

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

Francisco Fernandes Lacerda Júnior

Padronização do modelo de dismenorreia primária e a prevenção das
alterações induzidas no sistema reprodutor feminino de ratas Wistar
tratadas com *Spirulina platensis*

João Pessoa-PB

2022

Francisco Fernandes Lacerda Júnior

Padronização do modelo de dismenorrea primária e a prevenção das alterações induzidas no sistema reprodutor feminino de ratas Wistar tratadas com *Spirulina platensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de 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 mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: Farmacologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Paula Benvindo Ferreira

João Pessoa-PB

2022

L131p Lacerda Júnior, Francisco Fernandes.

Padronização do modelo de dismenorreia primária e a prevenção das alterações induzidas no sistema reprodutor feminino de ratas Wistar tratadas com *Spirulina platensis* / Francisco Fernandes Lacerda Júnior. - João Pessoa, 2022.

174 f. : il.

Orientação: Bagnólia Araújo da Silva.

Coorientação: Paula Benvindo Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Dismenorreia primária. 2. *Spirulina platensis*. 3. Ocitocina. 4. Prostanoides. 5. Estresse oxidativo. I. Silva, Bagnólia Araújo da. II. Ferreira, Paula Benvindo. III. Título.

UFPB/BC

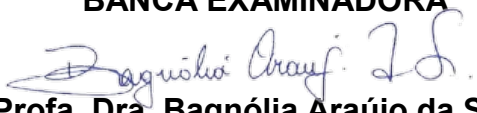
CDU 618.175 (043)

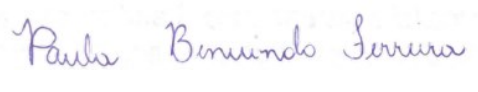
Francisco Fernandes Lacerda Júnior

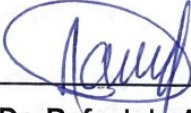
***Spirulina platensis* previne as alterações do sistema reprodutor feminino em
modelo de dismenorreia primária em ratas Wistar**

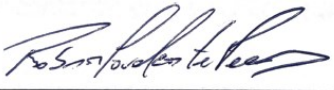
Aprovado em 24/ 02 / 2022


BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dra. Paula Benvindo Ferreira
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora


Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo


Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno


Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno

Dedicatórias

Dedico este trabalho aos verdadeiros amores da minha vida, Francisco Fernandes Lacerda e Joaquina Pimenta de Lacerda, como forma de representar o maior amor e carinho que posso sentir. Obrigado por não medirem esforços em me ver crescer na vida pessoal e profissional, mesmo em meio a todas as dificuldades enfrentadas. Obrigado por sempre se preocuparem com meus anseios e vibrarem com as vitórias e estarem comigo em todas as horas.

A vocês eu dedico.

Agradecimentos

Ser grato é uma das mais belas qualidades do ser humano, não poderia deixar de agradecer as pessoas que marcaram à minha vida e fizeram com que tudo isso se tornasse possível. Preciso verbalizar o quanto sou grato pelas pessoas que estão comigo, desde a minha infância, até os que estiveram comigo durante esta jornada acadêmica.

Primeiramente agradeço a Deus por me permitir chegar tão longe, por fazer com que tudo desse certo, mesmo tendo momentos que não acreditei que poderia chegar até aqui. Por nunca ter deixado que eu desistisse e ter me dado forças para superar todas as provas que surgiram pelo caminho.

Agradeço à minha orientadora professora Bagnólia Araújo da Silva, pelo acolhimento no seu laboratório e por ter aceitado ser à minha mãe científica nesse processo, por todos os aprendizados, seja como professora durante a graduação e pós-graduação ou como orientadora desde a iniciação científica até o mestrado, é imensurável o valor de tudo que eu pude aprender com a senhora. Obrigado por nunca ter desistido de mim e sempre estar de portas abertas quando precisei, é e será sempre uma fonte de inspiração por todo o seu amor, dedicação e luta diária na formação dos seus orientandos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Paula Benvindo Ferreira, que esteve me orientando desde a iniciação científica nos ensinamentos da bancada, pela ajuda na elaboração desse trabalho e nos ensinamentos científicos e pessoais. Por ter se tornado uma grande amiga durante esse processo, por todos os seus conselhos que foram de extrema importância para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante e ao Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos, por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar, nas apresentações e no auxílio de dúvidas, pelo exemplo de profissionais e por toda torcida durante a minha caminhada acadêmica.

Aos Professores Dr. Adriano Francisco Alves e Alexandre Sérgio Silva pelas colaborações na realização dos experimentos de histologia e de estresse oxidativo, pela disponibilidade em ensinar e esclarecer todas as dúvidas e por contribuir grandemente com a realização do nosso trabalho.

Aos membros titulares da banca examinadora professores doutores Robson Cavalcante Veras e Rafael de Almeida Travassos e aos suplentes Giciane Carvalho Vieira e Juan Carlos Ramos Gonçalves da Universidade Federal da Paraíba, pela

disponibilidade em participar da banca, pelas contribuições a este trabalho e por aceitarem fazer parte desse importante passo na minha formação.

A doutoranda Bárbara Cavalcanti Barros pelo laço de amizade construído durante nossa vida acadêmica, obrigado pela força e estímulo diário, pela contribuição na obtenção desses resultados e pelo apoio essencial em todas as atividades científicas por nós realizadas, você teve papel fundamental na produção deste trabalho e foi essencial para que esse projeto fosse concluído.

A aluna de Iniciação Científica, Petruska Pessoa de Souza envolvida diretamente na construção desse projeto, pela ajuda e apoio durante a realização deste trabalho, por sempre estar disponível para participar dos experimentos, muito obrigado pelos momentos de descontração e pela amizade construída durante esta fase.

Aos alunos de iniciação científica Brena Claudino, Manoel Duvirgens, Thiago Dália, e em especial Daiany Francelino, por toda a ajuda e companheirismo no período de mestrado.

A toda equipe que fez ou faz parte do Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas”: Alana Cristina Costa, Alissa Maria de Oliveira Martins, Anderson Fellyp Avelino Diniz, Antônio Raphael Cavalcanti, Brena Freire de Oliveira Claudino, Elba dos Santos Ferreira, Iara Luna Leão de Souza, Indyra Alencar Duarte Figueiredo, João Pedro Moura Lima, Luiz Henrique César Vasconcelos, Manoel Duvirgens, Maria da Conceição Correia Silva, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Paula Benvindo Ferreira, Petruska Pessoa, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Ferreira, Thayna Maria Fernandes de Moura, Thiago Afonso Melo e Thiago Dália pela boa convivência e por toda ajuda nos experimentos e nas correções dos trabalhos.

Aos seres de luz que entraram na minha vida durante essa jornada no Laboratório de Farmacologia Funcional (LFF) Professor George Thomas, Anderson Fellyp Avelino Diniz e Maria da Conceição Correia Silva, pela amizade e por toda paciência comigo, por não medirem esforços a cada pedido de socorro meu, por todos os aprendizados que me proporcionaram e por todo carinho que tem comigo.

Às minhas amigas Iana Oliveira de Souza e Gleice Rayanne da Silva, por todas as conversas em momentos difíceis, apoio, compreensão e por todos os momentos de descontração.

Agradeço às minhas amigas que tive a oportunidade de conhecer durante a minha vida acadêmica e se tornaram irmãs para mim, Tamires Gonçalves de Jesus, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Camila Maria Cordeiro Dias e Michelle Liz de Souza Pessoa, por me ouvirem, aconselharem, por todas as horas que passamos em ligações em momentos difíceis, por me confortarem e me oferecerem o melhor abraço que poderiam em todos os momentos, agradeço pela amizade e companheirismo, por nunca me deixarem sozinho e terem se tornado minha segunda família.

A José Vitor Santana Do Nascimento por ter feito dessa fase da minha vida mais leve, agradeço ainda por toda a paciência, companheirismo, compreensão e amizade durante esse período, você me motivou diariamente para que eu continuasse e foi apoio nessa jornada.

Aos amigos que conheci aqui durante essa caminhada em João Pessoa, Nayane Cordeiro Alves e Amanda Gomes, por todos os momentos de descontração que tivemos, os filmes que assistimos juntos e todas as conversas que tivemos.

Às minhas irmãs Maria Fernandes Lacerda, Maria Das Dores Pimenta de Lacerda, Maria de Fátima Lacerda, Maria Josefa Pimenta de Lacerda e Maria Aparecida Pimenta de Lacerda que nunca mediram esforços para me ajudar, por confiarem em mim e sempre vibrarem com minhas vitórias e estarem sempre na torcida para que todos os meus sonhos sejam alcançados.

Às minhas sobrinhas Maria Gabrielli Lacerda Santos e Maria Ravana Fernandes dos Santos, por estarem comigo desde a minha infância e terem sido o meu ponto forte aqui em João Pessoa, por serem a única parte da minha família que estavam ao meu lado fisicamente, obrigado por me ouvirem, por todo o carinho e amor.

A nova geração da minha família, à minha sobrinha e afilhada Maya Emanuely Lacerda, e aos meus sobrinhos Francisco Luiz Lacerda, por serem fonte de motivação e amor, todos os dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro pelo suporte técnico-científico desde a iniciação científica até o mestrado.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação profissional.

Ao Centro de Ciências da Saúde (CCS), ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), pelo apoio físico e institucional.

Ao coordenador do PPgPNSB, Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e à vice coordenadora, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pelo trabalho em busca de crescimento e êxito para o programa.

À Caroline Manguiera e Nilmar Níncia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, por toda dedicação e paciência em atender as demandas dos alunos.

À Dra. Roberta Parentoni e José Crispim Duarte, pelo trabalho coordenação e condução da Unidade de Produção Animal (UPA).

Ao Sr. Luís C. Silva e Adriano S. Cordeiro pelo auxílio técnico ao laboratório e ao Biotério Prof. Thomas George, possibilitando a realização dos nossos experimentos.

À Mônica R. da Silva, pela sua amizade e auxílio no seu trabalho na limpeza, proporcionando momentos alegres e descontraídos durante a realização dos experimentos.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigado,

Francisco Fernandes Lacerda Júnior

Resumo

RESUMO

A dismenorreia primária (DisP) é a principal causa de dor pélvica crônica que acomete mulheres, podendo estar associada a fatores genéticos, sociais e comportamentais. A farmacoterapia desta desordem envolve o uso de anti-inflamatórios não esteroidais e antiespasmódicos, no entanto, muitas mulheres não respondem bem a estes tratamentos. Dessa forma, visando novas alternativas terapêuticas para prevenção da DisP, avaliou-se o efeito da suplementação com *Spirulina platensis* (SP), uma alga com efeitos anti-inflamatório e antioxidante, durante 8 semanas (v.o), em modelo de DisP. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (2240150621 e 1886010520). Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (GC), DisP e grupos tratados com escopolamina + dipirona (Esc + Dip) ou ibuprofeno (IBU) e grupos suplementados com a SP nas doses de 50 (SP50) e 100 mg/kg (SP100). Para isso, foi padronizado um modelo de DisP induzida pela administração de dietilestilbestrol e ocitocina e promoveu, *in vivo*, o aumento na pontuação de contorções nas ratas, que foi diminuída pelas drogas padrão (Esc + Dip ou IBU). Além disso, *in vitro*, a DisP aumentou a camada miometrial e promoveu danos à camada endometrial uterina, aumentou a reatividade contrátil e diminuiu a relaxante em útero de ratas e aumentou o estresse oxidativo em útero e ovários de ratas. Frente a essas alterações ocasionadas pela DisP, a suplementação com SP promoveu efeito antidismenorreico. Os grupos SP50 e SP100 em estudos *in vivo* preveniram parcialmente o aumento das contorções uterinas, provavelmente por promover efeitos anti-inflamatórios ou antiespasmódicos, já nos parâmetros *in vitro* a SP nas duas doses preveniu o aumento da camada miometrial e os danos a camada endometrial uterina, porém, nos ovários a alga em ambas as doses não alterou a expressão dos folículos, tais efeitos possivelmente podem ser atribuídos a inibição dos efeitos estrogênicos. Na reatividade contrátil uterina induzida pela ocitocina somente SP100 preveniu totalmente o aumento da potência e parcialmente o efeito máximo da ocitocina, sugerindo que a alga pode estar diminuindo a afinidade da ocitocina ao seu receptor. Quando o agente contrátil utilizado era a PGF_{2α}, verificou-se que somente SP100 preveniu parcialmente o aumento da potência sugerindo dessa forma, que a SP pode estar promovendo efeitos negativos na afinidade da PG ao seu receptor. Diferentemente, no acoplamento eletromecânico de contração frente ao KCl, SP, nas doses de 50 e 100 mg/kg, preveniu o aumento da potência, já em relação a prevenção do aumento da eficácia máxima, a SP foi mais eficaz na dose 100 do que na de 50 mg/kg; sugerindo que SP pode estar regulando negativamente a abertura/ativação dos Cav. No relaxamento, verificamos que SP (50 mg/kg) preveniu a diminuição da eficácia relaxante da isoprenalina e do nifedipino. Já na dose de 100 mg/kg, a SP preveniu a diminuição da potência e eficácia relaxante da isoprenalina e nifedipino, promovido pela DisP, esse conjunto de resultados sugere que SP pode modular positivamente alvos na via adrenérgica uterina e negativamente a ativação dos Cav. Além disso, SP (50 mg/kg) promoveu melhora nos parâmetros de estresse oxidativo, por prevenir o aumento dos níveis de MDA e a diminuição da CAT em ovários. Em SP (100 mg/kg) preveniu o aumento de MDA e diminuição da CAT e em útero e ovários iduzidos pela DisP, sugerindo que a alga pode estar reduzindo/neutralizando a formação de EROs. Portanto, a suplementação com *S. platensis* previne a hipercontratibilidade uterina, bem como aumento do estresse

oxidativo em útero e ovários de ratas provocadas pela DisP e surge como alternativa para o tratamento da DisP.

Palavras-chave: 1. *Spirulina platensis*. 2. Dismenorreia primária. 3. Ocitocina. 4. Prostanoides. 5. Estresse oxidativo.

Abstract

ABSTRACT

Primary dysmenorrhea (DisP) is the main cause of chronic pelvic pain that affects women and may be associated with genetic, social and behavioral factors. The pharmacotherapy of this disorder involves the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and antispasmodics, however, many women do not respond well to these treatments. Thus, aiming at new therapeutic alternatives for the prevention of DisP, the effect of supplementation with *Spirulina platensis* (SP), an algae with anti-inflammatory and antioxidant effects, for 8 weeks (v.o), in a DisP model, was evaluated. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the UFPB (2240150621 and 1886010520). The animals were divided into the following groups: control (GC), DisP and groups treated with scopolamine + dipyron (Esc + Dip) or ibuprofen (IBU) and groups supplemented with SP at doses of 50 (SP50) and 100 mg/kg (SP100). For this, a model of DisP induced by the administration of diethylstilbestrol and oxytocin was standardized and promoted, in vivo, the increase in the writhing score in the rats, which was decreased by the standard drugs (Esc + Dip or IBU). Furthermore, in vitro, DisP increased the myometrial layer and promoted damage to the uterine endometrial layer, increased contractile reactivity and decreased relaxant in rat uterus and increased oxidative stress in rat uterus and ovaries. In view of these changes caused by DisP, SP supplementation promoted an antidysmenorrhea effect. The SP50 and SP100 groups in in vivo studies partially prevented the increase in uterine writhing, probably by promoting anti-inflammatory or antispasmodic effects, whereas in the in vitro parameters SP at both doses prevented the increase in the myometrial layer and damage to the uterine endometrial layer. , however, in the ovaries, the alga at both doses did not change the expression of the follicles, such effects could possibly be attributed to the inhibition of estrogenic effects. In the oxytocin-induced uterine contractile reactivity, only SP100 totally prevented the increase in potency and partially the maximum effect of oxytocin, suggesting that the alga may be decreasing the affinity of oxytocin to its receptor. When the contractile agent used was PGF_{2α}, it was found that only SP100 partially prevented the increase in potency, thus suggesting that SP may be promoting negative effects on the affinity of PG to its receptor. Differently, in the electromechanical coupling of contraction against KCl, SP, at doses of 50 and 100 mg/kg, prevented the increase in potency, in relation to the prevention of the increase in maximum efficacy, SP was more effective at dose 100 than at dose 100. at 50 mg/kg, suggesting that SP may be down-regulating the opening/activation of Cav. In relaxation, we found that SP (50 mg/kg) prevented the decrease in the relaxing efficacy of isoprenaline and nifedipine. At a dose of 100 mg/kg, SP prevented the decrease in the potency and relaxing efficacy of isoprenaline and nifedipine, promoted by DisP, this set of results suggests that SP can positively modulate targets in the uterine adrenergic pathway and negatively the activation of Cav. In addition, SP (50 mg/kg) improved oxidative stress parameters by preventing the increase in MDA levels and the decrease in CAT in ovaries. In SP (100 mg/kg) it prevented the increase in MDA and decrease in CAT and in uterus and ovaries induced by DisP, suggesting that the alga may be reducing/neutralizing the formation of ROS. Therefore, supplementation with *S. platensis* prevents uterine hypercontractility, as well as increased oxidative stress in the uterus and ovaries of rats caused by DisP and appears as an alternative for the treatment of DisP.

Keywords: 1. *Spirulina platensis*. 2. Primary dysmenorrhea. 3. Oxytocin. 4. Prostanoids. 5. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia uterina humana.....	36
Figura 2 – Morfologia uterina de ratas.....	37
Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	41
Figura 4 – Mecanismo de contração do miométrio uterino induzido pela ocitocina, estrogênio e progesterona.	43
Figura 5 – Mecanismo farmacomecânico de relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.....	47
Figura 6 – Regulação da produção de prostaglandinas pela progesterona no útero	51
Figura 7 – A) Sistema de banho para órgãos isolados, composto por cubas de vidro, transdutores isométricos e bomba termostática; B) amplificador e sistema de aquisição digital.	65
Figura 8 – Protocolo de indução da dismenorreia	66
Figura 9 – Efeito da dismenorreia primária sobre a morfologia do útero (A) e ovários (B) de ratas Wistar, nos grupos GC (A), DisP (B), Esc + Dip (C), IBU (D).	76
Figura 10 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com ocitocina GC (A) e DisP (B) ou $PGF_{2\alpha}$ GC (C) e DisP (D) em útero isolado de rata.....	77
Figura 11 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com $PGF_{2\alpha}$ GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.....	79
Figura 12 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com KCl GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.....	83
Figura 13 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com isoprenalina GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.....	86
Figura 14 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com nifedipino GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.....	89
Figura 15 – Protocolo de administração da <i>Spirulina platensis</i>	110
Figura 16 – – Efeito da dismenorreia primária e suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a morfologia do útero (A) e ovários (B) de ratas Wistar, nos grupos GC (A), DisP (B), DisP + SP50 (C), DisP + SP100 (D).	119
Figura 17 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com ocitocina SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.....	122
Figura 18 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com $PGF_{2\alpha}$ SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.....	123

Figura 19 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com KCl SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.....	127
Figura 20 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com isoprenalina SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.....	130
Figura 21 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com nifedipino SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.....	133

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Pontuação referente as contorções dos grupos, GC, DisP, Esc+Dip e IBU em ratas Wistar.	74
Gráfico 2 – Efeito da dismenorreia primária sobre a área muscular em útero de rata, nos grupos GC, DisP, Esc + Dip e IBU.	77
Gráfico 3 – Curvas concentração-resposta cumulativas a ocitocina (A) ou PGF _{2α} (B) dos grupos, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.	79
Gráfico 4 – Curvas concentração-resposta cumulativas ao KCl dos grupos, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.....	84
Gráfico 5 – Efeito da dismenorreia primária sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento induzidas pela isoprenalina em útero isolado de rata pré-contráído com ocitocina, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.	87
Gráfico 6 – Efeito da dismenorreia primária sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento induzidas pelo nifedipino em útero isolado de rata pré-contráído com KCl, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.	90
Gráfico 7 – Efeito da dismenorreia primária sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, IBU e Esc + Dip.....	93
Gráfico 8 – Efeito da dismenorreia primária sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, IBU e Esc + Dip.	95
Gráfico 9 – Pontuação referente as contorções dos grupos, GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100 em ratas Wistar.	117
Gráfico 10 – Efeito da dismenorreia primária e <i>Spirulina platensis</i> sobre a área muscular em útero de rata, nos grupos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.	120
Gráfico 11 – Efeito da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina (A) e PGF _{2α} (B) em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).	122
Gráfico 12 – Efeito da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).	127

Gráfico 13 – Efeito da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento a isoprenalina em útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).	130
Gráfico 14 – Efeito da suplementação alimentar com <i>S. platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento com nifedipino em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).	133
Gráfico 15 – Efeito da dismenorreia primária e suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.	136
Gráfico 16 – Efeito da dismenorreia primária e suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a capacidade antioxidante total no útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{\max} e de pCE_{50} da ocitocina e $PGF_{2\alpha}$ em útero isolado de rata, nos GC e DisP.	82
Tabela 2 – Valores de E_{\max} e de pCE_{50} da $PGF_{2\alpha}$ em útero isolado de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Scores para padrão comportamental dos animais.....	67
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_c	Concentração citosólica de cálcio
AA	Ácido araquidônico
AC	Ciclase de adenilil
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Capacidade antioxidante total
Cav	Canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CICR	Liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
COX	Ciclo-oxigenase
DAG	Diacilglicerol
e.p.m.	Erro padrão da média
E_{max}	Efeito máximo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FP	Receptor da prostaglandina F _{2α}
G_{12/13}	Proteínas G ₁₂ e G ₁₃
G_{q/11}	Proteína G _q e G ₁₁
G_s	Proteína G _s
G_{αq/11}	Subunidade α das proteínas G _{q/11}
G_{αs}	Subunidade α da proteína G _s
GC	Grupo controle
GDP	Difosfato de guanosina
GMP	Monofosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídio de guanina

GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO•	Radical hidroxila
HO₂•	Radical peridroxila
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	Receptor de IP ₃
KCl	Cloreto de potássio
MDA	Malondialdeído
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da MLC
MLCP	Fosfatase da MLC
MYPT1	Subunidade catalítica da MLCP
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCX	Trocador sódio/cálcio
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do NO
OCI	Ocitocina
ONO₂•	Peroxinitrito
O₂•-	Ânion superóxido
OT	Receptor da ocitocina
pCE₅₀	Logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol

PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLCβ_1	Fosfolipase C β_1
PLD	Fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
RhoA	Proteína G monomérica da família Rho do tipo A
ROCK	Proteína cinase associada à Rho
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SOD	Superóxido dismutase
TFP	Treinamento de Força Progressivo
TxA₂	Tromboxano A ₂

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

SUMÁRIO

1 Introdução	31
2 Fundamentação teórica.....	35
2.1 Morfologia uterina e ciclo menstrual.....	36
2.2 Contração e relaxamento do músculo liso uterino.....	39
2.3 Dismenorreia	49
2.4 Produtos naturais marinhos e dismenorreia primária	55
3 Objetivos	59
3.1 Geral.....	60
3.2 Específicos	60
4 Capítulo I: Padronização e implantação do método de dismenorreia primária em útero de rata Wistar	62
4.1 Material.....	62
4.1.1 Animais.....	62
4.2 Grupos experimentais	62
4.3 Substâncias e reagentes	62
4.4 Solução nutritiva	63
4.5 Equipamentos	64
4.6 Métodos.....	65
4.6.1 Padronização do modelo de dismenorreia em ratas Wistar	65
4.6.1.1 Abordagem <i>In vivo</i>	65
4.6.1.1.1 Protocolo de indução da dismenorreia	65
4.6.1.1.2 Pontuação de contorções.....	67
4.6.1.2 Abordagem <i>In vitro</i>	68
4.6.1.2.1 Avaliação da reatividade uterina	68
4.6.1.2.1.1 Preparação do útero de ratas	68

4.6.1.2.1.2 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade contrátil farmacomecânica induzida por ocitocina ou PGF _{2α} em útero de ratas Wistar	68
4.6.1.2.1.3 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade contrátil eletromecânica induzida por KCl em útero de ratas Wistar	69
4.6.1.2.1.4 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina em útero de ratas Wistar	69
4.6.1.2.1.5 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade relaxante induzida por nifedipino em útero de ratas Wistar	69
4.6.1.2.2 Avaliação das alterações histopatológicas do útero e ovário induzidas pela dismenorreia primária	69
4.6.1.2.3 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas Wistar	70
4.6.1.2.3.1 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino	70
4.6.1.2.3.2 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido uterino e ovariano	70
4.6.1.2.4 Análise estatística	72
4.7 Resultados	73
4.7.1 Pontuação de contorções do modelo experimental de dismenorreia primária em ratas Wistar	73
4.7.2 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária sobre os parâmetros histomorfométricos do útero e ovários em ratas Wistar	75
4.7.2 Efeitos da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de contração em útero de ratas Wistar	78
4.7.3 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento eletromecânico de contração induzida por KCl em útero de ratas Wistar	83
4.7.4 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por isoprenalina em útero de ratas Wistar	86
4.7.5 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por nifedipino em útero de ratas Wistar	89

4.7.6 Efeito da dismenorreia primária sobre o sistema antioxidante no útero e ovário de rata	92
4.7.6.1 Efeito da dismenorreia primária sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero e ovário de rata	92
4.7.6.2 Efeito da dismenorreia primária sobre a concentração de MDA no útero e ovário de rata	94
Discussão.....	96
5-Capítulo II.....	106
5 Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre as alterações induzidas pela dismenorreia primária no sistema reprodutor feminino de rata Wistar	107
5.1 Material.....	107
5.1.1 Produto-teste.....	107
5.1.2 Animais.....	107
5.1.3 Substâncias e reagentes	107
5.1.4 Solução nutritiva	108
5.1.5 Equipamentos	108
5.2 Métodos.....	109
5.2.1 Grupos experimentais	109
5.2.2 Preparo e administração da <i>S. platensis</i>	109
5.2.3 Investigação do efeito preventivo da suplementação com <i>S. platensis</i> nas alterações de reatividade contrátil e relaxante induzidas pela dismenorreia primária	110
5.3 Abordagem <i>In vivo</i>	111
5.3.1 Protocolo de indução da dismenorreia	111
5.3.1.1 Pontuação de contorções.....	111
5.4 Abordagem <i>In vitro</i>	111

5.4.1 Efeitos da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade contrátil farmacomecânica induzida por ocitocina ou PGF _{2α} nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária	111
5.4.2 Efeitos da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade contrátil eletromecânica induzida por KCl nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária.....	112
5.4.3 Efeitos da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade relaxante induzida pela isoprenalina nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária	112
5.4.4 Efeitos da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a reatividade relaxante induzida pelo nifedipino nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária.....	113
5.4.5 Análise histopatológica do útero e ovário	113
5.4.6 Avaliação dos efeitos da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> nas alterações induzidas pela dismenorreia primária sobre CAT e MDA em útero de ratas Wistar	114
5.4.7 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino e dos ovários	114
5.4.8 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido uterino e ovariano	114
5.5 Análise estatística	115
5.6 Resultados	116
5.6.1 Efeitos da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre às contorções no modelo experimental de dismenorreia primária em ratas Wistar	116
5.6.2 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária e da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre os parâmetros histomorfométricos do útero e ovários em ratas Wistar	118
5.6.3 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre acoplamento farmacomecânico de contração em útero de ratas Wistar	121

5.6.3.1 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre o acomplamento farmacomecânico de contração induzida por ocitocina ou PGF _{2α} em útero de ratas Wistar	121
5.6.3.2 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre o acomplamento eletromecânico de contração induzida por KCl.....	126
5.6.4 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre o acomplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por isoprenalina	129
5.6.5 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre o acomplamento eletromecânico de relaxamento induzido por nifedipino	132
5.6.6 Efeito da dismenorreia primária e suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero e ovário de rata.....	137
5.6.7 Efeito da dismenorreia primária e suplementação com <i>Spirulina platensis</i> sobre a concentração de malondialdeído (MDA) no útero e ovário de rata	135
Discussão.....	139
6-Conclusões	148
Referências	150
Anexos	170
Anexo 1 – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animal.....	171
Anexo 2 – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animal.....	172
Anexo 3 – Certificado de análise da <i>Spirulina platensis</i>	173
Anexo 4 - Certificado de análise do pó de <i>Spirulina platensis</i>	175

1 Introdução

1 Introdução

A dismenorreia, conhecida popularmente como cólica menstrual, é o distúrbio ginecológico que mais acomete mulheres em idade reprodutiva e caracteriza-se pela presença de dores na região pélvica (KONINCKX et al., 2017).

Baseado na fisiopatologia da doença, a dismenorreia pode ser classificada em dois tipos, a primária (DisP) e a secundária. A DisP é definida como cólicas espasmódicas dolorosas na parte inferior do abdômen, na ausência de qualquer doença prévia. Diferentemente, a dismenorreia secundária é originada por condições patológicas, como endometriose, adenomiose, miomas e doença inflamatória pélvica (BURNETT; LEMAYRE, 2016; FERRIES-ROWE; ARCHER, 2020).

Adicionalmente, a DisP acomete até 90% das mulheres jovens ou adultas e este é o principal motivo que impede cerca de 13-51% destas mulheres de realizarem normalmente suas atividades diárias, como frequentar a escola ou ir ao trabalho. Diante disso, esse distúrbio é considerado um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SANCTIS et al., 2015).

Quanto a patogênese da DisP, um dos principais mecanismos inflamatórios envolvidos ocorre durante o período menstrual, devido a necrose em células epiteliais do endométrio, resultando no aumento de substratos para ação da fosfolipase A₂ (PLA₂), que converte os fosfolipídios (fosfatidilserina e fosfatidilcolina) das membranas celulares em ácido araquidônico, com isso, o aumento na expressão de enzimas ciclo-oxigenases 2 (COX-2) em mulheres com DisP leva a uma superprodução de prostaglandinas (PGs), principalmente de PGF_{2α} (SUN et al., 2017; SMITH, 2018). Visto isso, atribui-se à hiperprodução das PGs, particularmente de PGF_{2α}, a origem do quadro de DisP (DAWOOD, 2006; IACOVIDES; AVIDON; BAKER, 2015).

