (35,5 ± 0,5) onde se notou um aumento do número desses vacúolos em comparação ao grupo controle (17,8 ± 1,0) (Figura 7, Gráfico 29E). Ainda nessa mesma observação, evidenciou-se que o treinamento de força (49,8 ± 2,0) levou a um aumento do número de vacúolos em relação ao grupo controle (17,8 ± 1,0) e que a suplementação com a alga nas doses de 50 (15,2 ± 0,8) e 100mg/kg (27,2 ± 0,5) diminuíram esses valores (Figura 8, Gráfico 30E).

Em relação à camada reticulosa, houve diminuição apenas no grupo GSP100 (0,26 ± 0,03), diferente do grupo GSP50 (0,74 ± 0,01) o qual não houve alteração em comparação ao controle (0,86 ± 0,05) (Figura 7, Gráfico 29C). Nas ratas submetidas ao treinamento de força (0,7 ± 0,01), observou-se uma diminuição da área dessa

camada nos grupo GT50 (0,7 ± 0,006) e GT100 (0,71 ± 0,02) em comparação ao grupo controle (0,86 ± 0,05) (Figura 8, Gráfico 30C).

Em relação à análise da área medular, a suplementação na dose de 50mg/kg (2,4 ± 0,2) não alterou a área desta camada, diferente do observado na dose de 100mg/kg (2,0 ± 0,08), onde evidenciou-se uma diminuição desse parâmetro, em comparação ao grupo controle (2,3 ± 0,2) (Figura 7, Gráfico 29D). Nas ratas submetidas ao treinamento de força (2,0 ± 0,05), não foi observado alteração da área da camada medular, bem como em GT50 (2,5± 0,2) e GT100 (2,4 ± 0,09) em comparação ao grupo controle (2,3 ± 0,2) (Figura 8, Gráfico 30D).

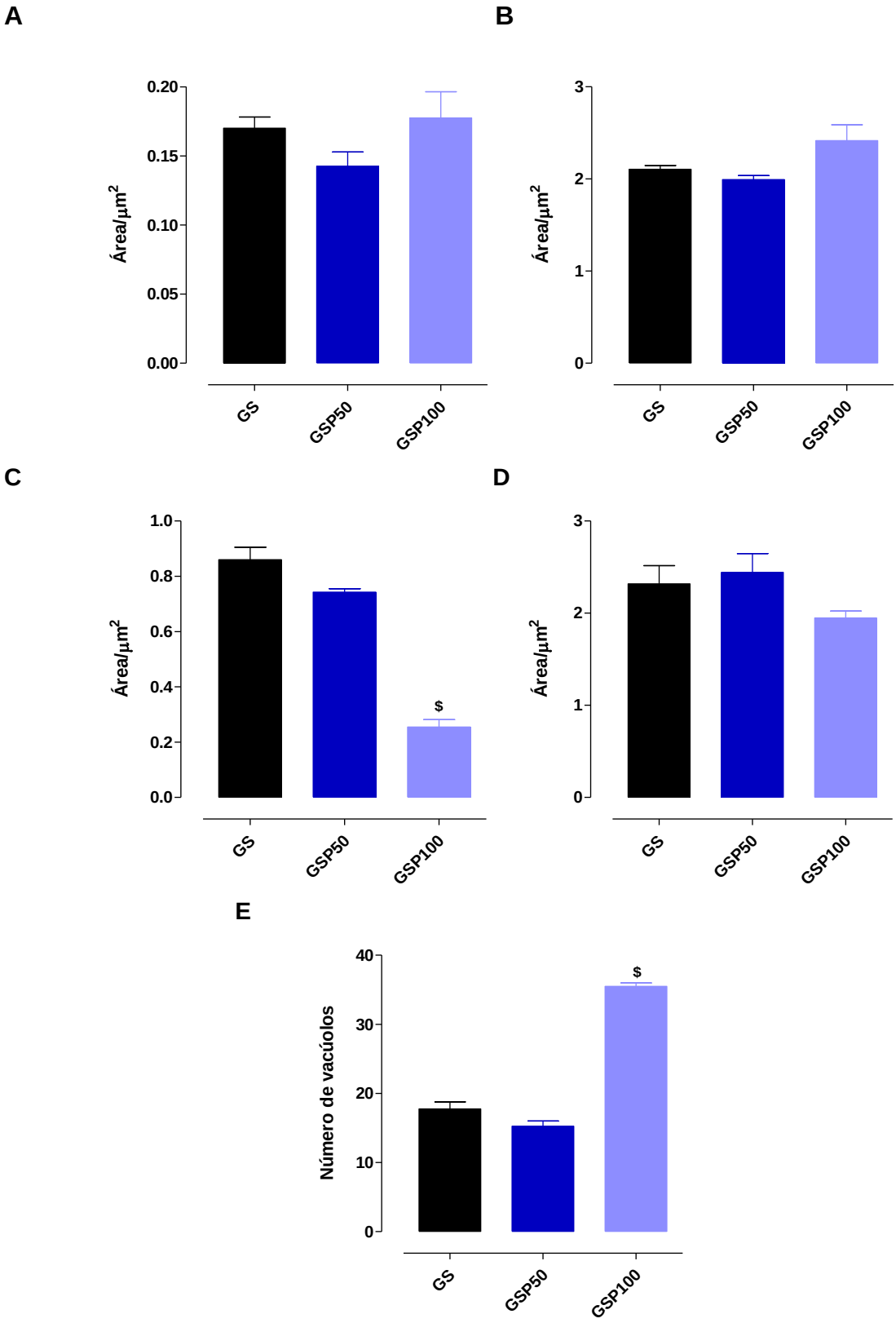
Figura 5 - Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre a morfologia da glândula adrenal em rata, nos GS, GSP50 e GSP100.



Fotomicrografia da glândula adrenal de ratas em GS, GSP50 e GSP100. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita).Setas amarelas indicativas de vacúolos lipídicos na camada fasciculada. C = cortex; M = medula; GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 29 - Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as áreas das camadas glomerulosa (**A**), fasciculada (**B**), reticulada (**C**) e medular (**D**) e do número de vacúolos (**E**) em rata, nos GS, GSP50 e GSP100.

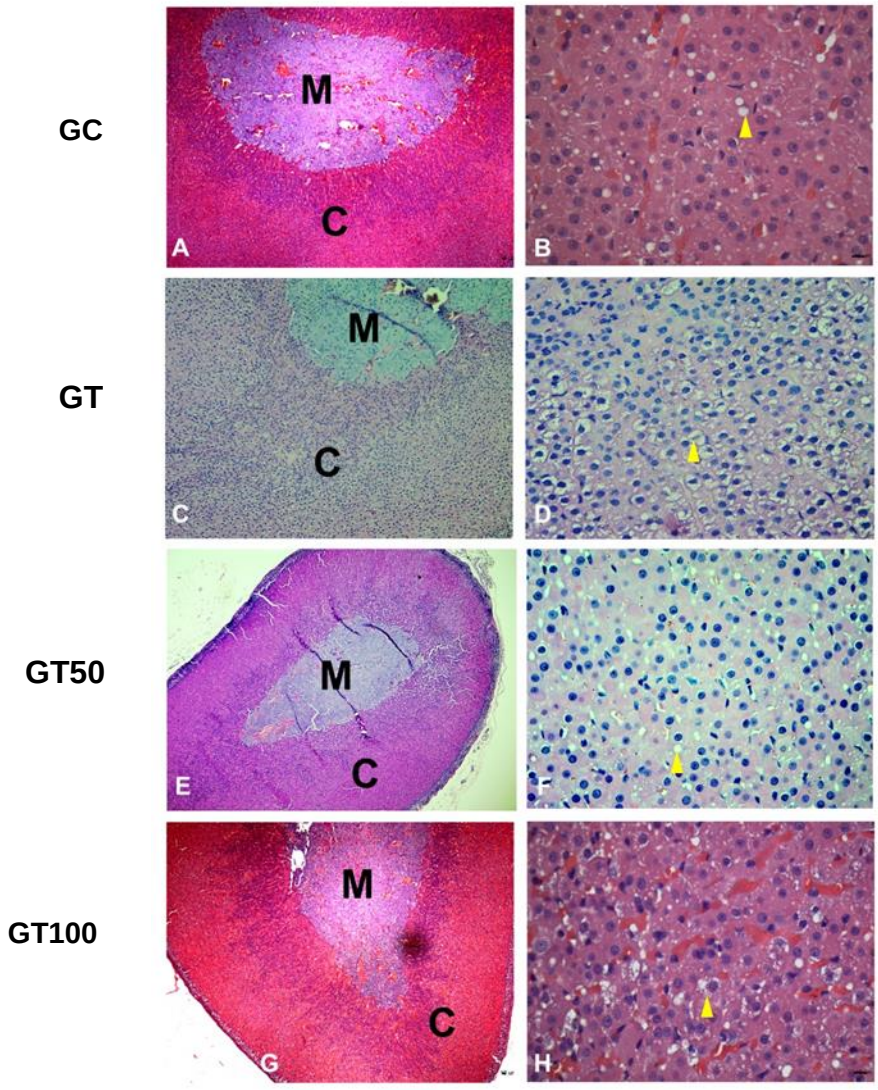


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $^{\$}p < 0,05$ (GSP50 e GSP100 *vs.* GS), (n = 5).

GS = grupo salina; GSP50 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GSP100 = grupo suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

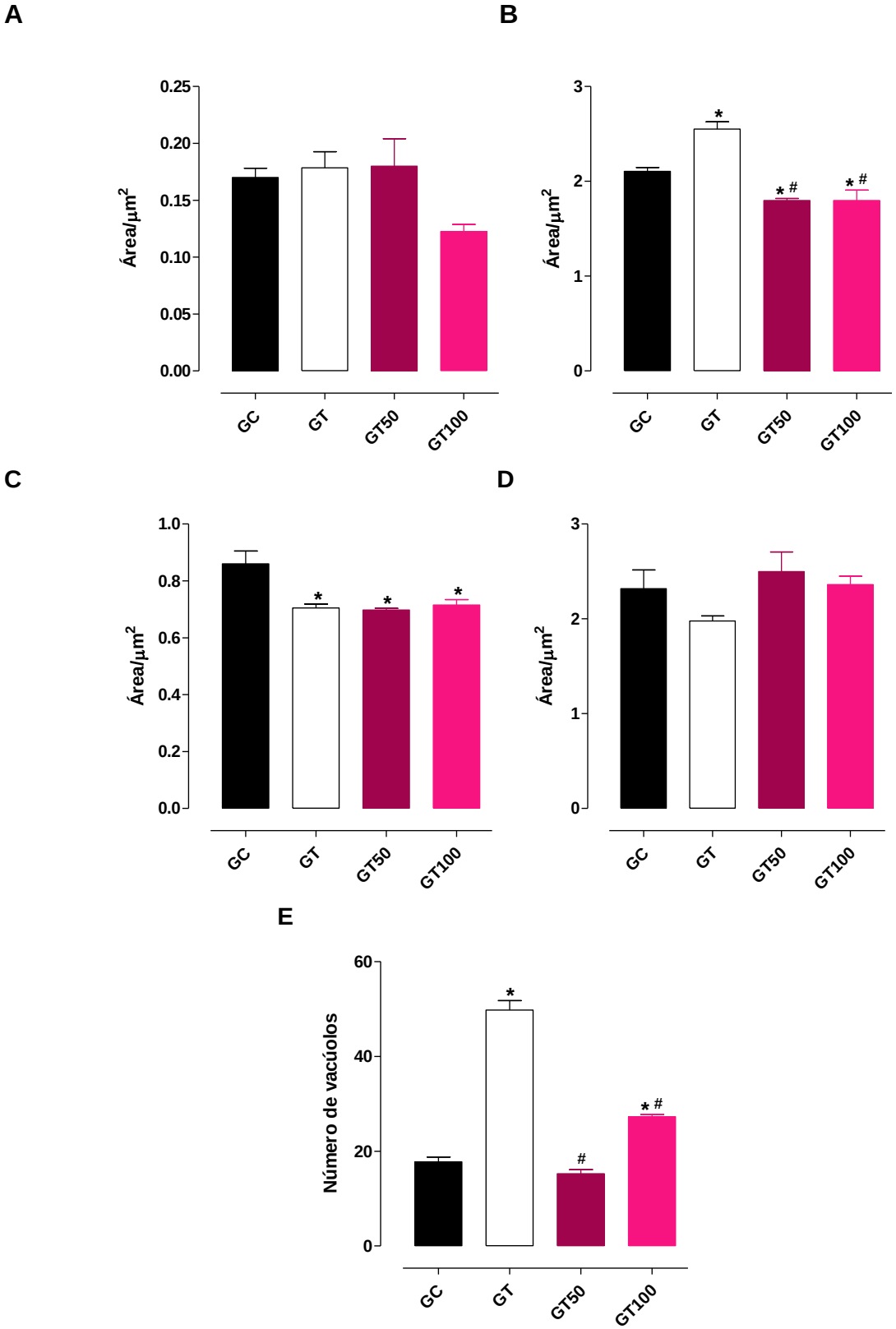
Figura 6 - Efeito do treinamento de força e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre a morfologia da glândula adrenal em rata, nos GC, GT, GT50 e GT100.



Fotomicrografia da glândula adrenal de ratas em GC, GT, GT50 e GT100. Aumento de 4x (esquerda) e 40x (direita). Setas amarelas indicativas de vacúolos lipídicos na camada fasciculada.C = cortex; M = medula; GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

Gráfico 29 – Efeito do treinamento de força e/ou da suplementação alimentar com S. platensis sobre as áreas das camadas glomerulosa (**A**), fasciculada (**B**), reticulada (**C**) e medular (**D**) e do número de vacúolos (**E**) em rata, nos GC, GT, GT50 e GT100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, *p < 0,05 (GT, GT50 e GT100 *vs.* GC) e $^{\#}p$ < 0,05 (GT50 e GT100 *vs.* GT), (n = 5). GC = grupo controle; GT = grupo treinado; GT50 = grupo

treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg; GT100 = grupo treinado e suplementado com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Ferreira, 2019.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstra-se pela primeira vez que uma sessão de exercício de força resultou no aumento da resposta contrátil, diminuição da reatividade relaxante, sem alterar o estresse oxidativo nem a via das MAPK por meio de um aumento a camada muscular uterina. Além disso, demonstrou-se que o treinamento de força diminui a potência e aumenta a eficácia contrátil, diminui a potência relaxante em útero de ratas e que esses efeitos são prevenidos pela suplementação alimentar com *S. platensis,* com o envolvimento da via das ciclooxigenases, do NO e de espécies reativas de oxigênio, por uma diminuição da área cortical da adrenal e da produção de hormônios catabólicos contráteis.

Vários estudos demonstram que a fisiopatologia de diversas doenças, que afetam órgãos revestidos por músculo liso, como intestino, vasos e útero, pode estar envolvida com a desregulação do estresse oxidativo, pois este é prejudicial à contração da musculatura lisa, além de promover alterações na função de várias proteínas, desde receptores a canais iônicos que são responsáveis pelo desencadeamento dos processos contráteis (VAN DER VLIET, 1992).

Avaliando esse aspecto, é importante enfatizar que algumas condições podem interferir com a regulação da maquinaria contrátil uterina, destacando-se a prática de exercício físico por mulheres, seja por razões estéticas ou por prática de esportes, no qual elas são submetidas a exercícios excessivos que muitas vezes são acompanhados de recuperação inadequada levando a pertubações na homeostase do corpo e desregulação hormonal, o que, por sua vez, pode causar distúrbios no sistema reprodutivo relacionados com o estresse oxidativo (WARREN; PERLROTH, 2001).

Apesar de também estarem correlacionados com as adaptações benéficas ao exercício (PATE et al., 1995), a relação entre o estresse oxidativo induzido por EROs e tais desordens não está claro e não pode ser adequadamente investigado em humanos por razões éticas auto-evidentes. Além disso, há uma falta de informações fundamentais sobre as respostas adaptativas a nível celular, bioquímico e molecular decorrente de um ambiente oxidante sob condições fisiológicas e estados de doença.

Nesse contexto, estudos demonstraram os efeitos do exercício sobre o sistema reprodutor femino como distúrbios reprodutivos, incluindo menarca tardia, amenorreia primária e secundária e a oligomenorreia (WARREN; PERLROTH, 2001;

SOUZA; WILLIAMS, 2004). Ademais, apenas um trabalho demonstrou o efeito de uma sessão de exercício exaustivo de esteira sobre a reatividade uterina, na qual foi observado aumento da peroxidação lipídica, alteração na plasticidade uterina, levando a atrofia e modulação negativa da contratilidade do útero o que pode ser uma importante ferramenta não-invasiva para aliviar a disfunção da mobilidade uterina (COSTA et al., 2014).