Mais recentemente, também vêm sendo estudado a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como protagonistas na fisiopatologia da DisP. O processo de hipóxia/isquemia ocasionado pelo aumento das ações de PGF_{2α} promove a geração de radicais livres que medeiam eventos celulares, como aumento de cálcio citoplasmático [Ca²⁺]_c e ativação de processos inflamatórios, como a ativação de PLA₂. Além disso, EROs,

como o peroxinitrito (NO_3^-), pode levar a ativação de COXs (TSAI; PALMER; KULMACZ, 1992; MARNETT et al., 1999) e inibir sintase de prostaciclina (PGI_2), enquanto ativa a sintase de tromboxano A_2 (TXA_2) favorecendo assim a contração uterina (ZOU; MARTIN; ULLRICH, 1997; ZOU; ULLRICH, 1996).

Atualmente, o tratamento para DisP pode ser farmacológico, realizado através do uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (diclofenaco e ibuprofeno) e antiespasmódicos (escopolamina) (HAREL, 2012), além dos tratamentos não-farmacológicos como acupuntura (ARMOUR et al., 2017), aromaterapia (SUT; KAHYAOGU-SUT, 2017) e a prática de exercícios físicos (CARROQUINO-GARCIA et al., 2019). O tratamento farmacológico com AINES é a primeira linha de escolha para tratar a DisP, porém, o uso prolongado desses medicamentos está associado ao aparecimento de diversos efeitos indesejáveis, como distúrbios gastrintestinais (MITTAL, 2019).

Nesse contexto, a *Spirulina platensis* (SP), uma alga verde-azulada, vem chamando atenção devido ao seu alto valor nutricional (teor de proteínas cerca de 70%) (ZAHRA et al., 2018). No Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas/IpeFarM/UFPB, diversos estudos demonstraram efeitos relaxantes dessa alga em diferentes modelos experimentais de músculo liso como em íleo (FERREIRA, 2017), aorta (BRITO et al 2019) e corpo cavernoso (SOUZA, 2018; DINIZ et al., 2020) de ratos Wistar.

Ademais em útero de ratas Wistar submetidas ao treinamento de força, a suplementação com SP na dose de 100 mg/kg, preveniu o aumento da eficácia e a diminuição da potência ao KCl e ocitocina, bem como diminuiu os níveis de ânion superóxido (O_2^-), aumentou os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e diminuiu a expressão das proteínas ERK 1/2, demonstrando um papel protetor da SP em processos fisiopatológicos envolvendo hipercontratilidade uterina como parto prematuro, aborto e dismenorreia (FERREIRA et al., 2021).

Dessa forma, nesse trabalho foi implantado e padronizado um modelo de dismenorreia primária induzida pela administração de dietilestilbestrol e ocitocina em ratas Wistar, com a finalidade de contribuir com a busca de novas drogas que possam se utilizadas no tratamento dessa doença. Adicionalmente, foi avaliado um provável efeito preventivo da suplementação com SP sobre a pontuação de contorções *in vivo*, alterações funcionais, histomorfométricas e estresse oxidativo

em útero e ovários. Contribuindo com novas evidências científicas que demonstrem um potencial da SP com propriedades de saúde, especialmente frente a dismenorreia primária.

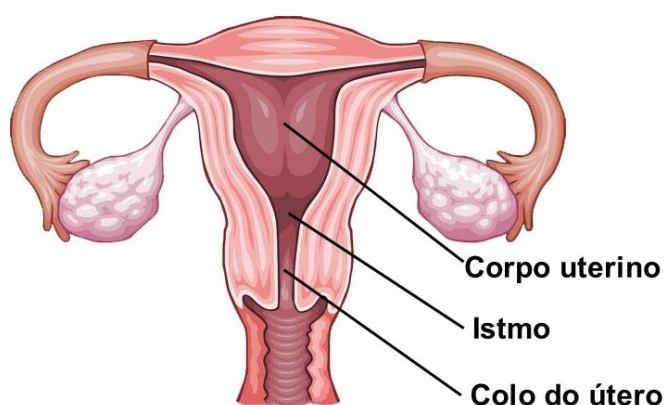
2 Fundamentação teórica

2.1 Morfologia uterina e ciclo menstrual

O útero é uma das estruturas anatômicas que compõe o sistema reprodutor feminino e suas características estruturais podem se diferenciar entre as espécies. Em mulheres, este órgão se apresenta em formato de pêra, sua composição compreende uma formação morfológica de três camadas distintas, o perimétrio, miométrio e endométrio e macroscopicamente é composto pelo corpo, istmo e colo uterino (Figura 1) (RENDI et al., 2013).

O perimétrio é a camada mais externa que reveste o útero e inclui um revestimento seroso de tecido conjuntivo; o miométrio que corresponde a porção intermediária uterina, é considerado a maior camada da estrutura uterina, sendo formada principalmente por músculo liso entrelaçado ao tecido conjuntivo; a faixa mais interna compreende o endométrio, composto principalmente por glândulas uterinas e vasos sanguíneos, com espessura variável durante o ciclo menstrual devido à alterações hormonais, essa porção pode ser constituída ao longo do ciclo por camadas musculares, vasos sanguíneos e nervos uterinos (RENDI et al., 2013; MYERS; ELAD, 2017).

Figura 1 – Morfologia uterina humana.

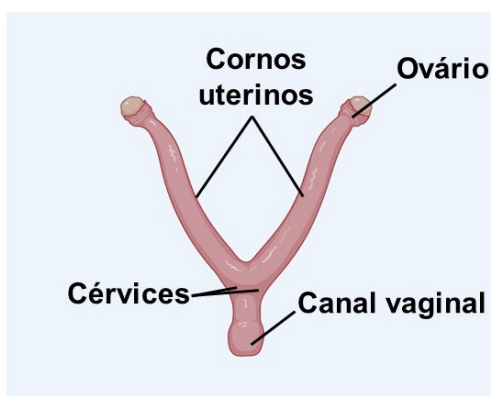


Fonte: [Medicinus.net/uterus.com](https://www.medicinus.net/uterus.com). Acesso em: 25 dez. 2021.

Diferentemente, em outras espécies animais como em roedores, o útero se apresenta disposto em formato de Y, composto por dois cornos uterinos que estão separados em suas extremidades e se fundem na altura do corpo uterino em

direção à vagina. Esses cornos são rodeados por musculatura formando um pequeno corpo uterino, e logo abaixo é encontrado a cérvix uterina. Além disso, estão presentes na porção superior dos cornos uterinos as tubas e os ovários (Figura 2) (HASCHEK; ROUSSEAU; WALLIG, M., 2010; WRAY; PRENDERGAST, 2019).

Figura 2 – Morfologia uterina de ratas.



Fonte: Adaptado de Biorender.com. Acesso em: 25 dez. 2021.

Nas ratas, o útero possui as mesmas camadas do órgão em humanos, o perimétrio, miométrio e endométrio. Embora estruturalmente existam diferenças na organização do sistema reprodutor feminino de roedores para o de humanos, suas composições celulares e teciduais são semelhantes. Ademais, uma das principais diferenças observadas estruturalmente ocorre no miométrio, que em ratas o músculo liso está disposto em duas camadas uma longitudinal externa e uma circular interna, o que promove um padrão de contrações diferenciados (MICHALAKIS; SEGARS, 2010; RIBEIRO, 2013).

O ciclo uterino ou ciclo menstrual, reflete as mudanças ocorrida principalmente no endométrio e ovários pela ação dos hormônios estradiol ou progesterona. Cada ciclo em mulheres dura cerca de 28 dias, e é compreendido em três fases: menstrual, proliferativa e secretora, sendo a fase menstrual caracterizada pela descamação do endométrio com ruptura dos vasos sanguíneos, desencadeando o fluxo menstrual. Já na fase proliferativa, o endométrio está espesso e observa-se o desenvolvimento de artérias espirais e dos vasos sanguíneos rompidos. Na fase secretora, a parede interna do útero apresenta-se

na sua maior espessura com amplo desenvolvimento de glândulas, preparando o útero para receber o embrião (MICHALAKIS; SEGARS, 2010).

Já em ratas, o ciclo uterino é chamado de ciclo estral, com duração de cerca de quatro a cinco dias em média, ocorrendo durante a puberdade dos animais por volta da 32ª semana de idade, podendo variar entre as espécies. As fases deste ciclo são divididas em proestro, estro, diestro e metaestro, podendo ser diferenciadas quanto a predominância de tipos celulares diferenciados no fluido vaginal dos animais ou padrões comportamentais das ratas (MULLER, 2007; DIXON et al., 2014).

O ciclo estral se inicia pela fase do proestro, com duração de cerca de 12 horas, que é representada pela presença majoritária de células epiteliais nucleadas no útero. A segunda fase é o estro, tem duração em torno de 24 horas, e é corresponde ao período em que a fêmea apresenta mudanças comportamentais como por exemplo, maior receptividade ao macho, e no seu fluido vaginal, observa-se o predomínio de células queratinizadas anucleadas. Na continuidade do ciclo, caso não haja concepção, a terceira fase é o metaestro, durando entre 24 e 48 horas, em que se observa principalmente a proporção equivalente de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos. Já na última fase do ciclo, o diestro, dura 24 horas, e há predominância de uma grande quantidade de leucócitos, células epiteliais e muco (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002; VILELA; SANTOS-JUNIOR; SILVA, 2007; CARRASCO-GARCIA et al., 2019).

O ciclo estral é regulado pela ação dos hormônios progesterona e estradiol, semelhante como ocorre nas mulheres, o que caracteriza as modificações estruturais observadas no epitélio vaginal de ratas em cada uma de suas fases durante o seu ciclo uterino. Observa-se em cada uma das fases do ciclo uma variação desses hormônios, em que durante o proestro, o nível de estrogênio apresenta-se aumentado e os folículos ovarianos aumentam de forma rápida.

Durante o estro, no período entre 10 e 12h após o aumento do hormônio luteinizante, ocorre a ovulação. Quando não há copulação dos animais, os corpos lúteos secretam uma pequena quantidade de progesterona, mas quando há acasalamento, os óvulos são fertilizados pelos espermatozoides e a vida lútea se estende por toda a primeira metade da gravidez e sua gestação dura em cerca de 21 dias (PACCOLA et al., 2013; ARITONANG et al., 2017). Assim, devido ao curto

período do ciclo uterino de ratas e as grandes similaridades com o ciclo de mulheres, as ratas se caracterizam como um modelo experimental atraente para investigação das alterações no sistema reprodutor feminino (TROINA, 2008).

2.2 Contração e relaxamento do músculo liso uterino

O miométrio é a maior camada uterina e é composta majoritariamente por músculo liso, estando organizada morfológicamente em camadas circulares e longitudinais, acomodadas de forma perpendicular umas às outras. A apresentação de formas indefinidas na composição do miométrio, permitem ao útero durante a contração se apresentar de diversas formas. No período da gravidez este órgão se adapta para correta acomodação do feto, porém, com o início do trabalho de parto se contrai ritmicamente para expulsar o feto e a placenta (HUSZAR; NAFTOLIN et al., 1984; O'BRIEN, 2011).

Além disso o miométrio uterino é composto por fibras musculares lisas, constituídas por células em formato de fuso, que apresentam um núcleo centralizado em suas estruturas e um tamanho de cerca de 100 µm de comprimento e um diâmetro de 2-10 µm e estão densamente compactadas com miofilamentos e corpos densos associados, que ocupam 80-90% do volume celular e constituem a maquinaria contrátil uterina (SOMLYO; SOMLYO, 1994; MORGAN; GANGOPADHYAY, 2001; GUNST; ZHANG, 2008).

As células do músculo liso estão inseridas na matriz extracelular que é composta por fibras de colágeno, posicionadas estreitamente opostas em um ângulo reto entre si, além disso, estão presentes membranas celulares que estão fortemente aderidas entre si, dessa forma, proporcionando a transmissão de forças de contração de célula para célula (CSAPO, 1962; ALBERTS et al., 1989; WEBB, 2003).

Diante disso, a contração muscular lisa se fundamenta na interação entre os filamentos de actina e miosina, que consiste na ligação cíclica da porção globular da miosina com a actina, seguida por uma mudança do ângulo de orientação do complexo actino-miosina, permitindo o deslizamento de um filamento sobre o outro (HUXLEY; NIEDERGERKE, 1954; KOEPPEN; STANTON, 2009).

As proteínas actinas e miosinas de forma semelhante a outros tecidos musculares, são as proteínas predominantes expressas no músculo liso uterino. No tecido uterino, há cerca de 6 vezes mais actina do que miosina. Os miofilamentos são classificados de acordo com seu diâmetro em filamentos finos com diâmetro de 6 - 8 nm que compõem a porção globular monomérica da actina e em filamentos grossos com 15–18 nm de diâmetro são compostos de miosina. Nesse sentido, os filamentos de actina e miosina se dispõem paralelamente e na dimensão longitudinal da célula (WORD et al, 1993).

O miométrio é um músculo liso espontaneamente ativo (miogênico), capaz de produzir contrações regulares sem estímulos hormonais ou nervosos. As contrações do miométrio são de natureza bifásica, apresentando um padrão de ciclos de contrações discretas e intermitentes com amplitude frequência e duração variadas (WRAY, 1993; BURDYGA; WRAY; NOBLE K., 2007).

O músculo liso uterino por ter uma contração bifásica, apresenta uma contração fásica inicial (contração transitória rápida [< 30 s]), e posteriormente uma contração tônica sustentada (contração de manutenção lenta), desenvolvendo-se lentamente e se mantendo durante o período de ação do agente contrátil (BYTAUTIENE et al., 2003; BROWN et al., 2007).

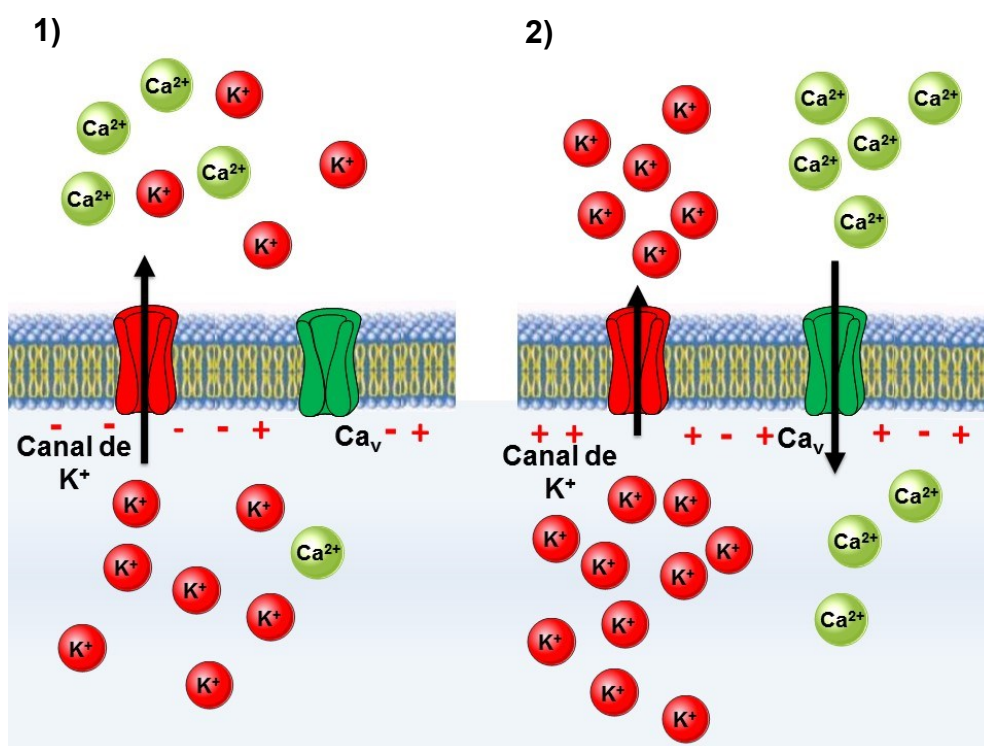
Como em todos os músculos lisos, para a contração uterina, precisa haver interação significativa entre a actina e miofilamentos de miosina no miométrio. As contrações uterinas são desencadeadas por aumentos transientes na concentração de cálcio citoplasmática $[Ca^{2+}]_c$, que se iniciam e são controlados pelos potenciais de ação miometrial (GARFIELD; SIMS; DANIEL, 2009; SANBORN, 2010).

Alguns mecanismos são responsáveis por regular o padrão de contração do miométrio, nas contrações fásicas também conhecidas como transitórias e nas tônicas ou sustentadas, o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ regula essas contrações (AGUILAR; MITCHELL, 2010). A contração fásica se inicia pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, por meio da ação do 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3), diferentemente a contração tônica é iniciada por um influxo de Ca^{2+} advindas do meio extracelular através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (PHILLIPPE, 1994).

O acoplamento excitação-contração no músculo liso uterino que é composto pelos mecanismos eletromecânico e farmacomecânico de contração. O

acoplamento eletromecânico se inicia a partir de uma mudança no potencial de repouso nas células musculares lisas, promovendo a despolarização da membrana, o que desencadeia o influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e, promove a contração uterina (Figura 3). A despolarização que ocorre nesse mecanismo, pode ser desencadeada normalmente pelo aumento da concentração extracelular do íon potássio ($[\text{K}^+]_e$) bem como também, indiretamente pela ação de agonistas que promovem acoplamentos mistos (eletro e farmamecânico), como por exemplo a ocitocina, que ao se ligar ao seu receptor desencadeiam perturbações na membrana celular (BLANKS; THORNTON, 2013).

Figura 3 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente eletroquímico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (2) um aumento na $[\text{K}^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração.

Fonte: Autor, 2022.

Como relatado anteriormente, o miométrio tem a capacidade de contrair independente da ação de hormônios ou do sistema nervoso, por apresentarem em suas estruturas células marcapassos capazes de conduzir e apresentarem

propriedades elétricas (WRAY et al., 2001). Porém, um dos principais mecanismos para condução da contração uterina, envolve a geração do potencial de ação, proveniente do aumento transitório de íons livres através da membrana plasmática, especialmente o Ca^{2+} através dos Ca_v (GRUBER; O'BRIEN, 2011).

Visto isso, os canais Ca_v são a família de canais majoritariamente envolvidos com o influxo de Ca^{2+} no miométrio. Estruturalmente estes canais são complexos hetero-oligoméricos, compostos por subunidades, na qual a subunidade α_1 é a formadora de poros e fornece sítio de ligação para os agonistas e antagonistas (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

A família de Ca_v , podem ser subdivididos em 3 subtipos: Ca_v1 (Ca_v do tipo L), sensíveis à di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, estes canais estruturalmente são formados por 5 subunidades (α_1 , α_2 , β , δ e γ). Além disso, os Ca_v , podem ser subdivididos, em $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ e $\text{Ca}_v1.4$, sendo o 1.2 o principal canal expresso nas musculaturas lisas. Nesse sentido, todos os bloqueadores de canais de cálcio empregados na clínica, como anlodipino ou nifedipino apresentam seu mecanismo de ação, bloqueando os Ca_v1 , desta forma, estes são canais extremamente importantes pois podem estar envolvidos em diversos processos fisiopatológicos. Já os Ca_v2 , que são canais insensíveis à di-hidropiridina, podem ser ativados por alta voltagem, e estão envolvidos principalmente na condução sináptica, estes canais podem ser subdivididos em $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ e $\text{Ca}_v2.3$. Adicionalmente os Ca_v3 , também são insensíveis à di-hidropiridina e podem ser ativados por uma baixa tensão, estes tipos de canais estão presentes majoritariamente em neurônios e se subdividem em $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Ca}_v3.3$ (WILLIAMS et al., 1992; PEREZ-REYES et al., 1998; CRIBBS et al., 1998; LEE et al., 1999; CATTERALL, 2011; ZAMPONI et al., 2015).

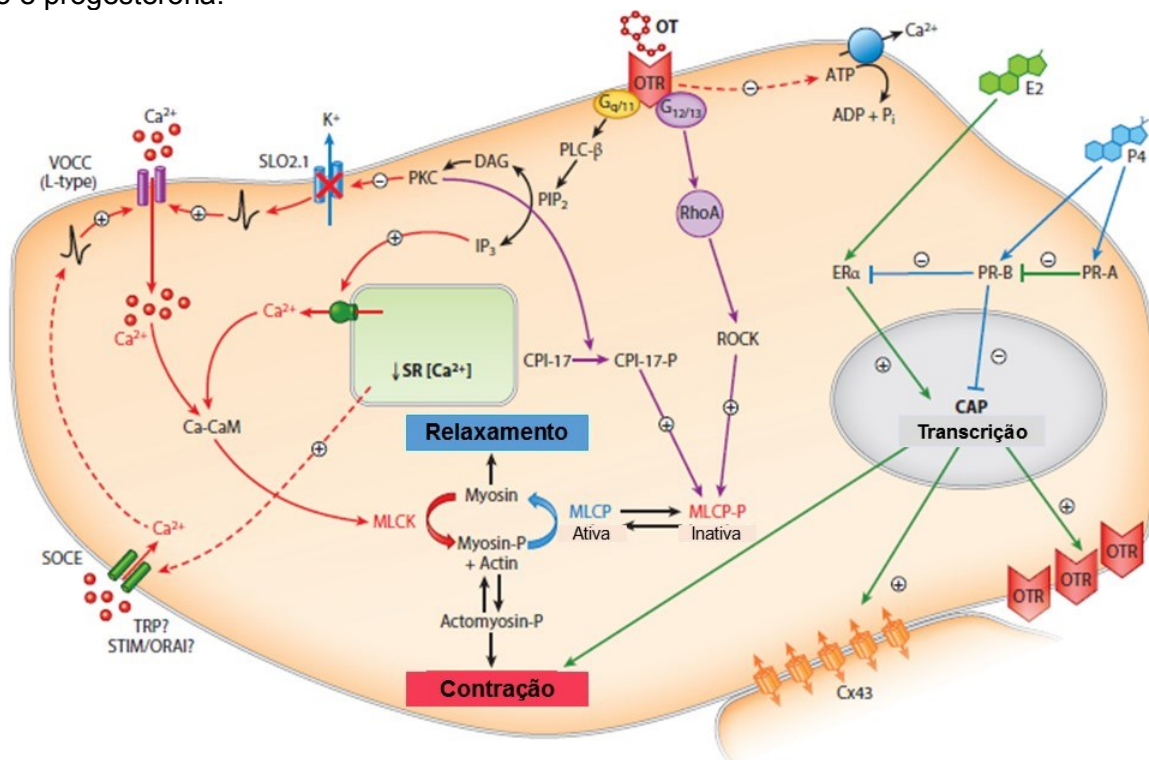
No miométrio uterino estão expressos dois tipos de canais de Ca^{2+} : o Ca_v1 que apresenta abertura de longa duração, e o Ca_v2 com abertura transitória (HAHM et al., 2009). Porém, é descrito que o canal de Ca_v1 é a principal fonte de entrada de Ca^{2+} para contração do miométrio tanto de humanos como também de ratas (WRAY et al., 2021).

Estes canais podem ser abertos por uma despolarização de membrana, durante o potencial de ação, resultando em influxo do Ca^{2+} (figura 3). Além disso, alguns estudos demonstram que a estimulação da ocitocina nos seus receptores

OT em células do miométrio, promovem uma pequena perturbação na membrana da célula desencadeando uma leve despolarização na membrana, que é suficiente para abrir os canais Ca_v1 , assim aumentando o influxo de Ca^{2+} na célula, levando a contração uterina (ARROWSMITH; WRAY; 2014).

Outra forma de contração do miométrio uterino, ocorre através do acoplamento farmacomecânico (Figura 4), esse evento ocorre através da ligação de agonistas aos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), como por exemplo a ocitocina, através dos receptores OT, ou prostanoides contráteis, como a prostaglandina F_2 alfa ($\text{PGF}_{2\alpha}$) se ligando aos seus receptores FP, dessa forma levando a ativação da cascata do inositol através das proteínas $\text{G}_{q/11}$, estimulando a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático ou via ativação direta dos Ca_v presentes na membrana plasmática, desencadeando o processo de contração do músculo liso (TAGGART; MORGAN et al., 2007).

Figura 4 – Mecanismo de contração do miométrio uterino induzido pela ocitocina, estrogênio e progesterona.



Mecanismos de sinalização hormonal promovido pelo estrogênio, progesterona e ocitocina no miométrio levando à contração. As setas vermelhas indicam vias de sinalização com participação direta na $[\text{Ca}^{2+}]$, enquanto as setas roxas indicam vias independentes da sinalização do Ca^{2+} para a contração, incluindo a via de sensibilização ao Ca^{2+} . As setas verdes indicam as vias genômicas/transcricionais que promovem a contração uterina e as

setas azuis indicam aquelas que as inibem a contração. As linhas tracejadas indicam vias que os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

Abreviaturas: CaM, calmodulina; CAP, proteína associada à contração; CPI-17, proteína inibitória da fosfatase potenciada pela proteína quinase C de 17 kDa; Cx43, conexina 43; DAG, diacilglicerol; E2, estrogênio; ER α , receptor alfa de estrogênio; IP $_3$, inositol 1,4,5-trisfosfato; MLCK, cinase de cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase da cadeia leve de miosina; OT, ocitocina; OTR, receptor de ocitocina; -P, fosforilado; P4, progesterona; PIP $_2$, 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol; PKC, proteína cinase C; PLC- β , fosfolipase C beta; PR-A / B, receptor A / B da progesterona; RhoA, família homóloga de Ras membro A; ROCK, cinase associada à Rho; SLO2.1, canal de vazamento de potássio ativado por sódio, de alta condutância; SOCE, entrada de cálcio operada por estoques; SR, retículo sarcoplasmático; TRP, canal potencial do receptor transiente; VOCC, canal de cálcio operado por voltagem.

Fonte: Adaptado de WRAY; ARROWSMITH, 2021.

Após a liberação do IP $_3$, este estimula a liberação de Ca $^{2+}$ do retículo sarcoplasmático (RS) através dos receptores de IP $_3$ (IP $_3$ R). Assim, o Ca $^{2+}$ liberado do retículo ativa o receptor de rianodina (RyR) aumentando ainda mais a liberação de Ca $^{2+}$ deste estoque para o citoplasma, dessa forma o aumento de Ca $^{2+}$ induz o translocamento da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde ativada pelo DAG, esta proteína no seu estado ativado, fosforila proteínas-alvo específicas, dentre estas os Ca $_v$, culminando com o aumento do influxo de Ca $^{2+}$ (SANBORN et al., 1998; BERRIDGE, 2012).

A contração uterina pode ser desencadeada seja pelo acoplamento eletro ou farmacomecânico, pelo aumento de Ca $^{2+}$ que permite que estes íons se liguem a quatro sítios de ligação na calmodulina, promovendo uma mudança conformacional fazendo com que o complexo cálcio-calmodulina possa interagir com a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), resultando na sua ativação. Esta proteína quando ativada, fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), promovendo mudanças conformacionais na MLC, ativando a sua subunidade ATPásica, levando a interação actina-miosina, resultando na geração da contração (SAKURADA, SETO, SASAKI, 1998; SAKURADA et al., 2003).

Outra via alternativa que contribui para a contração do músculo liso (Figura 4), é a via de sensibilização ao Ca $^{2+}$, esta se inicia a partir da modulação positiva de agentes por exemplo como a ocitocina ativando às proteínas G $_{12/13}$ levando a ativação da proteína G monomérica RhoA e a sua cinase associada (ROCK) (HORI; KARAKI, 1998). Esse processo ocorre através da modulação positiva direta ou indireta do fator de troca de nucleotídeos de guanina da RhoA (RhoGEF), que por

sua vez, ativam a RhoA (SOMLYO; SOMLYO, 2003; CHEN et al., 2019). A pequena proteína RhoA-GTP promove a ativação da ROCK, e esta fosforila a MLCP, tornando-a inativa, resultando na intensificação da ativação da MLC induzida pela MLCK e, dessa forma, na manutenção da contração do músculo liso (KIMURA et al., 1996).

Alguns outros hormônios também exercem um papel importante na contratilidade do miométrio uterino, como por exemplo, o estrogênio e a progesterona (Figura 4) que através dos seus efeitos genômicos, principalmente o estrogênio podem regular positivamente a expressão de proteínas com papel importante na contração uterina como, receptores da ocitocina e $\text{PGF}_{2\alpha}$, proteínas associadas a contração como, proteínas da via de sensibilização ao Ca^{2+} como as Rho-ROCK, além da cinase da cadeia leve da miosina ademais mais recentemente vêm sendo relatado modulação positiva desse hormônio, frente a expressão dos Ca_v (WRAY; ARROWSMITH, 2021).

Já a progesterona apresenta um efeito dual, mas principalmente atua estimulando o relaxamento uterino, porém, este hormônio através de mecanismos de autoregulação, inibe os seus efeitos sobre os receptores do tipo B, dessa forma, desencadeando um aumento na atividade estrogênia e ocasiona estímulos positivos na contração uterina (WRAY; ARROWSMITH, 2021).

Além disso, a formação de prostanoídes como as prostaglandinas (PGs), podem levar a contração do útero. Estes compostos estimulam o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, e em distúrbios uterinos como a dismenorreia primária, observa-se um aumento na expressão de ciclooxigenases 1 e 2 que levam a formação destas, além disso há aumento na produção de ácido araquidônico em mulheres durante o período menstrual (HAREL, 2012; MORROW; NAUMBURG, 2019).

Ademais, estímulos como aumento de Ca^{2+} podem ativar a PLA_2 e esta irá clivar fosfolípidios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) liberando o ácido araquidônico (AA), que é convertido pelas enzimas ciclo-oxigenases (COXs) 1 e 2 em endoperoxídeos de prostaglandinas, como a prostaglandina G_2 (PGG_2). Posteriormente, podendo ser reduzida à prostaglandina H_2 (PGH_2), e por ação da sintase de prostaglandina E_2 poderá gerar a PGE_2 , ou sofrer ação da sintase de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, gerando $\text{PGF}_{2\alpha}$. Após serem formadas ambas irão se ligar aos seus receptores EP_1 ou EP_3 e FP , respectivamente, estes receptores,

são receptores metabotrópicos e se acoplam às proteínas $G_{q/11}$, e levam a contração da musculatura lisa uterina (HERINGTON et al., 2018; FISCHER et al., 2020).

As principais PGs expressas no útero são a $PGF_{2\alpha}$ e a PGE_2 , a PGE_2 apresenta atividade dual, dependendo do estado em que útero se apresenta, podendo levar ao relaxamento do miométrio, quando útero é não grávido, bem como sua contração, quando este está grávido. Devido a variação das quatro isoformas de seu receptor, durante as fases uterinas, já a $PGF_{2\alpha}$ estimula a contração uterina por meio do aumento dos íons Ca^{2+} no citosol uterino (WRAY; ARROWSMITH, 2012).

No relaxamento uterino, como o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ é responsável pela contração, a diminuição destes íons é necessária para o relaxamento do miométrio, o relaxamento uterino pode ocorrer através do mecanismo eletromecânico (repolarização ou hiperpolarização da membrana), ou mesmo pelo mecanismo farmacomecânico (ativação de receptores de membrana que inibem as vias de contração ou induzem relaxamento) (WOODRUM; BROPHY, 2001)

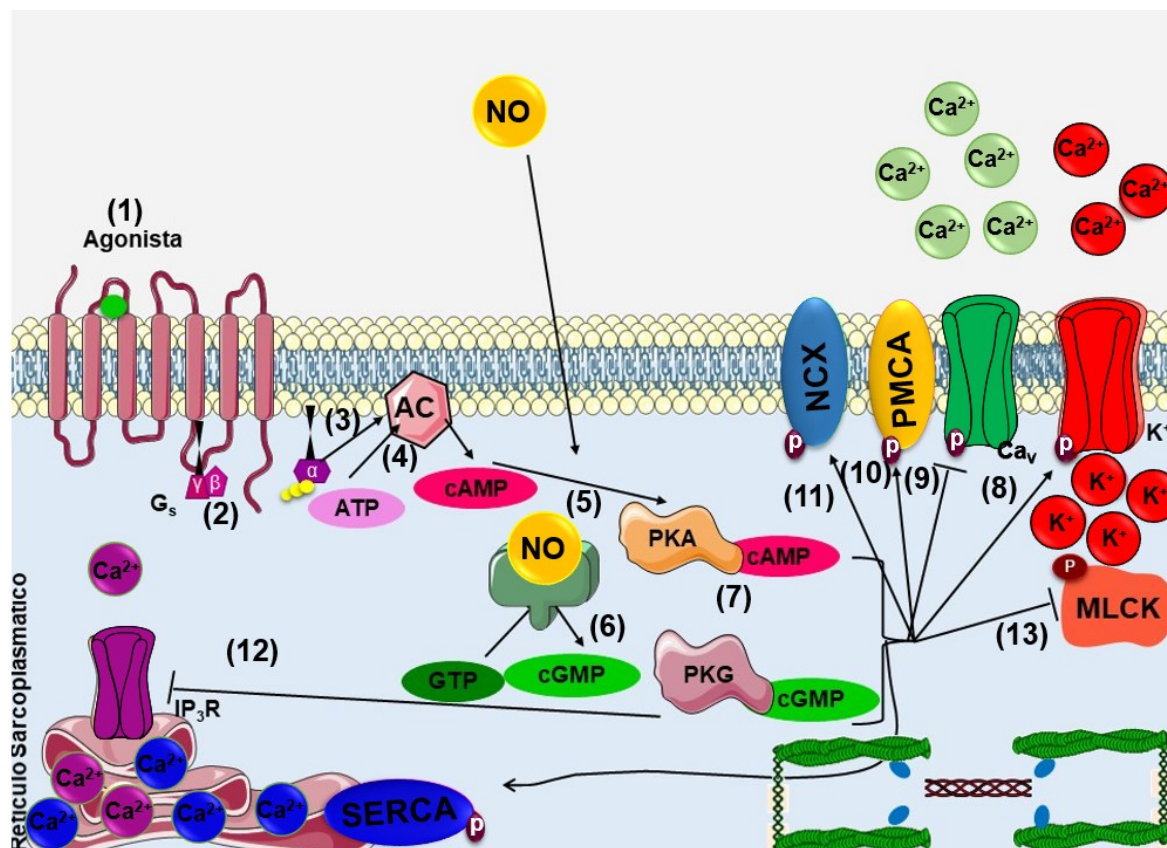
O relaxamento no acoplamento eletromecânico ocorre principalmente pela abertura de canais de K^+ , os quais regulam o potencial de membrana e a excitabilidade da célula. A expressão desses canais pode ser regulada positivamente pela progesterona, dessa forma os canais de K^+ permitem a condução dos íons K^+ através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico promovendo a manutenção do potencial de membrana das células no seu estado de repouso, estimado entre -35 e -60 mV (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; WRAY; ARROWSMITH, 2021).

Já o relaxamento por meio do acoplamento farmacomecânico, ocorre via ativação de receptores GPCRs, especificamente, acoplados à proteína Gs que promovem a ativação da enzima ciclase de adenilil (AC), que no seu estado ativa, hidrolisa e cicliza o trifosfato de adenosina (ATP), transformando-o em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), que por sua vez ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA), esta proteína ativada promove a fosforilação de diversos alvos resultando em diminuição de Ca^{2+} intracelular (TAYLOR et al., 2013).

A PKA tem como alvos os canais de K^+ , trocador Na^+/Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), a ativação

desses alvos desencadeia hiperpolarização e bloqueio direto de Cav. Além desses alvos a PKA fosforila e inibe a MLCK, promovendo dessa forma o relaxamento do músculo liso (Figura 5) (TAYLOR et al., 2013; HOLLINGSWORTH et al., 2020).

Figura 5 – Mecanismo farmacomecânico de relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efectoras do cAMP e cGMP.



(1). O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (não representado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado tanto dos nervos como das células epiteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, resultam, na interação entre os filamentos de miosina e os de actina, desencadeando o relaxamento do músculo liso.

Fonte: Autor. 2022.

O relaxamento uterino também pode ocorrer via ação do óxido nítrico (NO), este gás é amplamente distribuído e tem muitas funções, podendo regular o

relaxamento muscular liso e participar de outros processos celulares como, processos oxidativos e apoptose. O NO é uma molécula de sinalização celular chave, produzida através da via da L-arginina, NO sintase ou por meio de vias alternativas enzimáticas e não enzimáticas do nitrato-nitrito-NO. Sua síntese pode ocorrer durante um processo de oxidação de aminoácidos promovido pela sintase do NO (NOS), presente nas células do miométrio, a partir de L-arginina utilizando como co-fatores nesta reação, tetrahydrobiopterina (BH₄), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e grupo heme (TELFER et al., 1995; NORMAN, 1996).

O NO é identificado com um dos fatores relaxantes derivado do endotélio e pode também ser produzido pelo epitélio, ou através dos nervos. A enzima que promove a produção do NO no miométrio a NOS pode ser dividida em 3 isoformas, a induzida (iNOS), a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS). A nNOS é constitutiva e pode está presente em diversos tecidos como, células neuronais, células epiteliais, sistema nervoso central e periférico e nos nervos NANC, bem como em outros locais. A ativação dessa enzima ocorre mediante formação do complexo cálcio-calmodulina para ser ativado. A isoforma iNOS, ela é induzida mediante processos celulares que promovam aumento de citocinas e lipopolissacarídeos, em geral situações de injúria, já a eNOS é uma isoforma constitutiva e está presente no endotélio dos vascular (TELFER et al., 1995; SCOTT; TREMBLAY; BROCHU; ST-LOUIS, 2007).

O mecanismo de sinalização do NO, é realizado após este gás atravessar a membrana plasmática e promover na célula muscular lisa sua ligação a ciclase de guanilil solúvel (sCG), promovendo sua ativação. Quando esta enzim está ativa, promove a clivagem e ciclização do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), este por sua vez ativa a PKG que fosforila diversos alvos (Figura 5) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Visto que diversas vias podem regular a contração e o relaxamento uterino, e desregulações em passos dessas sinalizações podem estar envolvidas em processos fisiopatológicos envolvendo o sistema reprodutor feminino, como por exemplo a dismenorreia, neste contexto, destaca-se a importância de aprofundar os estudos nesse órgão, a fim de compreender os eventos que possam estar

envolvidos na patogênese desse distúrbio, bem como buscar novas substâncias que possam ser aplicadas no tratamento ou prevenção dessa doença.

2.3 Dismenorreia primária

A dismenorreia (DisP) popularmente conhecida como cólica menstrual, é um distúrbio que acomete as mulheres durante o período menstrual, a qual é designada o termo “menstruação dolorosa”. Clinicamente a dismenorreia se caracteriza pelo aparecimento de dor pélvica em mulheres, esse distúrbio acomete cerca de 90% das mulheres mundialmente (JU et al., 2014; MORROW et al., 2019).

Nesse sentido, essa doença caracteriza-se como um problema que pode limitar as atividades diárias realizadas pelas mulheres, durante o seu período menstrual. Os principais sintomas clínicos apresentados associados a esse distúrbio são, dor pélvica e abdominal inferior, dores nas costas, além de sintomas adicionais como náuseas, vômitos, inchaço e diarreia. O desenvolvimento desses sintomas, são considerados limitantes, visto que na maioria das vezes estão fortemente associados às ausências no trabalho e na escola, prejudicando a realização das atividades diárias pelas mulheres (IACOVIDE; AVIDON; BAKER., 2015; KULMANN et al., 2019).

A dismenorreia é considerada um distúrbio frequentemente subnotificado e subtratado, que pode ser classificado em dismenorreia primária (DisP) e secundária. Essa classificação se baseia na identificação ou não da causa etiológica no aparecimento da dor pélvica. Sendo a DisP, definida pelo aparecimento da dor pélvica sem associação a anormalidades ou causa subjacentes, já a dismenorreia secundária, o aparecimento da dor pélvica está associado ao acometimento das mulheres por outros distúrbios como, endometriose, miomas e doenças pélvicas inflamatórias (OSAYANDE; MEHULIC, 2014).

Adicionalmente a DisP primária são dores pélvicas, que se iniciam imediatamente antes e/ou durante a menstruação, o início desse distúrbio geralmente ocorre na adolescência, podendo também se iniciar logo após (6-24 meses) da menarca. O aparecimento da dor normalmente tem um padrão temporal previsível para a maioria das mulheres, começando pouco antes ou no

início da menstruação. A dor pode durar de 8 - 72 horas, sendo mais intensa nas primeiras horas/primeiro dia do seu aparecimento (PROCTOR et al., 2002; RUOFF; LEMA, 2003).

Alguns fatores podem estar associados ao aparecimento ou piora da DisP, como o tabagismo, início precoce da menarca, obesidade, consumo de álcool, fatores genéticos e fatores psicológicos como estresse, ansiedade e depressão. Quanto a gravidade a dor dismenorreica pode diminuir sua intensidade, muitas vezes após o parto e com o aumento da idade. Visto que diversos fatores de riscos, já são apontados para o aparecimento da DisP, dados controversos e ainda pouco estudados demonstram a necessidade da busca por mais estudos para aprofundar a compreensão desses fatores tanto ambientais e genéticos para DisP. (SUNDELL et al., 1990; MESSING et al., 1993; PARAZZINI et al., 1994; JUANG et al., 2006; JU et al., 2014).

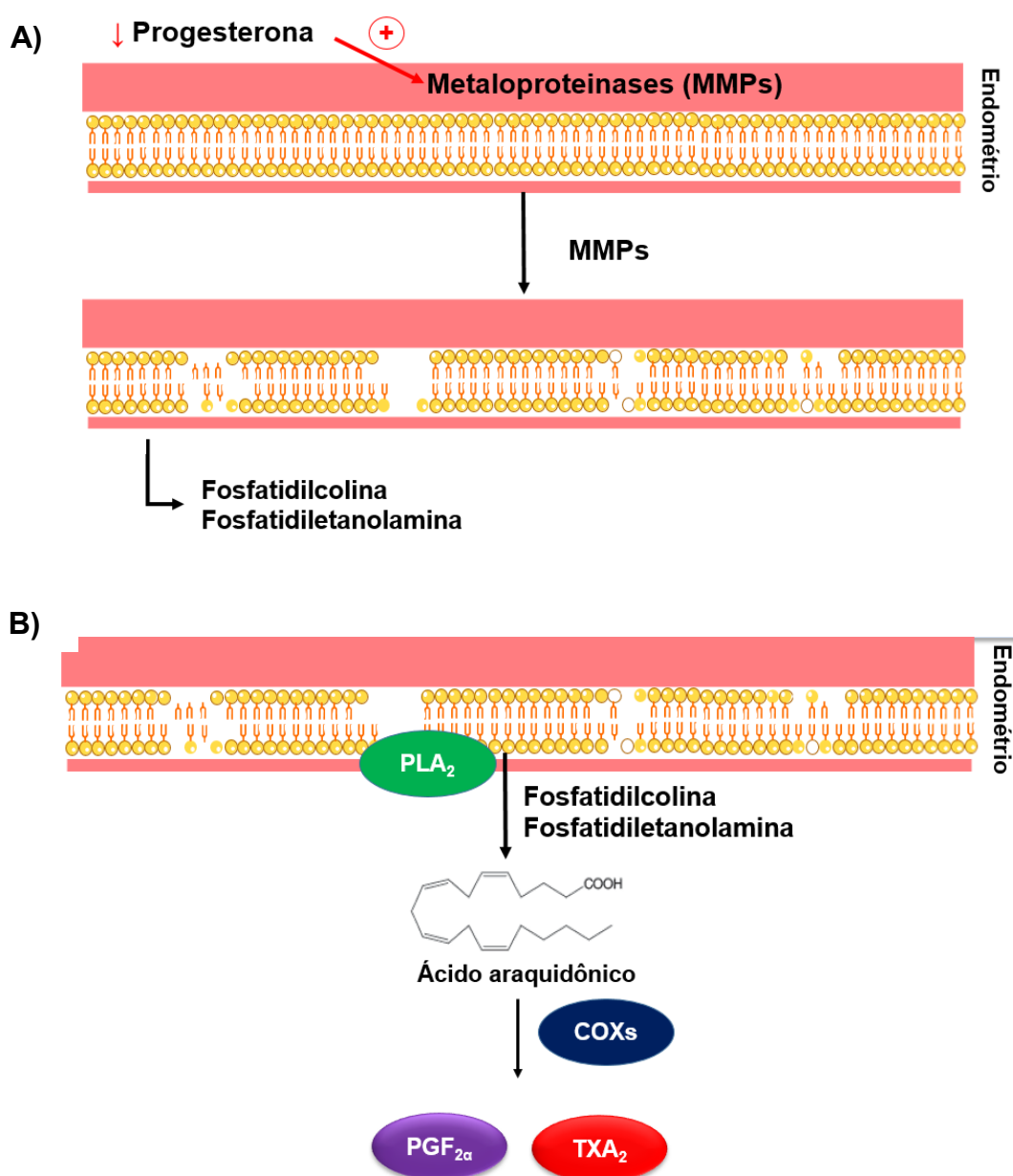
A fisiopatologia da doença ainda não é totalmente esclarecida, mas as teorias mais aceitas demonstram um papel importante do aumento nos níveis de prostaglandinas liberadas pelo endométrio durante a menstruação. O início da menstruação, promove apoptose das células endometriais que fornece substrato aumentado para o processo de síntese de PGs, quando a PLA₂ converte os fosfolipídios das membranas celulares em ácido araquidônico, que por ação da COX-2, leva ao aumento principalmente de PGE₂ e PGF_{2α} (PAN et al., 2014; SUN et al., 2017; SMITH, 2018)

Visto isso, acredita-se que a alteração dos níveis hormonais durante o ciclo menstrual pode regular a estabilidade das camadas uterinas, um dos hormônios que regulam a atividade uterina, é a progesterona, é bem descrito que níveis elevados de progesterona tendem a inibir as ações das metaloproteinases (MMPs), enquanto níveis diminuídos desse hormônio tendem a estimular a atividade dessas enzimas (DAWOOD, 1995; HOFMEYR, 2010).

Nesse contexto, com a diminuição da progesterona que acompanha a regressão do corpo lúteo na fase lútea tardia do ciclo menstrual resulta na estimulação das metaloproteinases endometriais, as MMPs reguladas positivamente degradam o tecido endometrial, liberando fosfolipídios da membrana celular, promovendo a liberação de substrato para ação das fosfolipases uterinas como a PLA₂ que convertem os fosfolipídios disponíveis em ácido araquidônico,

que é então convertido em PGs como PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ e tromboxano, via pela ação das ciclooxygenases. Notavelmente, a expressão de COX-2 é maior durante a menstruação, e os produtos finais formados (PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) se apresentam aumentados nas secreções menstruais em mulheres com DisP, quando comparadas a mulheres saudáveis (Figura 6) (AGÚNDEZ et al., 2015; FOLABOMI et al., 2018).

Figura 6 – Regulação da produção de prostaglandinas pela progesterona no útero



(A). A diminuição dos níveis de progesterona durante a menstruação, leva a ativação de metaloproteinases uterinas presentes no endométrio. A ativação dessas enzimas promove a clivagem da matriz extracelular do endométrio, resultando na liberação de fosfolípidos

de membrana. **(B)** A PLA₂ atua sobre os fosfolipídeos liberados, convertendo-os em ácido araquidônico, que serve como substrato para ação das ciclooxigenases, promovendo a formação principalmente de prostaglandinas PGE₂ e PGF_{2α}.

Fonte: Adaptado de OLADOSU; HELLMAN, 2018.

A formação das prostaglandinas, estão envolvidas na patogênese da dismenorreia primária, a PGF_{2α} estimula potente constrição dos vasos sanguíneos uterinos, exibindo uma particular importância na etiologia deste distúrbio (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011). Entretanto, a PGE₂ pode estimular a contração ou relaxamento uterino, essa variação do seu efeito depende do subtipo de receptor que irá se ligar (BREYER et al., 2001), além disso, esta prostaglandina promove indução adicional da dor (BLEY et al., 1998). O aumento contratilidade uterina, mediante atuação dessas substâncias aumenta a pressão uterina, desencadeando hipóxia, isquemia local e podendo levar a sensibilização dos nervos periféricos por ativarem nociceptores, levando à estimulação dolorosa (DAWOOD, 2006).

Adicionalmente, outros agentes também regulam a contratilidade miometrial, como ocitocina e vasopressina, estudos já demonstraram um aumento nos níveis plasmáticos desses hormônios, em mulheres com dismenorreia (MECHSNER et al., 2010). Além da contração uterina, esses agentes podem também provocar vasoconstrição em pacientes com dismenorreia, dessa forma podendo contribuir com o processo de isquemia e hipóxia nos quadros de dismenorreia (AKERLUND, 1993).

Nesse sentido, estudos relatam a expressão dos receptores de ocitocina (OT) aumentados em quadros de DisP, desencadeado pelo aumento nos níveis de estrogênio, que por via transcricional aumentam sua expressão, desencadeando aumento da contratilidade uterina, e modulando através da ativação dos receptores OT a regulação positiva da PLA₂ e da COX-2, gerando a formação de PGs principalmente, da PGF_{2α} pelas células endometriais, que são armazenadas em depósitos localizados no endométrio uterino (WILSON; LIGGINS; WHITTAKER, 1988; BURNS et al., 2001; ARROWSMITH, 2021).

Nesse contexto, recentemente vem sendo descrito um papel importante do estresse oxidativo na fisiopatologia da DisP. Os mecanismos envolvidos no desbalanço do estresse oxidativo como um dos reguladores da patogênese da DisP, ainda é recente, portanto, alguns passos nessa sinalização ainda não são

bem descritos e alguns estudos apresentam controvérsias nesses aspectos. A maioria das pesquisas relatam que o processo de isquemia e hipóxia induzida durante a contração uterina aumentada em quadros de dismenorreia, promovem à diminuição do fluxo sanguíneo para o miométrio e esse evento pode desencadear o acúmulo de radicais livres, como as EROs (SIRMALI et al., 2007; DIKENSOY et al., 2008).

Os radicais livres são os produtos de reações biológicas e a superprodução de EROs tem sido implicada na patogênese da dismenorreia. O oxigênio é um elemento necessário para a vida, e o metabolismo oxidativo representa a principal fonte de energia para as células. Os sistemas biológicos apresentam defesas contra a geração de EROs exacerbadas, em que na fisiologia uterina, gera-se um equilíbrio adequado entre pró-oxidantes e antioxidantes. A geração do desbalanço oxidativo, ocorre mediante por exemplo, a geração de EROs excessivas ou quando os mecanismos de defesa antioxidantes estão desregulados (TURHAN et al., 2013; SANTANAM et al., 2013; SZMIDT et al., 2020).

Nesse sentido, as EROs mais estudadas e conhecidas envolvidas na sinalização de processos celulares são o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Esses radicais livres são instáveis e altamente reativos, mas podem se tornar estáveis reagindo com elétrons de lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos por exemplo, causando uma cascata de reações, sendo uma das mais conhecidas dessas reações a peroxidação lipídica, que pode resultar em danos celulares capazes de promover doenças. Dessa forma, em condições fisiológicas no organismo existem mecanismos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, que visam regular a geração e combater o excesso dos radicais livres. Os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD) que promove a dismutação do ânion superóxido levando a formação de H_2O_2 , a glutathione peroxidase (GPx) que removem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) de forma indireta, usando-o como substrato para a oxidação de glutathione reduzida (GSH), e a catalase enzima que catalisa a decomposição direta do peróxido em oxigênio e água. Já os antioxidantes não enzimáticos são compostos sintéticos ou suplementos alimentares, como vitamina C, vitamina E, β -caroteno, selênio e zinco que reduzem as EROs no organismo (PIERCE et al., 2004; LU et al., 2018).

Visto isso, o desbalanço oxidativo no sistema reprodutor feminino geram alterações induzidas pelo aumento das EROs nas proteínas e DNA da célula que resultam na alteração da função celular alterada ou ativação de cascatas de sinalização que, resultam em dano e inflamação endometrial e miometrial (GÜNEY et al., 2008; GÜNEY, 2012).

Acredita-se que a hipóxia/isquemia, leva ao aumento do estresse oxidativo na dismenorreia primária, desencadeando um aumento na produção de EROs, espécies reativas de nitrogênio (RNS) e peróxidos lipídicos, enquanto as defesas antioxidantes são reduzidas, incluindo as enzimas SOD, GPx e CAT, o que resulta no desbalanço do *status* oxidativo e aumento do estresse oxidativo sistêmico, devido a danos no DNA e aumento da resposta inflamatória (LU et al., 2018; TENÓRIO et al., 2019).

Esses efeitos ocorrem por meio da produção de citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina- (IL-6), bem como na redução na produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10. Na resposta inflamatória, observa-se o aumento de genes que podem resultar no aumento do estresse oxidativo, principalmente do fator nuclear kappa B (NF- κ B), localizado no citoplasma celular. Além disso, as EROs oxidam o complexo I κ B quinase (IKK), levando a a liberação de NF- κ B, que é formado pelas subunidades p50 e p65. Dessa forma, o NF- κ B por ser um fator nuclear, entra no núcleo da célula e promove a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , resultando no aumento da inflamação uterina ocasionada pela dismenorreia primária (LU et al., 2018; TENÓRIO et al., 2019).

Ademais, além do processo inflamatório, a DisP também resulta em disfunção endotelial nos vasos uterinos devido à biodisponibilidade reduzida de óxido nítrico (NO), resultado da reação desse gás, com o ânion superóxido formando peroxinitrito, que por sua vez, pode levar a ativação de enzimas e proteínas regulando positivamente a contratilidade uterina, como por exemplo através da ativação da proteína cinase C (PKC), resultando no aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e ainda na ativação das ciclooxigenases através de uma reação com o grupo heme presentes nessas enzimas, promovendo dessa forma o aumento da produção de prostanoídes inflamatórios (GULIAEVA et al., 1998; HIGASHI et al., 2014).

Visto isso, a farmacoterapia para dismenorreia se baseia no tratamento dos sintomas dessa doença, são utilizados como medidas farmacológicas, principalmente aintinflamatórios não esteroidais (AINES) (ibuprofeno) que é o medicamento de primeira linha para a DisP, antiespasmódicos (escopolamina) e anticoncepcionais hormonais. Além disso, podem ser utilizadas medidas não farmacológicas como mudanças alimentares, incluindo aumento na ingestão de substâncias antioxidantes, prática de exercícios físicos e utilização de compressas na região acometida pela dor. (MARJORIBANKS et al., 2010; PROCTOR; FARQUHAR, 2016; RYAN, 2017).

Apesar da ampla disponibilidade de medicamentos para o tratamento da dismenorreia primária, a sua utilização a longo prazo, podem levar ao desenvolvimento de diversos efeitos adversos, como distúrbios gastrointestinais (gastrite e náusea), retenção de líquido e problemas cardiovasculares (risco aumentado de trombose) (RYAN, 2017; GUIMARÃES, 2020).

Diante disso, as buscas por novos tratamentos para a dismenorreia primária vêm crescendo, vislumbrando a diminuição do acometimento das mulheres pelos efeitos adversos causados pelas terapias farmacológicas clássicas e que sejam capazes de suprimir os sintomas desenvolvidos por esse distúrbio. Nesse contexto, os produtos naturais, principalmente os produtos naturais de origem marinha, apresentam grande potencial farmacológico para o tratamento de doenças inflamatórias como a dismenorreia devido a diversos metabólitos e substâncias extraídos de produtos naturais apresentarem potencial anti-inflamatório e antioxidante (ARUSELVAN et al., 2016).

2.4 Produtos naturais marinhos e dismenorreia primária

Os produtos naturais vêm sendo utilizados como fonte de medicamentos por milênios, diversas drogas foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013). Atualmente, destacam-se os estudos com produtos de origem marinha, tendo em vista a ampla distribuição desses pelo mundo e sua pouca exploração. Estudos a respeito das espécies marinhas demonstraram uma ampla abundância e distribuição da vida no oceano, e concluiu que potencialmente

mais de 90% das espécies marinhas permanecem não descritas (SNELGROVE, 2016).

Apesar disso, uma grande diversidade de organismos marinhos estão sendo reconhecidos e estudados pela ciência, muitos já descritos como fonte de compostos que apresentam benefícios a saúde como, ácidos graxos poliinsaturados, polissacarídeos, pigmentos naturais, minerais essenciais, vitaminas e enzimas (SHAHIDI; ALASALVAR, 2011; PANGESTUTI; KIM., 2011). Dentre esses organismos, as algas são identificadas como recursos vegetais subexplorados, apesar de serem usadas há muito tempo como suplementação em dietas alimentares e com propriedades medicinais na medicina tradicional (BURTIN, 2003; KHAN; KONG; KIM, 2010).

O estudo ampliado das algas, descreveu importantes substâncias naturais bioativas extraídas desses produtos. Muitos metabólitos isolados de algas marinhas apresentaram atividades biológicas capazes de promover benefícios à saúde. Um dos componentes majoritários nas algas marinhas são os pigmentos fotossintéticos como a ficocianina, que além dos seus efeitos fotossintéticos e de pigmentação, apresenta diversos benefícios a saúde como efeito antioxidante e anti-inflamatório, outro pigmento importante presente nas algas é o β -caroteno que foi descrito com uma substância antimutagênica, anti-inflamatória e antioxidante (CICCONE et al., 2013; IZADI; FAZILATI., 2018; MIDDAH et al., 2019).

Portanto, o interesse nos metabólitos oriundos das algas tem atraído atenção nas áreas de alimentos, cosméticos e principalmente da química e farmacologia. Visto que, diversas atividades farmacológicas foram descritas para algas marinhas como, a *Eclonia cava* que demonstrou capacidade antimutagênica (inibição da invasão de células A549 em células de câncer de pulmão humano) (LEE et al., 2011); *Eisenia bicyclis* efeito anti-inflamatório (inibiu a produção de óxido nítrico (NO) induzida por LPS em camundongos) (JUNG et al., 2013), *Jania rubens* (atividade bactericida) (MOHY; EL-AHWANY., 2016) e *Spirulina platensis* efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Diminuiu níveis de malondialdeído, TNF- α e IL-6 em ratos diabéticos) (NASIRIAN et al., 2018).

Nesse contexto, vêm se destacando a *Spirulina platensis* (SP) também conhecida como *Arthrospira platensis*, é uma alga verde-azulada, unicelular, microscópica, de estrutura simples, mas que apresenta composição complexa, o

que vêm chamando atenção para os estudos na área da farmacologia (ZEWEIL et al., 2016). A composição da SP é rica em substâncias com propriedades de saúde como nutrientes essenciais e constituintes bioativos, como ácidos graxos poliinsaturados (ácido gama-linolênico), aminoácidos essenciais (arginina, triptofano), enzimas (SOD), vitaminas (B₁₂), minerais (ferro), pigmentos fotossintéticos (β -caroteno, clorofila *a* e ficocianina) e polifenóis (MARKOU, 2014).

Atualmente, a presença de compostos antioxidantes e antiinflamatórios presentes na SP vem sendo estudados vislumbrando sua aplicação no tratamento de várias doenças humanas. Esses compostos desempenham um importante papel na prevenção da formação de radicais livres, em particular, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (RNS). Além disso, o efeito anti-inflamatório da SP parece advir da presença do ácido γ -linolênico (GLA), linoleico e oleico presentes na alga, visto que o ácido γ -linolênico é precursor para formação de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano, ademais, recentemente foi demonstrado que a ficocianina apresenta potente atividade inibidora da COX-2, dessa forma, a SP pode regular a formação de mediadores envolvidos na inflamação e processos imunológicos (SHIH et al., 2009; GUTIÉRREZ-SALMEÁN; FABILA-CASTILLO; CHAMORRO-CEVALLOS., 2015).