Diante dessas premissas, o exercício pode ser uma opção de tratamento, seja como intervenção autônoma ou como complemento a outras formas de tratamento se prescrito da maneira correta e modelos animais são essenciais para preencher essas importantes lacunas no nosso conhecimento. Assim, hipotetizou-se, pela primeira vez, que uma sessão única de exercício de força seria capaz de alterar a reatividade uterina, homeostase redox e parâmetros histomorfométricos do útero e da glândula adrenal.

Inicialmente, decidiu-se investigar se uma sessão aguda de exercício de força alteraria a reatividade contrátil e relaxante do útero de rata. No músculo liso, a contração pode ser obtida através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando a um aumento na $[Ca^{2+}]_c$, ou induzida por um agonista (acoplamento misto) (SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A.V., 2003; WRAY et al., 2014).

Conforme observado na avaliação do componente eletromecânico de contração, houve uma diminuição da reatividade uterina logo após a sessão de exercício com recuperação da potência contrátil decorridas doze horas da sessão de exercício. A restauração desse parâmetro ocorreu apenas 24 horas após o exercício, sugerindo que uma única sessão de exercício de força altera resposta do órgão ao KCl nas primeiras horas após o exercício com uma provável adaptação do órgão ao dano sofrido após 24 horas (Gráfico 1) Esses resultados são similares ao observado por Costa et al. (2014) e Rosa et al. (2008) no útero e no íleo de camundongos, respectivamente, em que o exercício físico intenso da esteira promoveu diminuição da eficácia contrátil ao KCl.

Na avaliação do mecanismo de relaxamento eletromecânico, utilizou-se o nifedipino, um bloqueador do canal de cálcio dependente de voltagem do tipo 1 (Ca_V1). Imediatamente após o exercício físico, a curva de controle foi deslocada para a direita, indicando uma diminuição na potência relaxante do agonista, sugerindo que uma modulação positiva de Ca_V1 pode estar ocorrendo.

Curiosamente, após 12 e 24 horas o órgão pode ter sofrido adaptações ao exercício, favorecendo assim o relaxamento do músculo liso uterino (Gráfico 3). Dentre as possíveis adaptações, o aumento da disponibilidade de NO que ocorre após uma sessão de exercício (JUNGERSTEN et al., 1997; ROBTS et al., 1999) pode estar contribuindo para o favorecimento do relaxamento e diminuição da contração uterina.

Em relação ao acoplamento farmacomecânico, houve aumento da eficácia contrátil da ocitocina em todas as horas testadas (Gráfico 2), mas sem alteração na potência. Resultados divergentes foram obtidos por Costa et al. (2014), no útero de camundongos submetidos a uma única sessão de exercício físico intenso, em que houve diminuição da eficácia contrátil do carbacol (CCh), um agonista que promove a contração por um acoplamento misto, semelhante à ocitocina.

Na análise do relaxamento induzido por um acoplamento farmacomecânico, observou-se que a sessão aguda de exercício de força deslocou a curva controle para a direita, com diminuição da potência relaxante em todas as condições experimentais testadas (Gráfico 4). Os resultados indicam que, possivelmente, mudanças podem estar ocorrendo no nível do receptor ou nos mecanismos subsequentes de transdução celular do acoplamento farmacomecânico. Além disso, Shelley e colaboradores 2006 mencionaram que a atividade física leva ao estresse do corpo e melhora da circulação sanguínea que fornece um estímulo à hipófise posterior para secretar ocitocina, favorecendo a contração uterina mediada por esse agonista.

Com esses achados, observou-se que as respostas não foram as mesmas frente aos estímulos utilizados, sugerindo que outros mecanismos, podem estar modulando a reatividade contrátil e o relaxamento uterino. As alterações induzidas pelo exercício podem estar associadas ao aumento da produção de EROs como resultado das alterações circulatórias citadas anteriormente, responsáveis por danificar as membranas celulares e/ou macromoléculas, como enzimas, canais iônicos e proteínas receptoras de proteínas, modificando os mecanismos de transdução (JI, L.L., GOMEZ-CABRERA, M. C. & VIÑA, J., 2006), além da produção de espécies reativas, entre eles o ânion superóxido, com efeitos contráteis na musculatura lisa uterina (ZOU; MARTIN; ULLRICH, 1997; ZOU; ULLRICH, 1996).

A maioria dos estudos utilizou o malonilaldeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica, como uma medida do estresse oxidativo causado pelo exercício (URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. 2003). Usando essa metodologia, níveis semelhantes de MDA foram observados no útero em todos os tempos investigados após a sessão de exercício (Gráfico 5).

Em sistemas biológicos, o aumento da produção de EROs é contrabalançado pela capacidade antioxidante do corpo, que representa a capacidade do corpo para sequestrar os radicais livres através de sistemas redox (BRIGHENTI et al, 2005). Com base nessas informações, avaliou-se se uma sessão aguda de exercício de força alteraria a capacidade antioxidante uterina de ratos. Os achados demonstram que, após 24 horas, o útero apresentou aumento na capacidade antioxidante (Gráfico 6), o que pode estar associado ao aumento da expressão da enzima antioxidante SOD no útero de ratos observado após 12 horas do exercício (Gráfico 9), visto que essa enzima é responsável pela dismutação do ânion superóxido, precurssor de radicais contráteis e produção do H_2O_2, com efeitos relaxantes já descritos em útero de rata, via ativação de canias de potássio (YU, 1994; PIETTA, 2000). Esses achados corroboram os resultados observados na avaliação da reatividade relaxante uterina, na qual observou-se potencialização do relaxamento induzido pelo nifedipino.

Também neste cenário, os radicais livres são importantes reguladores em diversos processos celulares, incluindo a ativação de fatores de transcrição, expressão gênica e proliferação celular (LIU et al., 2007). Neste contexto, foi descrito que a via de sinalização das EROs pode estar por trás do aumento da expressão e/ou atividade de MAPKs (GAITANAKI, et al, 2003; SCHAEFFER, et al, 2003), destacando a modulação da expressão de JNK e ERK1/2, os alvos mais comuns do exercício, no entanto, eles não foram alterados nas condições experimentais testadas (Gráficos 7 e 8). Portanto, é necessário investigar mais alvos celulares associados a esses efeitos, a fim de melhor esclarecer a natureza mecanicista dessas alterações, bem como permitir uma melhor correlação clínica à luz da prática de exercício físico.

Durante a fase aguda do exercício, ocorrem ajustes na homeostase e na fase mais crônica, acontecem as adaptações fisiológicas de longo prazo. Durante e imediatamente após uma sessão de exercício, há doenças metabólicas e alterações

neuromusculares que são proporcionais aos aumentos taxa metabólica (LAMBERT, M. I., 2016). Outras mudanças que ocorrem para atender as demandas do aumento da taxa metabólica incluem alteração do fluxo sanguíneo para os músculos ativos, aumento da frequência cardíaca e respiratória, secreção de hormônios do estresse (p.ex., hormônio adrenocorticotrópico, cortisol, catecolaminas) e aumento da temperatura para manter a constância do estado interno do corpo durante o exercício (STANTON; HANDY; MESTON, 2018).

Em relação ao exercício de força, constatou-se que possui propriedades imunomoduladoras, aumenta os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α), cortisol em homens destreinados (GORZI et al, 2012) e alterações na reatividade contrátil e aumento da peroxidação lipídica (COSTA et al., 2014). A prática desse tipo de exercício exige uma alta demanda energética, o que impõe forte estresse na homeostase do organismo, levando a alterações hormonais, como a liberação de cortisol, que por sua vez pode cronicamente causar distúrbios no sistema reprodutor feminino (WARREN M. P.; PERLROTH N. E, 2001), disfunção no hipotálamo e alterações na secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), resultando em menarca tardia, amenorreia, oligomenorreia, redução da fase luteal e não ovulação (COSTA et al., 2014).

Apesar disso, pouco se sabe sobre os efeitos agudos do exercício físico na função uterinae, baseado na informação que sugerem que o aumento do tamanho da glândula adrenal após um estímulo estressante indica um aumento na atividade funcional da glândula, hipotetizamos e analisamos se uma única sessão de exercício de força poderia induzir alterações histológicas na glândula supra-renal sugestivas de modulação hormonal, e por quanto tempo após o exercício este efeito se desenvolveria.

Nossos achados mostraram que, 24 horas após o exercício, houve um aumento das zonas glomerular e fasciculada que sugerem aumento da atividade dessas áreas da glândula adrenal e, de forma compensatória, diminuição da zona reticulada e da medula (Gráfico 11A, B, C e D). Adicinalmente, a diminuição da área medular, responsável pela produção de catecolaminas acontece devido a ausência do estímulo incial do exercício. Em relação ao aumento dos vacúolos lipídicos na zona fasciculada, eles são indicativos da presença de depósitos para o armazenamento de precursores de hormônios esteróides e cortisol (NUSSDORFER,

G., 1986; BARTALUCCI et al., 2012). Além disso, verificou-se que imediatamente após o exercício, houve uma redução no número de vacúolos, sugerindo que, em resposta ao estresse pelo exercício, os glicocorticoides foram liberados na corrente sanguínea e após 12 e 24 horas, o estoque dos precursores foi restabelecido (Gráfico 11E, Figura 4).

No entanto, na ausência de ensaios funcionais, nossos achados não nos permitem fazer afirmações conclusivas sobre a liberação real dos hormônios corticais. De fato, não podemos descartar que após uma única sessão de exercício de força, uma potente indução da síntese de hormônios corticais pode desencadear respostas compensatórias que causam uma redução na liberação de hormônios. Isso pode ser consistente com baixos níveis de glicocorticóides encontrados após o exercício no plasma de ratos treinados (ROSA et al., 2008; JODŁOWSKA-JĘDRYCH et al., 2010; SASSE et al., 2013).

Quando a atividade física induz dano muscular, a resposta imune torna-se elevada, ativando os leucócitos e seus subtipos celulares diferenciados para liberar moléculas de sinalização, culminando na migração de células inflamatórias para o tecido. Assim, a intensidade, o volume e a frequência do exercício desempenham um papel fundamental na determinação das respostas a um esforço e podem aumentar ou reduzir a função imunológica (McKUNE et al., 2004). Nesse sentido, já está bem documentado que a inflamação sistêmica ou imunossupressão são fenômenos presentes na resposta aguda a uma sessão de exercício físico intenso, como o de força (CARDOSO et al, 2012).

Nossos achados evidenciaram um infiltrado eosinofílico no útero de ratas do grupo controle, sugestivo de alguma infecção parasitária ou reação inflamatória preexistente. Imediatamente após o exercício, observou-se um aumento no número de eosinófilos e, após 12 e 24 horas, houve diminuição dessas células (Gráfico 10A). Já é relatado que exercícios de alta intensidade estão associados a uma alteração bifásica na circulação de leucócitos: no período imediatamente após o exercício, observa-se um aumento no número total de leucócitos, que ocorre principalmente à custa de linfócitos, neutrófilos e, em menor extensão, monócitos. Após um período de recuperação, uma diminuição no número de linfócitos, que dura de 3 a 6 horas, foi relatada (NATALE et al., 2003). Esse aumento de eosinófilos sugere um aumento de resposta TH_2, que por sua vez também leva ao aumento de interleucinas do tipo

IL4 e IL13, com efeitos estimulatórios sobre a contratiliade de músculo liso intestinal de ratos e podem justificar a manutenção da eficácia cotrátil uterina observada nos nossos achados funcionais (Gráfico 1 e 2) (DONOHUE et al., 2012)

Assim, neste estudo, foi demonstrado que, pelo menos do ponto de vista eosinofílico, o útero responde agudamente a uma sessão de exercício e esses dados sugerem que é interessante avaliar essa resposta imune adicionando citocinas para melhor configurar a resposta à nível uterino. Além disso, foi evidenciado que o útero também participa da resposta inflamatória já conhecida por exercício em nível sistêmico.

Além das alterações no sistema imunológico (ANDERSON, S.D.; DAVISKAS, E., 2000), o exercício intenso está fortemente associado à geração de EROs que alteram a homeostase tecidual e produzem um forte estresse, levando a diferentes adaptações das alterações fisiológicas induzidas pelo desvio do débito cardíaco e hipóxia, que, em determinadas circunstâncias relacionadas ao protocolo de exercício, pode afetar outros sistemas não diretamente relacionados ao exercício, incluindo o sistema reprodutivo feminino (WARREN, M. P.; PERLROTH, N. E., 2001). Esses ajustes são refletidos por alterações nas proteínas contráteis, função mitocondrial, alterações metabólicas, sinalização intracelular e nas respostas transcricionais (PEDERSEN et al., 1998).

Junto com a resposta de estresse miocelular, uma sessão aguda de exercício induz mudanças transitórias e variadas na expressão gênica que, com surtos cumulativos de exercício, podem levar a adaptações de treinamento específicas. Curiosamente, pesquisas demonstraram que em resposta a um exercício semelhante antes e após o treinamento, o músculo esquelético treinado em exercício é menos responsivo transcricionalmente (SCHMUTZ et al., 2006; PERRY et al., 2010). Essa observação pode ser explicada devido a uma resposta refinada no músculo esquelético para responder de forma mais potente e rápida ao ataque agudo do exercício. Surpreendentemente, a resposta transcricional a uma sessão aguda de exercício após treinamento físico de curta duração é incompletamente compreendida. (HINKLEY et al, 2016)

Dentre as respostas transcricionais, têm se que os queratinócitos humanos secretam o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em resposta a diferentes estímulos, entre eles a hipóxia. O VEGF tem inúmeros efeitos sobre as

células endoteliais, como promover divisão e sobrevivência celular, modular a expressão da integrina e induzir a migração e remodelação da matriz celular (BAE et al., 2015). No presente estudo, verificou-se que, como resposta imediata ao exercício, houve diminuição do número de vasos e, após 12 e 24 horas, observou-se aumento desse parâmetro em relação ao controle (Figura 4), além de aumento da área (Gráfico 10B C), demonstrando que a plasticidade da rede capilar permite que as células se adaptem às mudanças nas condições microambientais para fornecer quantidades adequadas de nutrientes e oxigênio e garantir a função tecidual adequada (EGAN, B.; ZIERATH, J. R., 2013). De fato, as alterações relacionadas à área vascular alterada são mais rápidas, uma vez que os mecanismos de liberação de mediadores relaxantes, como o óxido nítrico, são mais rápidos que o processo de remodelamento (PADILL et al., 2011).

Curiosamente, as alterações histológicas relacionadas à camada muscular foram observadas apenas 24 horas após a sessão de exercício, onde a hipertrofia e a hiperplasia do miométrio foram observadas em resposta ao estímulo imposto (Gráfico 5D). Este fato é evidenciado pela presença de células em processo de divisão, observadas histologicamente. Estes resultados argumentam fortemente a favor de alterações nos processos de contração e relaxamento uterino e possivelmente está associado ao reestabelecimento da função contrátil observados após 24 horas após a sessão aguda de exercício de força está associado ao aumento compensatório observado na camada muscular (Gráfico 4).

Ademais, demonstrou-se que 24 horas após o exercício, ocorreu a hipertrofia e hiperplasia do miométrio, possivelmente de forma compensatória a diminuição da reatividade contrátil observada frente a um agente eletromecânico e ainda são sugestivos de alterações á nível de receptor ou ainda nos subsequentes mecanismos de transdução celular do acoplamento fármacomecânico de contração.

Como o balanço total do estresse oxidativo não foi alterado sistemicamente, nem no órgão analisado, rejeitou-se a hipótese que as alterações contráteis observadas poderiam ser explicadas por um desbalanço do estresse oxidativo nem pela modulação positiva da via das MAPK e foi evidenciado que útero, é um alvo para o exercício agudo de força e tem sua função contrátil alterada podendo levar a danos nas funções fisiológicas do sistema reprodutor feminino como um todo.

Muitas variáveis claramente afetam esses resultados, sendo duas das mais importantes as diferenças de intensidades no desenho experimental do exercício e os diferentes métodos usados para estimar o estado de estresse oxidativo (PINGITORE et al., 2015). Diante disso, sabendo que o exercício agudo leva à alterações no útero e que já é estabelecido que a prática contínua de exercício leva às adaptações ao exercício é necessário questionar sobre os efeitos do exercício contínuo de força, visto que o treinamento de força pode levar a desregulações na homeostase redox e induzir a peroxidação lipídica conduzindo a problemas como a inativação de enzimas da membrana celular, necrose das fibras musculares, liberação de enzimas celulares para o sangue, diminuição da efetividade do sistema imune e alteração da função mitocondrial, levando à diminuição do desempenho muscular, *overtraining* e prejudicando importantes adaptações ao treinamento (POWERS; JACKSON, 2008), e que, a realização de um treinamento físico crônico bem estruturado desencadeia adaptações fisiológicas, que reduzem a susceptibilidade dos músculos aos radicais livres e induzem o aumento das enzimas antioxidantes (BLOOMER, 2008).