Quanto aos aspectos toxicológicos os estudos demonstraram que a alga apresenta segurança para seu uso em humanos, visto que a SP não apresentou toxicidades agudas ou crônicas (GUTIÉRREZ-SALMEÁN; FABILA-CASTILLO; CHAMORRO-CEVALLOS., 2015). Além disso, a SP demonstrou diversas atividades farmacológicas, como melhora da alergia e rinite em humanos (MAO; VAN DE WATER; GERSHWIN., 2015) efeitos antidiabéticos (MANI; DESAI; IYER., 2000) anti-hipertensivo (CARRIZZO et al., 2019) e anticâncer (KONÍCKOVÁ et al., 2014).

No nosso laboratório foram demonstrados alguns efeitos da SP frente a diferentes modelos de músculo liso, foi visto que a suplementação com SP restaurou a reatividade contrátil intestinal em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica (FERREIRA, 2017), em corpo cavernoso potencializou a resposta relaxante em ratos saudáveis e reduziu a reatividade contrátil cavernosa de ratos alimentados com dieta hipercalórica (SOUZA, 2018), diminuiu a resposta contrátil e aumentou os níveis de relaxamento e de nitrito em aorta de ratos Wistar,

indicando maior produção de NO, por diminuir estresse oxidativo e aumentar atividade antioxidante (BRITO et al., 2019), além disso, restaurou a função erétil em ratos obesos e diminuiu o estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico (DINIZ et al., 2020).

Em modelo de músculo liso uterino, a suplementação com a alga preveniu o aumento da eficácia e diminuição da potência do acoplamento eletromecânico da contração em ratas submetidas ao treinamento de força. Em útero de ratas sedentárias, a suplementação com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg promoveu uma leve diminuição da eficácia contrátil no acoplamento eletromecânico induzido pelo KCl (BARROS et al., 2021). Já em útero de ratas Wistar treinadas, observou-se que a alga parece inibir a via Rho/ROCK e diminuir os níveis do ânion superóxido e promoveu diminuição de janus cinase (JNK) mas não alterou a expressão de superóxido dismutase (SOD) e da proteína cinase regulada por sinal extracelular 1 / 2 (ERK1/2), sugerindo que a alga modula negativamente a hipercontratilidade uterina provocada pelo exercício intenso de força, promovendo uma diminuição na formação de EROs e diminuindo a ativação dos Cav em útero de ratas (FERREIRA et al., 2021)

Diante disso, a SP apresentou um papel antioxidante e relaxante protetor em útero de ratas, evidenciando um potencial promissor para a *S. platensis* frente a desordens que possam acometer o sistema reprodutor feminino, como as alterações induzidas pela dismenorreia primária. Com base nisso, este trabalho objetiva padronizar e implantar um modelo de dismenorreia primária e investigar o efeito preventivo da SP sobre alterações da reatividade uterina e folículos ovarianos além da capacidade antioxidante em útero e ovários de ratas Wistar com DisP.

3 Objetivos

3.1 Geral

Padronizar e implantar um modelo experimental de dismenorreia primária no Laboratório de Farmacologia Funcional Professor George Thomas e avaliar os efeitos preventivos da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* frente as alterações de reatividade, histomorfológicas e sobre parâmetros de estresse oxidativo induzidas pela dismenorreia primária em útero e ovário de ratas Wistar.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos da dismenorreia primária e efeitos preventivos da suplementação com *Spirulina platensis* nas alterações *in vivo* e *in vitro* em ratas Wistar sobre:

- Pontuação de contorções de dismenorreia (*In vivo*);
- A reatividade contrátil no acoplamento farmacomecânico frente aos agentes ocitocina e PGF_{2α} e eletromecânico frente ao KCl;
- A reatividade relaxante no acoplamento farmacomecânico frente a isoprenalina e eletromecânico frente ao nifedipino;
- Estresse oxidativo (níveis de malondialdeído e capacidade antioxidante total) em útero e ovários;
- Parâmetros histomorfométricos em útero (espessura das camadas miometrial e endometrial) e ovários (folículos ovarianos).

4 Capítulo 7

Lacerda-Júnior, 2022**4 Capítulo I: Padronização e implantação do método de dismenorreia primária em útero de rata Wistar****4.1 Material****4.1.1 Animais**

As ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 8 semanas de idade (180 – 200g), eram provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Previamente, as ratas eram mantidas sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo pellets (Nuvilab®) e livre acesso a água, com 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. Os experimentos eram realizados no período de 8 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios de cuidados com animais seguindo “Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies” (SHERWIN et al., 2003) e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão N° 2240150621 e 1886010520) da UFPB (Anexos 1 e 2).

4.2 Grupos experimentais

As ratas, foram divididas randomicamente em quatro grupos experimentais: (1) grupo controle (GC); (2) ratas com dismenorreia primária (DisP); (3) ratas com dismenorreia primária tratadas com escopolamina e dipirona (Esc+Dip) (1,2 mg/kg) e (4) ratas com dismenorreia primária tratadas com ibuprofeno (IBU) (50 mg/kg).

4.3 Substâncias e reagentes

Para a realização dos experimentos funcionais: O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de magnésio di-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o

Lacerda-Júnior, 2022

cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), isoprenalina e nifedipino foram obtidos da Sigma-Aldrich.

O dietilestilbestrol e a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) foram obtidos da Cayman Chemical Company (EUA). A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil). Estas substâncias foram mantidas em um “freezer” à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os anestésicos utilizados para eutanásia dos animais foram adquiridos em farmácia comercial a xilazina (2%) da syntec farmacêutica e a cetamina (50 mg/mL) da cristália farmacêutica.

Todas foram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o dietilestilbestrol, que era dissolvido em álcool etílico absoluto para obtenção da solução-estoque. Quando necessário, essas soluções-estoque eram diluídas para obtenção de concentrações apropriadas para cada protocolo experimental.

O ibuprofeno (50 mg/kg / v.o) foi adquirido em farmácia comercial, produzido pela Medley farmacêutica e a escopolamina com dipirona (6,67 e 333,4 mg/mL respectivamente / v.o) da Neo Química farmacêutica, ambos medicamentos foram adquiridos na forma farmacêutica de solução oral em gotas.

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

Para avaliação histomorfométrica e de estresse oxidativo: a eosina, e hematoxilina de Mayer, ácido tiobarbitúrico (0,6%), o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e o 1,1,3,3-tetrametoxipropano foram adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil). O formaldeído e ácido perclórico (35%) foram adquiridos da Vetec (Brasil), o formol foi utilizado para conservar as amostras de tecidos utilizadas para realização dos cortes histológicos.

4.4 Solução nutritiva

Era utilizada a solução nutritiva de Locke Ringer para a realização dos experimentos (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997), que tinha seu pH ajustado para 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH, 1N, e gaseificada com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuja composição está descrita abaixo:

Composição da solução de Locke Ringer (mM): NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl₂ (2,1), CaCl₂ (2,2), glicose (5,6), NaHCO₃ (6,0).

4.5 Equipamentos

Para obtenção e registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) de modelo BOI-04 conectadas a transdutores de força isométricos de modelo TIM 05 e acoplados a um amplificador modelo AECAD04F, que por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 proporcionado aquisição dos dados e ANCAD para análise destes (Figura 7). Conectado ao sistema que possui uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos utilizados nos experimentos funcionais foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias utilizadas eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

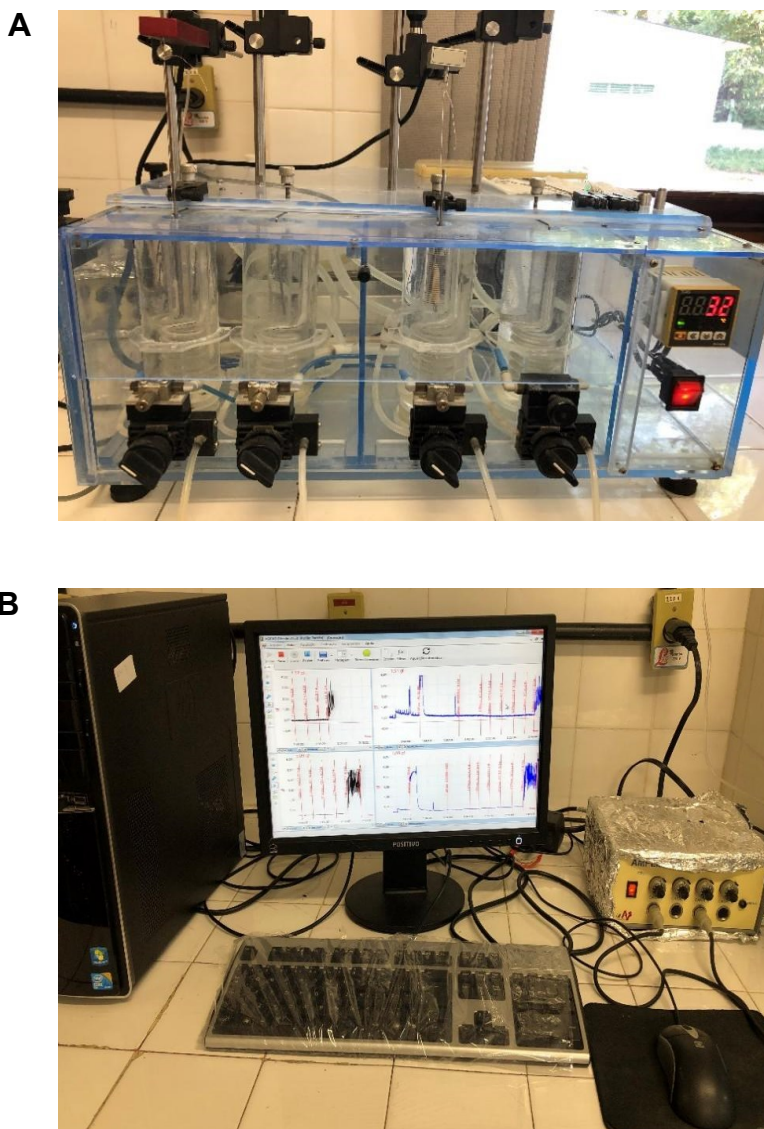
Todos os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

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

Para os experimentos de estresse oxidativo, as amostras utilizadas foram centrifugadas em aparelho refrigerado, modelo VS-15000 CFN II (VISION, Coreia do Sul) e centrifuga de bancada, modelo NI 1811- A (NOVA instruments, SP, Brasil). Para a leitura das absorbâncias e realização da dosagem de MDA e do teste da capacidade antioxidante total (CAT) era 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).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 7– A) Sistema de banho para órgãos isolados, composto por cubas de vidro, transdutores isométricos e bomba termostática; **B)** amplificador e sistema de aquisição digital.



Fonte: Autor, 2022.

4.6 Métodos

4.6.1 Padronização do modelo de dismenorreia em ratas Wistar

4.6.1.1 Abordagem *In vivo*

4.6.1.1.1 Protocolo de indução da dismenorreia

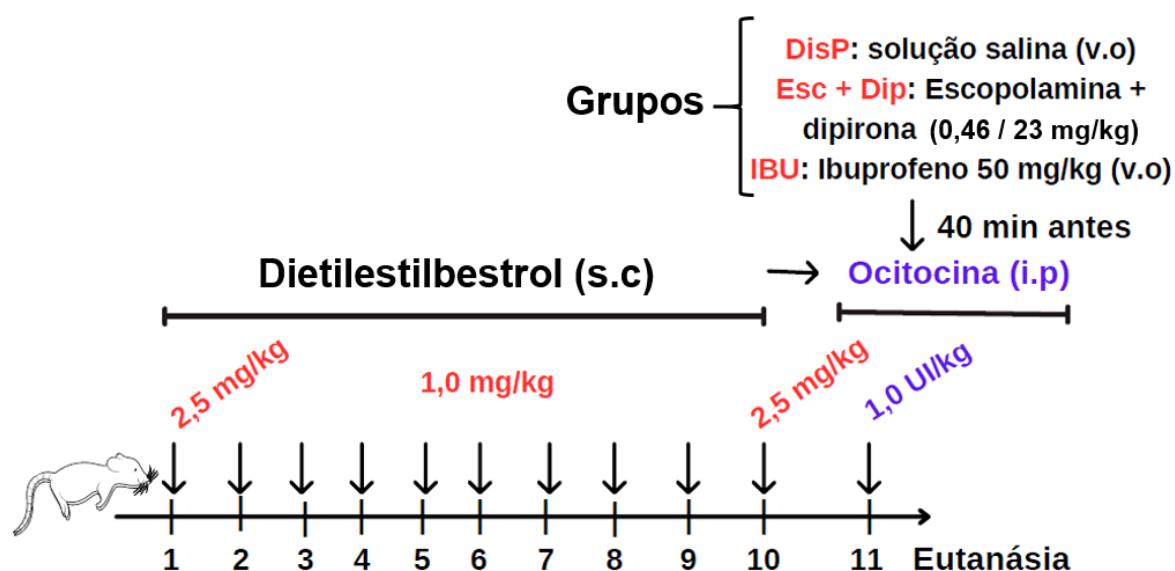
Lacerda-Júnior, 2022

Para a indução da dismenorreia, era injetado nos animais dietilestilbestrol (s.c) uma vez ao dia por 10 dias consecutivos, sendo no 1º (primeiro) e 10º (último) dia (2,5 mg/kg) e 1 mg/kg do 2º (segundo) ao 9º (nono) dia. Após 24 horas da última administração, era injetado ocitocina (i.p) 1 UI/kg nos animais (Figura 8) (CHEN et al., 2013).

Os animais do grupo controle eram tratados somente com solução salina durante todos os dias de tratamento e 24h antes da realização do experimento era administrado 1 mg/kg de dietilestilbestrol para padronização do ciclo estral dos animais. Já os animais tratados com as drogas padrão (Esc+Dip ou IBU) receberam 1h antes da administração de ocitocina, via oral com auxílio do método de gavagem butilbrometo de escopolamina com dipirona ou ibuprofeno, respectivamente.

Após os tratamentos, as ratas eram eutanasiadas por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de decapitação por guilhotina, e o útero e ovário eram removidos para análises posteriores (HU; JIN, 1999; ETTEN., 2002; LIU et al., 2011).

Figura 8 – Protocolo de indução da dismenorreia



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2013.

4.6.1.1.2 Pontuação de contorções

Os critérios de pontuação para os experimentos comportamentais dos animais eram realizados mediante a atribuição de *scores* para cada movimento de contorção apresentado pelos animais, a fim de avaliar a dismenorreia primária experimental. Para isso, os animais eram colocados em uma caixa de vidro, após a administração de ocitocina e eram observados durante 30 minutos por dois avaliadores, que passaram por treinamentos prévios de calibração para avaliação comportamental. Os *scores* atribuídos a cada padrão comportamental estão apresentados no quadro a seguir e eram aplicados para cálculo da pontuação de contorção, usando a seguinte fórmula descrita na equação a seguir: (SCHMAUSS; YAKSH, 1984; XIAO et al., 2019).

Equação 1:

$$\text{Pontuação} = \Sigma (\text{número de repetições} \times \text{scores})$$

Quadro 1 – Scores para padrão comportamental dos animais

Scores	Características
0	Postura normal;
1	Lado oblíquo do corpo;
2	Dorsiflexão da pata traseira;
2	Extensão do corpo com rotação lateral pélvica frequente;
3	Contração do músculo abdominal;
3	Extensão dos membros posteriores.

Quadro de pontuação em scores para o padrão comportamental apresentado pelos animais, **0)** animais com postura normal; **1)** Movimentos para o lado oblíquo do corpo; **2)** Movimento de dorsiflexão da pata traseira ou extensão do corpo com rotação pélvica frequente; **3)** Contração do músculo abdominal ou extensão dos membros posteriores.

Fonte: SCHMAUSS; YAKSH, 1984; XIAO et al., 2019.

Lacerda-Júnior, 2022

4.6.1.2 Abordagem *In vitro***4.6.1.2.1 Avaliação da reatividade uterina****4.6.1.2.1.1 Preparação do útero de ratas**

Após a eutanásia das ratas conforme descrito no item 4.6.1.1.1 a cavidade abdominal era aberta com um corte longitudinal, o útero retirado e limpo de todo o tecido conjuntivo e adiposo. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva de Locke Ringer, aquecidas a 32 °C e gaseificados com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂).

Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneceram em repouso por 40 minutos, tempo necessário para estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997). Após o período de estabilização, era induzida uma contração para verificação da funcionalidade do órgão que deveria ser maior ou igual 1g para considerar o órgão funcional, esta contração induzida com 60 mM de KCl, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, para verificação da funcionalidade do órgão

4.6.1.2.1.2 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade contrátil farmacomecânica induzida por ocitocina ou PGF_{2α} em útero de ratas Wistar

Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas consecutivas com concentrações cumulativas de ocitocina ou PGF_{2α}. Os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero do grupo com dismenorreia com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle (HEYLEN et al., 2008).

Lacerda-Júnior, 2022**4.6.1.2.1.3 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade contrátil eletromecânica induzida por KCl em útero de ratas Wistar**

Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas consecutivas com concentrações cumulativas ao KCl. Os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero do grupo com dismenorreia com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle (HEYLEN et al., 2008).

4.6.1.2.1.4 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade relaxante induzida por isoprenalina em útero de ratas Wistar

Após o período de estabilização, uma contração com ocitocina foi induzida e durante o componente tônico da contração, a isoprenalina era adicionada de maneira cumulativa à cuba no grupo com dismenorreia e no grupo controle (HEYLEN et al., 2008).

4.6.1.2.1.5 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade relaxante induzida por nifedipino em útero de ratas Wistar

Após o período de estabilização, uma contração com KCl foi induzida e durante o componente tônico da contração, o nifedipino era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações distintas no grupo com dismenorreia e no grupo controle (HEYLEN et al., 2008).

4.6.1.2.2 Avaliação das alterações histopatológicas do útero e ovário induzidas pela dismenorreia primária

As amostras de útero e ovários de cada rata eram isoladas e fixadas em solução de formaldeído tamponado 10% e incluídos em parafina. Posteriormente, eram cortados em micrótomo (espessura de 4 µm), montadas em lâminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, logo após eram hidratadas em álcool absoluto em concentrações decrescentes por 25 minutos e

Lacerda-Júnior, 2022

lavados em água corrente por 5 minutos, depois eram lavados em água destilada. As amostras eram tratadas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destilada por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e, após também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos.

Finalmente as lâminas eram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan.

Foram analisados os seguintes parâmetros nos cortes uterinos: a espessura das camadas uterinas endométrio e miométrio, o número das glândulas uterinas e vasos sanguíneos. Nos ovários foram avaliados: o número de folículos graafianos (maduros), folículos primários e secundários (antrais) (MOSAVAT et al., 2019). As fotomicrografias das lâminas eram capturadas através de câmera acoplada a um microscópio óptico. Para a metodologia empregada no imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi utilizado método descrito por Caliari (1997).

4.6.1.2.3 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes de ratas Wistar

4.6.1.2.3.1 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino

Após a eutanásia dos animais, os cornos uterinos e os ovários eram isolados, coletados e armazenados, congelados a -20 °C até a preparação do homogenato. Para realização do homogenato, o tecido era pesado, macerado e homogeneizado com KCl 10% na proporção de 1:1. Logo após, as amostras eram centrifugadas (1.198 x g/10 min) e era realizada a coleta do sobrenadante para análise posterior.

4.6.1.2.3.2 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido uterino e ovariano

A quantificação da produção de malondialdeído (MDA) era realizada por meio do método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Após a obtenção do

Lacerda-Júnior, 2022

homogenato uterino e ovariano, alíquotas de 250 µL eram incubadas a 37 °C em banho-maria por 60 minutos. Em seguida, as amostras eram precipitadas com 400 µL de ácido perclórico 35% e centrifugadas a 16.851 x g por 20 minutos a 4 °C. Logo após, as amostras do sobrenadante eram transferidas 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 obtida comparando 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).

Por fim, a medida da capacidade antioxidante total (CAT) era feita utilizando o método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). O experimento era realizado utilizando tubos apropriados para centrifuga, em seguida eram adicionados 50 µL do homogenato uterino ou ovariano e 2 mL da solução de DPPH dissolvido em etanol absoluto (0,012 g/L) e os tubos eram protegidos da luz; em seguida, os tubos eram agitados em vórtex por 10 segundos e, então, mantidos em repouso por 30 minutos. Após esse procedimento, 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:

Equação 2:

$$\text{CAT} = 100 - ([\text{DPPH} \cdot \text{R}] \times \text{T}) / ([\text{DPPH} \cdot \text{R}] \times \text{B}) \times 100$$

Sendo $[\text{DPPH} \cdot \text{R}] \times \text{T}$ e $[\text{DPPH} \cdot \text{R}] \times \text{B}$ 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 ($\mu\text{mol/L}$ de amostra) ou da CAT (%) entre os grupos GC, DisP, Esc+Dip, IBU.

4.6.1.2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância *one way* (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, sendo as diferenças entre as médias consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os valores de $p\text{CE}_{50}$ foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados. Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Para reatividade contrátil do útero de rata era avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logaritmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo ($p\text{CE}_{50}$) da ocitocina, KCl ou $\text{PGF}_{2\alpha}$ para os animais com dismenorreia primária e comparados com o grupo controle. A reatividade relaxante era analisada como a percentagem reversa da contração induzida por ocitocina ou KCl e os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante do útero das ratas do grupo com dismenorreia primária com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

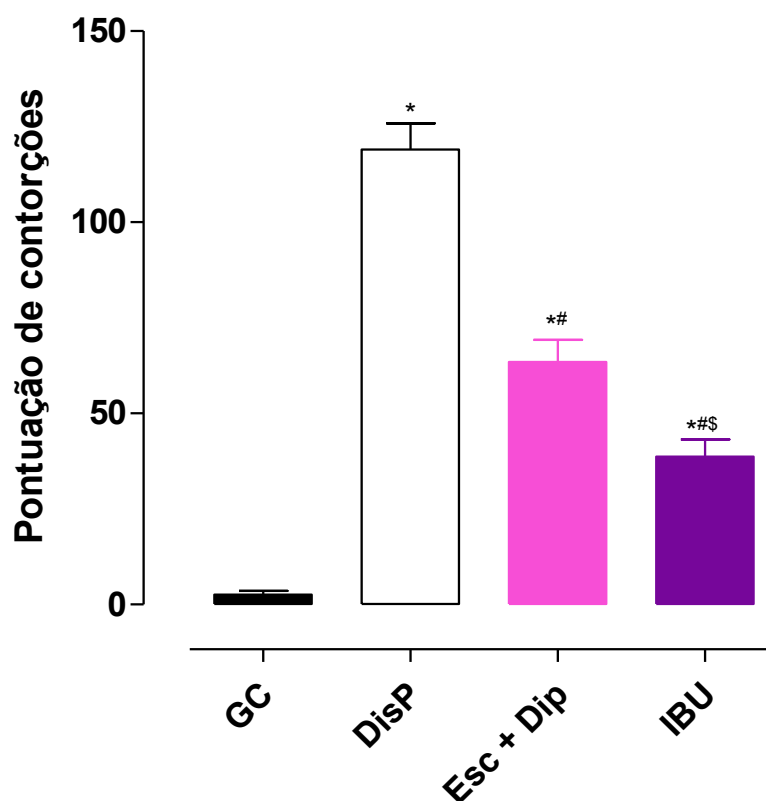
Os resultados das análises histopatológicas e do estresse oxidativo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se análise de variância *one way* (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, sendo as diferenças entre as médias consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4.7 Resultados**4.7.1 Pontuação de contorções do modelo experimental de dismenorreia primária em ratas Wistar**

Ao analisarmos a pontuação de contorção induzidas pelo método experimental de dismenorreia primária em ratas Wistar, observamos que a pontuação do grupo DisP ($119 \pm 6,9$) foi aumentada quando comparado com o grupo controle (GC) ($3,0 \pm 1,0$). Já os grupos tratados com as drogas padrão escopolamina e dipirona (Esc +Dip) ($64,0 \pm 5,8$) e ibuprofeno (IBU) ($39,0 \pm 4,5$), apresentaram uma diminuição na pontuação de contorção ao compararmos com o grupo DisP.

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 1 – Pontuação referente as contorções dos grupos, GC, DisP, Esc+Dip e IBU em ratas Wistar.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 10$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP); # $p < 0,05$ (DisP vs. Esc+Dip; IBU), e \$ $p < 0,05$ (IBU vs. Esc+Dip).

Fonte: Autor, 2022.

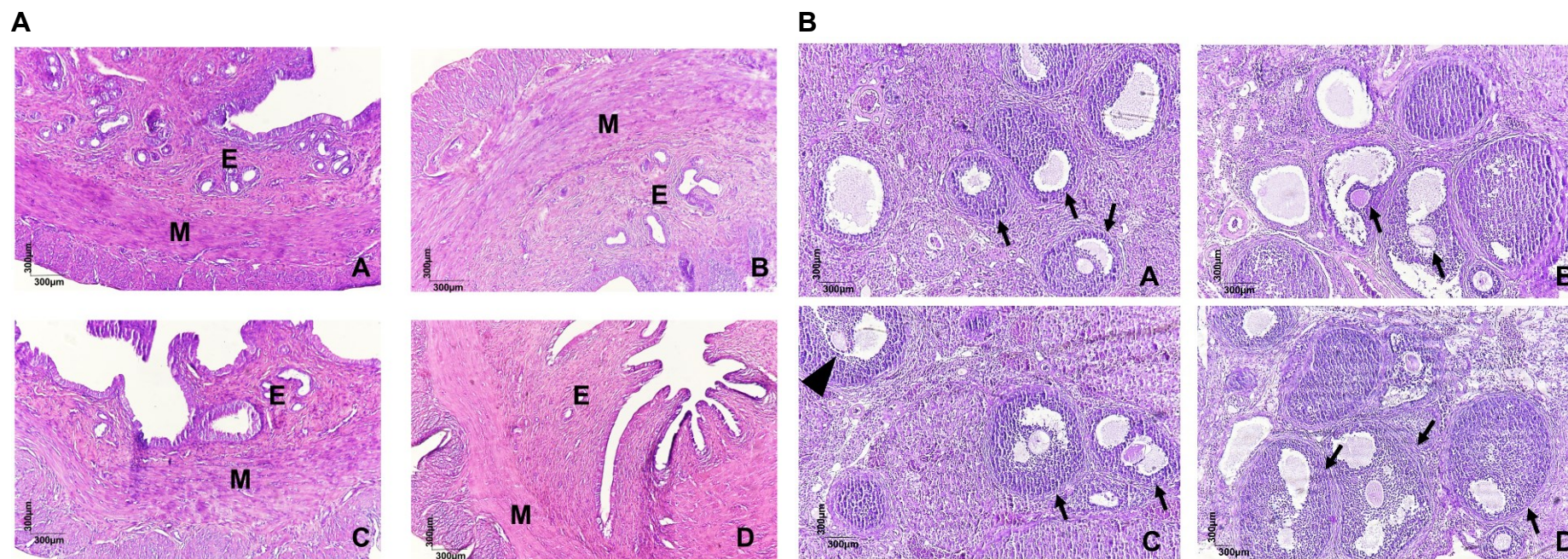
4.7.2 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária sobre os parâmetros histomorfométricos do útero e ovários em ratas Wistar

No corte histológico de útero (Figura 9A) corado em hematoxilina e eosina mostrando partes do órgão, destacando o endométrio (E) e o miométrio (M). Nos animais do grupo GC (A), observa-se o endométrio histologicamente preservado, conformações glandulares circulares e ausência de lesão morfológica. Diferentemente nos grupos DisP, Esc + DiP e IBU, observa-se glândulas endometriais desorganizadas e danos no tecido endometrial (E), além do espessamento da camada miometrial (M) quando comparado ao GC.

Ao analisar a camada miometrial (M), os dados morfométricos indicam que ao comparar as ratas do GC ($289,2 \pm 3,8 \mu\text{m}^2$), o grupo DisP ($582 \pm 11,5$) aumentou. Já os grupos tratados com as drogas padrão Esc + Dip ($586,2 \pm 4,6 \mu\text{m}^2$) e IBU ($528,8 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$) não reverteram o aumento quando comparados ao grupo DisP (Gráfico 2).

No corte histológico dos ovários (Figura 9B) corado em hematoxilina e eosina, observa-se neste órgão a presença majoritária de folículos secundários em todos os grupos GC, DisP, Esc + DiP e IBU.

Figura 9 – Efeito da dismenorreia primária sobre a morfologia do útero (A) e ovários (B) de ratas Wistar, nos grupos GC (A), DisP (B), Esc + Dip (C), IBU (D).

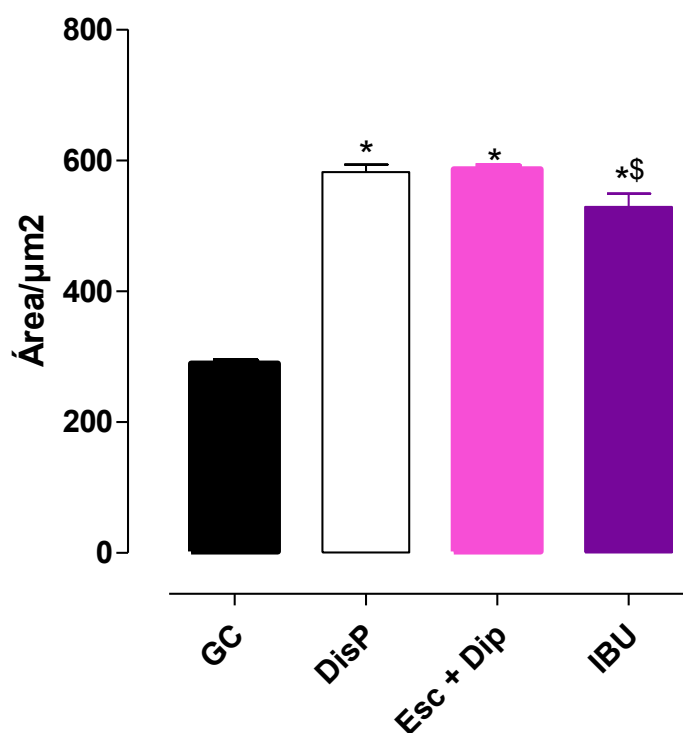


Fotomicrografia de útero (A) e ovários (B) de rata em GC (A), DisP (B), Esc + Dip (C) e IBU (D). Em útero (A) observa-se o endométrio (E); miométrio (M). Nos ovários (↑) indicam folículos secundários e os (▲) indicam folículos de graaf. GC = grupo controle; DisP = grupo dismenorreia primária; Esc + Dip = grupo dismenorreia primária + escopolamina com dipirona (1,2 mg/kg); IBU = grupo dismenorreia primária + ibuprofeno (50 mg/kg).