As correlações entre o estresse oxidativo e doenças envolvendo o sistema reprodutor feminino, têm levado a um aumento do consumo de suplementos antioxidantes como uma ferramenta não invasiva útil, principalmente por mulheres praticantes de exercício, buscando diminuir o dano muscular, melhorar o desempenho no exercício e prevenir ou reduzir o estresse oxidativo. Além disso, a utilização concomitante dessa alternativa tem se mostrado promissora e importante para a obtenção dos resultados positivos do exercício (PINGITORE et al., 2015). Destaca-se nesse cenário a *Spirulina platensis*, utilizada por atletas e praticantes de atividade física devido ao seu potencial antioxidante e sua alta concentração proteica (CARVALHO, 2010).

Com essas pemissas, hipotetizou-se que o treinamento de força promove alterações deletérias na reatividade contrátil e relaxante uterina por meio de um aumento do estresse oxidativo e que a suplementação alimentar das ratas com *Spirulina platensis* preveniria os efeitos do exercício na reatividade do útero de rata por diminuição do estresse oxidativo.

Na investigação do efeito da *Spirulina platensis* foi demonstrado que a suplementação com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg não alterou a eficácia

contrátil, mas promove, em útero isolado de rata, uma diminuição da potência do agente contrátil do acoplamento eletromecânico KCl, (Gráfico 12A). Resultados semelhantes foram observados por Souza (2018) no qual a eficácia contrátil do KCl foi reduzida no corpo cavernoso de ratos suplementados com a alga na dose de 100 mg/kg. Nos animais submetidos ao treinamento de força, observou – se um aumento da reatividade contrátil do KCl e que a suplementação alimentar com *Spirulina platensis* preveniu esses efeitos em todas as doses testadas (Gráfico 12B). Esses resultados indicam que a *Spirulina platensis*, pode estar alterando a ativação dos alvos envolvidos na ação farmacológica, possivelmente reduzindo o influxo de Ca^{2+} pelos Ca_V, dessa forma promovendo uma diminuição da reatividade contrátil do músculo liso uterino.

Na avaliação farmacomecânica da contração, avaliou-se a resposta contrátil frente à ocitocina das ratas suplementadas com *S. platensis* e foi possível observar que não houve nenhuma alteração significativa (Gráfico 13A). Já nas ratas treinadas, verifica-se, semelhante ao acoplamento eletromecânico, que o treinamento aumentou a eficácia contrátil e que a suplementação com a alga preveniu apenas parcialmente os efeitos deletérios do exercício (Gráfico 13B). Esses dados indicam que possivelmente a *Spirulina platensis* tem como alvo pontos especícficos que foram modulados pelo exercício, apontando fortemente para que uma diminuição de radicais livres contráteis decorrente da prática do exercício de força, seja um dos possíveis mecanismos para explicar esse efeito preventivo.

Brito (2014) demonstrou que a suplementação com *S. platensis* potencializa a reatividade relaxante da aorta (nas doses de 150 e 500 mg/kg), frente à acetilcolina, e uma diminuição da reatividade contrátil frente à fenilefrina em aorta de ratos saudáveis. De maneira semelhante, Souza (2018) verificou que a suplementação com *S. platensis* potencializou a reatividade relaxante do corpo cavernoso de rato. Assim, hipotetizou-se que a suplementação alimentar com *S. platensis* alteraria a reatividade relaxante de útero de rata.

Na avaliação do acoplamento farmacomecânico de relaxamento, observou-se que o efeito promovido pela isoprenalina, um agonista farmacomecânico, não foi alterado quando comparado os valores do grupo controle e os grupos suplementados nas doses testadas (Gráfico 15A), demonstrando assim que o tratamento com a alga também não estaria alterando o acoplamento

farmacomecânico de relaxamento. De fato, esses resultados corroboram os achados relacionados a avaliação da atividade contrátil, onde esse acoplamento não foi alterado. Em relação aos animais submetidos ao treinamento, observou-se mais uma vez o efeito preventivo de *S. platensis*, visto que a redução da potência relaxante foi prevenida em todas as doses testadas (Gráfico 15B).

Para a resposta relaxante utilizando o nifedipino, um agente eletromecânico, observou-se que o tratamento com a *Spirulina platensis* não alterou a eficácia relaxante em nenhuma das doses testadas (Gráfico 14A). Porém, quando analisou-se o parâmetro potência, a suplementação com a alga promoveu uma redução da potência relaxante deste bloqueador dos Ca_V nas doses de 50 e 100 mg/kg, indicando que, possivelmente, a *Spirulina platensis*, pode estar alterando a afinidade de ocupação do bloqueador ao seu alvo farmacológico (NEUBIG, 2003), dificultando assim o relaxamento. Resultados semelhantes foram observados por Ferreira (2017) em que animais suplementados com *S. platensis* foi observada uma atenuação da potência relaxante em íleo de ratos, quando induzidas curvas concentração-respostas cumulativas ao verapamil, um bloqueador de Ca_V (SOMLYO, 2003).

Interessantemente, o treinamento de força não alterou o relaxamento por agente eletromecânico, mas a suplementação com a alga atenuou a potência relaxante do nifedipino. Similarmente, em estudo realizado por Souza (2018), no qual animais que foram suplementados com a alga, observou-se uma diminuição da reposta relaxante promovida pela regulação negativa sobre a atividade da ROCK (cinase da Rho), sugerindo assim que, a *S. platensis* possa estar promovendo um aumento na expressão de proteínas relacionadas com os processos contráteis, prejudicando o relaxamento do músculo liso uterino (Gráfico 14B).

Diante desses resultados, decidiu-se investigar o efeito treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre a via da RhoA/ROCK em útero de rata. Para isso, o Y27632, um inibidor da ROCK (MILLS et al., 2001), era incubado nas preparações e, em seguida, eram induzidas contrações cumulativas à ocitocina. No grupo GT, observou-se que a curva cumulativa à ocitocina não foi deslocada (Gráfico 16A), sugerindo que o mecanismo de aumento da reatividade contrátil uterina pelo treinamento de força não envolve a via de sensibilização ao Ca^{2+}.

Caso a suplementação alimentar com a alga na dose de 100 mg/kg alterasse essa via de sinalização no útero de ratas treinadas e suplementadas com a alga, a

redução da eficácia contrátil da ocitocina deveria apresentar magnitude similar ao observado no grupo GC. No grupo GT100, evidenciou-se a redução do efeito máximo, na presença do Y27632, sugerindo que a *S. platensis* atenua, pelo menos e parte, a eficácia contrátil uterina por uma possível inibição da via RhoA/ROCK. (Gráfico 16).

Diante dessas suposições, faz-se necessário avaliar, em estudos futuros, a expressão das proteínas chaves da via de sensibilização ao Ca^{2+}, por meio de metodologias moleculares, com o objetivo de comprovar os efeitos atribuídos à suplementação alimentar com a alga sobre esses alvos celulares.

Ainda na busca da elucidação para o mecanismo de ação preventido da alga em animais treinados, resolvemos investigar a influência da formação de espécies reativas decorrentes do treinamento de força e se o estresse oxidativo é um dos alvos modulados pela *S. platensis* para prevenir os danos desenvolvidos na função uterina.

. O complexo NADPH oxidase representa uma fonte para produção do ânion superóxido proveniente do exercício (BRANDES; KREUZER, 2005; KONIOR et al., 2014). Esse radical livre é altamente reativo e citotóxico, sendo, espontaneamente ou enzimaticamente dismutado a um produto menos reativo, o H_2O_2, pela família de metaloproteinases da SOD (FRIDOVICH, 1995).

Desta maneira, decidiu-se investigar a contribuição das EROs no aumento da contração induzida pela ocitocina em útero de ratas submetidas a treinamento de força. Para isso, as preparações eram incubadas com a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (SOVARI; MORITA; KARAGUEUZIAN, 2008), previamente à indução da contração com a ocitocina. Nas ratas submetidas ao treinamento de força, observou-se uma redução na eficácia e na potência contrátil da ocitocina, sugerindo que o treinamento de força induz aumento da reatividade contrátil por meio da produção de superóxido via NADPH oxidase (Gráfico 17).

Curiosamente, nas ratas treinadas e suplementadas com a alga, verificou-se um aumento da eficácia e da potência contrátil da ocitocina na presença de apocinina (Gráfico 17). Esse resultado sugere que a *Spirulina platensis* possa estar competindo pelo mesmo alvo de (inibição do complexo NADPH oxidase) para redução da produção de superóxido, dificultando assim a sua atividade. Essa hipótese corrobora com dados já relatados na literatura que demonstram o poderoso

efeito da ficocianina isolada de extrato de *S. platensis* que evidenciou um potente efeito antioxidante por meio da eliminação de vários radicais livres, entre eles, o ânion superóxido (WANG et al., 2018).

Baseado nas premissas já apresentadas de que a presença de EROs, aumenta a reatividade contrátil de músculo liso uterino, o próximo passo desse estudo consistiu na avaliação da influência do treinamento de força e da suplementação com *S. platensis* sobre os níveis intracelulares do ânion superóxido, elencado em trabalhos que demonstram o potencial antioxidante dessa alga (KARADENIZ et al., 2008; MAZZOLA et al., 2015; BRITO et al., 2018). Para isso, as preparações eram incubadas com o tempol, um mimético da SOD (PEIXOTO et al., 2009) antes da indução da contração com ocitocina. Nas ratas do grupo GT, observou-se uma diminuição da eficácia e da potência contrátil da ocitocina, corroborando o resultado anterior e respaldando a influência deletéria do ânion superóxido para a contratilidade uterina de ratas treinadas (Gráfico 18)

Caso a suplementação alimentar com a alga na dose de 100 mg/kg não alterasse os níveis intracelulares de ânion superóxido nos cornos uterinos de ratas suplementadas com a alga, a diminuição do efeito contrátil observado
deveria apresentar magnitude similar ao observado no grupo GT100. Entretanto, houve uma potencialização da diminuição da eficácia contrátil promovida pela ocitocina, na presença do mimético da SOD (Gráfico 18). Diante desses resultados, confirma-se a hipótese que alga reduz os níveis intracelulares basais do ânion superóxido, para diminuir a resposta contrátil uterina.

Outrossim, outras substâncias produzidas podem regular os processos de contração e relaxamento uterino, entre eles uma produção de prostanoides contráteis, como a $PGF_{2\alpha}$ e o TXA_2 modulada pelo metabolismo do O_2 e reduzida pela hipóxia (CHRIST et al., 1990; AZADZOI et al., 1992; DALEY et al., 1996; MARTÍNEZ et al., 2005). Além da produção de prostanoides relaxantes, como a PGI_2, a PGE_1 e a PGE_2, que modulam o tônus muscular (PRIETO et al., 1998; SIMONSEN et al., 2001; ÂNGULO et al., 2002).

Pautado nessas informações, a modulação dos prostanoides sobre a contratilidade uterina de ratas treinadas e/ou suplementados com *S. platensis* foi avaliada utilizando a indometacina, inibidor não seletivo da COX (CARTLEDGE; EARDLEY; MORRISON, 2000). Nas ratas submetidas ao treinamento de força,

verificou-se um aumento da eficácia e potência relaxante da isoprenalina quando comparado a ausência desse inibidor (Gráfico 20). Esses dados sugerem que o relaxamento uterino é modulado pelo balanço de prostanoides contráteis/relaxantes.

Na avaliação do possível efeito da *S. platensis* sobre a via de sinalização do ácido araquidônico em útro de ratas treinadas, a sobreposição das curvas de isoprenalina na ausência e na presença da indometacina descartaria a modulação dos prostanoides pela alga. Porém, a suplementação das ratas com 100 mg/kg de *S. platensis* promoveu um aumento da eficácia do agonista relaxante na presença da indometacina (Gráfico 20), dessa forma, sugere-se uma modulação sobre o balanço dos prostanoides contráteis/relaxantes. Como a remoção desses mediadores lipídicos, por meio da inibição da COX, potencializou o relaxamento induzido pela isoprenalina, hipotetiza-se que a alga esteja aumentando a produção de prostanoide contráteis em detrimento aos relaxantes.

Já foi evidenciado um crosstalk entre as vias de sinalização dos prostanoides e do NO (HYSLOP; NUCCI, 1991; DAVIDGE et al., 1995). Em níveis basais, onde há a presença do NO, o balanço dos prostanoides é favorável aos mediadores relaxantes, enquanto, após sua inibição, esse balanço é favorável aos mediadores contráteis (LAEMMEL et al., 2003). Nesse sentido, existem diferentes mecanismos propostos para explicar essa relação direta entre o NO e os prostanoides.

Em uma das propostas, especula-se que o peroxinitrito interage com o ferro presente no grupo heme da COX e, dessa forma, gera um produto radicalar intermediário que acelera a reação enzimática (KARTHEIN et al., 1988; TSAI; PALMER; KULMACZ, 1992; MARNETT et al., 1999). Além disso, em situações de injúria, o peroxinitrito inibe seletivamente a sintase de PGI_2, enquanto ativa a sintase de TXA_2 favorecendo a contração (ZOU; MARTIN; ULLRICH, 1997; ZOU; ULLRICH, 1996). Entretanto, o outro mecanismo proposto, refere-se a S-nitrosilação mediada pelo NO, processo que parece ser responsável pela ativação da COX (KENNEDY; SMITH; MARNETT, 1994; HAJJAR et al., 1995). Ainda nesse contexto, já foi demonstrado que a iNOS pode se ligar diretamente a COX e promover a sua S-nitrosilação e, consequente, ativação (KIM; HURI; SNYDER, 2005).

Diante dessas premissas, investigou-se a participação da via óxido nítrico no mecanismo preventivo de *S.platensis* em ratas submetidas ao treinamento de força. Curiosamente, foi observado em GT um aumento da eficácia e da potência relaxante

da isoprenalina na presença do inibidor da sintase do óxido nítrico, L-NAME, quando comparado a sua ausência, sugerindo assim que o óxido nítrico participa do mecanismo relaxante (Gráfico 19). Já nas ratas treinadas e suplementadas com 100 mg/kg da alga, a eficácia relaxante da isoprenalina não foi alterada na presença de L-NAME, porém observou-se uma diminuição da potência relaxante quando comparado a ausência desse inibidor (Gráfico 19).

Dados já consolidados na literatura apontam o NO como um neurotransmissor liberado por neurônios NANC e como potente relaxante derivado do endotélio (IGNARRO et al., 1987; BULT et al., 1990). Entretanto, a desregulação da produção do NO, que pode acontecer através da sua síntese intermitente pela iNOS, em situações de injúria, tem sido considerada danosa para a função sexual feminina (GONZALEZ-CADAVID; RAJFER, 2005). Além disso, a síntese do NO pode ser reduzida em decorrência do desacoplamento da eNOS, processo que ocorre quando essa enzima não está associada ao seu cofator ou ao seu substrato. Nesse caso, a formação do ânion superóxido a partir da L-arginina, substrato da NOS, na falta do cofator tetrahidrobiopterina, supera a formação de NO pela enzima. O ânion superóxido e o NO reagem e formam o radical livre peroxinitrito (LUO et al., 2014).

Parece contraditório haver aumento da síntese de NO pela iNOS e dano a contratilidade uterina, porém, ocorre liberação de 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ a partir da peroxidação do ácido araquidônico da membrana pelo radical livre peroxinitrito (RADI et al., 1991; USHIYAMA et al., 2004; ZHANG et al., 2011), favorecendo a contração uterina (VOSS; SIEMS, 2006; SHUKLA et al., 2009). Esse resultado corrobora o que já foi apresentado até aqui, onde demonstrou-se que o treinamento de força leva ao aumento de da produção de superóxido e de prostanoides contráteis, bem como já é relatado na literatura o aumento da produção da expressão de eNOS e diminuição da concentração de íon superóxido pela suplementação com *S. platensis*.

Diante desses dados e das suposições levantadas a partir deles, faz-se necessário investigar futuramente os possíveis efeitos diretos da suplementação alimentar com a alga sobre a expressão das proteínas envolvidas na via NO/cGMP/PKG, a fim de determinar qual o(s) alvo(s) específico(s) modulados pela S. platensis em útero de rata.

Enzimaticamente, há a geração do peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido pela ação da SOD (YU, 1994; PIETTA, 2000). Curiosamente, é descrito na literatura um efeito bifásico para o H_2O_2 que depende de sua concentração intracelular. Nesse contexto, a resposta contrátil do H_2O_2 foi associada ao aumento da síntese e/ou liberação do TXA_2, enquanto o relaxamento foi correlacionado à ativação de canais de K^+ (GAO et al., 2003; CÔCO, 2012). Dessa forma, uma vez que o peróxido de hidrogênio modula a contração muscular lisa uterina, decidiu-se investigar a participação dessa EROs no relaxamento induzido pela nifedipino. Para isso, as preparações eram incubadas com a catalase, enzima que decompões o H_2O_2 (YU, 1994; PIETTA, 2000), previamente à indução do relaxamento com a isoprenalina.

Nos animais submetidos ao treinamento de força, observou-se aumento na eficácia e da potência relaxante da isoprenalina na presença dessa enzima, sugerindo que a presença do H_2O_2 atenua o relaxamento induzida pelo agonista. Se a suplementação alimentar com a alga não reduzisse os níveis basais do H_2O_2 a potencialização do efeito relaxante da isoprenalina deveria se apresentar de forma similar ao observado em GT (Gráfico 21). Entretanto, nas ratas suplementadas e treinadas, a *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg foi observada um aumento da potência relaxante na presença da catalase (Gráfico 21). Diante desses resultados, infere-se que a suplementação utilizada nesse estudo preveniu as alterações causadas pelo treinamento de força sobre os níveis intracelulares do H_2O_2 e, dessa forma, modulam positivamente o relaxamento do útero de rata.

Diante dos dados apresentados, infere-se que o modelo de treinamento de força promoveu alterações na reatividade uterina contrátil e relaxante, com um resultante aumento da função contrátil e que essas alterações foram prevenidas pela suplementação alimentar com *S. platensis*. Além disso, essas alterações estão correlacionadas com a modulação das vias RhoA/ROCK, os prostanoides, do NO e das EROs. Assim, a etapa seguinte desse trabalho foi avaliar se o treinamento de força e a suplementação com *S. platensis* modificariam o balanço estresse oxidativo/defesa antioxidante no plasma, bem como no tecido uterino, afim de confirmar os resultados obtidos nas avaliações funcionais.

Para isso, a metodologia de determinação dos níveis de MDA através de uma reação colorimétrica que resulta na formação de um cromógeno de cor rosa

fluorescente que, por sua vez, pode ser detectado por meio de leitura em espectrofotômetro (CAMPOS et al., 2008; GIERA; LINGEMAN; NIESSEN, 2012), foi utilizada como forma de confirmar ou descartar a hipótese de que, a suplementação alimentar com *S. platensis* diminua a formação de radicais livre e previna o estresse oxidativo induzido pelo treinamento de força, em útero de ratas Wistar.

Ao analisar o grupo suplementado com a alga na dose de 100 mg/kg durante 8 semanas, observou-se uma diminuição nos níveis de MDA em relação ao grupo que recebeu solução salina, corroborando os dados da literatura que reiteram o potencial da *S. platensis* e de seus constituintes em diminuir o estresse oxidativo e consequentemente os níveis de peroxidação lipídica (PIÑERO ESTRADA et al., 2001; SOUZA et al., 2006; LUPATINI et al., 2017; BRITO et al., 2018). Nas ratas submetidas ao protocolo de treinamento, observou-se um aumento nos níveis de MDA que foi prevenido pela suplementação com a alga nas doses testadas. Embora um aumento agudo na produção de oxidantes seja necessário para as adaptações miocelulares ao exercício, um aumento crônico na oxidação de proteínas pode ter consequências graves. Dessa forma, a suplementação com *S. platensis* demonstra o efeito preventivo frente a situações de desequilíbrios do balnço oxidativo sistêmico e também para o útero.

A resposta crônica ao treinamento tanto aeróbico quanto anaeróbico é a melhora da capacidade antioxidante do plasma, e a resposta aguda se relaciona com a produção de antioxidantes específicos (ATALAY E LAAKSONEN, 2002; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; MARTÍN-GALLÁN et al., 2007). Partindo dessa premissa e de que o dano oxidativo estimula as defesas antioxidantes, avaliamos se a suplementação alimentar com *S. platensis* e o treinamento de força alterariam a capacidade antioxidante sistêmica e tecidual de ratas Wistar.

Quando analisamos os grupos suplementados com *S. platensis,* constata-se que a alga não altera capacidade antioxidante total plasmática, mas, na dose de 100 mg/kg, induz um aumento desse parâmetro no tecido uterino, possivelmente como resposta ao aumento da peroxidação lipídica, uma vez que os mecanismos de defesa antioxidante são potencializados quando há elevação na produção de radicais livres (ANTUS, 2016). Esse resultado sugere uma utilização da suplementação alimentar com a alga como preventiva do dano oxidativo no tecido uterino (Gráfico 22A e B).

Nas ratas submetidas ao treinamento de força, uma diminuição do percentual da inibição da oxidação plasmática foi observada, demonstrando que o treinamento de força pode diminuir a capacidade antioxidante sistêmica e que a suplementação com *S. platensis* preveniu parcialmente essa diminuição. Apesar disso, não foi observado consequências relacionadas à peroxidação lipídica sistêmica (Gráfico 23A e B). Entretanto, ao analisar esse parâmetro à nível tecidual, constata-se um aumento da capacidade antioxidante em todos os grupos testados, indicando que *S. platensis* potencializa o aumento da capacidade antioxidante em útero de ratas induzido pelo treinamento de força (Gráfico 23C e D).

A superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha enzimática antioxidante e é uma enzima importante no sistema antioxidante, sendo apontada como capaz de proteger de forma eficaz o estresse oxidativo muscular (LUPATINI et al., 2013). Diante disso, hipotetizou-se que o aumento da capacidade antioxidante uterina poderia estar relacionado com o aumento da expressão dessa enzima.

Ao analisar os resultados, verificou-se um aumento na expressão da SOD apenas no grupo GSP100 e esse resultado pode ser atribuído ao fato já relatado de *S. platensis* ser uma fonte de SOD (DESAI, K.; SIVAKAMI, S., 2007). Já nos animais submetidos ao protocolo de treinamento, o aumento da capacidade antioxidante não pode ser atribuído ao aumento dessa enzima, sendo necessários estudos que avaliem outros sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, como a glutationa peroxidase, visto que já foi demonstrado sua modulação pelo exercício e que a microalga é uma fonte para essa enzima (Gráfico 24) (JI L.L., 1993; LUPATINI et al., 2013).

Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio geradas no exercício podem ativar as MAPKs. A ativação dessa via resulta em uma maior expressão de proteínas celulares importantes, tais como iNOS, eNOS e Mn-SOD (CABRERA et al., 2005) e tem sido identificada como uma via de sinalização chave para adaptações crônicas ao exercício como a hipertrofia musular esquelética (HADDAD; ADAMS 2004; SHI et al. 2009) e de uma gama de processos celulares envolvidos no crescimento celular, incluindo proliferação e diferenciação (WIDEGREN et al. 2001), além de induzir a contração uterina (WRAY et al., 2014). Diante dessas premissas, resolvemos investigar se o treinamento de força estaria aumentando a expressão de JNK e

ERK1/2 por meio do aumento da produção de EROs e se a suplementação alimentar com *S. platensis* preveniria esse efeito.

A suplementação alimentar com a alga não alterou a expressão da JNK, mas, na dose de 100 mg/kg, preveniu a diminuição a expressão dessa enzima em ratas treinadas (Gráfico 25). Esse efeito observado apenas nos animais exercitados sugerem que a *S.platensis* possa estar induzido um efeito anti-inflamatório e consequentemente, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias que levam ao aumento da expressão de JNK, efeito esse já observado para o pigmento ficocianina (CHEN et al., 2014)

Nas ratas suplementadas com a alga, observamos uma diminuição na expressão de ERK1/2 no útero de rata, o que pode explicar o relaxamento observados nos estudos funcionais, visto que a ativação de ERK1/2 leva a contração da musculatura uterina (Gráfico 26). Além disso, esse dado corrobora estudos que demonstram a atividade da *S. platensis* na prevenção de desordens caracterizadas por crescimento celular, como o câncer, (KONÍCKOVÁ et al., 2014; BARAKAT et al., 2015) e de que terapias antioxidantes levam a diminuição da expressão essa enzima (TROY; MICHAEL, 2016), sugerindo um efeito preventivo da suplementação nesse órgão. De maneira similar, nas ratas treinadas e suplementadas, observou-se uma diminuição da expressão sugerindo que ambas as intervenções, treinamento e suplementação, podem ser consideradas ferramentas úteis para as condições citadas acima (Gráfico 26).

Diante desses achados, demonstramos pela primeira vez, que a contratilidade uterina é um alvo para o treinamento de força e que a suplementação com *S. platensis* previne o aumento da contratilidade uterina por inibição da via Rho/ROCK e diminuição da disponibilidade do ânion superóxido e previne a diminuição do relaxamento por inibição das COXs, aumento na biodisponibilidade de NO e aumento do H_2O_2, além de diminuir a expressão das MAPK JNK e ERK1/2, contribuindo para os efeitos pró-relaxantes (Figura 10).

Visto que o treinamento de força aumentou o estresse oxidativo, indicativo de dano muscular e de atividade inflamatória, e que a suplementação alimentar com *S. platensis* preveniu esse efeito, hipotetisamos que o treinamento poderia estar induzindo alterações morfológicas no útero de ratas.

Para testar essa hipótese, realizaram-se cortes histológicos nos quais foi observou-se que o treinamento uma diminui o infiltrado eosínofílico e que a suplementação alimentar com *S. platensis* não alterou esse parâmetro, sugerindo que a alga não interefe com o recrutamento dos eosinófilos no útero de ratas (Gráfico 27A e 28A).

Además, observou-se que a suplementação alimentar com a alga isoladamente, bem como o treinamento físico e suplementação alimentar concomitante aumentaram o número de vasos (Gráfico 27B e C; 28B e C). A angiogênese induzida pelo treinamento já é caracterizada por diferentes estudos e mostrou a expressão aumentada de RNAm para VEGF em humanos e animais (GUSTAFSSON; KRAUS, 2001; BREEN et al., 1996) e aumento da expressão da eNOS que parece estar relacionada à intensidade do exercício e aumentada acentuadamente no ambiente hipóxico (BREEN et al., 1996; BIROT et al., 2003). Esses achados reforçam os resultados observados nos estudos funcionais, no qual um aumento da liberação do NO e sua reação com o ânion superóxido contribui para a formação de substâncias contráteis (VOSS; SIEMS, 2006).

Adicionalmente, apesar de ser um processo natural que ocorre durante o ciclo reprodutivo feminino (para construir o revestimento do útero e amadurecer o óvulo durante a ovulação), quando a ângiogênese ocorre de forma excessiva ou insuficiente está associada a vários distúrbios que devem ser melhor avaliados (KORIVI et al., 2010).

Ainda na análise dos cortes histológicos, observou-se que a suplementação com a alga em todas as doses testadas aumentou a área da camada muscular uterina provavelmente pelo efeito antioxidante da alga, preventivo de lesões na musculatura. Já nas ratas treinadas, o aumento da área muscular pode ser atribuída ao aumento do estresse oxidativo e a ativação da via p38-MAPK que leva ao crescimento de células da musculutara lisa, efeito já evidenciado por estudos com modelos de treinamento de resistência (TROY; MICHAEL, 2016) e esse efeito é prevenido pela suplementação alimentar com *S. platensis* (Gráfico 27D e 28D).

Exercício intenso, como o de força, também está associado a um conjunto de riscos para mulheres praticantes entre eles, alteração no eixo hipotálamo-hipófise-ovario resultando em disfunção hipotalâmica com consequente a alteração da liberação do GnRH (LOUCKS et al., 1992; BIRCH, K., 2005; LAGOWSKA; JESZKA,

2011). Essa alteração é explicada pelos distúrbios na homeostase redox dentro do ambiente adrenocortical que podem afetar a esteroidogênese, fato evidenciado por vários distúrbios da insuficiência adrenal (PRASAD et al., 2014).

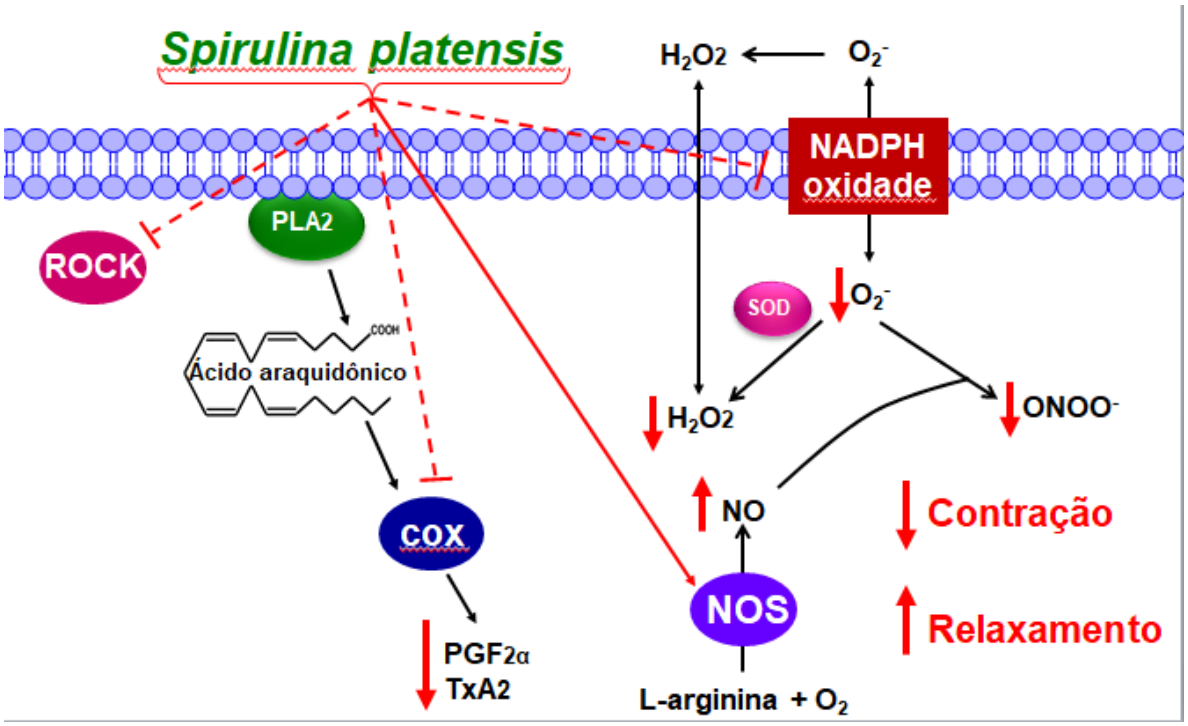
Ainda nesse contexo, o alto nível de cortisol sérico resultante do estresse fisiológico induzido pelo exercício somado a baixa disponibilidade de energia resultante são fatores relacionados a supressão da liberação de gonadotrofina e hipoestrogenismo observados em mulheres atletas (MOSAVA et al., 2014). Diante disso, hipotetisou-se que o treinamento de força alteraria a histologia da glândula adrenal, sugestiva de modulação hormonal e que a suplementação com *S. platensis* preveniria esses efeitos.

Nossos resultados demonstraram que a suplementação com a alga, bem como o treinamento de força não alteram a área da zona glomerulosa. Já em relação à zona fasciculada, responsável pela produção de cortisol, observu-se que o exercício aumentou o tamanho dessa área, bem como o número de vacúolos, sugestivos da presença de cortisol, e que esse efeito foi prevenido pela suplementação com a alga. Esse efeito pode ser correlacionado com o aumento da reatividade utrina observada nos estudos funcionais, visto que situações de estresse homeostásicos, como a prática de exercício de força, levam ao aumento da liberação de cortisol, que por sua vez, aumenta a circulação sanguínea da hipófise, resultado numa maior liberação de ocitocina (Gráfico 29 e 30) (TAYLOR et al., 2006).

Ainda analisando os cortes histológicos, observamos uma diminuição da área reticulada, responsável pela produção dos hormônios sexuais, nos animais treinados, como já era esperado e que esse efeito não prevenido pela suplementação com *S. platensis*, sugerindo que o mecanismo pelo qual o exercício diminui essa área não é modulado pela alga. Em relação à área medular, responsável pela produção de catecolaminas, não foi observada alterações, possivelmente devido às adaptações ao exercício já descritas para a liberação de catecolaminas (Gráfico 29 e 30) (TANK; WONG D. L., 2015). Apesar das observações, ressalta-se que são sugestivas em relação a espessura da área e studos de quantificação dos hormônios circulantes são necessários para comprovar esses achados.

Diante desses achados, postulamos que o treinamento de força exerce forte influência sobre a contratilidade do útero de rata, o estresse oxidativo tecidual, a via das MAPK e nos parâmentros histológicos uterinos e da glândula adrenal e que *S. platensis* previne parte dos efeitos deletérios, sugerindo o potencial promissor da suplementação alimentar com a alga em processos fisiopatológicos que envolvem a desregulações na homeostase contrátil uterina como dismenorreia, parto-prematuro, aborto espôntaneo.

Figura 10: Mapa conceitual dos efeitos preventivo de *S. platensis* em útero de ratas submetidas ao treinamento de força.