Fonte: Autor, 2022.

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 2 – Efeito da dismenorreia primária sobre a área muscular em útero de rata, nos grupos GC, DisP, Esc + Dip e IBU.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 10). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP, Esc + Dip, IBU); e \$ $p < 0,05$ (IBU vs. Esc+Dip).

Fonte: Autor, 2022.

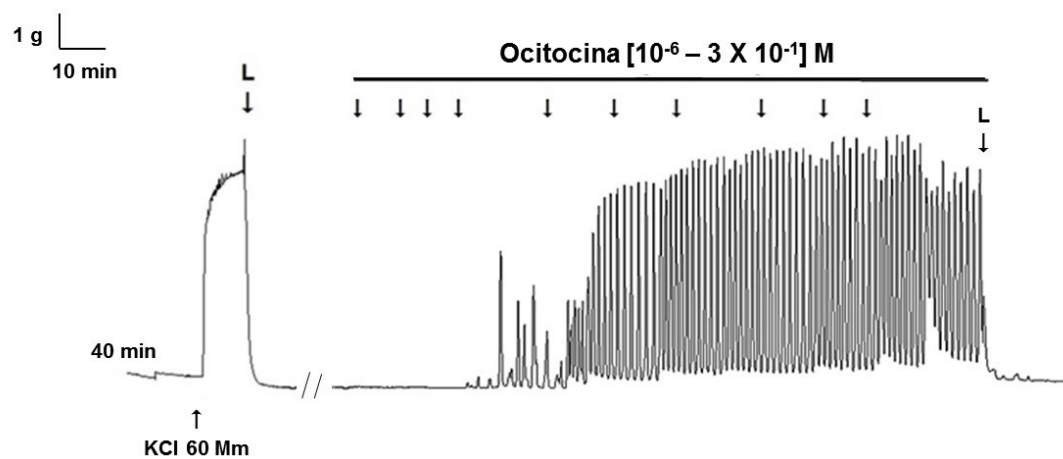
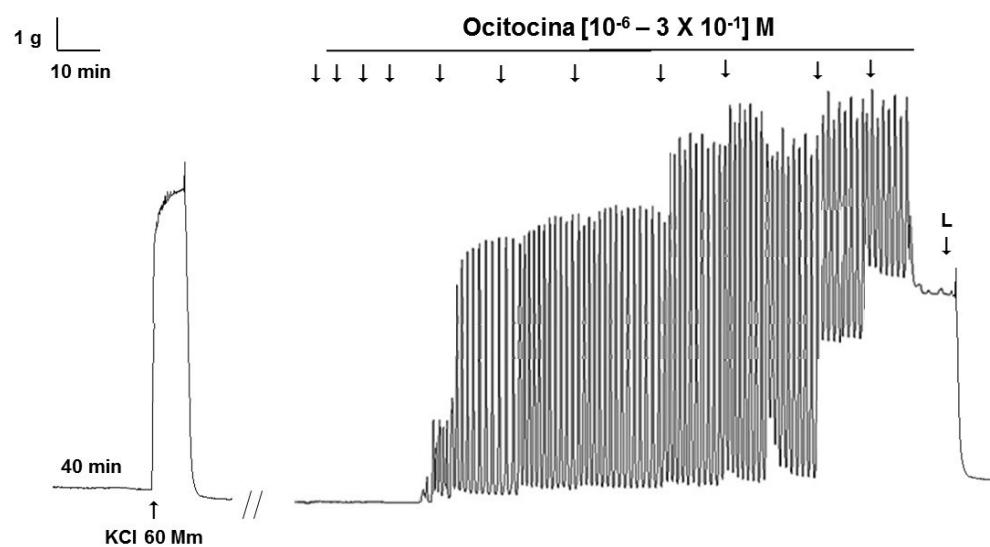
4.7.2 Efeitos da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de contração em útero de ratas Wistar

4.7.2.1 Efeitos da dismenorreia primária sobre a reatividade contrátil induzida por ocitocina ou PGF_{2α} em útero de ratas Wistar

Nos resultados obtidos, observa-se que a curva de contração cumulativa de ocitocina do grupo DisP foi deslocada para a esquerda com aumento da potência contrátil ($pCE_{50} = 3,6 \pm 0,2$) e do efeito máximo ($E_{max} = 145,1 \pm 8,7$) do agonista quando comparado com o GC ($pCE_{50} = 3,1 \pm 0,1$ e $E_{max} = 100\%$) respectivamente (Gráfico 3A e Tabela 1).

Ao avaliarmos as alterações de reatividade frente ao agonista PGF_{2α}, observou-se que a curva do grupo DisP apresentou um deslocamento para a esquerda, aumentando a potência do agonista ($pCE_{50} = 7,4 \pm 0,2$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 6,2 \pm 0,1$). De forma semelhante, observou-se um aumento no efeito máximo da PGF_{2α} no grupo DisP ($E_{max} = 127,3 \pm 15,6$) quando comparado ao GC ($E_{max} = 100\%$) (Gráfico 3B e Tabela 1).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 10 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com ocitocina GC (A) e DisP (B) ou PGF_{2α} GC (C) e DisP (D) em útero isolado de rata.**A****B**

Lacerda-Júnior, 2022

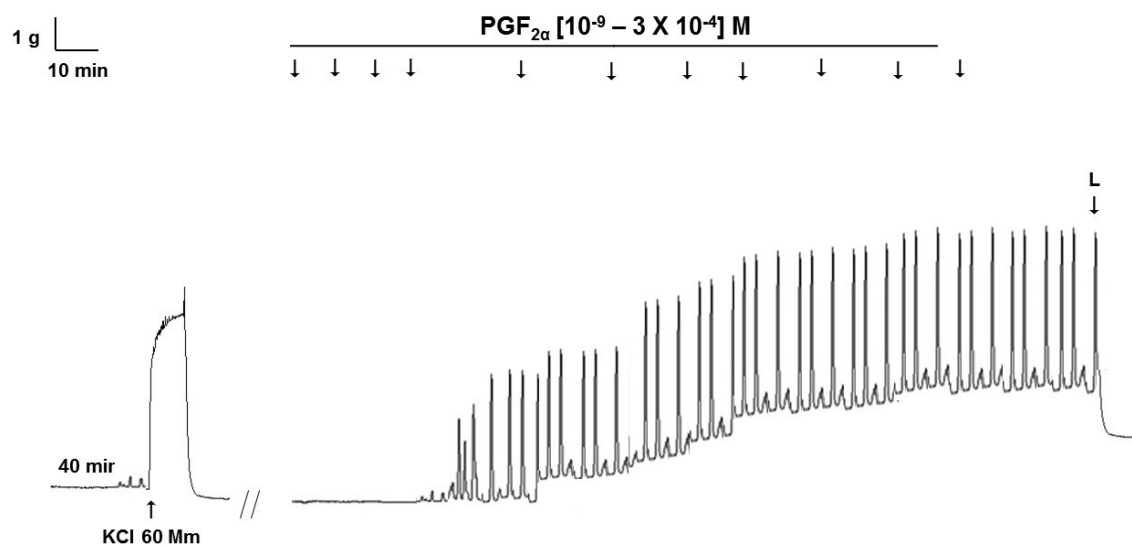
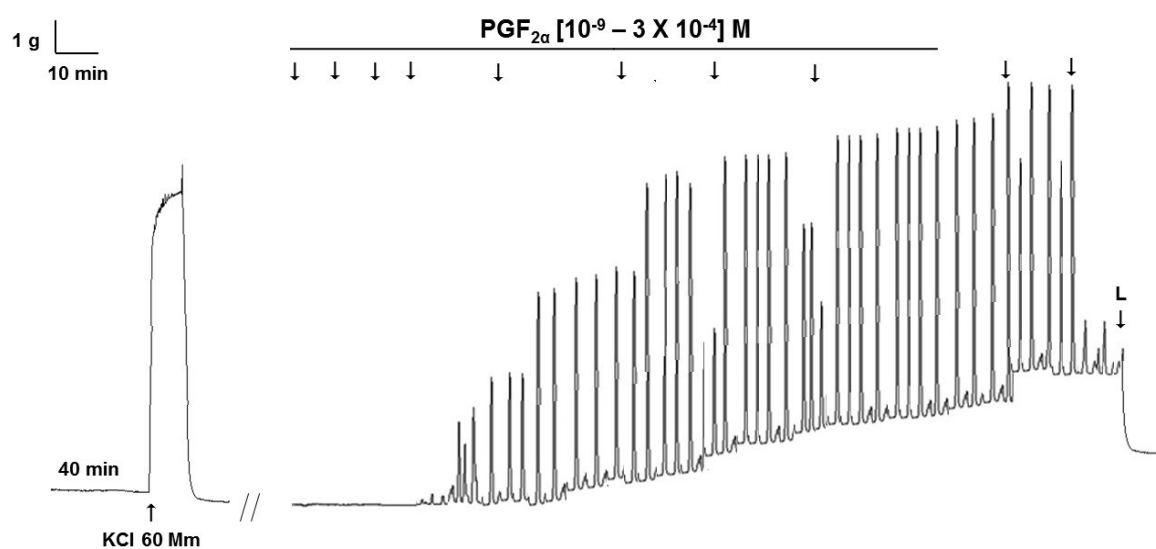
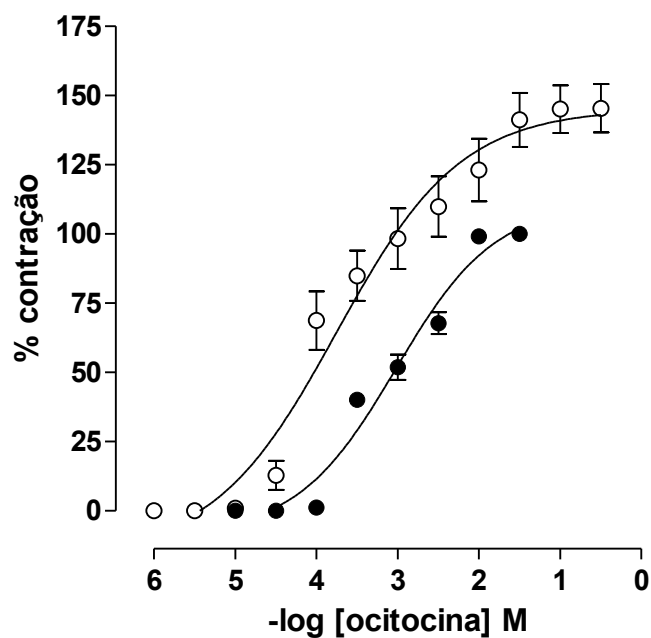
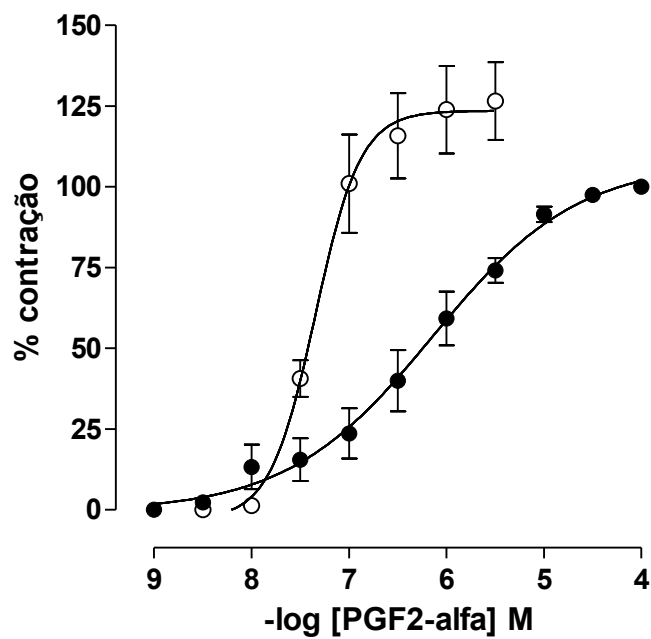
Figura 11 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Gráfico 3 – Curvas concentração-resposta cumulativas a ocitocina (A) ou PGF_{2α} (B) dos grupos, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.

A



B



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). Teste *t*; DisP = grupo dismenorrea primária e GC = grupo controle.

Lacerda-Júnior, 2022

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 1 – Valores de E_{\max} e de pCE_{50} da ocitocina e $PGF_{2\alpha}$ em útero isolado de rata, nos GC e DisP.

Agentes	Grupos	E_{\max} (%)	pCE_{50}
Ocitocina	GC	100	$3,1 \pm 0,1$
	DisP	$145,1 \pm 8,7^*$	$3,6 \pm 0,2^*$
$PGF_{2\alpha}$	GC	100	6,2
	DisP	$127,3 \pm 15,6^*$	$7,4 \pm 0,2^*$

Teste t , $*p < 0,05$ (DisP vs. GC), ($n = 5$). GC = grupo controle; DisP = grupo com dismenorreia primária.

Fonte: Autor, 2022.

4.7.3 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento eletromecânico de contração induzida por KCl em útero de ratas Wistar

Avaliando as alterações da dismenorreia primária no acoplamento eletromecânico induzida pelo KCl, observou-se que no grupo DisP, a curva de contração cumulativa induzida por KCl foi deslocada para a esquerda, com aumento da potência do agente contrátil ($pCE_{50} = 2,2 \pm 0,1$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 1,8 \pm 0,1$) e, de forma semelhante, observou-se um aumento no efeito máximo do KCl no grupo DisP quando comparado ao GC ($E_{max} = 164 \pm 8,0$ e $100,0\%$ respectivamente) (Gráfico 4).

Lacerda-Júnior, 2022

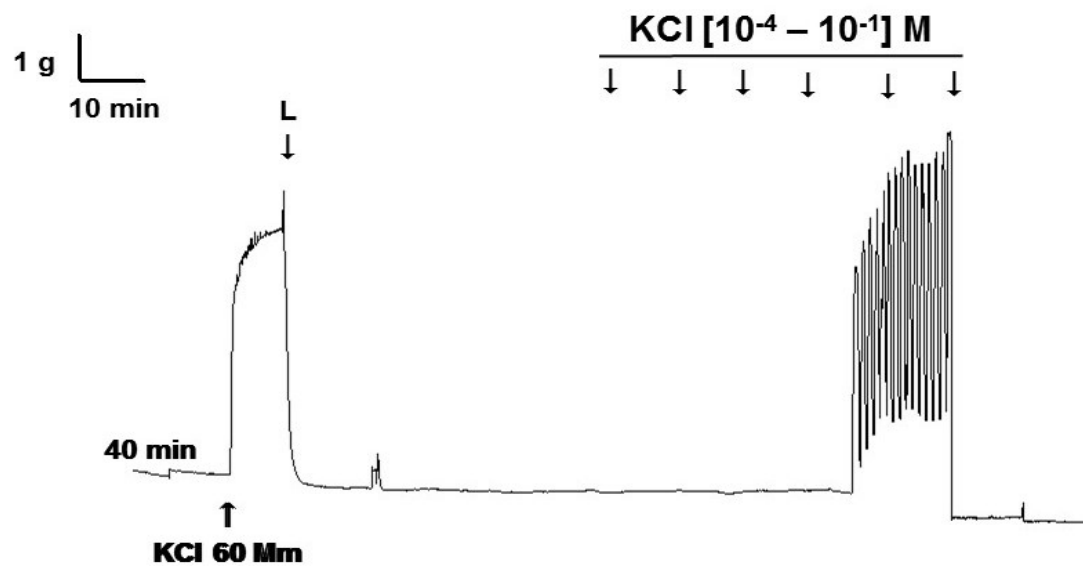
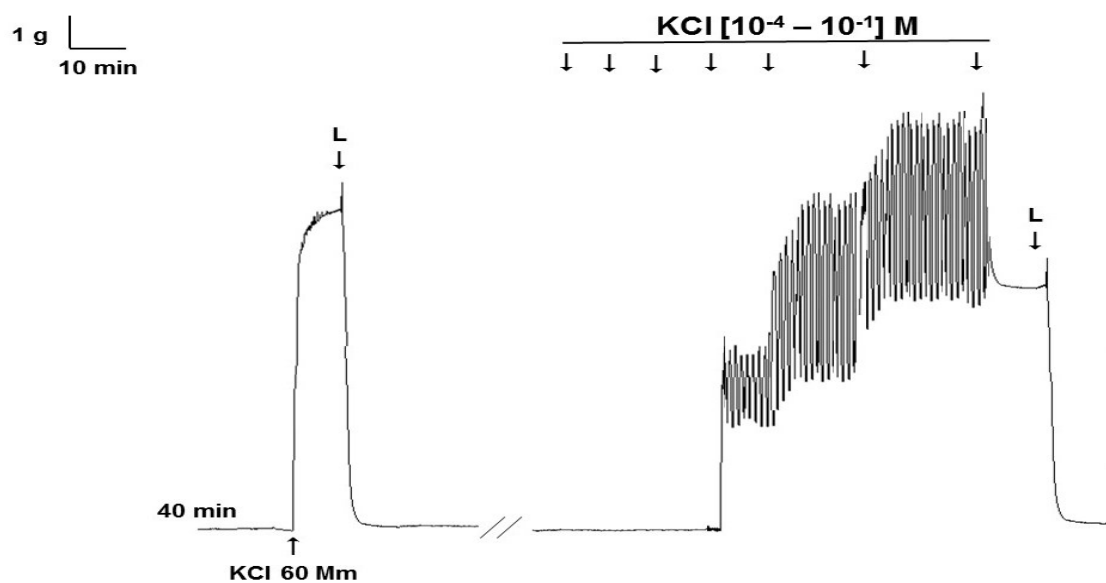
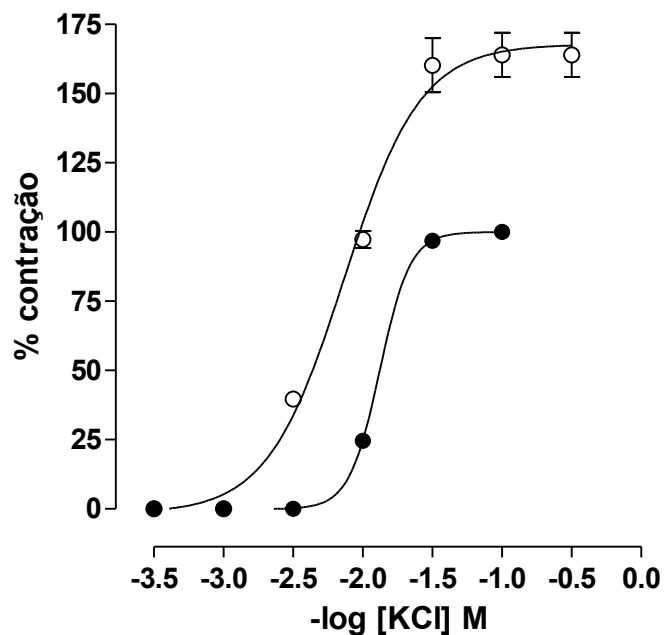
Figura 12 – Registros originais das curvas concentrações cumulativas com KCl GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Gráfico 4 – Curvas concentração-resposta cumulativas ao KCl dos grupos, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). Utilizando teste *t*; DisP = grupo com dismenorrea primária e GC = grupo controle.

Fonte: Autor, 2022.

4.7.4 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por isoprenalina em útero de ratas Wistar

No grupo DisP a curva cumulativa de relaxamento com isoprenalina apresentou um deslocamento para a direita, com diminuição da potência do agonista ($pCE_{50} = 11,0 \pm 0,2$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 15,1 \pm 0,2$). Observou-se também uma diminuição no efeito máximo da isoprenalina no grupo DisP quando comparado ao GC ($E_{max} = 79,4 \pm 2,7$ e 100%, respectivamente) (Gráfico 5).

Lacerda-Júnior, 2022

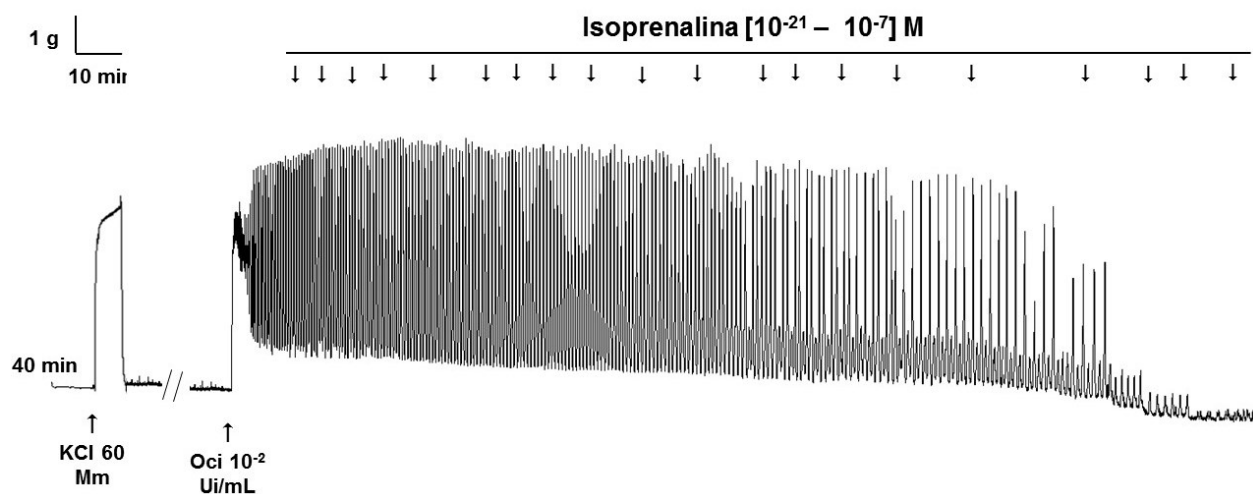
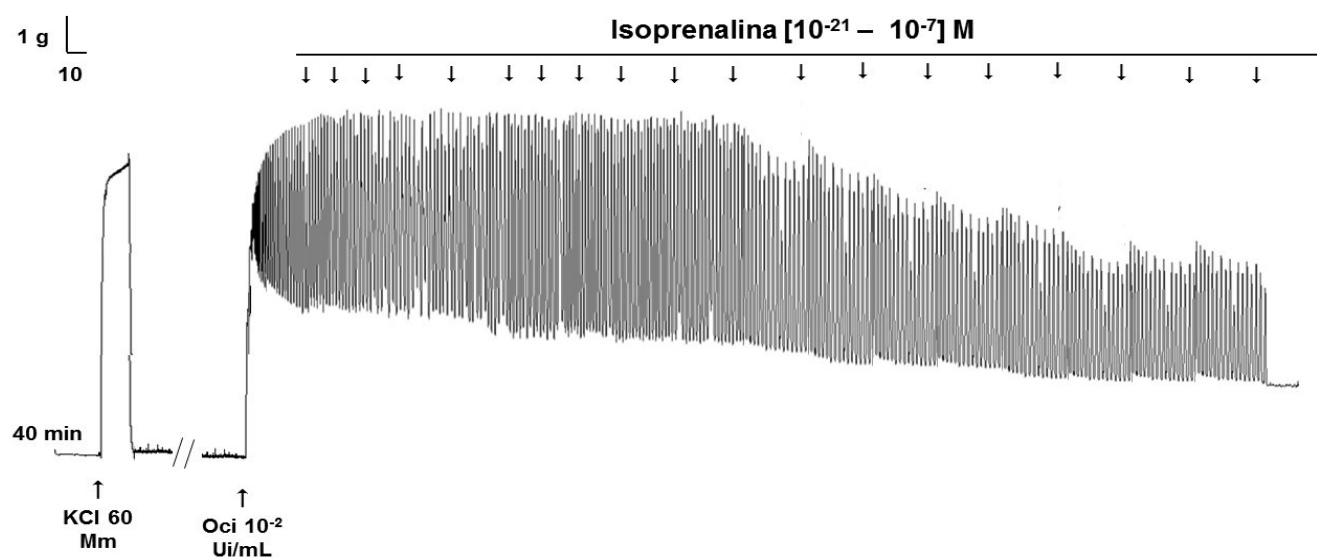
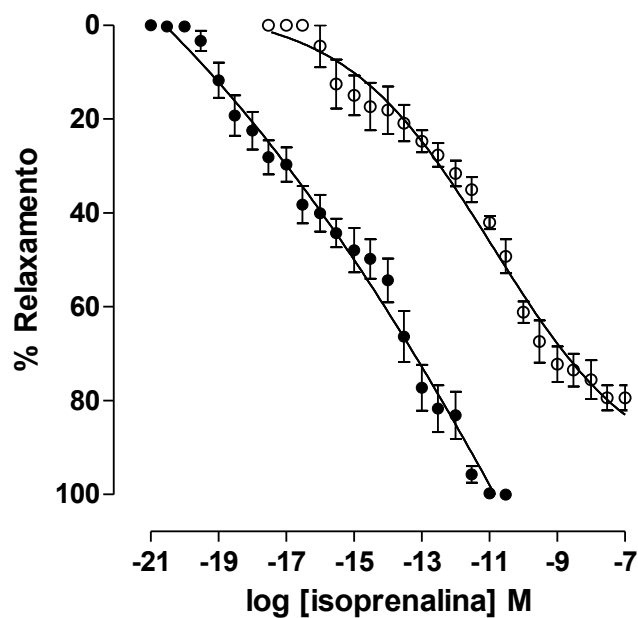
Figura 13– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com isoprenalina GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Gráfico 5 – Efeito da dismenorreia primária sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento induzidas pela isoprenalina em útero isolado de rata pré-contráido com ocitocina, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.



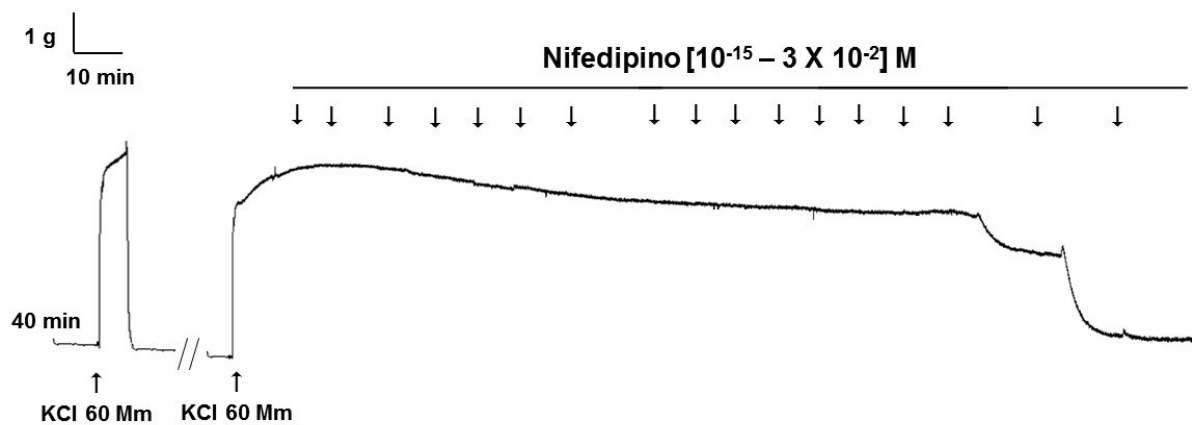
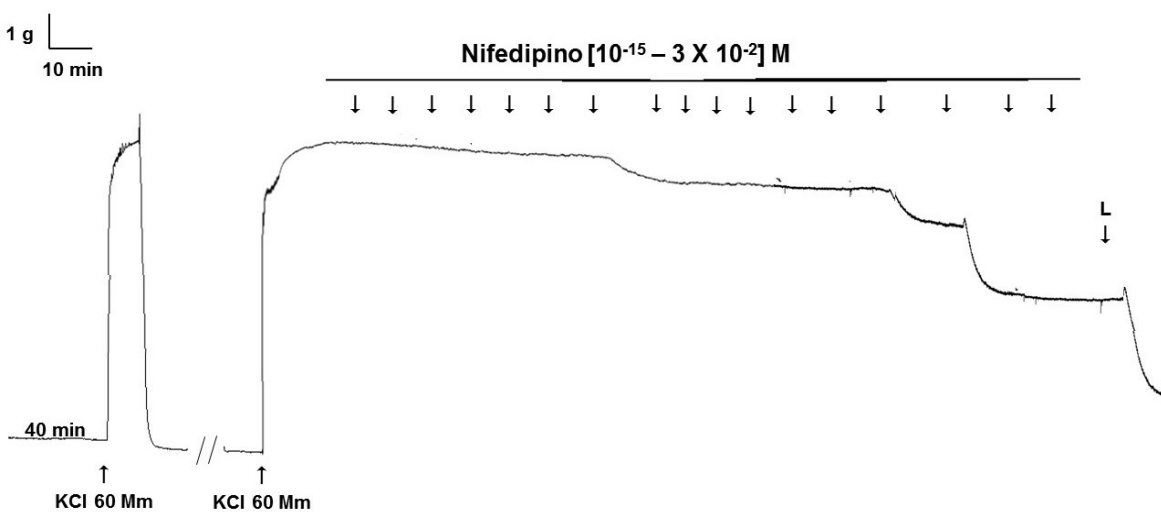
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). Teste *t*; DisP = grupo dismenorreia primária e GC = grupo controle.