Fonte: Ferreira, 2019

7 CONCLUSÕES

Na investigação do efeito do exercício de força agudo sobre o útero de ratas, conclui-se que há um aumento da resposta contrátil, diminuição da reatividade relaxante, sem alteração do estresse oxidativo nem da via das MAPK, além de um aumento a camada muscular uterina

Na investigação do efeito da suplementação alimentar com *S. platensis,* nas doses de 50 e 100 mg/kg, sobre o útero de rata, é possível concluir:

- Não altera o componente farmacomecânico de contração e relaxamento nem a potência do componente eletromecânico da contração;
- Diminui a reatividade contrátil e relaxante por reduzir a eficácia do componente eletromecânico da contração e do relaxamento;
- Diminui a expressão de ERK1/2;
- Aumenta a vascularização, área vascular e área do miométrio;
- Diminui a área medular da glândula adrenal

Na investigação do efeito do treinamento de força e da suplementação *S. platensis*, nas doses de 50 e 100 mg/kg, sobre o útero de ratas, é possível concluir:

- Previne o aumento da eficácia e diminuição da potência do componente eletromecânico da contração e previne parcialmente o aumento da eficácia do componente farmacomecânico de contração por inibição da via Rho/ROCK e diminuição dos níveis do ânion superóxido;
- Previne a diminuição da potência do componente eletromecânico de relaxamento e diminui a potência do componente eletromecânico de relaxamento por inibição das COXs, aumento na biodisponibilidade de NO e aumento de H_2O_2 ;
- Não alteram a expressão de SOD
- Previne a diminuição da expressão de JNK, mas não a de ERK1/2;
- Não previne a diminuição no número de eosinófilos, aumenta a vascularização e a área vascular e previne a redução da espessura do miométrio;
- Previne parcialmente o aumento da área fasciculada e de degeneração lipídica, mas não previne a diminuição da área reticulada.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTAA, S.; SIKKAB, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, p. 325–332, 2006.

AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B. J.; SHAMAN, A.; GUPTA, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 10, p. 49, 2012.

AGHDASI B, ZHANG J-Z, WU Y, REID MB, HAMILTON SL. Multiple classes of sulfhydryls modulate the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. **J Biol Chem** 272: 3739–3748, 1997.

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

ALESSIO, H.M. Exercise-induced oxidative stress. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 25, p. 218-224, 1993.

AL-GUBORY, K. H., FOWLER, P. A., & GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, *42*(10), 1634-1650, 2010

AMBROSI M.A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.2, 2008.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. **Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins;** 1995.

ANDRADE FH, REID MB, ALLEN DG, WESTERBLAD H. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. J Physiol 509: 565–575, 1998.

ANUNCIAÇÃO, P. G.; POLITO, M. D. A review on post-exercise hypotension in hypertensive individuals. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** v. 96, n. 5, p.100-109, 2011.

APPIAH, I., MILOVANOVIC, S., RADOJICIC, R., NIKOLIC-KOKIC, A., ORESCANIN-DUSIC, Z., SLAVIC, M., & BLAGOJEVIC, D. Hydrogen peroxide affects contractile activity and anti-oxidant enzymes in rat uterus. **British journal of pharmacology**, *158*(8), 1932-1941, 2009.

ARAUJO, L.C.C.; SOUZA, I.L.L.; VASCONCELOS, L.H.C.; BRITO, A.F.; QUEIROGA, F.R.; SILVA, A.S.; SILVA, M.P.; CAVALCANTE, F.A.; SILVA, B.A. Chronic aerobic swimming exercise promotes functional and morphological changes in rat ileum. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 5, p. 00259, 2015.

ARAUJO, L.C.C.; SOUZA, I.L.L.; VASCONCELOS, L.H.C.; BRITO, A.F.; QUEIROGA, F.R.; SILVA, A.S.; SILVA, P.M.; CAVALCANTE, F.A.; SILVA, B.A.

Acute aerobic swimming exercise induces distinct effects in the contractile reactivity of rat ileum to KCl and Carbachol. **Front Physiol,** 2016, v.7.

ARDANAZ N, PAGANO PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. **Exp Biol Med** 231: 237–251, 2006.

ARMSTRONG, R. B., OGILVIE, R. W., & SCHWANE, J. A. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle**. Journal of Applied Physiology**, 54(1), 80–93. doi:10.1152/jappl.1983.54.1.80(1983).

ARROWSMITH, S.; KENDRICK, A.; HANLEY, J. A.; NOBLE, K.; WRAY, S. Myometrial physiology–Time to translate. **Experimental physiology**, v. 99, n. 3, p. 495-502, 2014.

ASMATHUNISHA, N.; KATHIRESAN, K.A. Review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 283-287, 2012.

ATIG F, RAFFA M, ALI HB, ABDELHAMID K, SAAD A, ET AL. (2012) Altered antioxidant status and increased lipid per-oxidation in seminal plasma of tunisian infertile men. **Int J Biol Sci 8**(1):139–149.

BANTING, L. K.; GIBSON-HELM, M.; POLMAN, R.; TEEDE, H. J.; STEPTO, N. K. Physical activity and mental health in women with polycystic ovary syndrome. **BMC women's health**, v. 14, n. 1, p. 51, 2014.

BARAKAT, R.; PELAEZ, M.; MONTEJO, R.; REFOYO, I.; COTERON, J. Exercise throughout pregnancy does not cause preterm delivery: a randomized, controlled trial. **Journal of Physical Activity & Health**, v. 11, p. 1012-1017, 2014.

BARLOW RS, EL-MOWAFY AM, WHITE RE. H2O2 opens Bkca channels via the PLA2-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. **Am J Physiol** 279: 475–483, 2000.
BASHANDY, S. A. E. B.; SALLY, A. E. A.; HOSSAM, E.; IBRAHIM, M. A. Antioxidant potential of Spirulina platensis mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.16, p.122-130, 2016.

BECK DT, MARTIN JS, CASEY DP, BRAITH RW. Exercse training improves endothelial function in resistance arteries of young prehypertensives. **J Hum Hypertens**, v.28, p. 303-309, 2014.

BECKER, E. W; Jakober, B; Luft, D, Schmilling, R.W. Clinical and biochemical evaluations of Spirulina with regard to its application in the treatment of obesity. **Nutrition Reports International**, v. 33, p.33-565, 1986.

BELAY, A. et al. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal Applied Physiology**, v. 5, n. 2, p. 235-241, 1993.

BENTLEY, D. J.; ACKERMAN, J.; CLIFFORD, T.; SLATTERY, K. S. Acute and chronic effects of antioxidant supplementation on exercise performance. **Antioxidants in sport nutrition. Ed. M. Lamprecht. Boca Raton, Finland**, p. 125, 2015.

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

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga Spirulina platensis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n.1, p.42-48, 2009.

BLOOMER, R.J. Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. **Advanced Clinical Chemistry**, v. 46, p. 1-50, 2008.

BLUNT, J. W., COPP, B. R., KEYZERS, R. A., MUNRO, M. H. G., & PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports,** v. 33, p. 382–431, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**, 2013.
BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Suplementos alimentares: documentos de base para discussão regulatória**, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, (Vigitel)**. Brasília, 2017b.

BRISSWALTER, J.; LOUIS, J. Vitamin supplementation benefits in master athletes. **Sports Medicine, v.** 44, p. 311-318, 2014.

BRITO AF, ALVES NFB, SOUZA AA, GONCALVES, MCR, SILVA AS. Active intervals between sets of resistance exercises potentiate the magnitude of postexercise hypotension in elderly hypertensive women. **J Strength Cond Res** (2011) 25(11):3129-36. doi: 10.1519/JSC.0b013e318212dd25.

BRITO, A. F. Avaliação dos efeitos do treinamento de força e da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre o sistema antioxidante e sobre a reatividade da aorta de ratos Wistar saudáveis. **Tese de Doutorado – Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

BRITO, A. F.; OLIVEIRA, C. V. C.; SANTOS, M. S. B.; SANTOS, A. C. High-intensity exercise promotes postexercise hypotension greater than moderate intensity in

elderly hypertensive individuals. **Clinical Physiology and Functional Imaging***,* v. 34, p. 126-132, 2014.

BRITO, A. F.; SILVA, A. S.; SOUZA, I. L. L.; PEREIRA, J. C.; SILVA, B. A. Intensity of Swimming Exercise Influences Aortic Reactivity in Rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.48, p. 996-1003, 2015.

BROCK, T.D.; MADIGAN, H.T. Biology of Microorganism. 6. ed. **Englewood cliffs: Prentice Hall**, 1991.

BRUNORI, M.; ROTILIO, G. Biochemistry of oxygen radical species. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 22-35, 1984.

BURKE TM, WOLIN MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonar arterial relaxation and guanylate cyclase activation. Am J Physiol 252: 721–732,1987.

BURKE, L. M.; LUNDY, B.; FAHRENHOLTZ, I. L.; MELIN, A. K. Pitfalls of conducting and interpreting estimates of energy availability in free-living athletes. **International journal of sport nutrition and exercise metabolism**, v. 28, n. 4, p. 350-363, 2018.
CAGLAYAN, A.; KATLAN, D. C.; TUNCER, Z. S.; YUCE, K.; SAYAL, H. B.; KOCER-GUMUSEL, B. Assessment of oxidant-antioxidant status alterations with tumor biomarkers and reproductive system hormones in uterine myomas. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, *in press* (2018).

CARDOSO, C. G.; J. R.; GOMIDES, R. S.; QUEIROZ, A. C.; PINTO, L. G.; DA SILVEIRA, LOBO F.; TINUCCI, T.; MION, D. JR.; DE MORAES FORJAZ, C. L. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. **Clinics** v.65, n.3, p.317–325, 2010.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, B. A.; SANTOS, B. V. O.; LIRA, D. P., SOUSA, J. C. F.; MIRANDA, G. E. C.; CAVALCANTE, F. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Spasmolytic Effect of Caulerpine Involves Blockade of Ca^{2+} Influx on Guinea Pig Ileum. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1553-1564, 2013.

CECI, R.; VALLS, M.R.B.; DURANTI, G.; DIMAURO, I.; QUARANTA, F.; PITTALUGA, M.; SABATINI, S.; CASEROTTI, P.; PARISI, P.; PARISI, A.; CAPOROSSI, D. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training. **Redox biology**, v. 2, p. 65-72, 2014.

CECI, S. J.; GINTHER, D. K.; KAHN, S.; & WILLIAMS, W. M. Women in academic science: A changing landscape. **Psychological Science in the Public Interest**, v. *15, n.* 3, p. 75-141, 2014.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; ARAUJO, K. G. L.; SANTOS, C. P.; CEBALLOS, G.; FABILA-CASTILLO, L. Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 232-239, 2002.

CHOI Y, AKAZAWA N, MIYAKI A, RA SG, SHIRAKI H, AJISAKA R, MAEDA S. Acute effect of high-intensity eccentric exercise on vascular endothelial function in young men. **Journal of Strength and Conditioning Research.**

CHRISTODOULOU, D.; KUDO, S.; COOK, J. A.; KRISHNA, M. C.; MILES, A.; GRISHAM, M. B.; MURUGESAN, R.; FORD, P. C.; WINK, D. A. Electrochemical methods for detection of nitric oxide. **Methods in Enzymology**, v. 268, p. 69-83, 1996.

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

CLAUDINO, M. A.; DELBIN, M. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; PRIVIERO, F. B. B.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; ZANESCO A. Exercise training ameliorates the impairment of endothelial and nitrergic corpus cavernosum responses in diabetic rats. **Life Sciences,** v. 88, p. 272-277, 2010.

COGGAN, A. R.; WILLIAMS, B. D. Metabolic adaptations to endurance training: substrate metabolism during exercise. **Exercise metabolism**, p. 177-210, 1995.

COOPER, C. E., VOLLAARD, N. B., CHOUEIRI, T., & WILSON, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress, 2002.

CORCORAN, A., & COTTER, T. G. Redox regulation of protein kinases. **FEBS Journal,** v.280, p.1944–1965, 2013.

COSTA, A. E. A.; SILVA, J. L. V.; SIMÕES, M. J.; NOUAILHETAS, V. L. A. Morphofunctional alterations of the nonpregnant murine uterus in response to intense and exhaustive exercise are not not related to oxidative stresse. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, p. 604-610, 2014.

DADGOSTAR, H.; RAZI, M.; ALEYASIN, A.; ALENABI, T.; DAHAGHIN, S. The relation between athletic sports and prevalence of amenorrhea and oligomenorrhea in Iranian female athletes. **Sports Medicine Arthroscopy Rehabilitation Therapy & Technology**, v. 30, p. 1-16, 2009.

DAVIES, K. P.; MELMAN, A. Markers of erectile dysfunction. Indian Journal of Urology: **Journal of the Urological Society of India**, v. 24, n. 3, p. 320, 2008.
DE ALMEIDA, C. L.; FALCÃO, H. S.; LIMA, G. R.; MONTENEGRO, C. A.; LIRA, N. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; RODRIGUES, L. C.; DE SOUZA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Bioactivities from marine algae of the genus Gracilaria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4550–4573, 2011.

DE SOUZA, M. J.; WILLIAMS, N. I. Physiological aspects and clinical sequelae of energy deficiency and hypoestrogenism in exercising women. **Human reproduction update**, v. 10, n. 5, p. 433-448, 2004.

DEATON, C.M.; MARLIN, D.J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, 2(3), 278-291, 2003.

DESAI, K., & SIVAKAMI, S. (2007). Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium, Spirulina platensis. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(12), 1661-1666.

DRUMMOND GR, CAI H, DAVIS ME, RAMASAMY S, HARRISON DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endotelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. **Circ Res** 86:347–354, 2000.

DUVAL, B.; SHETTY, K.; THOMAS, W. H. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga Chlamydomonas nivalis after exposure to UV light. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 559-556, 1999.

ELCHURI, S; OBERLEY, TD.; QI, W.; EISENSTEIN, R.; ROBERTS, J.; REMMEN, V.; EPSTEIN, C.; HUANG, T. CuZn/SOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative demage and hepatocarcinogenesis later in life. **Oncogene.**24:367-380, 2005.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 39-46, 2004.

EMERY B, DE LA CRUZ J, ROCAK S, DELOCHE O, LINDER PHas1p, a member of the DEAD-box family, is required for 40S ribosomal subunit biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. **Mol Microbiol 52**(1):141-58, 2004.

ESTRADA, J.E.P.; BESCO´S, P.B.; FRESNO, A.M.V. Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract. **Il farmaco**, v. 56, p. 497-500, 2001.

FARIA, T.; TARGUETA, G. P.; ANGELI, J. K.; ALMEIDA, E. A.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V.; LIZARDO, J. H. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 110, p. 359-366, 2010.

FAULKNER, A. Martyr for the cause. **Critical Quarterly,** 42(4), 39–39. doi:10.1111/1467-8705.00324(2000).

FERREIRA, E. S. Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* promove efeito antiobesidade e restaura a reatividade contrátil de íleo em ratos Wistar. **Dissertação de Mestrado - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, 2001.

FULLE, S.; PROTASI, F.; DI TANO, G.; PIETRANGELO, T.; BELTRAMIN, A.; BONCOMPAGNI, S.; VECCHIET, L.; FANÒ, G. The contribution of reactive oxygen

species to sarcopenia and muscle ageing. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 17–24, 2004.

GANCEDO, J.M. “Yeast carbon catabolite repression.” Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 334-61, 1998.

GAO, Y. J.; HIROTA, S.; ZHANG, D. W.; JANSSEN, L. J.; LEE, R. M. Peroxide induced biphasic response in rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1085-1092, 2003.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A.; LAMONTE, M. J.; LEE, I. M.; NIEMAN, D. C.; SWAIN, D. P. American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 43, n. 7, p. 1334-1359, 2011.

GASTIN, P. B. Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. **Sports medicine**, v. 31, n. 10, p. 725-741, 2001.

GERSHWIN, M.E.; BELAY, A. Spirulina in Human Nutrition and Health. **CRC Press**, 2007.

GIULIVI, C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. **Biochemical Journal**, v. 332, pt. 3, p. 673-679, 1998.

GOMEZ-CABRERA, M.-C., DOMENECH, E., ROMAGNOLI, M., ARDUINI, A., BORRAS, C., PALLARDO, F. V., … VIÑA, J. Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. **The American Journal of Clinical Nutrition,** 87(1), 142–149. doi:10.1093/ajcn/87.1.142(2008).

GORZI, A.; AGHA A. H.; RAJABI, H.; AZAD A.; MOLANOURI S. M.; HEDAYATI M. Effect of concurrent, strength and endurance training on hormones, lipids and inflammatory characteristics of untrained men. **Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 13, p. 1-6, 2012.

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic plants and their bioactive constituents. **Planta medica**, v. 77, n. 3, p. 207-220, 2011.

HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M. A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M. R.; NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 43-50, 2010.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; KOJIMA, I. An extract from Spirulina platensis is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 76-80, 1993.

HE, H. L., CHEN, X. L., WU, H., SUN, C. Y., ZHANG, Y. Z., & ZHOU, B. C. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. **Bioresource Technology**, 98, 3499–3505, 2007.

HEYLEN, E.; GUERRERO, F.; MANSOURATI, J.; THERON, M.; THIOUB, S.; SAIAG, B. Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. **European jornal of cardiovascular prevencion and rehabilitation**, v. 15, n. 1, p. 52-58, 2008.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Chemical Biology**, v. 15, p. 350-354, 2011.

HOWLEY, E. T. Type of activity: resistance, aerobic and leisure versus occupational physical activity. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 33, p. 364-369, 2001.

HSU, W. H.; KUO, L. T.; FAN, C. H.; LEE, M. S.; HSU, R. W. W. The relationship between health-related fitness and quality of life in postmenopausal women from Southern Taiwan. **Clinical Interventions in Aging**, v. 9, p. 1573-1579, 2014.

HUANG, Z. X.; MEI, X. T.; XU, D. H.; XU, S. B.; LV, J. Y. Protective effects of polysacchiride of Spirulina platensis and sargassum thunbeergii on vascular of alloxan induced dibetic rats. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi,** v.30, n. 3, p. 211-215, 2005.

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

HUXLEY, A. F.; NIEDERGERKE, R. Measurement of muscle striations in stretch and contraction. **The Journal of physiology**, v. 124, n. 2, p. 46, 1954.
IMLAY JÁ. Pathways of oxidative damage. **Annu Rev Microbiol,** v. 57, p. 395-418, 2003.

JACKSON, M. J. Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation. **Proceedings Of The Nutrition Society**, 58(3), 673-676, 2008.
JI, L. L. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. **The American journal of sports medicine**, v. 24, n. 6, p. 20-24, 1996.

JI, L.L., GOMEZ-CABRERA, M. C. & VIÑA, J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1067, 425–435, 2006.

JI.; KANEKO, S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism,** v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.

JIN, H.; YANG, R.; LI, W.; LU, H.; RYAN, A. M.; OGASAWARA, A. K.; PEBORGH, J. V.; PAONI, N. F. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression,

and apoptosis in rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 5, p. 2994 – 3002, 2000.

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

JOZSI, A. C.; CAMPBELL, W. W.; JOSEPH, L.; DAVEY, S. L.; EVANS, W. J. Changes in power with resistance training in older and younger men and women. **Journal of Gerontology: MEDICAL SCIENCES**, v. 54, n. 11, p. 591 – 596, 1999.

JUÁREZ-OROPEZA, M. A., MASCHER, D., TORRES-DURÁN, P. V., FARIAS, J. M. & PAREDES-CARBAJAL, M. C. Effects of dietary *Spirulina* on vascular reactivity. **Journal of Medicinal Food**, 12(1), 15-20, 2009.

KARASU C. Time course of changes in endothelium-dependent and -independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species. **Eur J Pharmacol** 392: 163–173, 2000.

KASAPOVIC, J., PEJIC, S., TODOROVIC, A., STOJILJKOVIC, V. AND PAJOVIC, S.B. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in the Blood of Breast Cancer Patients of Different Ages. **Cell Biochemistry & Function**, 26, 723-730, 2008.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6 a, p. 2165-2180, 2008.
KU, C. S.; YANG, Y.; PARK, Y.; LEE J. Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Medicinal Food,** v. 16, n.2, p. 103-111, 2013.

KULSHRESHTHA, A., ZACHARIA, A. J., JAROULIYA, U., BHADAURIYA, P., PRASAD, G. B. & BISEN, P. S. Spirulina in health care management. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 9, 400-405, 2008.

LACY F, O'CONNOR DT. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. **J Hypertens** 16: 291–303., 1998.

LATHAM, N. K.; BENNETT, D. A.; STRETTON, C. M.; ANDERSON, C. S.; Progressive resistance strength training for physical disability in older people. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, p. 41 – 48, 2003.

LIMA, F.D.; STAMM, D.N.; DELLA-PACE, I.D.; DOBRACHINSKI, F.; CARVALHO, N.R.; ROYES, L.F.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; BRESCIANI G. Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The relative importance of HO¢ONOO¡on mediating the toxicity of O¡2.**Fre e Radical Biol . Med .**26,777–778, 1999.

LIU, Q., HUANG, Y., ZHANG, R., CAI, T., & CAI, Y. Medical application of Spirulina platensis derived C-phycocyanin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2016(7803846), 1–14, 2016.

LOVREN, F. & VERMA, S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. **Clinical Chemistry**, 59, 1166-1174, 2013.

LU, J., REN, D. F., XUE, Y. L., SAWANO, Y., MIYAKAWA, T. & TANOKURA, M. Isolation of an antihypertensive peptide from alcalase digest of Spirulina platensis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7166-7171, 2010.

LUPATINI, A. L., COLLA, L. M., CANAN, C., & COLLA, E. (2017). Potential application of microalga Spirulina platensis as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, *97*(3), 724-732.

MARCUS, B. H.; FORSYTH, L. H.; STONE, E. J.; DUBBERT, P. M.; MCKENZIE, T. L.; DUNN, A. L.; BLAIR, S. N. Physical activity behavior change: issues in adoption and maintenance. **Health Psychology**, v. 19, n. 1S, p. 32, 2000.

MARQUETI, R. C.; PARIZOTTO, N. A.; CHRIGUER, R. S.; PEREZ, S. E.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Androgenic-anabolic steroids associated with mechanical loading inhibit matrix metallopeptidase activity and affect the remodeling of the achilles tendon in rats. American **Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 8, p. 1274-1280, 2006.

MATSUZAWA-NAGATA, N.; TAKAMURA, T.; ANDO, H.; NAKAMURA, S.; KURITA, S.; MISU, H.; OTA, T.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; MIYAMOTO, K.
MAZOKOPAKIS, E. E., STARAKIS, I. K., PAPADOMANOLAKI, M. G., MAVROEIDI, N. G. & GANOTAKIS, E. S. The hypolipidaemic effects of Spirulina (Arthrospira platensis) supplementation in a Cretan population: a prospective study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94, 432-437, 2014.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. J.; KATCH, V. L. Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano. Traduzido por Giuseppe Taranto. Rio de Janeiro. **Editora: Guanabara Koogan**. Edição: 7ª; 2011, p 3-1039.

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

MCKINNEY, J.; LITHWICK, D. J.; MORRISON, B. N.; NAZZARI, H.; ISSEROW, S. H.; HEILBRON, B.; KRAHN, A. D. The health benefits of physical activity and cardiorespiratory fitness. **British Columbia Medical Journal**, v. 58, n. 3, p. 131-137, 2016.
MINISTÉRIO DA SAÚDE. Lei nº. 9.782, de 26 de janeiro de 1999a. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União. Brasília DF**, 26 jan. 1999b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999. Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, estados, municípios e Distrito Federal, na área de epidemiologia e controle de doenças e define a sistemática de financiamento. **Diário Oficial [da] União. Brasília DF,** 15 dez. 1999a.

MOSAVAT, M.; MOHAMED, M.; MIRSANJARI, M. O. Effect of exercise on reproductive hormones in female athletes. ***International Journal*** of ***Exercise Science***, v 5, n. 1, p. 7–12, 2013.

MOURA, L. P.; GURJÃO, A. L.; JAMBASSI FILHO, J. C.; MIZUNO, J.; SUEMI, C.; MELLO, M. A. *Spirulina*, exercise and serum glucose control in diabetic rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 1, n. 56, p. 25-32, 2012.

NAKAI A, OYA A, KOBE H, ASAKURA H, YOKOTA A, KOSHINO T et al. (). Changes in maternal lipid peroxidation levels and antioxidante enzymatic activities before and after delivery. **J Nippon Med Sch** 67: 434–439, 2000.

NAKAO, A.; IMAMURA, T.; SOUCHELNYTSKYI, S.; KAWABATA, M.; ISHISAKI, A.; OEDA, E.; TEN D. P. TGF-β receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. **The EMBO journal**, v. 16, n. 17, p. 5353-5362, 1997.

NAKASHIMA A, UENO M, USHIMARU T, URITANI M. Involvement of a CCAAT-binding complex in the expression of a nitrogen-starvation-specific gene, isp6+, in Schizosaccharomyces pombe. **Biosci Biotechnol Biochem 66**(10):2224-7, 2002.

NANGLE, M. R.; COTTER, M. A.; CAMERON, N. E. Effects of the peroxynitrite decomposition catalyst, FeTMPyP, on function of corpus cavernosum from diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 502, n. 1, p. 143-148, 2004.

NEUBIG, RICHARD R. et al. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NOAKES, T. D. Drinking guidelines for exercise: what evidence is there that athletes should drink “as much as tolerable”, “to replace the weight lost during exercise” or “ad libitum?” **Journal of sports sciences**, v. 25, n. 7, p. 781-796, 2007.

NOBREGA, A. C. L.; FREITAS, E. V.; OLIVEIRA, M. A. B.; LEITÃO, M. B.; LAZZOLI, J. K.; NAHAS, R. M.; BAPTISTA, C. A. S.; DRUMMOND, F. A.; REZENDE, L.; PEREIRA, J.; PINTO, M.; RADOMINSKI, R. B.; LEITE, N.; THIELE, E. S.; HERNANDEZ, A. J.; ARAÚJO, C. G. S.; TEIXEIRA, J. A. C.; CARVALHO, T.; BORGES, S. F.; DEROSE, E. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte e da Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia:Atividade Física e Saúde no Idoso. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 5, p. 207-211, 1999.

O'CONNELL, J. K.; PRICE, J. H.; ROBERTS, S. M.; JURS, S. G. R. "Utilising the Health Belief Model to predict dietary and exercising behaviour of obese and nonobese adolescents". **Health Education Quarterly** 12: 343-351, 1985.

OKAFOR, O., ERUKAINURE, O., AJIBOYE, J., ADEJOBI, R., OWOLABI, F. & KOSOKO, S. Modulatory effect of pineapple peel extract on lipid peroxidation, catalase activity and hepatic biomarker levels in blood plasma of alcohol-induced oxidative stressed rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 1(1), 12-14, 2011.

PARISI, A. S.; YOUNES, S.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Assessment of theantibacterial activity of microalgae Spirulina platensis. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3, p. 297-301, 2009.

PARK, C. J., S. SONG, P. R. LEE, W. SHOU, R. J. DESHAIES, AND K. S. LEE. Loss of CDC5 function in Saccharomyces cerevisiae leads to defects in Swe1p regulation and Bfa1p/Bub2p-independent cytokinesis**. Genetics** 163:21-33. 2008.

PARK, H. J., LEE, Y. J., RYU, H. K., KIM, M. H., CHUNG, H. W. & KIM, W. Y. A. Radomized double-blind, placebo-controlled study to establish the effects of spirulina in elderly Koreans. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 52, 322-328, 2008.

PATE, R. R.; PRATT, M.; BLAIR, S. N.; HASKELL, W. L.; MACERA, C. A.; BOUCHARD, C.; KRISKA, A. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. **Jama**, v. 273, n. 5, p. 402-407, 1995.

PAYTON, R. G.; BRUCKER, M. C. Drugs and Uterine Motility. **Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing**, v. 28, n. 6, p. 628-637, 1999.

PEDERSEN, B. K.; OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; BRUUNSGAARD, H. The cytokine response to strenuous exercise. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, p. 505–511, 1998.

PETERNELJ, T.; COOMBES, J. S. Antioxidant supplementation during exercise training. **Sports medicine**, v. 41, n. 12, p. 1043-1069, 2011.

PETROVIĆ-OGGIANO, G., DAMJANOV, V., VUČIĆ, V., DEBELJAK-MARTAČIĆ, J., PAVLOVIĆ, M., & GLIBETIĆ, M. Effects of three types of physical activity on reduction of metabolic parameters involved in cardiovascular risk. **Archives of Biological Sciences**, 61(3), 367-374, 2009.

PHAM, T. X.; PARK, Y. K.; LEE, J. Y. Anti-Inflammatory effects of Spirulina platensis extract via the modulation of histone deacetylases. **Nutrients**, v. 8, p. 381-393, 2016.

PINGITORE, A.; LIMA, G. P. P.; MASTORCI, F.; QUINONES, A.; IERVASI, G.; VASSALLE, C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7-8, p. 916-922, 2015.

POLLOCK, M. L, ET A. L. Resistence exercise in individuals with and without cardiovascular disease. **CIRCULATION**, v. 101, p. 828-833, 2000.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Pshysiological Reviews**, v. 88, n.4, p. 1234-1276, 2008.

PRASAD, R. et al. Oxidative stress and adrenocortical insufficiency. **The Journal of endocrinology**, v. 221, n. 3, p. R63, 2014.

RAHA, S., & ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in biochemical sciences**, v.25, p.502-508, 2000.

RASTOGI, R. P. & SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**,27, 521-539, 2009.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Despolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by $CaCl_2$. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RHEE, T., NEUMANN, U., LEWIS, J.: Human hand modeling from surface anatomy. **In I3DG '06: Proc. of ACM SIGGRAPH** Symposium on Interactive 3D Graphics and Games, 2006.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press; In: 1990.

ROBBINS M. A.; O'CONNELL J. B. Economic impact of heart failure. In: ROSE E. A, STEVENSON L. W, eds. Management of End-Stage Heart Disease. **Philadelphia: Lippincott-Raven**, p. 3–13, 1998

ROGERS PA, DICK GM, KNUDSON JD, FOCARDI M, BRATZ IN, SWAFFORD AN JR et al. H2O2-induced redox sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K+ channels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 291: 2473–2482, 2006.

ROMERO-PUERTAS, M. C., & SANDALIO, L. M. Nitric oxide level is self-regulating and also regulates its ROS partners. **Frontiers in plant science**, 7, 316, 2016.

ROSA, E. F.; FREYMULLER, E.; IHARA, S. S. M.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A. Damaging effects of intense repetitive treadmill running on murine intestinal musculature. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 5, p. 1410-1417, 2008.

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

SHEA-DONOHUE, T.; NOTARI, L.; SUN, R.; ZHAO, A. Mechanisms of smooth muscle responses to inflammation. **Neurogastroenterology Motility**, *v. 24*, p. 802-811, 2012.

SEN, C. K. & PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, 10(7), 709-720, 1996.

SENGUPTA, S., & BHOWAL, J. Optimization of ingredient and processing parameter for the production of Spirulina platensis incorporated soy yogurt using response surface methodology. **Journal of Microbiology**, **Biotechnology and Food Sciences**, v.6, n.4, p.1081–1085. 2017a.

SENGUPTA, S., & BHOWAL, J. Effects of different methods of drying on antioxidant and microscopic characteristics of Spirulina platensis enriched soy yogurt. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n.4, p.1001–1006, 2017b.

SHARMA, M. K.; SHARMA, A.; KUMAR, A.; KUMAR M. Spirulina fusiformis provides protection against mercuric chloride induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Food Chemical Toxicology**., v. 45, p. 2412–2419, 2007.

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

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

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

SILVA, A. S.; PAIM, F. C.; SANTOS, R. C.; SANGOI, M. B.; MORESCO, R. N.; LOPES, S. T.; JAQUES, J. A.; BALDISSARELLI, J.; MORSCH, V. M.; MONTEIRO, S. G. Nitric oxide level, protein oxidation and antioxidant enzymes in rats infected by Trypanosomaevansi. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 166-170, 2012.

SILVA, F. H.; MÓNICA, F. Z.; BÁU, F. R.; BRUGNEROTTO, A. F.; PRIVIERO, F.; TOQUE, H. A.; ANTUNES, E. Superoxide anion production by NADPH oxidase plays a major role in erectile dysfunction in middle aged rats: Prevention by antioxidant therapy. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 10, n. 4, p. 960-971, 2013.

SIPILÄ, S., MULTANEN, J., KALLINEN, M., ERA, P. & SUOMINEN, H. Effects of strength and endurance training on isometric muscle strength and walking speed in elderly women. **Acta Physiologica Scandinavica,** 156, 457-464, 1996.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca2+ sensitivity of smooth muscle and non-muscle myosin II: modulated by g proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**. v. 83, p.1325-1358, 2003.

SOSA-STANLEY, J. N.; BHIMJI, S. S. Anatomy, abdomen and pelvis, Uterus. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2018.

SOUZA FT, MARGARITES AC, COLLA LM, COSTA JAV AND BERTOLIN TE, Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina emsistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. Alim Nutr 17:275–279, 2006.

SOUZA, I. L. L. Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* previne o desenvolvimento da disfunção erétil em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica. **Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

STANTON, A. M.; HANDY, A. B.; MESTON, C. M. The effects of exercise on sexual function in women. **Sexual medicine reviews**, v. 6, n. 4, p. 548-557, 2018.

SUGAMURA, K.; KEANEY JR, J.F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 978-992, 2011.

TAHARA, M.; MORISHIGE, K. I.; SAWADA, K.; IKEBUCHI, Y.; KAWAGISHI, R.; TASAKA, K.; MURATA, Y. RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. **Endocrinology**, v. 143*, p.*920-929, 2002.
TEIXEIRA, P. S. A. CARACTERIZAÇÃO DO TREINAMENTO FÍSICO EXPERIMENTAL DE *ENDURANCE* EM ESTEIRA ADAPTADA ATRAVÉS DE MARCADORES METABÓLICOS ENERGÉTICOS. **Dissertação de mestrado – Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas**, Universidade Estadual do Ceará-UECE, 2010.