Fonte: Autor, 2022.

4.7.5 Efeito da dismenorreia primária no acoplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por nifedipino em útero de ratas Wistar

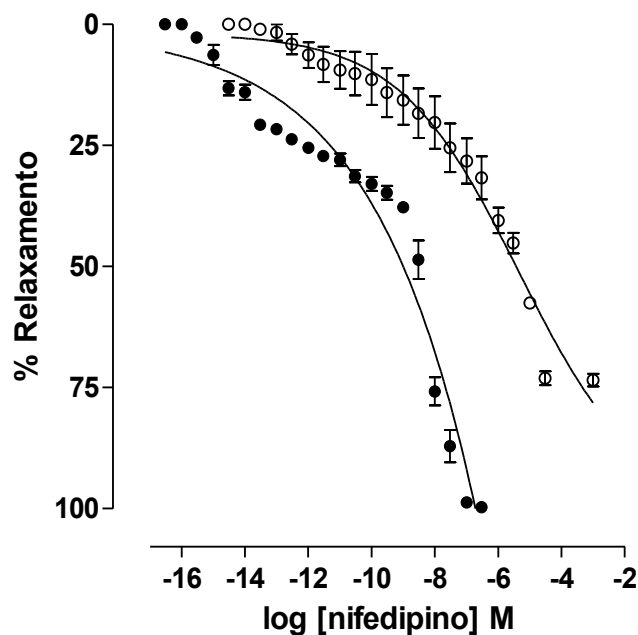
No grupo DisP a curva cumulativa de relaxamento com nifedipino foi deslocada para direita com diminuição da potência do agente relaxante ($pCE_{50} = 6,6 \pm 0,1$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 9,5 \pm 0,1$). Além disso, houve uma diminuição no efeito máximo do nifedipino no grupo DisP quando comparado ao GC ($E_{max} = 73,5 \pm 1,3$ e $100 \pm 0,1\%$) respectivamente (Gráfico 6 e tabela 5).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 14– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com nifedipino GC (A) e DisP (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 6 – Efeito da dismenorreia primária sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento induzidas pelo nifedipino em útero isolado de rata pré-contráido com KCl, GC (●) e DisP (○) em útero isolado de rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). Teste t ; DisP = grupo dismenorreia primária e GC = grupo controle.

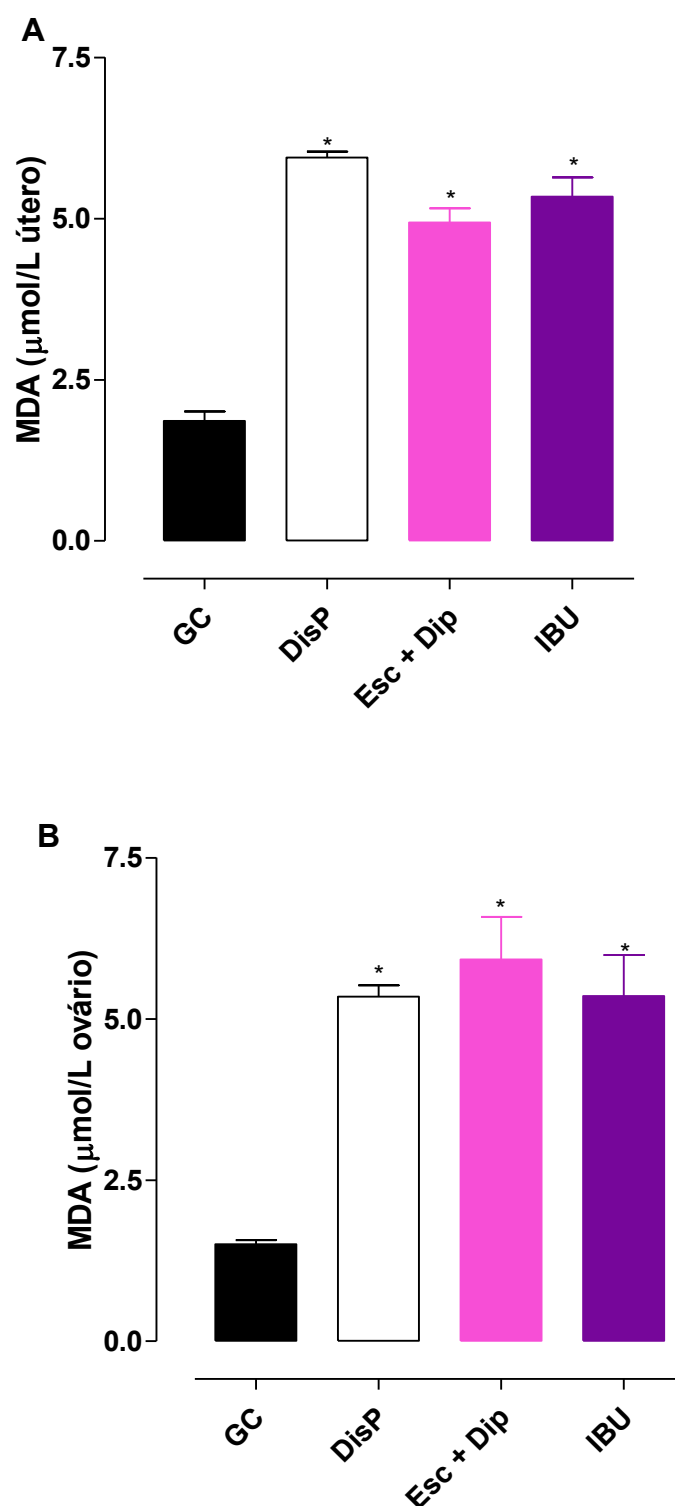
Fonte: Autor, 2022.

4.7.6 Efeito da dismenorreia primária sobre o sistema antioxidante no útero e ovário de rata**4.7.6.1 Efeito da dismenorreia primária sobre a concentração de MDA no útero e ovário de rata**

No grupo DisP ($6,0 \pm 0,1\%$) verificou-se um aumento nos níveis de MDA no útero de ratas quando comparado ao GC ($1,9 \pm 0,2\%$), o mesmo foi observado nos grupos IBU ($5,3 \pm 0,3\%$) e Esc + Dip ($4,9 \pm 0,2\%$) (Gráfico 7A).

Nos ovários, foi demonstrado que o grupo DisP ($5,4 \pm 0,2\%$) apresentou um aumento nos níveis de MDA quando comparado ao GC ($1,5 \pm 0,1\%$) o mesmo foi observado nos grupos, IBU ($5,4 \pm 0,6\%$) e Esc + Dip ($5,9 \pm 0,7\%$) (Gráfico 7B).

Gráfico 7 – Efeito da dismenorrea primária sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, IBU e Esc + Dip.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP, IBU e Esc + Dip).

Fonte: Autor, 2022.

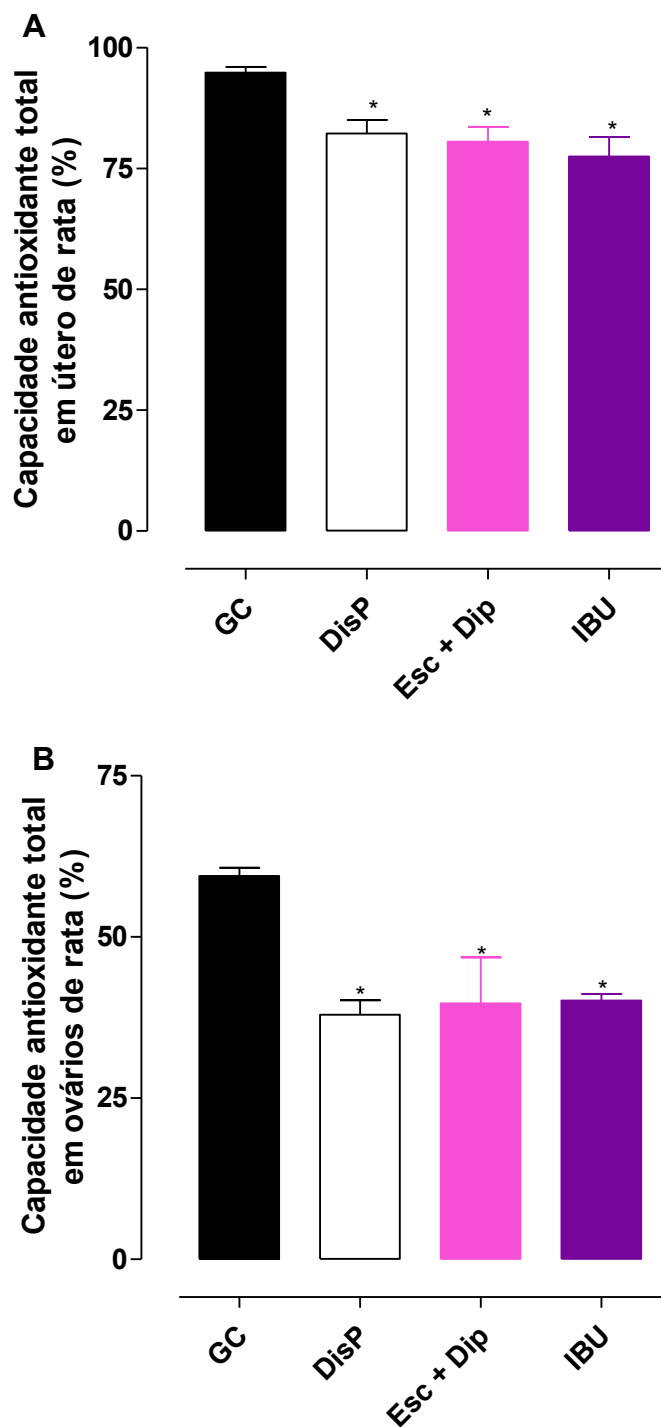
4.7.6.2 Efeito da dismenorreia primária sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero e ovário de rata

No útero de ratas submetidas ao protocolo de dismenorreia, apresentaram uma diminuição da CAT ($82,2 \pm 2,9\%$) quando comparada ao controle ($94,8 \pm 1,2\%$). As drogas padrão IBU ($77,5 \pm 4,0\%$) e Esc + Dip ($80,5 \pm 3,1\%$) não evitaram a diminuição da CAT promovida pela DisP (Gráfico 8A).

Resultado semelhante foi verificado nos ovários, no grupo DisP houve uma diminuição da CAT ($37,9 \pm 2,3\%$) quando comparada ao GC ($59,5 \pm 1,3\%$) e os animais tratados com as drogas padrão IBU ($40,1 \pm 1,0\%$) e Esc + Dip ($39,7 \pm 7,1\%$) não promoveram reversão da diminuição da CAT nos ovários (Gráfico 8B).

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 8 – Efeito da dismenorreia primária sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, IBU e Esc + Dip.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP, IBU e Esc + Dip).

Fonte: Autor, 2022.

Discussão

Neste trabalho, foi padronizado um modelo experimental de dismenorreia primária utilizando a administração de dietilestilbestrol e ocitocina, avaliando seus efeitos em abordagens *in vivo* através da pontuação de contorções e *in vitro* verificando alterações na reatividade, histomorfologia do útero e ovários, além da reatividade contrátil e relaxante uterina de ratas Wistar. Adicionalmente, foi visto que em ratas com dismenorreia primária há um desbalanço no estresse oxidativo, caracterizando-se por uma diminuição da capacidade antioxidante total (CAT) no útero e ovários e um aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) e o tratamento com as drogas padrão não reverte essas alterações.

A dismenorreia primária se caracteriza pelo aumento da contração uterina o que desencadeia o aumento de dor pélvica em mulheres (GUO et al., 2013). Nesse contexto, com o intuito de avaliar se o modelo foi implantado com eficiência, realizou-se um estudo comportamental, no qual avaliou-se a pontuação de contorções nas ratas, posteriormente a administração de estradiol e ocitocina, caso os animais apresentassem um aumento no número de contorções, significaria que o modelo de dismenorreia primária foi instalado e apresentaria características semelhantes à DisP humana, caracterizada pelo aumento da contração uterina em mulheres.

Os resultados obtidos mostraram aumento na pontuação de contorções do grupo DisP, ao ser comparado com o grupo GC (Gráfico 1) e quando os animais foram tratados com medicamentos antidismenorreicos como o butilbrometo de escopolamina e dipirona (Esc+Dip – 1,2 mg/kg) ou ibuprofeno (IBU – 50 mg/kg), as pontuações de contorção destes grupos foram diminuídas significativamente ao serem comparadas com o grupo DisP (Gráfico 1). A utilização dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento da dismenorreia primária, baseia-se nos seus mecanismos de ação, envolvendo o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno e a dipirona, estes medicamentos são responsáveis por inibir as ciclooxigenases, dessa forma diminuindo a formação de prostanoídes contráteis como a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e tromboxano A_2 que são mediadores importantes na patogênese da DisP. Além disso, utiliza-se antiespasmódicos como a escopolamina um antagonista dos receptores muscarínicos M_3 dessa forma, antagonizando as ações

da acetilcolina nesses receptores, diminuindo os níveis de cálcio citosólico resultando no relaxamento da musculatura lisa uterina. Esses resultados são consistentes com dados da literatura, tendo em vista que a dismenorreia primária induz aumento anormal da contração uterina e na dor abdominal (XIAO et al., 2019; YANG et al., 2015; CHEN et al., 2013).

Visto isso, é relatado na literatura que a contratilidade uterina pode ser regulada por ação dos hormônios sexuais femininos como o estrogênio. A camada miometrial constituída principalmente por músculo liso, pode ser estimulada pelo estradiol durante a menstruação, aumentando por sua vez a expressão de receptores presentes nesse tecido como os receptores da ocitocina (OT), da $PGF_{2\alpha}$ (FP) e da acetilcolina (M_3), além disso, a extensão da camada miometrial é aumentada pela ação desse hormônio, desencadeando assim um aumento na contratilidade uterina relacionada com patogênese da dismenorreia primária (TSENG; GURPIDE., 1975; SMITH., 2018).

Adicionalmente com o aumento dos níveis de estradiol, observa-se uma diminuição dos níveis de progesterona no início do ciclo menstrual em mulheres e em roedores como as ratas na fase estral do seu ciclo, diante disso, o nível mais baixo de progesterona causa a ativação de metaloproteinases que degradam as células endometriais e causam a liberação de prostaglandinas principalmente. A diminuição da progesterona também contribui para a resposta inflamatória que leva à esfoliação do endométrio e o sangramento menstrual, desencadeando assim danos na camada endometrial (MAYBIN et al., 2011; DRAPER et al., 2018).

Diante disso, decidimos avaliar os aspectos histomorfológicos uterinos para confirmar a instalação da dismenorreia primária, dessa forma esperávamos que se o modelo de DisP estivesse sido instalado com eficácia, observaríamos um aumento da camada miometrial e danos a camada endometrial conforme observado na DisP humana e corroborado em outros estudos utilizando animais como ratas e camundongos fêmeas. Nos resultados obtidos, observamos que a DisP promoveu um aumento da camada do miométrio quando comparado ao GC (Figura 9 A e B e Gráfico 2), observou-se ainda que os grupos tratados com as drogas padrão Esc + dip e IBU não reverteram o aumento dessa camada. Na análise da camada endometrial observamos que quando comparado ao GC, o grupo DisP promoveu danos na camada endometrial, observado pela

desorganização das glândulas endometriais (Figura 9 A e B) e o tratamento com as drogas padrão Esc + Dip e IBU não reverteram esses danos. Esses achados demonstram que o modelo experimental estudado se assemelha com as características observadas na DisP humana, promovidas pela ações estrogênica aumentada, bem como corrobora com outros estudos em animais, nos quais observou-se aumento da camada miometrial e danos na camada endometrial, além disso, verificou-se que o tratamento com as drogas padrão não reverteram essas alterações, possivelmente esses medicamentos não atuam sobre a via de sinalização envolvida com a proliferação e crescimento celular em útero (KUMAR et al., 2009; ZHANG et al 2021).

Outro órgão que pode sofrer alterações em quadros de DisP são os ovários, que são órgãos endócrinos complexos que sofrem modificações estruturais e funcionais significativas ao longo dos ciclos menstruais recorrentes. Esses órgãos são responsáveis por liberar hormônios como o estradiol e a progesterona e desregulações na secreção desses hormônios podem estar relacionados com a patogênese da dismenorreia primária. A DisP pode ser avaliada através da dinâmica ovariana pela modulação dos folículos secundários, graaf e folículos luteinizados não rompidos (estes são folículos ovarianos maduros que não se rompem e sofrem luteinização com oócitos aprisionados) e corpos lúteos (MVONDO et al., 2017; SONG et al., 2021).

Nas análises histopatológicas observamos que no modelo experimental estudado de DisP, não houve diferença na apresentação dos folículos secundários presentes nesse órgão, quando comparado ao GC. O tratamento com as drogas padrão grupos Esc + Dip e IBU também não alterou os folículos presentes nos ovários. Sugerindo que o modelo de DisP e o tratamento com as drogas padrão provavelmente não estão promovendo alterações na ovulação das ratas, visto que não há alteração dos folículos maduros expressos nos ovários (Figura 9B).

A DisP é o distúrbio ginecológico que mais acomete mulheres jovens e adultas, caracterizando-se por uma dor pélvica crônica que ocorre durante a menstruação (JAMIESON; STEEGE., 1996; BURNETT; LEMYRE., 2017). Diversos estudos apontam que os ciclos menstruais estão associados ao aumento das contrações uterinas dolorosas, podendo tal fato ser desencadeado pela diminuição dos níveis de progesterona no início da menstruação, desencadeando dessa forma

Lacerda-Júnior, 2022

eventos como hipóxia e isquemia uterina, resultando no aumento do nível de dor devido aumento da produção de prostanoídes contráteis como as prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (AKERLAND., 1979; CHAPRON et al., 2011).

O aumento na contratilidade uterina durante a menstruação é um processo fisiológico que facilita a expulsão dos tecidos endometriais e, nas mulheres com dismenorreia primária, observa-se uma desregulação nesse processo, ocasionando o aparecimento de dor pélvica (QU et al., 2019). A contração uterina pode ser regulada por ação de alguns hormônios, a exemplo da ocitocina, cujo mecanismo de ação desempenha um papel fundamental no trabalho de parto, por promover o aumento das contrações uterinas, a expressão do receptor de ocitocina (OT) no miométrio humano, que é fortemente regulada pelo aumento nos níveis de estradiol (TOM; ASSINDER, 2010; YULIA; JOHNSON, 2014).

Nesse contexto, o protocolo de indução da dismenorreia primária utilizado nesse trabalho baseia-se na administração de dietilestilbestrol, um análogo do estradiol, o que pode resultar em um aumento no número de receptores de ocitocina (OT). Se em nosso modelo isso estivesse acontecendo esperava-se que a resposta a ocitocina fosse aumentada.

Nas ratas do grupo DisP, observou-se uma potencialização em 1,82 vezes do efeito do agonista contrátil ao compararmos o parâmetro de potência, com o deslocamento da curva para esquerda, além disso houve aumento do efeito máximo quando comparado ao GC (Gráfico 3A e Tabela 1), sugerindo assim que o hormônio pode está aumentando o número dos receptores OT e afinidade de ocupação da ocitocina ao seu alvo farmacológico, ainda nesse contexto, o aumento do efeito máximo pode sugerir o aumento da expressão ou uma modulação positiva de proteínas associadas a contração como, as proteínas da via de sensibilização ao cálcio (Rho-ROCK) nas ratas do grupo DisP (NEUBIG et al., 2003).

Diante disso, o estradiol e a ocitocina podem ser considerados fatores etiológicos para DisP por regularem a coordenação da contratilidade miometrial (LIEDMAN et al., 2008), uma vez que também já foram relatados níveis plasmáticos aumentados em mulheres com dismenorreia (MECHSNER et al., 2010). A ocitocina, possivelmente, contribui também para vasoconstrição das artérias uterinas em pacientes com dismenorreia e foi demonstrado que a expressão dos

receptores de ocitocina (OT) está positivamente correlacionada com o aumento da gravidade da dismenorreia (AKERLUND, 2006; GUO et al., 2013) promovendo hiperatividade uterina. Além disso, a ativação de receptores OT também pode resultar na regulação positiva da PLA₂ e da COX-2, resultando na maior produção de PGs (GUO et al., 2013) da PGF_{2α} pelas células endometriais (WILSON; LIGGINS; WHITTAKER, 1988; BURNS et al., 2001).

Assim, acredita-se que níveis elevados de prostanoídes contráteis, como as prostaglandinas do tipo PGF_{2α} seja uma das principais causas do aumento da dor pélvica durante a menstruação, devido aos seus efeitos estimulatórios da contratilidade uterina, como demonstrado em outros estudos não clínicos recentes, em que se observou que a PGF_{2α} ocasionou maior contratilidade uterina promovendo dor visceral em útero de camundongos fêmeas (YANG et al., 2015).

Diante dessas premissas, nós hipotetizamos que a indução da dismenorreia causaria um aumento da resposta contrátil à PGF_{2α}. Para confirmar essa hipótese, foram induzidas contrações com PGF_{2α} sintética e esperava-se que as respostas contráteis dos animais do grupo DisP fossem aumentadas. Foi observado que a curva de contração do grupo DisP foi deslocada em 1,4 vezes para a esquerda, com aumento da potência e além disso houve um aumento da eficácia contrátil quando comparado ao GC (Gráfico 3B), indicando assim que provavelmente as alterações fisiopatológicas induzidas pelo modelo de dismenorreia estudado, envolvem a modulação positiva da via das prostaglandinas, possivelmente pelo aumento da expressão dos receptores FP no miométrio uterino e maior afinidade das PGF_{2α} aos seus receptores.

Esses efeitos podem estar relacionado a atividade do estrogênio, sugerido pela potencialização nos resultados, além disso o aumento do efeito máximo, pode estar relacionado a estimulação positiva na expressão de ciclooxigenases promovidas pelo estrogênio, desencadeando uma estimulação na produção de prostanoídes contráteis, promovendo maior resposta contrátil uterina *in vitro*, característica do quadro de cólica uterina (MILSOM I, ANDERSCH., 1984; BLESSON et al., 2012; HELLMAN et al., 2017).

Para mais, o processo de contração do músculo liso uterino ocorre pelos acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico. A contração uterina está diretamente ligada à um aumento da concentração de cálcio citosólica ([Ca²⁺]_c). O

Lacerda-Júnior, 2022

acoplamento eletromecânico de contração está relacionado a uma mudança no potencial de repouso promovendo a despolarização da membrana, desencadeando o influxo de Ca^{2+} pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), levando assim a uma resposta contrátil (AGUILAR; MITCHELL, 2010; HILL-EUBANKS, 2011; FERNANDES, 2018).

Nesse contexto, a contração no acoplamento eletromecânico pode ser induzida por agentes como o KCl que promove uma ativação dos Ca_v e o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, levando a contração uterina, esse passo também é comum para a via da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Mais recentemente vem sendo descrito uma regulação positiva promovida pelo estrogênio sobre a expressão destes canais, sugerindo que este pode ser um dos passos pelos quais há um aumento na contratilidade uterina em quadros de dismenorreia primária (ARROWSMITH; WRAY, 2014; WRAY et al., 2015; WRAY; ARROWSMITH., 2020)

Dessa forma, decidimos avaliar a participação dos canais de Ca_v no modelo experimental em estudo, induzindo curvas concentrações cumulativas com KCl, e esperava-se que se o modelo de dismenorreia primária estivesse levando ao aumento na contração induzida pelo agente haveria o deslocamento da curva para esquerda com aumento da potência e eficácia máxima do KCl. E foi observado que a curva do grupo DisP foi potencializada com deslocamento para a esquerda em 1,8 vezes e maior eficácia ao KCl, quando comparado ao GC (Gráfico 4), indicando assim que possivelmente pode estar havendo aumento na expressão dos Ca_v ou aumento no influxo dos íons Ca^{2+} , que podem estar envolvidos na fisiopatologia dessa doença no modelo testado.

Em relação ao relaxamento uterino é necessário que ocorra uma diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que se dá tanto pelo meio do mecanismo eletromecânico, levando a repolarização ou a hiperpolarização da membrana, como pelo mecanismo farmacomecânico, a partir da ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração ou ativação de vias relaxantes (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003). Visto isso, o relaxamento uterino pode ser regulado, por exemplo, através de mecanismos envolvendo o acoplamento farmacomecânico, a partir da ativação de receptores metabotrópicos como na via adrenérgica (β_2) (WOODRUM; BROPHY, 2001; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Com base nisso, em quadros de dismenorreia primária, é sugerido que a transdução β -adrenérgica esteja prejudicada, devido aos níveis de progesterona, diminuídos. A progesterona é responsável por regular alguns passos dessa via, por exemplo, aumentando a expressão dos receptores adrenérgicos- β_2 e regulando positivamente a proteína $G_{\alpha s}$ resultando em um maior acoplamento e ativação desses receptores e da via do seu efector, a ciclase de adenilil resultando no relaxamento uterino (COHEN-TANNOUDJI et al., 1991; VIVAT et al., 1992; ELWARDY-MÉRÉZAK et al., 1994; MAYBIN; CRITCHLEY., 2011).

Para verificar essa hipótese, realizamos curvas concentrações cumulativa de relaxamento com isoprenalina, um agonista dos receptores β_2 e esperava-se que as respostas relaxantes dos animais do grupo DisP fossem diminuídas.

A resposta relaxante do grupo DisP a isoprenalina, um agonista β_2 , foi dificultada com o deslocamento da curva para direita em 1,2 vezes, quando comparada ao GC e diminuição da potência e eficácia (Gráfico 5), sugerindo assim que nesse modelo experimental, pode estar havendo diminuição nos níveis de progesterona destes animais ou inibição de passos envolvidos na via de sinalização adrenérgica- β para promover relaxamento do miométrio uterino.

Além disso, a DisP também pode promover alterações sobre o acoplamento eletromecânico de relaxamento uterino. O relaxamento uterino no acoplamento eletromecânico ocorre por exemplo, pela abertura de canais de K^+ , regulando o potencial de membrana de repouso e a excitabilidade da célula muscular lisa, com isso pode gerar processos despolarização ou hiperpolarização na membrana. A membrana da célula hiperpolarizada promove o fechamento dos canais Ca_v , diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$. Ademais, mais recentemente vêm sendo descrito que a progesterona pode regular positivamente a expressão de canais de K^+ e o estrogênio podem regular positivamente a expressão de Ca_v no miométrio uterino, diante do exposto, o aumento dos níveis de estradiol no quadro de DisP, pode resultar no aumento da expressão de Ca_v e levar ao aumento da contratilidade uterina (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; WRAY, S; ARROWSMITH., 2020).

Assim, nos questionamos se em nosso modelo experimental a DisP estaria levando a um aumento da expressão de Ca_v e para isso realizamos curvas concentrações cumulativas de relaxamento com nifedipino, um bloqueador de Ca_v do tipo L. Se isso fosse verdade, esperava-se que os resultados apresentassem

Lacerda-Júnior, 2022

um deslocamento da curva do grupo DisP para a direita, sugerindo uma diminuição do relaxamento frente ao nifedipino.

E foi observado que houve um deslocamento da curva do nifedipino para a direita, em cerca de 1,1 vezes, com diminuição da potência e da eficácia relaxante do bloqueador no grupo DisP quando comparado ao GC (Gráfico 6), corroborando o resultado anterior observado na reatividade contrátil com o agente KCl.

A hipercontratibilidade uterina promovida pelo aumento de íons Ca^{2+} no útero resulta em contrações miométriais anormais e vasoconstrição das artérias uterinas, desenvolvendo fenômenos de isquemia e hipóxia no sistema reprodutor feminino, causando dor pélvica e aumento da sua intensidade. Os eventos de isquemia/hipóxia induzidos durante a contração uterina, devido à diminuição do fluxo sanguíneo para o miométrio, podem desencadear o acúmulo de radicais livres (EROs). Os radicais livres são os produtos de reações de redução biológica e a superprodução de EROs estão implicadas na patogênese da dismenorreia, tendo em vista que esses radicais podem desencadear alterações em proteínas e no DNA podendo levar à alterações na função miometrial ou à ativação de cascatas de sinalização (ativação de proteínas como PKC, MAPK/ERK e enzimas como as ciclooxigenases), resultando em eventos como hipercontratibilidade uterina e inflamação endometrial (GUNEI, 2012; KAPLAN et al., 2013).

Visto isso, o aumento de espécies reativas promovidas pela hipóxia e isquemia no sistema reprodutor feminino, levam ao desenvolvimento de eventos oxidativos, como a peroxidação lipídica. O acúmulo de EROs reagem com ácidos graxos das membranas celulares, promovendo a destruição das estruturas celulares. Com isso, decidimos avaliar se a peroxidação lipídica poderia estar envolvida no modelo de DisP estudado, dessa forma, esperávamos que caso a hipótese fosse verdadeira, o grupo DisP levaria a um aumento na produção de MDA, o principal produto da peroxidação lipídica (SZMIDT et al., 2020).

Observamos nos nossos resultados um aumento dos níveis de MDA em útero e ovários no grupo DisP, quando comparado ao GC (Gráfico 7A e B), demonstrando possivelmente o envolvimento da peroxidação lipídica, ocasionado pelo aumento de EROs na DisP, que por sua vez possivelmente resulta em danos celulares, bem como na ativação de processos celulares envolvidos no aumento da contratilidade e inflamação uterina, como a liberação de prostanoídes contráteis

Lacerda-Júnior, 2022

(PGs) mediante ativação das COXs e aumento na produção de fatores pró-inflamatórios (NF- κ B). Esses achados corroboram outros estudos da literatura, nos quais em outros modelos de DisP apresentaram aumento nos níveis de MDA em útero de ratas (LI et al., 2010; MVONDO et al., 2017).