TAYLOR, S.E., GONZAGA, G.C., KLEIN, L.C., HU, P., GREENDALE, G.A., SEEMAN, T.E. Relation of oxytocin to psychological stress responses and hypothalamic—pituitary—adrenocortical axis activity in older women. **Psychosom. Med.** v. 68, p. 238—245, 2006.

THARMALINGAM N., RAJMUTHIAH R., KIM W., FUCHS B. B., JEYAMANI E., KELSO M. J., et al. Antibacterial properties of four novel hit compounds from a methicillin-resistant Staphylococcus aureus–Caenorhabditis elegans high-throughput screen. **Front Microbiol**. 10.1089/mdr.2017.0250(2018).

THOMAS SR, CHEN K, KEANEY JF JR (2002). Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinasedependent signaling pathway. **J Biol Chem** 277: 6017–6024.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. A method has been devised for the electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-149, 1992.

TRACHOOTHAM, D., LU, W., OGASAWARA, M. A., VALLE, N. R.-D., & HUANG, P. Redox Regulation of Cell Survival. **Antioxidants & Redox Signaling,** 10(8), 1343–1374. doi:10.1089/ars.2007.1957(2008).

TRINITY JD, WRAY DW, WITMAN MA, LAYEC G, BARRETT-O'KEEFE Z, IVES SJ, CONKLIN JD, REESE V, RICHARDSON RS. Contribution of nitric oxide to brachial artery vasodilation during progressive handgrip exercise in the elderly. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.15; n.305, p.893-899, 2013.

URSO, M. L. & CLARKSON, P. M.. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. 189, 41-54, 2003.

VALE, R. G. S., BARRETO, A. C. G., NOVAES, J. S. & DANTAS, E. H. M. Effect of resistive training on the maximum strenght, flexibility and functional autonomy of elderly woman. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, 8, 52-58, 2006.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca2+]_c$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315 – 329, 1989.

VAN DER VLIET, A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. **Chemical and biology interactions**. v. 85, p. 95-116, 1992.

VAN REMMEN H, WILLIAMS MD, GUO Z, ESTLACK L, YANG H, CARLSON EJ, EPSTEIN CJ, HUANG TT, RICHARDSON A. Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2003;281:H1422–1432.

VIRDIS, A.; NEVES. M. F.; DURANTI, E.; BERNINI, G.; TADDEI, S. Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. **Current Pharmaceutical Design,** v. 19, n. 13, p. 2382-2389, 2013.

VON DER WEID, D.; DILLON, J.C.; FALQUET, J. Malnutrition: a silent massacre. Geneve: **Antenna Technology**, 2000.
WANG, B., DENG, J., GAO, Y., ZHU, L., HE, R. & XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Fitoterapia**, 8, 1141-1151, 2014.

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. Free radical research, v. 40, n. 12, p. 1339-1349, 2006.

WANG, Y., BRANICKY, R., NOË, A., & HEKIMI, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. J Cell Biol, 217(6), 1915-1928.

WANG, Y.; XU, Z.; BACH, S. J.; MCALLISTER, T. A. Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on *in vitro*ruminal digestion of mixed forage or barley grain. Anim. **Feed Sci. Technol**., 145 (1/4): 375-395., 2008.

WANG, Z. J., & ZHANG, X. W. Inhibitory effects of small molecular peptides from Spirulina (Arthrospira) platensis on cancer cell growth. **Food & Function,** 7, 781–788, 2016.

WARREN AY, MATHAROO-BALL B, SHAW RW, KHAN RN. Hydrogen peroxide and superoxide anion modulate pregnant human myometrial contractility. **Reproduction** 130: 539–544, 2005.

WARREN M. P; PERLROTH N. E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 3–11, 2001.

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

WEIMANN, E. Gender-related differences in elite gymnasts: the female athlete triad. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2146-2152, 2002.

WILSON GJ, DOS REMEDIOS CG, STEPHENSON DG, WILLIAMS DA. Effects of sulphydryl modification on skinned rat skeletal muscle fibres using 5,5′-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **J Physiol** 437: 409–430, 1991.

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

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, D.; NOBLE, K.; BORYSOVA, L.; ARROWSMITH, S. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 2, p. 417-431, 2015.

WRAY, S.; JONES, K.; KUPITTAYANANT, S.; LI, Y.; MATTHEW, A.; MONIR-BISHTY, E.; NOBLE, K.; PIERCE, S. J.; QUENBY, S.; SHMYGOL, A. V. Calcium signaling and uterine contractility. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, p. 252-264, 2003.

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

WRZAL, P. K.; GOUPIL, E.; LAPORTE, S.A.; HÉBERT, T. E.; ZINGG, H. H. Functional interactions between the oxytocin receptor and the β2-adrenergic receptor: Implications for ERK1/2 activation in human myometrial cells. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 334-341, 2012.

XU, S.; TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 22, n. 11, p. 947-951, 2006.

YANG Z-W, ZHANG A, ALTURA BT, ALTURA BM. Hydrogen peroxideinduced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca2+ and other cellular metabolites. **Gen Pharmacol** 33:325–336, 2007.

YANG, P., Q. FENG, G. HONG, G.W. KATTAWAR, W.J. WISCOMBE, M.I. MISHCHENKO, O. DUBOVIK, I. LASZLO, and I.N. Sokolik, 2007: Modeling of the scattering and radiative properties of nonspherical dust-like aerosols. **J. Aerosol Sci.,** 38, 995-1014, doi:10.1016/j.jaerosci.2007.07.001.

YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1101, n. 1, p. 72-84, 2007.

ZANCHI, N. E.; LIRA, F. S.; SEELAENDER, M.; LANCHA, A. H. J. Experimental chronic low frequency resistance training produces skeletal muscle hypertrophy in the absence of muscle damage and metabolic stress markers. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 3, p. 232 – 238, 2010.

ZEINALIAN, R.; FARHANGI, M. A.; SHARIAT, A.; SAGHAFI-ASL, M. The effects of Spirulina platensis on anthropometric indices, appetite, lipid profile and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in obese individuals: a randomized double blinded placebo controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 225, 2017.

ZHAO, H.; LIU, J.; PAN, S.; SUN, Y.; LI, Q.; LI, F.; GUO, Q. SOD mRNA and MDA expression in rectus femoris muscle of rats with different eccentric exercise programs and time points. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73634, 2013.

ZINGG H. H.; ROZEN F.; BRETON C.; LARCHER A.; NECULCEA J.; CHU K.; RUSSO C.; ARSLAN A. Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. **Advances in Experimental *Medicine* and *Biology***, v. 395, p. 395–404, 2003

ZINGG, H. H.; LAPORTE, S. A. The oxytocin receptor. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 5, p. 222-227, 2003.

ANEXOS

Anexo 1: Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais.

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

CBiotec
Centro de Biotecnologia
UFPB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 19 de novembro de 2014
CEUA Nº **0211/14**

Ilmo(a). **Profa Dra Bagnólia Araújo da Silva**
Departamento **Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB**

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

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **13/11/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO DE FORÇA (AGUDO E CRÔNICO) E DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM Spirulina platensis NA REATIVIDADE DE ÚTERO DE RATA.**

Com previsão de empregar **500 Ratas WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George**.

Para serem utilizados no período de **02/12/2014** a **02/12/2018**

Atenciosamente,

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

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

Anexo 2: Certificado de análise da *Spirulina platensis.*

1

infinity® pharma

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Espirulina 60%	**Data de Análise:**	27-10-2017
Lote Interno:	17J11-B004-025041	**Lote Fabricante:**	SP17132
Data de Fabricação:	19-06-2017	**Data de Validade:**	18-06-2020
Origem:	China	**Procedência:**	Hong Kong
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	**Ordem de Fracionamento:**	025041

DCB:	-		**DCI:**	-	
CAS:	-		**Peso Molecular:**	-	
Fórmula Molecular:	-				
Observações:	**Parte Utilizada:**	Toda a planta	**Nome Científico:**	Spirulina platensis	

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Po fino verde, com leve odor de algas	Conforme		Fabricante
Sabor	Leve de algas	Conforme		Fabricante
Perda por Dessecação *	<= 8,0% (2g/ 105ºC/ Peso constante)	4,44	%	Fabricante
Proteina	>= 60	65,3	%	Fabricante
Cinzas totais *	<= 8,0	6,83	%	Fabricante
Total Carotenoides *	>= 0,3	0,30	g/100g	Fabricante
Arsênio *	<= 1,0	0,081	ppm	Fabricante
Chumbo *	<= 2,0	Não detectado	ppm	Fabricante
Cádmio *	<= 0,1	0,012	ppm	Fabricante
Mercurio	<= 0,1	Conforme	ppm	Fabricante
Granulometria	100 passa malha 80	Conforme	%	Fabricante
Densidade Aparente *	+ ou - 0,5	0,47	g/mL	Fabricante
Testes Microbiológicos				
Contagem total de bactérias *	<= 100000	< 1000	UFC/g	Fabricante
Fungos e Leveduras *	<= 300	< 10	UFC/g	Fabricante
Salmonella *	Negativo	Negativo		Fabricante
Echerichia coli *	Negativo	Negativo		Fabricante
Coliformes	<= 10	< 10	UFC/g	Fabricante
Staphylococcus *	Negativo	Negativo		Fabricante

(Continua)

(Continuação)

2

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Espirulina 60%	**Data de Análise:**	27-10-2017
Lote Interno:	17J11-B004-025041	**Lote Fabricante:**	SP17132
Data de Fabricação:	19-06-2017	**Data de Validade:**	18-06-2020
Origem:	China	**Procedência:**	Hong Kong
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	**Ordem de Fracionamento:**	025041

DCB:	-		**DCI:**		-
CAS:	-		**Peso Molecular:**		-
Fórmula Molecular:	-				
Observações:	**Parte Utilizada:**	Toda a planta	**Nome Científico:**		Spirulina platensis

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ( )

Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: Nº 7355

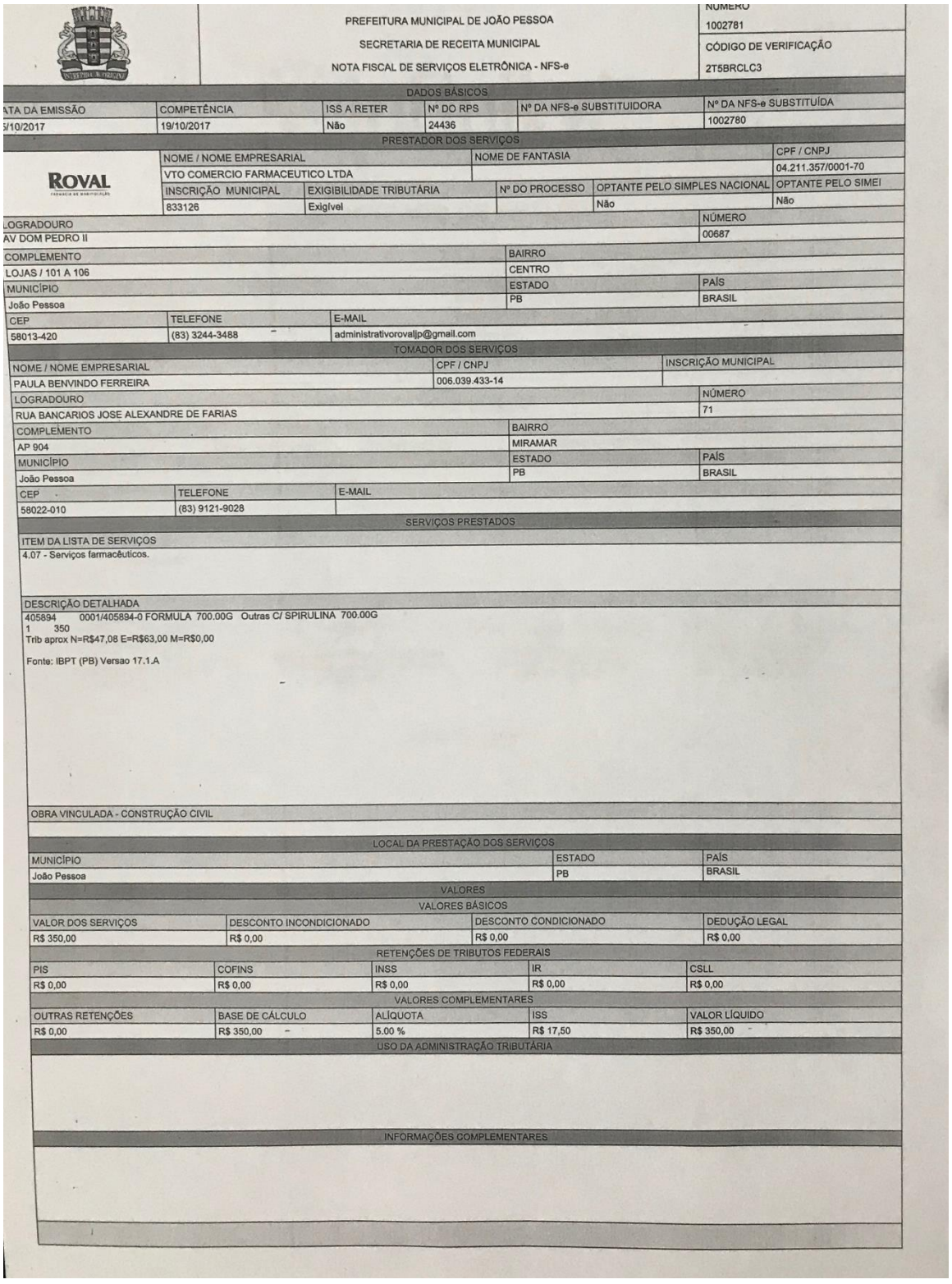
Responsável Técnico Substituto
Olivia Neiva Mesquita Mendes
CRF-GO: Nº 5227

Responsável Técnico
Ana Ligia Boer Barbosa
CRF-SP: 72.656

Responsável Técnico
Eliene Ribeiro de Lima
CRF-GO: Nº 11.361

Fim do Documento

Anexo 3: Certificado de análise do pó de *Spirulina platensis.*



PREFEITURA MUNICIPAL DE JOÃO PESSOA
SECRETARIA DE RECEITA MUNICIPAL
NOTA FISCAL DE SERVIÇOS ELETRÔNICA - NFS-e

NÚMERO: 1002781
CÓDIGO DE VERIFICAÇÃO: 2T5BRCLC3

DADOS BÁSICOS

ATA DA EMISSÃO	COMPETÊNCIA	ISS A RETER	Nº DO RPS	Nº DA NFS-e SUBSTITUIDORA	Nº DA NFS-e SUBSTITUÍDA
5/10/2017	19/10/2017	Não	24436		1002780

PRESTADOR DOS SERVIÇOS

NOME / NOME EMPRESARIAL	NOME DE FANTASIA	CPF / CNPJ
VTO COMERCIO FARMACEUTICO LTDA		04.211.357/0001-70

INSCRIÇÃO MUNICIPAL	EXIGIBILIDADE TRIBUTÁRIA	Nº DO PROCESSO	OPTANTE PELO SIMPLES NACIONAL	OPTANTE PELO SIMEI
833126	Exigível		Não	Não

LOGRADOURO	NÚMERO
AV DOM PEDRO II	00687

COMPLEMENTO	BAIRRO
LOJAS / 101 A 106	CENTRO

MUNICÍPIO	ESTADO	PAÍS
João Pessoa	PB	BRASIL

CEP	TELEFONE	E-MAIL
58013-420	(83) 3244-3488	administrativorovaljp@gmail.com

TOMADOR DOS SERVIÇOS

NOME / NOME EMPRESARIAL	CPF / CNPJ	INSCRIÇÃO MUNICIPAL
PAULA BENVINDO FERREIRA	006.039.433-14	

LOGRADOURO	NÚMERO
RUA BANCARIOS JOSE ALEXANDRE DE FARIAS	71

COMPLEMENTO	BAIRRO
AP 904	MIRAMAR

MUNICÍPIO	ESTADO	PAÍS
João Pessoa	PB	BRASIL

CEP	TELEFONE	E-MAIL
58022-010	(83) 9121-9028	

SERVIÇOS PRESTADOS

ITEM DA LISTA DE SERVIÇOS
4.07 - Serviços farmacêuticos.

DESCRIÇÃO DETALHADA
405894 0001/405894-0 FORMULA 700.00G Outras C/ SPIRULINA 700.00G
1 350
Trib aprox N=R$47,08 E=R$63,00 M=R$0,00

Fonte: IBPT (PB) Versao 17.1.A

OBRA VINCULADA - CONSTRUÇÃO CIVIL

LOCAL DA PRESTAÇÃO DOS SERVIÇOS

MUNICÍPIO	ESTADO	PAÍS
João Pessoa	PB	BRASIL

VALORES

VALORES BÁSICOS

VALOR DOS SERVIÇOS	DESCONTO INCONDICIONADO	DESCONTO CONDICIONADO	DEDUÇÃO LEGAL
R$ 350,00	R$ 0,00	R$ 0,00	R$ 0,00

RETENÇÕES DE TRIBUTOS FEDERAIS

PIS	COFINS	INSS	IR	CSLL
R$ 0,00	R$ 0,00	R$ 0,00	R$ 0,00	R$ 0,00

VALORES COMPLEMENTARES

OUTRAS RETENÇÕES	BASE DE CÁLCULO	ALÍQUOTA	ISS	VALOR LÍQUIDO
R$ 0,00	R$ 350,00	5.00 %	R$ 17,50	R$ 350,00

USO DA ADMINISTRAÇÃO TRIBUTÁRIA

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

Anexo 4 : Artigo publicado durante o doutorado na revista *International Journal of TROPICAL DISEASE & Health*, FI: 1,83, em 2015.