Além disso, verificou-se que o tratamento com as drogas padrão não alterou os níveis de MDA, quando comparado ao grupo DisP em útero e ovários (Gráfico 8A e B), esses resultados estão consistentes com os dados da literatura nos quais não foi observado benefícios da administração desses medicamentos frente aos níveis de MDA em útero (KAHRAMAN; CEVIK; SARACOGLU., 2021; ORIMADEGUN; AWOLUDE; AGBEDANA., 2021).

Neste cenário, sabendo que nos quadros de DisP em mulheres há o aumento na produção de EROs e supressão de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e catalase (BI et al., 2021), decidimos avaliar se no modelo de DisP estudado, estaria havendo alterações balanço oxidativo em útero e ovários de ratas avaliando a sua capacidade antioxidante total.

Visto isso, se houvesse uma diminuição da capacidade antioxidante no grupo DisP a hipótese seria considerada positiva. E observou-se que no grupo DisP houve uma diminuição da CAT no útero e ovários quando comparado ao GC (Gráfico 8A e B), demonstrando assim um desbalanço do estresse oxidativo no sistema reprodutor feminino em quadros de DisP, sugerindo dessa forma que possivelmente os eventos de hipóxia/isquemia podem estar gerando aumento das EROs nesses órgãos, corroborando dessa forma que em quadros de inflamação, como a DisP há aumento da produção espécies radicalares possivelmente pela supressão de enzimas antioxidantes causando danos oxidativos no sistema reprodutor feminino (AMINI; SHAMI; CHEGINI., 2020).

Ademais, foi observado nos nossos resultados que o tratamento com as drogas padrão ibuprofeno (IBU) e escopolamina com dipirona (Esc + Dip), não reverteram a diminuição da CAT promovida pela DisP em útero e ovários (Gráfico 7A e B), demonstrando que essas drogas não apresentaram efeitos benéficos frente ao desbalanço oxidativo, como demonstrado em outros estudos descritos na literatura (JESUÍNO et al., 2019; KAHRAMAN; CEVIK; SARACOGLU., 2021).

Portanto, nossos resultados fornecem evidências iniciais que o modelo de DisP utilizado nesse trabalho, aumenta a reatividade contrátil e diminui reatividade

Lacerda-Júnior, 2022

relaxante uterina, podendo este efeito estar relacionado ao aumento camada miometrial e mecanismos que envolvem aumento na expressão de receptores da ocitocina, prostaglandinas e/ou diminuição da ativação da sinalização β -adrenérgica, além de possivelmente modular positivamente a expressão dos Ca_v tipo L ou influxo dos íons Ca^{2+} .

Ademais, demonstrou-se que nesse modelo de dismenorreia primária houve um desbalanço no estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento nos níveis de MDA e diminuição da CAT. Esses achados revelam que o modelo experimental padronizado em ratas Wistar no nosso laboratório, pode contribuir para futuros estudos da sinalização envolvida com a fisiopatologia da DisP, bem como, na investigação de novas substâncias que possam vir a ser utilizadas como candidatos a fármacos/medicamentos para a prevenção e/ou tratamento da dismenorreia primária.

5- Capitulo 99

Lacerda-Júnior, 2022

5 Capítulo II: Efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* sobre as alterações induzidas pela dismenorreia primária no sistema reprodutor feminino de rata Wistar**5.1 Material****5.1.1 Produto-teste**

A *Spirulina platensis* foi adquirida na forma de pó no laboratório INFINITY Pharma. (HONG KONG - China) (lote nº 17J11-B004-025041, Anexo 3). Uma amostra foi analisada através da realização de testes de controle de qualidade e fracionada pela Farmácia de Manipulação Roval (João Pessoa-PB) (lote nº 20121025). A SP foi diluída com soro fisiológico para obtenção das soluções para administração.

5.1.2 Animais

Ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 8 semanas de idade (aproximadamente 180 – 200g), eram adquiridas da Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM da UFPB.

Previamente, as ratas eram mantidas sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo pellets (Nuvilab®) e livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidas diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 6 às 18h00. Os experimentos eram realizados no período de 8 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais seguindo os princípios de cuidados com animais e foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão Nº 1886010520) da UFPB (Anexo 2).

5.1.3 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de magnésio di-hidratado

Lacerda-Júnior, 2022

($\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o cloreto de sódio (NaCl), o ácido clorídrico (HCl), hidróxido de sódio (NaOH), isoprenalina e nifedipino foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil).

O dietilestilbestrol e a prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) foram obtidos da Cayman Chemical Company (EUA). A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil).

Estas substâncias foram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20°C . Todas foram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o dietilestilbestrol, que era dissolvido em álcool etílico absoluto para obtenção da solução-estoque. Quando necessário, essas soluções-estoque eram diluídas para obtenção de concentrações apropriadas para cada protocolo experimental.

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

5.1.4 Solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada para a realização dos experimentos era a de Locke Ringer (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997), que era ajustada ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH , 1N), e gaseificada com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a 32°C , cuja composição está descrita abaixo:

Composição da solução de Locke Ringer (mM): NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl_2 (2,1), CaCl_2 (2,2), glicose (5,6), NaHCO_3 (6,0).

5.1.5 Equipamentos

Para obtenção e registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) de modelo BOI-04 conectadas a transdutores de força isométricos de modelo TIM 05 e acoplados a um amplificador modelo AECAD04F, que por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 proporcionado aquisição dos dados e ANCAD para análise destes (Figura 7, Capítulo I). Conectado ao sistema que possui uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos utilizados nos experimentos funcionais foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Lacerda-Júnior, 2022

As substâncias utilizadas eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil). Todos os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

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

Para os experimentos de estresse oxidativo, as amostras utilizadas foram centrifugadas em aparelho refrigerado, modelo VS-15000 CFN II (VISION, Coreia do Sul) e centrifuga de bancada, modelo NI 1811- A (NOVA instruments, SP, Brasil). Para a leitura das absorbâncias e realização da dosagem de MDA e do teste da capacidade antioxidante total (CAT) era 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).

5.2 Métodos

5.2.1 Grupos experimentais

As ratas Wistar eram divididas randomicamente em quatro grupos experimentais: (1) grupo controle (GC); (2) ratas com dismenorreia primária (DisP); (3) ratas com dismenorreia primária suplementadas com *Spirulina platensis* com a dose de 50 mg/kg (DISP+SP50) e (4) ratas com dismenorreia primária suplementadas *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg (DISP+SP100).

5.2.2 Preparo e administração da *S. platensis*

A *S. platensis* em pó era diariamente dissolvido em soro fisiológico nas proporções de 0,005 e 0,010 g/mL para a preparação das doses de 50 e 100 mg/kg,

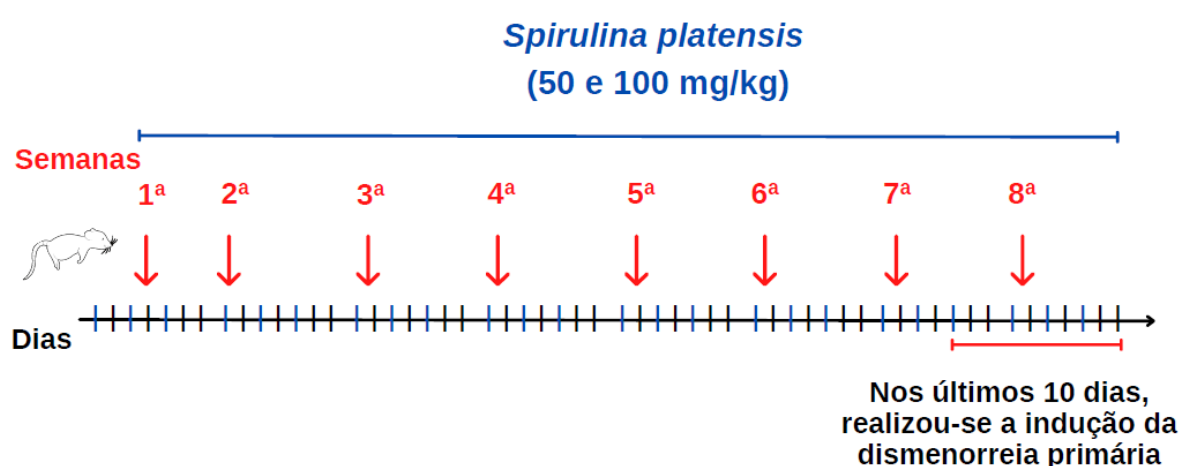
Lacerda-Júnior, 2022

respectivamente, que eram administradas por gavagem aos animais. As suplementações eram realizadas por um período de oito semanas sendo esta realizada 3 vezes por semana (FERREIRA et al., 2021). A administração da solução era feita por via oral utilizando como técnica a gavagem, a administração ocorria 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).

5.2.3 Investigação do efeito preventivo da suplementação com *S. platensis* nas alterações de reatividade contrátil e relaxante induzidas pela dismenorreia primária

Conforme descrito anteriormente no item 5.2.2 era administrado aos animais por via oral a alga *S. platensis* no período das 12 às 14h00 com o auxílio de agulhas de aço inoxidável para gavagem e seringas descartáveis de 5 mL com precisão de 0,2 mL o tratamento era realizado durante 8 semanas, com a frequência de três vezes na semana, sendo esta administração realizada três vezes por semana (Figura 10).

Figura 10 – Protocolo de administração da *Spirulina platensis*



Fonte: Autor, 2022.

Lacerda-Júnior, 2022

5.3 Abordagem *In vivo*

5.3.1 Protocolo de indução da dismenorreia

Durante as 8 semanas de tratamento com a *Spirulina platensis* nos últimos 10 dias era realizada a indução da dismenorreia, para tal, era injetado nos animais dietilestilbestrol (s.c) uma vez ao dia por 10 dias consecutivos, sendo no 1º (primeiro) e 10º (último) dia (2,5 mg/kg) e 1 mg/kg do 2º (segundo) ao 9º (nono) dia. Após 24 horas da última administração, era injetado ocitocina (i.p) 1 UI/kg nos animais (Figura 8, Capítulo I).

Após os tratamentos, as ratas eram eutanasiadas por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de decapitação por guilhotina, e o útero e ovário eram removidos para posteriores análises (HU; JIN, 1999; LIU et al., 2011).

5.3.1.1 Pontuação de contorções

Os critérios de pontuação para os experimentos comportamentais dos animais eram realizados mediante a atribuição de *scores* para cada movimento de contorção apresentado pelos animais, a fim de avaliar a dismenorreia experimental. Para isso, os animais eram colocados em uma caixa de vidro, após a administração de ocitocina e eram observados durante 30 minutos por dois avaliadores, que passaram por treinamentos prévios de calibração para avaliação comportamental. Os *scores* atribuídos a cada padrão comportamental estão apresentados no quadro 1 apresentado no capítulo I, para cálculo da pontuação de contorção, foi utilizada a fórmula descrita no capítulo I.

5.4 Abordagem *In vitro*

5.4.1 Efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade contrátil farmacomecânica induzida por ocitocina ou PGF_{2α} nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária

Lacerda-Júnior, 2022

Após o período de estabilização, duas curvas consecutivas com concentrações cumulativas de ocitocina ou PGF_{2α} eram obtidas. Os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero do grupo controle com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas dos grupos DisP e suplementado com a alga *Spirulina platensis* (SP) (HEYLEN et al., 2008).

A reatividade contrátil do útero de rata era avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logaritmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}) da ocitocina ou PGF_{2α} para os animais dos grupos DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100 e comparados com o grupo controle.

5.4.2 Efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade contrátil eletromecânica induzida por KCl nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária

Após o período de estabilização, duas curvas consecutivas com concentrações cumulativas com KCl eram obtidas. Os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta contrátil do útero do grupo controle com os outros grupos avaliados, conforme descrito no item anterior (HEYLEN et al., 2008).

A reatividade contrátil do útero de rata era avaliada pela determinação do E_{max} e pCE_{50} conforme descrito no item anterior.

5.4.3 Efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade relaxante induzida pela isoprenalina nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária

Após o período de estabilização, uma contração com ocitocina era induzida e durante o componente tônico da contração, a isoprenalina era adicionada respectivamente de maneira cumulativa à cuba em preparações distintas nos grupos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100 (HEYLEN et al., 2008). A reatividade relaxante uterina era avaliada conforme descrito no capítulo I.

Lacerda-Júnior, 2022**5.4.4 Efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* sobre a reatividade relaxante induzida pelo nifedipino nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária**

Após o período de estabilização, uma contração com KCl era induzida e durante o componente tônico da contração, o nifedipino era adicionado respectivamente de maneira cumulativa à cuba em preparações distintas nos grupos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100 (HEYLEN et al., 2008). A reatividade relaxante uterina era avaliada conforme descrito no capítulo I.

5.4.5 Análise histopatológica do útero e ovário

As amostras de útero e ovários de cada rata eram isoladas e fixadas em solução de formaldeído tamponado 10% e incluídos em parafina. Posteriormente, eram cortados em micrótomo (espessura de 4 µm), montadas em lâminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, logo após eram hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes por 25 minutos e lavados em água corrente por 5 minutos, depois eram lavados em água destilada. As amostras eram tratadas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destiladas por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos e, após também lavadas em água corrente durante mais 30 segundos.

Finalmente as lâminas eram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan. Os parâmetros analisados foram observados conforme descritos no capítulo I. As fotomicrografias das lâminas eram capturadas através de câmera acoplada a um microscópio óptico. Para a metodologia empregada no imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi utilizado método descrito por Caliari (1997).

Lacerda-Júnior, 2022**5.4.6 Avaliação dos efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* nas alterações induzidas pela dismenorreia primária sobre CAT e MDA em útero de ratas Wistar****5.4.7 Obtenção do homogenato do tecido muscular uterino e dos ovários**

Após a eutanásia dos animais, os cornos uterinos e ovários eram isolados, coletados e armazenados, para posterior preparo do homogenato dos tecidos conforme metodologia descrita no capítulo I.

5.4.8 Análise dos níveis de malondialdeído (MDA) e da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido uterino e ovariano

A quantificação da produção de malondialdeído (MDA) era realizada por meio do método descrito por Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Após a obtenção do homogenato uterino e ovariano, alíquotas de 250 µL eram incubadas a 37 °C em banho-maria por 60 minutos. Em seguida, as amostras eram precipitadas com 400 µL de ácido perclórico 35% e centrifugadas a 16.851 x g por 20 minutos a 4 °C. Logo após, as amostras do sobrenadante eram transferidas 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).

Por fim, a medida da capacidade antioxidante total (CAT) era feita utilizando o método de DPPH descrito por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995). O experimento era realizado utilizando tubos apropriados para centrífuga, em seguida eram adicionados 50 µL do homogenato uterino e ovariano e 2 mL da solução de

Lacerda-Júnior, 2022

DPPH dissolvido em etanol absoluto (0,012 g/L) e os tubos eram protegidos da luz; em seguida, os tubos eram agitados em vórtex por 10 segundos e, então, mantidos em repouso por 30 minutos. Após esse procedimento, 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 fórmula descrita no capítulo 1. As análises eram feitas comparando-se os níveis de MDA ($\mu\text{mol/L}$ de amostra) ou da CAT (%) entre os grupos GC, DisP, DisP+SP50 e DisP+SP100.

5.5 Análise estatística

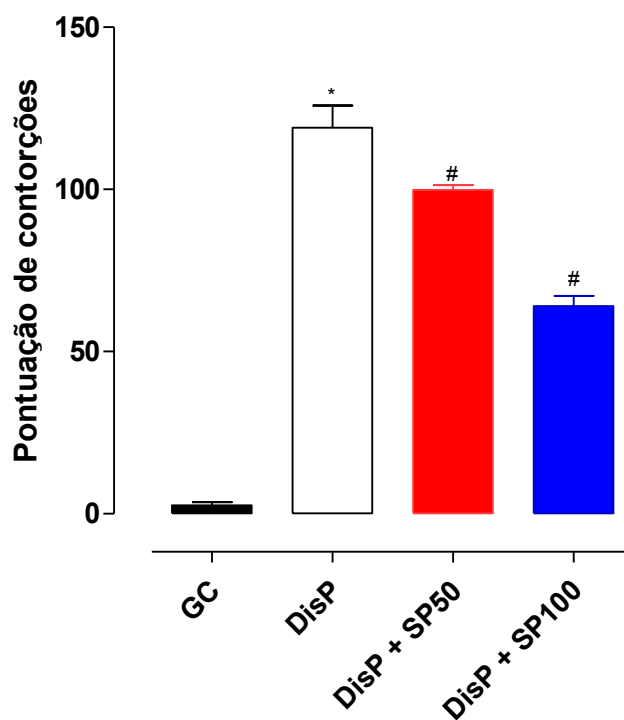
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância *one way* (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, sendo as diferenças entre as médias consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os valores de $p\text{CE}_{50}$ foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados. Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

Para reatividade contrátil do útero de rata era avaliada pela determinação do efeito máximo (E_{max}) e do logaritmo negativo na base dez da concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo ($p\text{CE}_{50}$) da ocitocina, KCl ou $\text{PGF}_{2\alpha}$ para os animais com dismenorreia primária e comparados com o grupo controle. A reatividade relaxante era analisada como a percentagem reversa da contração induzida por ocitocina ou KCl e os resultados eram avaliados comparando-se a amplitude da resposta relaxante do útero das ratas do grupo com dismenorreia primária com aquela obtida pela média das amplitudes máximas das curvas controle.

Os resultados das análises histopatológicas e do estresse oxidativo foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se análise de variância *one way* (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey, sendo as diferenças entre as médias consideradas significantes quando $p < 0,05$.

5.6.1 Efeitos da suplementação com *S. platensis* sobre às contorções no modelo experimental de dismenorreia primária em ratas Wistar

Ao avaliarmos os scores das pontuações entre os grupos, observou-se que o grupo Disp teve um aumento na pontuação ($119 \pm 6,9$) quando comparado ao GC ($3,0 \pm 1,0$). Quando as ratas eram suplementadas com a *S. platensis* nas doses de 50 (Disp + SP50) e 100 mg/kg (Disp + SP100), a alga diminuiu o aumento da pontuação de contorções no modelo de dismenorreia primária em ratas ($98,2 \pm 2,6$; $64,0 \pm 3,1$, respectivamente) (Gráfico 9).

Lacerda-Júnior, 2022**Gráfico 9** – Pontuação referente as contorções dos grupos, GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100 em ratas Wistar.

Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 10). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP); # $p < 0,05$ (DisP vs. DisP + SP50; DisP + SP100).

Fonte: Autor, 2022.

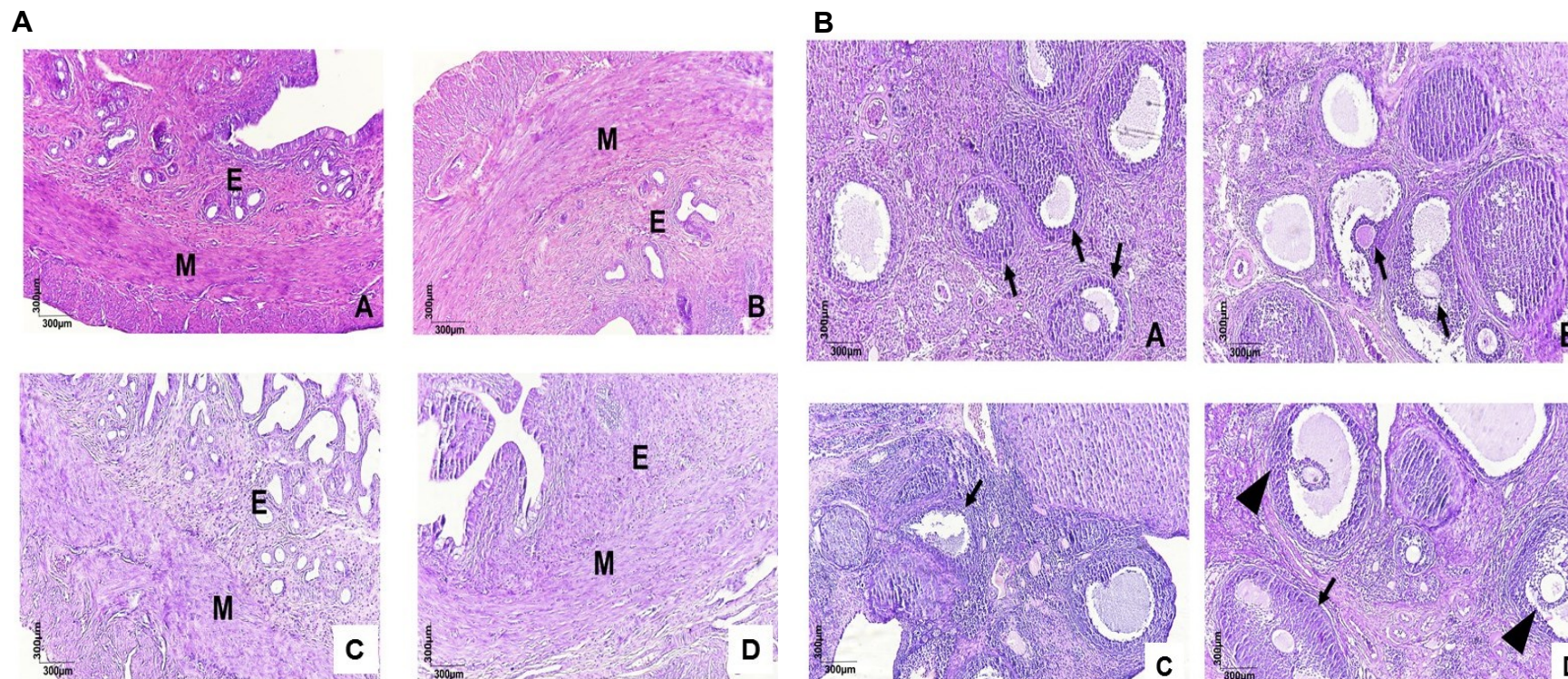
5.6.2 Avaliação dos efeitos da dismenorreia primária e da suplementação com *Spirulina platensis* sobre os parâmetros histomorfométricos do útero e ovários em ratas Wistar

No corte histológico de útero (Figura 11A) corado em hematoxilina e eosina mostrando partes do órgão, destacando o endométrio (E) e o miométrio (M). Nos animais do grupo GC (A), observa-se endométrio histologicamente preservado, conformações glandulares circulares e ausência de lesão morfológica. Diferentemente no grupo DisP, observa-se glândulas endometriais desorganizadas e danos no tecido endometrial (E), além do espessamento da camada miometrial (M) quando comparado ao GC.

Já nos grupos suplementados com *Spirulina platensis* nas doses de 50 e 100 mg/kg (C e D), observa-se que a alga preveniu as alterações no endométrio preservando as conformações glandulares e ausência de lesão morfológica, bem como diminuiu a espessura da camada miometrial (M) quando comparado ao DisP. Ao analisar a espessura da camada miometrial (M), os dados morfométricos indicam que ao comparar as ratas do GC ($289,2 \pm 3,8 \mu\text{m}^2$), o grupo DisP ($582 \pm 11,5$) aumentou a espessura miometrial. Já as ratas suplementadas com *Spirulina platensis* 50 mg/kg preveniu parcialmente ($381,0 \pm 37,2 \mu\text{m}^2$) e 100 mg/kg totalmente ($308,8 \pm 22,7 \mu\text{m}^2$) o aumento da camada do miométrio quando comparados ao grupo DisP (Gráfico 10).

No corte histológico dos ovários (Figura 11B), observa-se a presença majoritária de folículos secundários nos grupos GC e DisP, já nos animais suplementados com a alga, além dos folículos secundários, observa-se folículos de Graaf.

Figura 11 – Efeito da dismenorrea primária e suplementação com *Spirulina platensis* sobre a morfologia do útero (A) e ovários (B) de ratas Wistar, nos grupos GC (A), DisP (B), DisP + SP50 (C), DisP + SP100 (D).

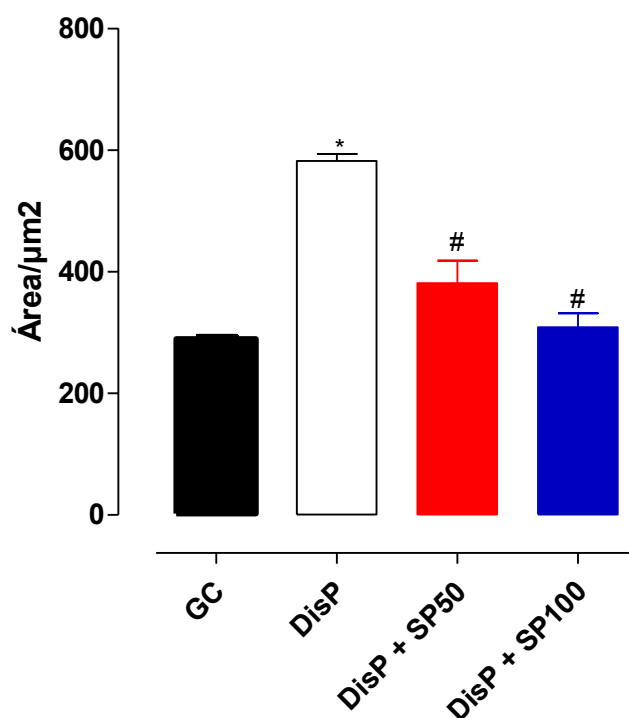


Fotomicrografia de útero (A) e ovários (B) de rata em GC (A), DisP (B), DisP + SP50 (C), DisP + SP100 (D). Em útero (A) observa-se o endométrio (E); miométrio (M). Nos ovários (↑) indicam folículos secundários e os (▲) indicam folículos de graaf. GC = grupo controle; DisP = grupo dismenorrea primária; DisP + SP50 = grupo dismenorrea primária + *Spirulina platensis* (50 mg/kg); IBU = grupo dismenorrea primária + *Spirulina platensis* (100 mg/kg).

Fonte: Autor, 2022.

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 10 – Efeito da dismenorreia primária e *Spirulina platensis* sobre a área muscular em útero de rata, nos grupos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 10). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP); e # $p < 0,05$ (DisP vs. DisP + SP50 e DisP + SP100).

Fonte: Autor, 2022.

5.6.3 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com *S. platensis* sobre acoplamento farmacomecânico de contração em útero de ratas Wistar

5.6.3.1 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com *S. platensis* sobre o acoplamento farmacomecânico de contração induzida por ocitocina ou PGF_{2α} em útero de ratas Wistar

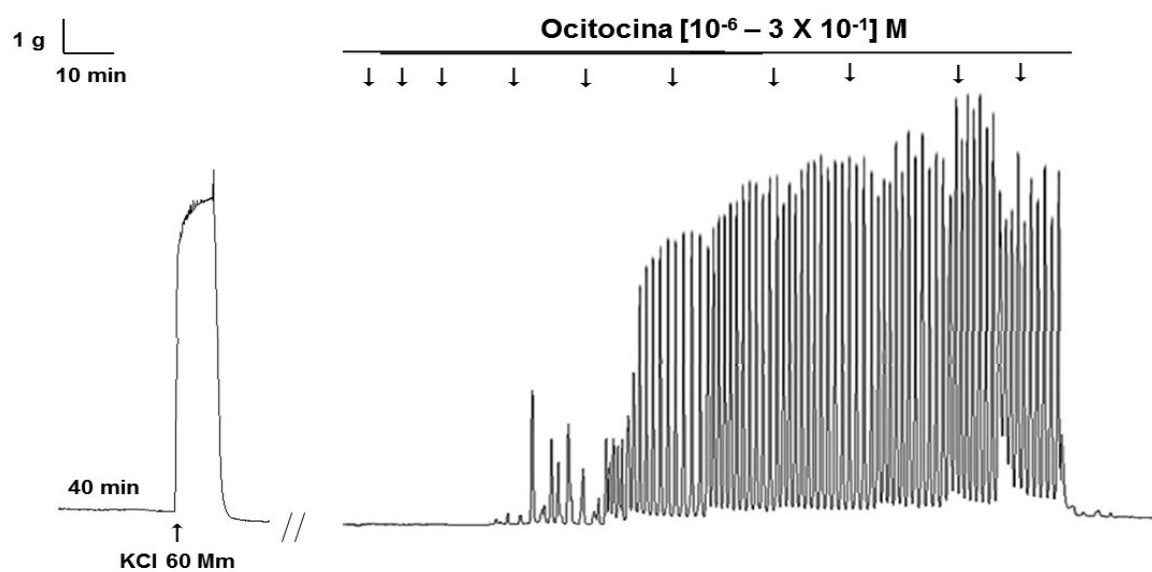
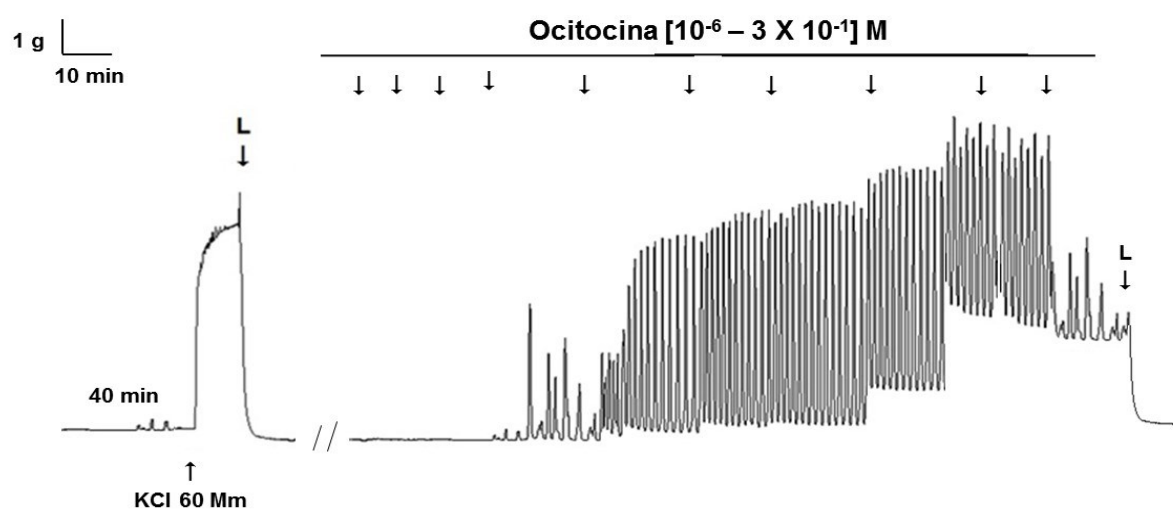
No grupo DisP, observou-se um aumento na potência e eficácia contrátil frente à ocitocina ($pCE_{50} = 3,5 \pm 0,1$; $E_{max} = 145,4 \pm 8,7\%$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 3,1 \pm 0,05$; $E_{max} = 100\%$) (Gráfico 11A e Tabela 2).