International Journal of TROPICAL DISEASE & Health
9(4): 1-8, 2015, Article no.IJTDH.18522
ISSN: 2278–1005

SCIENCEDOMAIN *International*
www.sciencedomain.org

Induced and Constitutive Clindamycin Resistance in *Staphylococcus* spp. Strains Isolated from a Neonatal Intensive Care Unit

Sávio Benvindo Ferreira[1*], José Ricardo Tomé Lopes Martins[2], Paula Benvindo Ferreira[1] and Zilka Nanes Lima[3]

[1]Program of Postgraduate in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil.
[2]Multiprofessional residence in Health, Federal University of Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brazil.
[3]Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Paraíba, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors SBF and ZNL did the study design, wrote the protocol and analyses of study. Author JRTLM did the processing samples while the literature searches were by author PBF. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/IJTDH/2015/18522
Editor(s):
(1) Ken-ichiro Inoue, Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Japan.
Reviewers:
(1) Anonymous, Kent State University, USA.
(2) Joseph P. Myers, Department of Internal Medicine, Northeast Ohio Medical University, USA.
(3) Anonymous, National Center of Public Health and Analyses, Bulgaria.
(4) Anonymous, Ecuador.
(5) S. Thenmozhi, Microbiology, Periyar University, India.
Complete Peer review History: http://sciencedomain.org/review-history/9869

Original Research Article

Received 27th April 2015
Accepted 9th June 2015
Published 19th June 2015

ABSTRACT

Aims: The hospital environment can act as a reservoir for microorganisms, which in turn can contaminate a range of hospital equipment and survive for long periods of time. One of these environments the Neonatal Intensive Care Unit (NICU), for the initial post partum period serving as a home for newborns of low birth weight and needing invasive procedures for administration of nutritional and medicinal substances, which makes the NICU a critical area for housing individuals with immune system. Thus, the aim of this study was to evaluate the phenotypic appearance of resistance of the *Staphylococcus spp.* compared to erythromycin and clindamycin, originating from

**Corresponding author: Email: savlobenvindo@gmail.com;*

Anexo 5: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Current Pharmaceutical Biotechnology*, FI: 2,14, em 2016.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 17, 1278-1284 1278

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of Antioxidant Activity of Phytol Using Non- and Pre-Clinical Models

Jéssica P. Costa[1], Md. T. Islam[1,2,3*], Pauline S. Santos[1,4], Paula B. Ferreira[4], George L.S. Oliveira[1,4], Marcus V.O.B. Alencar[2,4], Marcia F.C.J. Paz[2], Éverton L.F. Ferreira[5], Chistiane M. Feitosa[4], Antonia M.G.L. Citó[5], Damião P. Sousa[6] and Ana Amelia C. Melo-Cavalcante[2,4]

[1]*Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry, Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil;* [2]*Laboratory of Genetics and Toxicology, Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil;* [3]*Department of Pharmacy, Southern University Bangladesh, Mehedibag (Chittagong)-4000, Bangladesh;* [4]*Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil;* [5]*Department of Chemistry, CCN, Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil;* [6]*Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa (Paraíba)-58.051-900, Brazil.*

ARTICLE HISTORY

Received: February 25, 2016
Revised: August 01, 2016
Accepted: October 10, 2016

DOI: 10.2174/1389201017666161019161557

Abstract: ***Background***: Phytol (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol; PHY), the alcoholic diterpenoid is particularly interesting due to its diverse activities found in literature. This study evaluated *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity of PHY.

Methods: We conducted DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) radical scavenging tests as *in vitro*, while *Saccharomyces cerevisiae* test as *in vivo*. For *in vitro* tests, trolox and for *in vivo* test hydrogen peroxide (H_2O_2) were taken as standard and stressor, respectively. Additionally, we measured the superoxide dismutase (SOD), cata-lase (CAT), reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LP) and nitrite (NO_2^-) contents in mouse hippocampus taking 0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline (0.25 ml) and ascorbic acid (250 mg/kg; AA) as vehicle and standard, respectively. PHY was administered at doses 25, 50 and 75 mg/kg. In the latter case, all the treatments were administered *via* intraperitoneal (i.p.) route.

Results: PHY at 7.2 µg/ml exhibited 59.69 ± 0.73% and 62.79 ± 1.99% scavenging capacity of DPPH• and $ABTS^{\bullet+}$, respectively. In *S. cerevisiae* strains, PHY showed prominent protective effects. Moreover, in Swiss mouse hippocampus; PHY reduced the LP and NO_2^- contents, while increased in GSH, SOD and CAT activities.

Conclusion: PHY exerted antioxidant potential in our current non- and preclinical test systems and can be a good candidate for the development of treatments of oxidative stress mediated diseases.

Keywords: Antioxidant, Hippocampus, Mice, Oxidative stress, Phytol, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the regulation of normal cell function. However, an excessive production of ROS can have detrimental effects, a state that is known as 'oxidative stress', which is essentially signified as an imbalance between the production of ROS and antioxidative defense. The excess ROS can damage cellular components, including proteins, lipids and nucleic acids [1], that can impair function essential for cell function. Antioxidants are the substances capable of neutralizing the damaging effects of ROS, being increasingly used in clinical prevention and treatment of diseases; especially those are derived from oxidative stress.

Recent studies suggest that oxidative stress is involved in the pathogenesis of several diseases such as neurodegenerative diseases, including epilepsy, Alzheimer's disease (AD),

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Research in Experimental Neurochemistry, Postgraduate Program in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina (PI)-64.049-550, Brazil; Tel:/Fax: 55-86(9)-32371240; E-mail: rbiotufpi.br@gmail.com.

Anexo 6: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Fundamental & Clinical Pharmacology*, FI: 2,349, em 2018.

doi: 10.1111/fcp.12366

ORIGINAL ARTICLE

Comparison of behavioral, neuroprotective, and proinflammatory cytokine modulating effects exercised by (+)-cis-EC and (−)-cis-EC stereoisomers in a PTZ-induced kindling test in mice

Paula Regina Rodrigues Salgado[a], Diogo Vilar da Fonsêca[b], Cynthia Germoglio Farias de Melo[b], Fagner Carvalho Leite[b], Adriano Francisco Alves[b], Paula Benvindo Ferreira[b], Márcia Regina Piuvezam[a,c], Damião Pergentino de Sousa[a,d], Reinaldo Nóbrega de Almeida[a,c,*]

[a]*Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, João Pessoa, CEP 58051-900, Paraíba, Brazil*

[b]*Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, João Pessoa, CEP 58051-900, Paraíba, Brazil*

[c]*Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, João Pessoa, CEP 58051-900, Paraíba, Brazil*

[d]*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, CP 5009, João Pessoa, CEP 58051-900, Paraíba, Brazil*

Keywords
(−)-cis-epoxy-carvone, (+)-cis-epoxy-carvone, anticonvulsant, kindling, monoterpene

Received 21 May 2017; revised 5 March 2018; accepted 20 March 2018

*Correspondence and reprints: reinaldoan@uol.com.br

ABSTRACT

Epoxy-carvone (EC) has chiral centers that allow generation of stereoisomers, including (+)-cis-EC and (−)-cis-EC, whose effects in the kindling tests have never been studied. Accordingly, this study aims to comparatively investigate the effect of stereoisomers (+)-cis-epoxy-carvone and (−)-cis-epoxy-carvone on behavioral changes measured in scores, in the levels of cytokines (IL-1β, IL-6, and TNFα) and neuronal protection in the face of continuous treatment with pentylenetetrazol. Swiss mice were divided into five groups ($n = 10$), receiving vehicle, (+) – cis-EC, (−) – cis-EC (both at the dose of 30 mg/kg), and diazepam (4 mg/kg). Thirty minutes after the respective treatment was administered to the animals one subconvulsive dose of PTZ (35 mg/kg). Seven subconvulsives treatments were made on alternate days, in which each treatment several parameters were recorded. In the eighth treatment, the animals receiving the highest dose of PTZ (75 mg/kg) and were sacrificed for quantification of cytokines and histopathologic analysis. All drugs were administered by intraperitoneal route. In the kindling test, (+)-cis-EC and (−)-cis-EC reduced the average scores. The stereoisomer (+)-cis-EC decreased levels of proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNFα, whereas comparatively (−)-cis-EC did not reduce IL-1β levels. Histopathological analysis of the mice hippocampi undergoing this methodology showed neural protection for treated with (+)-cis-EC. The results suggest that the anticonvulsant effect of (+)-cis-EC possibly takes place due to reduction of proinflammatory cytokines involved in the epileptogenic process, besides neuronal protection, yet further investigation of the mechanisms involved is required.

© 2018 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Anexo 7: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Current Topics Medicinal Chemistry*, FI: 3,402, em 2018.

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

917

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018, *18*, 917-924

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM SCIENCE

Antibacterial Activity and Time-kill Kinetics of Positive Enantiomer of α-pinene Against Strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Letícia de Sousa Eduardo[a], Ticiane Costa Farias[a], Siluana Benvindo Ferreira[b], Paula Benvindo Ferreira[c], Zilka Nanes Lima[d] and Sávio Benvindo Ferreira[a,*]

[a]*Center for Teacher Training (CFP), Federal University of Campina Grande (UFCG), Cajazeiras campus, Paraíba, Brazil;* [b]*Agricultural Defense Agency of Piauí, Piauí, Brazil;* [c]*Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil;* [d]*Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brazil;* [e]*Center for Teacher Training, Federal University of Campina, (UAENF/CFP/UFCG), Grande (UFCG), Cajazeiras Campus, Paraíba, Brazil*

ARTICLE HISTORY

Received: March 14, 2018
Revised: May 09, 2018
Accepted: June 18, 2018

DOI
10.2174/1568026618666180712090914

Abstract: Research on new antimicrobial agents is needed, as more and more microorganisms that cause antibiotic-resistant diseases are emerging commercially. In this group, we can find strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which are highly opportunistic species. Faced with this perspective, research using essential oils present in plants is emerging as a therapeutic alternative for the treatment of antimicrobial infections. Many of these oils have, in their composition, monoterpene α-pinene, that shows to have antibacterial activity. The purpose of this research is to evaluate the antimicrobial activity of the positive enantiomer of α-pinene against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The methodologies used were: Disc-diffusion test, broth microdilution and bacterial death kinetics, all of which were standardized by CLSI. As a result, inhibition halos of 11 mm was obtained for the gram-positive strain and 12 mm for the gram-negative strain, both at the same concentration, 160 µl / ml. In addition, it was possible to observe with the death curve that the concentrations (1.25 µl/mL and 2.5 µl/mL of the (+)-α-pinene were able to eliminate the formation of bacterial colonies at one time of exposure of 2 hours for the *E. coli* strain. However, the death curve of the *S. aureus* strain was characterized by non-elimination of bacterial colonies at a 24 hours exposure time used for the experiment. Only amikacin evidenced its bacterial killing rate of all colonies within two hours of exposure. At the end, it was possible to verify the activity of the phytoconstituent against *Escherichia coli* strains ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, recommending the continuity of the studies with the use of different methodologies so that (+) - α-pinene in the future can be a compound used in antimicrobial therapy.

Keywords: Medicinal plants, Essential oils, Terpenes, Alpha-pinene, Enantiomers, Antibacterial activity.

1. INTRODUCTION

Research into new antimicrobial agents is necessary, as resistant microorganisms are increasingly emerging and cause fatal opportunistic infections. Thus, among the bacterial strains, there are the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [1].

E. coli is one of the most frequent strains for causing urinary tract infections, accounting for 80 to 90% of infections. This microorganism is in the form of a short, non-spore gram-negative rod, measuring between 1.1 and 1.5 µm by 2 to 6 µm, most of which are mobile due to the existence of peritrichous flagella. In addition, it belongs to the normal microbiota of the human intestine and can contaminate, colonize and subsequently cause extraintestinal infections and is a major etiological agent of septicemia, meningitis and urinary tract infections [2-3].

Regarding *S. aureus* strain, it one of the most common bacterial species, being the most virulent of its genus. Its endogenous dissemination is the most common, causing many infections acquired in the hospital, resulting from the presence of staphylococci in the skin and nasopharynx of 15% of healthy individuals. However, the exogenous spread can happen where bacteria can be transferred to a vulnerable person through direct contact or through fomites. Therefore, health workers should use appropriate handwashing techniques, with a view to preventing the transmission of this microorganism to patients or between the patients themselves, that is, cross-infection [4-5].

In this context, the discovery of new molecules with antimicrobial activity, as well as the understanding of the

*Address correspondence to this author at the Nursing Academic Unit, Center for Teacher Training, Federal University of Campina Grande (UFCG), Casas Populares, 58900-000, Cajazeiras, Paraíba, Brazil; Tel: +55 (83) 99925-6517; E-mail: saviobenvindo@gmail.com

1873-4294/18 $58.00+.00 © 2018 Bentham Science Publishers

Current Topics in Medicinal Chemistry
Not for Distribution

Anexo 8: Artigo publicado durante o doutorado na revista *Frontiers in Physiology*, FI: 3,394, em 2018.

frontiers in Physiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 31 October 2018
doi: 10.3389/fphys.2018.01522

Aortic Response to Strength Training and *Spirulina platensis* Dependent on Nitric Oxide and Antioxidants

Aline de Freitas Brito[1,2], Alexandre S. Silva[2,3], Alesandra A. de Souza[4], Paula B. Ferreira[5], Iara L. L. de Souza[5], Layanne C. da Cunha Araujo[6], Gustavo da Silva Félix[3], Renata de Souza Sampaio[5], Maria da Conceição C. Silva[5], Renata L. Tavares[7], Reabias de Andrade Pereira[3], Manoel Miranda Neto[7] and Bagnólia A. da Silva[5,8]*

[1] School of Physical Education, University of Pernambuco, Recife, Brazil, [2] Post-Graduation Program in Physical Education UPE/UFPB, Recife, Brazil, [3] Physical Education Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, [4] Federal University of Tocantins, Licentiate in Physical Education, Tocantinópolis, Brazil, [5] Postgraduate Program in Natural and Synthetic Products Bioactive, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, [6] Department of Biophysics and Physiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, [7] Laboratory of Studies of Physical Training Applied to the Performance and the Health, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil, [8] Pharmaceutical Sciences Department, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:
Lacolley Patrick, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France

Reviewed by:
Mario Kassmann, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany
Graziamaria Corbi, University of Molise, Italy
Valerio Nivot-Antoine, Université Paris Descartes, France

***Correspondence:**
Aline de Freitas Brito
alinebritoo@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Vascular Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

Received: 09 June 2018
Accepted: 11 October 2018
Published: 31 October 2018

Citation:
Brito AdF, Silva AS, de Souza AA, Ferreira PB, de Souza ILL, Araujo LCdC, Félix GdS, Sampaio RdS, Silva MdCC, Tavares RL, Pereira RdA, Miranda Neto M and da Silva BA (2018) Aortic Response to Strength Training and Spirulina platensis Dependent on Nitric Oxide and Antioxidants. Front. Physiol. 9:1522. doi: 10.3389/fphys.2018.01522

Studies have shown that supplementation with *Spirulina platensis* improves vascular reactivity. However, it is unclear whether in association with strength training this effect can be enhanced. Thus, this study aimed to determine the effects of strength training and *S. platensis* on the reactivity of the aorta from Wistar rat and the possible mechanisms involved. The animals were supplemented with *S. platensis* and divided into sedentary (SG, SG50, SG150, and SG500) and trained groups (TG, TG50, TG150, and TG500). Nitrite, malondialdehyde (MDA) and antioxidant activity were determined by biochemical assays. To evaluate vascular response, cumulative concentration—response curves to phenylephrine (PHE) and acetylcholine (ACh) were constructed. L-NAME was used to assess the participation of nitric oxide (NO). It was observed that the PHE contractile potency was reduced in TG50, TG150, and TG500 groups compared to SG50, SG150, and SG500 groups, respectively. However, the presence of L-NAME increased the contractile response in all groups. Strength training potentiated the increase in relaxing activity induced by *S. platensis*, where the pCE_{50} values of ACh increased in TG150 and TG500. These responses were accompanied by increased nitrite production, MDA reduction and increased antioxidant activity in the aorta of both TG150 and TG500 groups. Thus, the present study demonstrated that combined with strength training, *S. platensis* potentiates vascular improvement through the participation of NO and reduction of oxidative stress.

Keywords: Spirulina platensis, exercise, vasorelaxation, vasoconstriction, antioxidant activity