Quando as ratas eram suplementadas com a *S. platensis* na dose de 50 (Disp + SP50) não houve prevenção do aumento da potência e eficácia quando comparado ao grupo DisP ($pCE_{50} = 3,3 \pm 0,1$; $E_{max} = 131,9 \pm 2,7\%$), no entanto, quando os animais eram suplementados com a alga na dose de 100 mg/kg (Disp + SP100), a alga preveniu o aumento da potência e eficácia contrátil à ocitocina ($pCE_{50} = 3,1 \pm 0,1$; $E_{max} = 120,4 \pm 2,9\%$) quando comparado ao DisP (Gráfico 11A e Tabela 2).

Com a PGF_{2α} no grupo DisP, observou-se um aumento na potência e eficácia contrátil frente à PGF_{2α} ($pCE_{50} = 7,4 \pm 0,2$; $E_{max} = 127,3 \pm 15,7\%$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 6,2 \pm 0,1$; $E_{max} = 100\%$) (Gráfico 11B e Tabela 2).

Quando as ratas eram suplementadas com a *S. platensis* na dose de 50 (Disp + SP50) não houve prevenção do aumento da potência e eficácia quando comparado ao grupo Disp ($pCE_{50} = 7,4 \pm 0,1$; $E_{max} = 116,8 \pm 1,7\%$), porém, quando os animais eram suplementados com a alga na dose de 100 mg/kg (Disp + SP100), a alga preveniu parcialmente o aumento da potência ($pCE_{50} = 6,7 \pm 0,1$) sem alterar a eficácia contrátil da PGF_{2α} ($E_{max} = 119,0 \pm 3,9\%$) quando comparado ao Disp (Gráfico 11B e Tabela 2).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 17– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com ocitocina SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Lacerda-Júnior, 2022

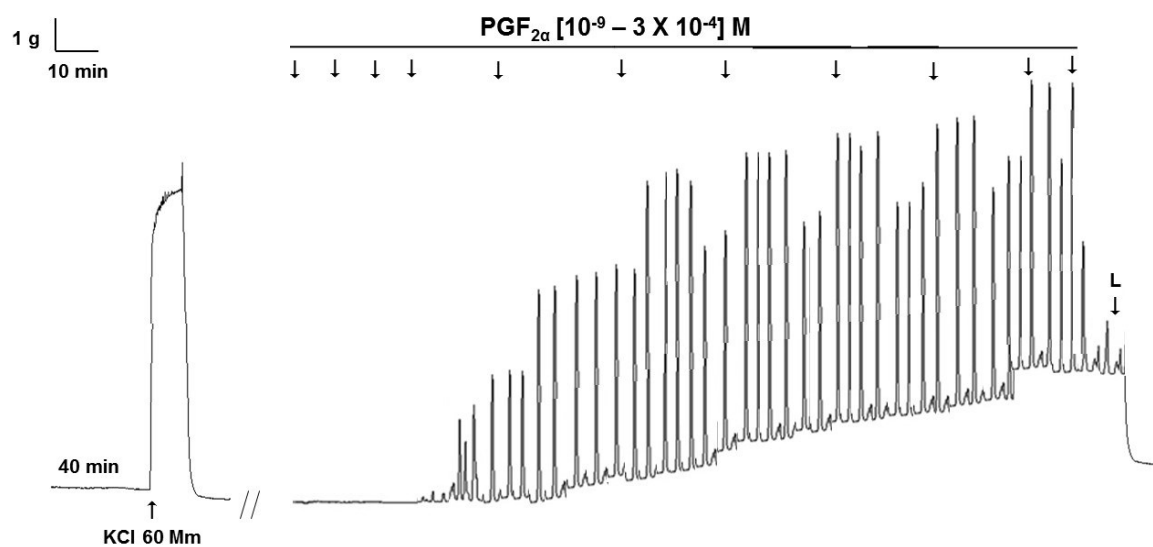
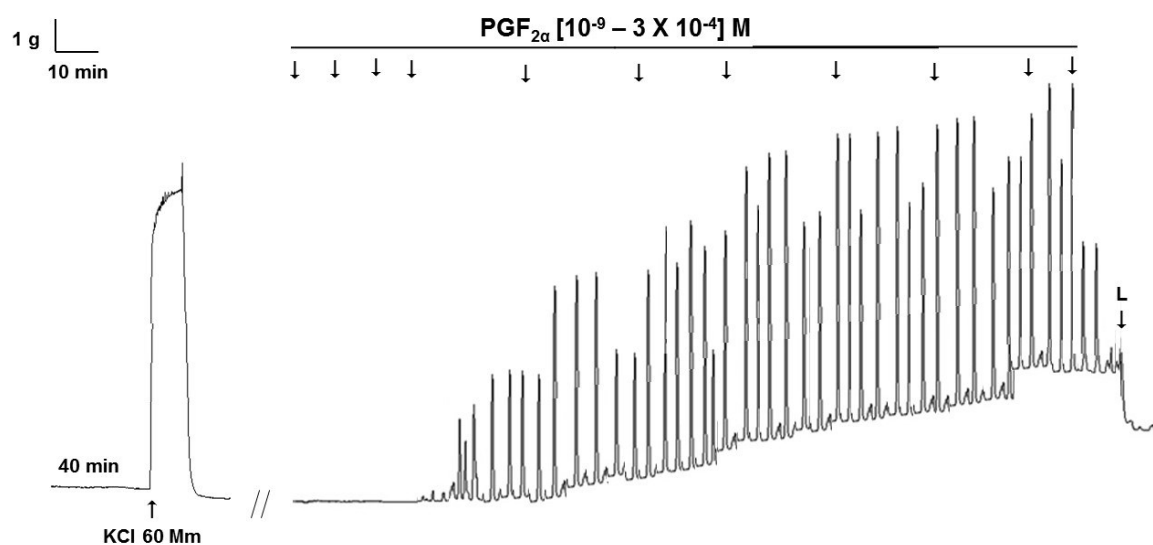
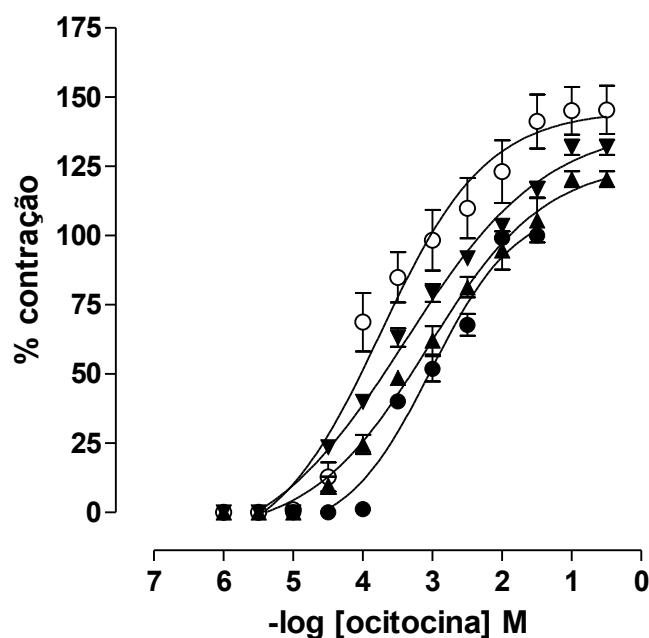
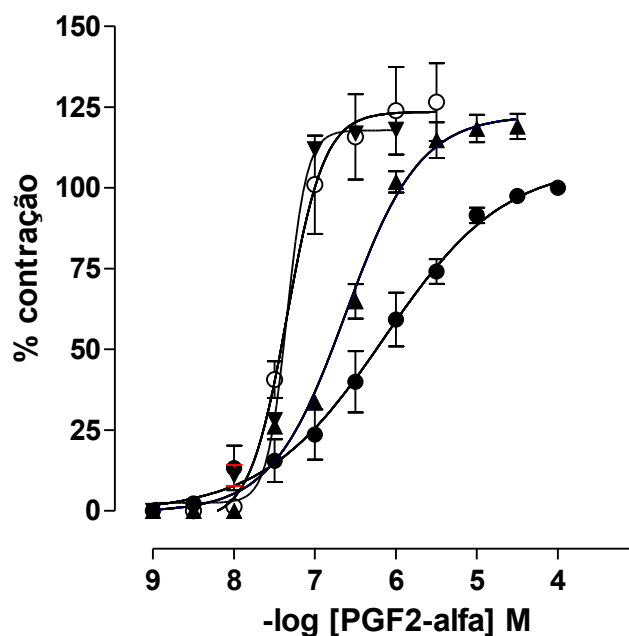
Figura 18– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com $\text{PGF}_{2\alpha}$ SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Gráfico 11 – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina (A) e PGF_{2α} (B) em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).

A)



B)



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one way*; nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 2 – Valores de E_{\max} e de pCE_{50} da $PGF_{2\alpha}$ em útero isolado de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

Agentes	Grupos	E_{\max} (%)	pCE_{50}
Ocitocina	GC	100	$3,1 \pm 0,1$
	DisP	$145,1 \pm 8,7^*$	$3,5 \pm 0,1^*$
	DisP + SP50	$131,9 \pm 2,7^*$	$3,3 \pm 0,1$
	DisP + SP100	$120,4 \pm 2,9^{*\#}$	$3,1 \pm 0,1^{\#}$
$PGF_{2\alpha}$	GC	100	$6,15 \pm 0,1$
	DisP	$127,3 \pm 15,6^*$	$7,42 \pm 0,2^*$
	DisP + SP50	$116,8 \pm 1,7$	$7,37 \pm 0,1^*$
	DisP + SP100	$119,0 \pm 3,90$	$6,65 \pm 0,1^{*\#\&}$

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $*p < 0,05$ (GC vs. DisP; DisP + SP50; DisP + SP100); $^{\#}p < 0,05$ (DisP vs. DisP + SP50; DisP + SP100), $^{\&}p < 0,05$ (DisP + SP50 vs. DisP + SP100), (n = 5). GC = grupo controle; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + SP50 = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 50 mg/kg; DisP + SP100 = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Autor, 2022.

5.6.3.2 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com *S. platensis* sobre o acomplamento eletromecânico de contração induzida por KCl

Frente a contração induzida pelo KCl no grupo DisP, observou-se um aumento na potência e eficácia contrátil frente ao agente contrátil ($pCE_{50} = 2,2 \pm 0,1$; $E_{max} = 164,0 \pm 7,9\%$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 1,8 \pm 0,1$; $E_{max} = 100\%$) (Gráfico 12 e Tabela 8).

Quando as ratas eram suplementadas com a *S. platensis* nas doses de 50 (Disp + SP50) e 100 mg/kg (Disp + SP100), preveniu o aumento da potência ($pCE_{50} = 1,8 \pm 0,1$; $pCE_{50} = 1,9 \pm 0,1$, respectivamente), o grupo DisP + SP50 preveniu parcialmente o aumento da eficácia contrátil do KCl ($E_{max} = 128,8 \pm 4,7\%$) diferentemente Disp + SP100 ($E_{max} = 102,9 \pm 1,8\%$) preveniu totalmente o aumento do efeito máximo, quando comparado ao Disp (Gráfico 12).

Lacerda-Júnior, 2022

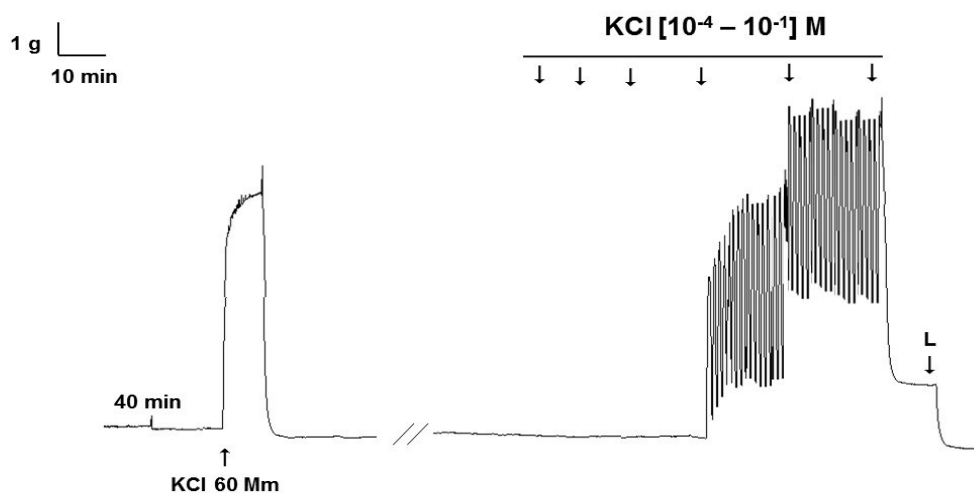
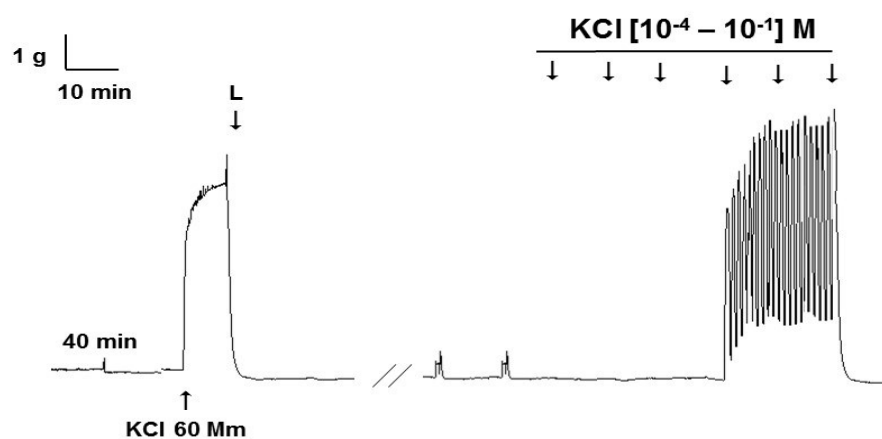
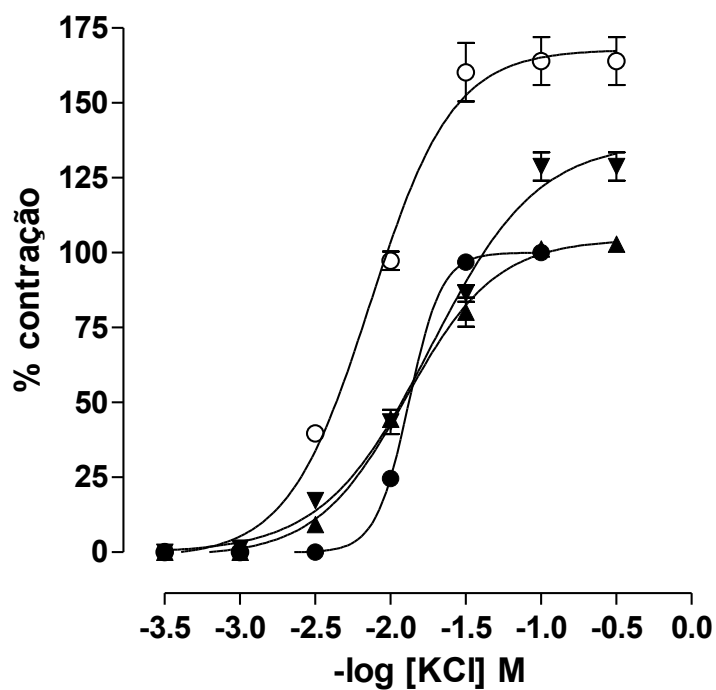
Figura 19– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de contração com KCl SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Gráfico 12 – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas ao KCl em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one way*; nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

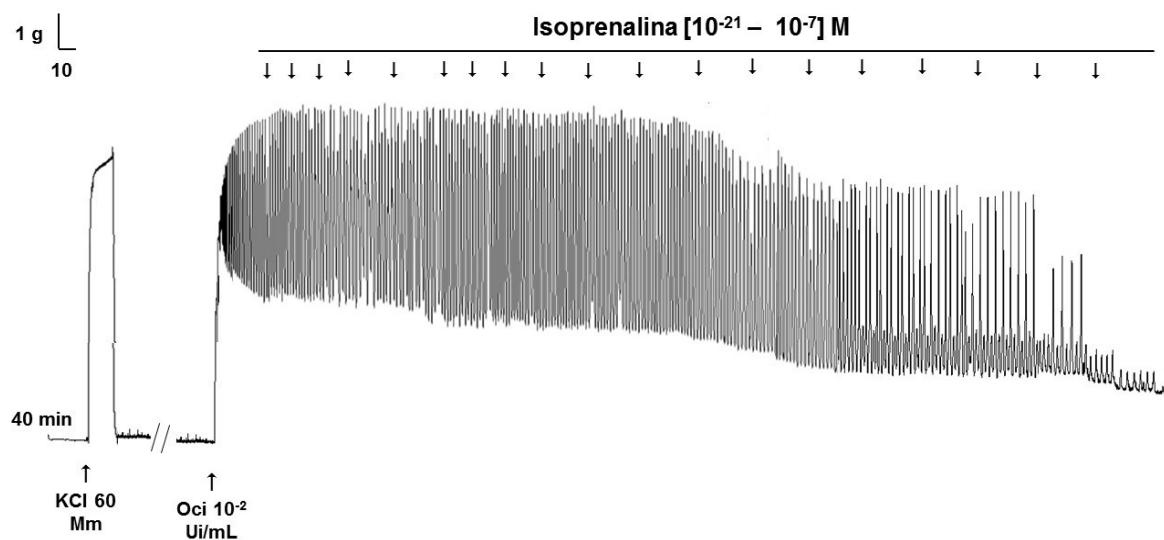
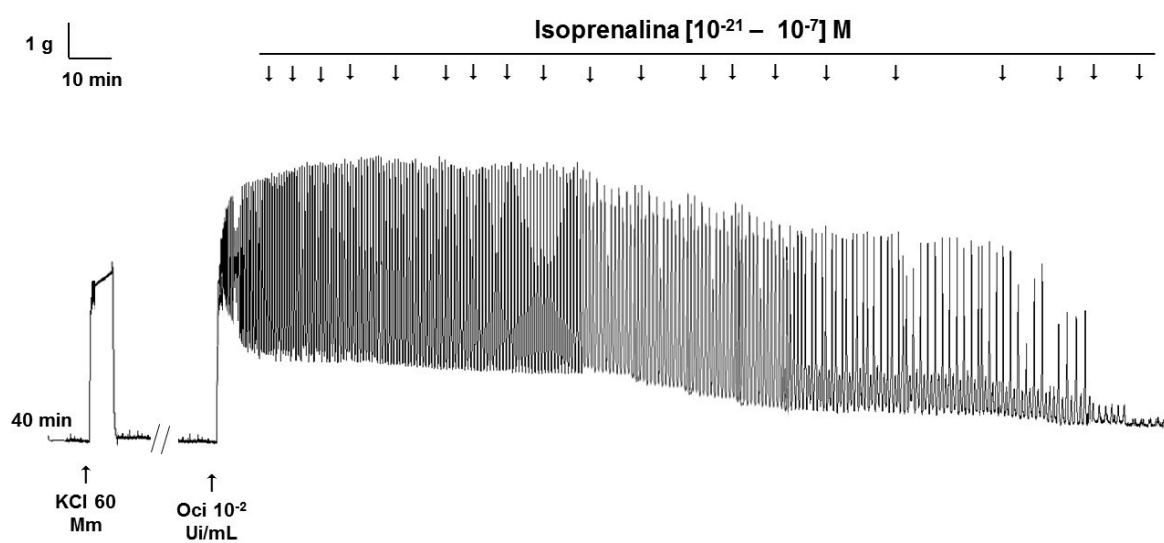
Fonte: Autor, 2022.

5.6.4 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com *S. platensis* sobre o acomplamento farmacomecânico de relaxamento induzido por isoprenalina

No relaxamento induzido pela isoprenalina o grupo DisP, diminuiu a potência e eficácia relaxante da isoprenalina ($pCE_{50} = 11,0 \pm 0,2$; $E_{max} = 79,4 \pm 2,7$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 15,1 \pm 0,2$; $E_{max} = 100\%$) (Gráfico 13).

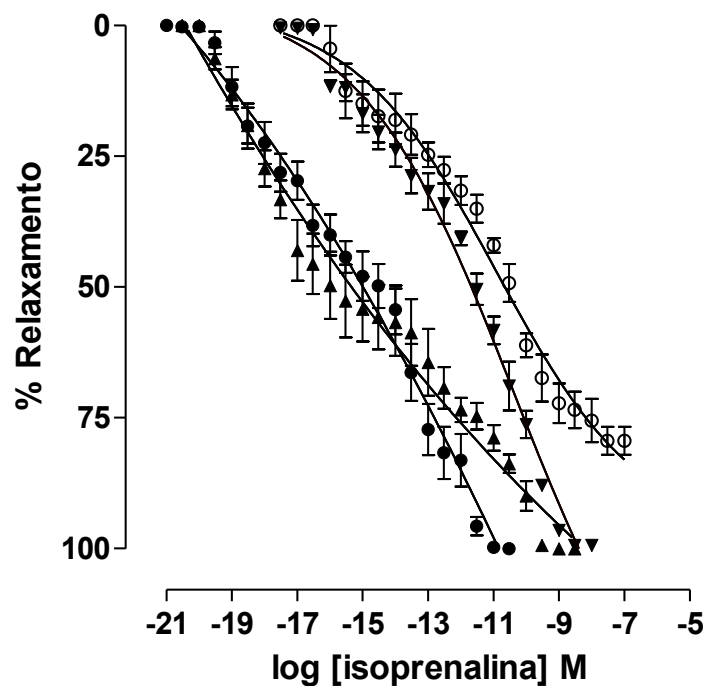
Quando as ratas eram suplementadas, com *S. platensis* na dose de 50 mg/kg, a alga preveniu uma diminuição do efeito máximo, mas não alterou a potência relaxante da isoprenalina ($pCE_{50} = 11,9 \pm 0,18$; $E_{max} = 99,4 \pm 0,6\%$), quando comparado ao grupo DisP, diferentemente quando as ratas foram suplementadas com a dose de 100 mg/kg (DisP + SP100) verificou-se uma prevenção da diminuição da potência e eficácia relaxante da isoprenalina ($pCE_{50} = 15,15 \pm 0,4$; $E_{max} = 100,0\%$) (Gráfico 13).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 20– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com isoprenalina SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.**A****B**

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 13 – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento a isoprenalina em útero isolado de rata pré-contráido com ocitocina, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one way*; nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

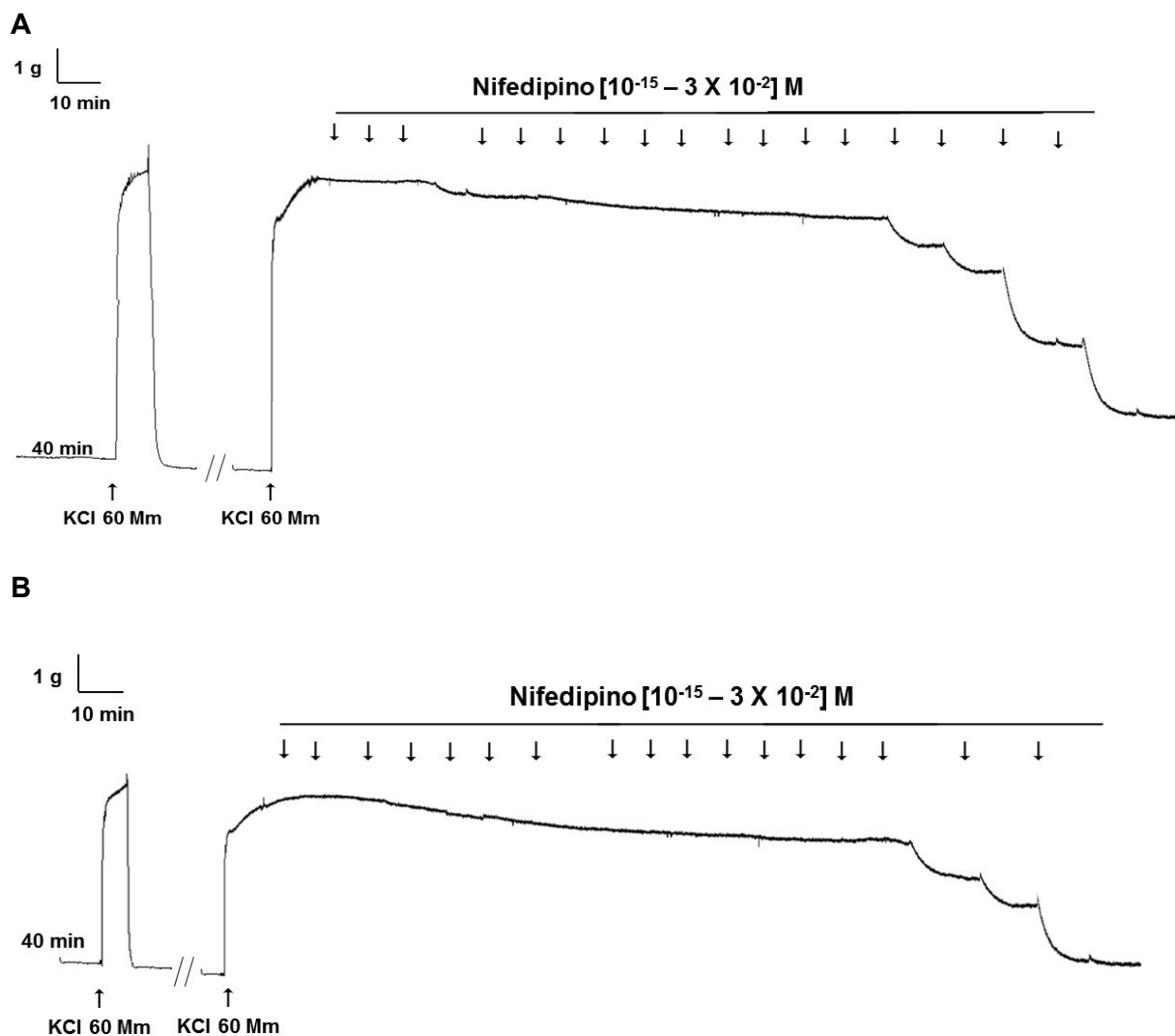
Fonte: Autor, 2022.

5.6.5 Efeito da dismenorreia primária e da suplementação com *S. platensis* sobre o acomplamento eletromecânico de relaxamento induzido por nifedipino

No relaxamento induzido com nifedipino o grupo DisP, diminuiu a potência e eficácia relaxantes do agente relaxante ($pCE_{50} = 6,6 \pm 0,1$; $E_{max} = 73,5 \pm 1,3\%$) quando comparado ao GC ($pCE_{50} = 9,5 \pm 0,1$; 100%) (Gráfico 14).

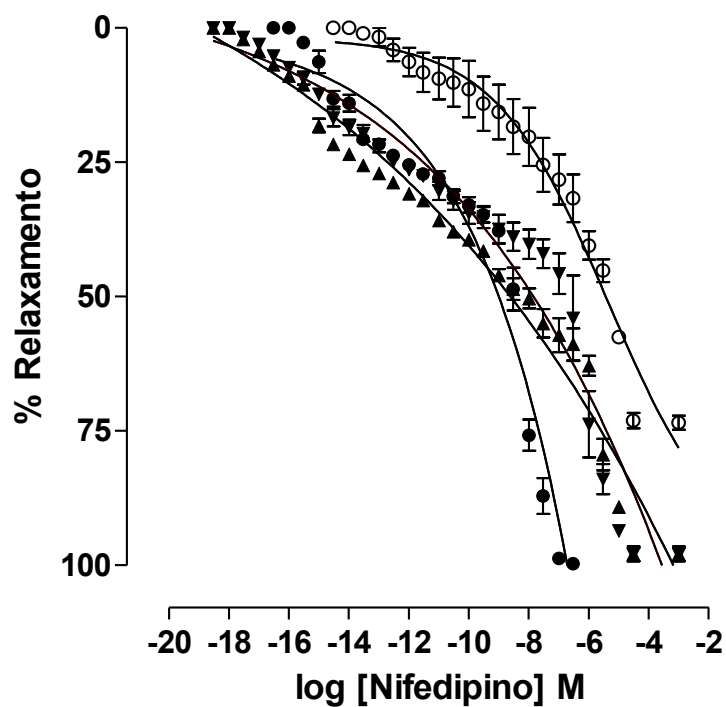
Quando as ratas eram suplementadas coma a alga, verificou-se que a suplementação com a dose de 50 mg/kg em DisP + SP50 uma prevenção da diminuição do efeito máximo relaxante do nifedipino e parcialmente da sua potência relaxante ($pCE_{50} = 8,1 \pm 0,1$; $E_{max} = 100\%$), porém no grupo DisP + SP100 com a dose de 100 mg/kg, observou-se prevenção total da diminuição da potência e do efeito máximo relaxantes do nifedipino ($pCE_{50} = 9,1 \pm 0,2$; 100%) (Gráfico 14).

Lacerda-Júnior, 2022

Figura 21– Registros originais das curvas concentrações cumulativas de relaxamento com nifedipino SP50 (A) e SP100 (B) em útero isolado de rata.

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 14 – Efeito da suplementação alimentar com *S. platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas de relaxamento com nifedipino em útero isolado de rata, nos GC (●), DisP (○), DisP + SP50 (▼) e DisP + SP100 (▲).



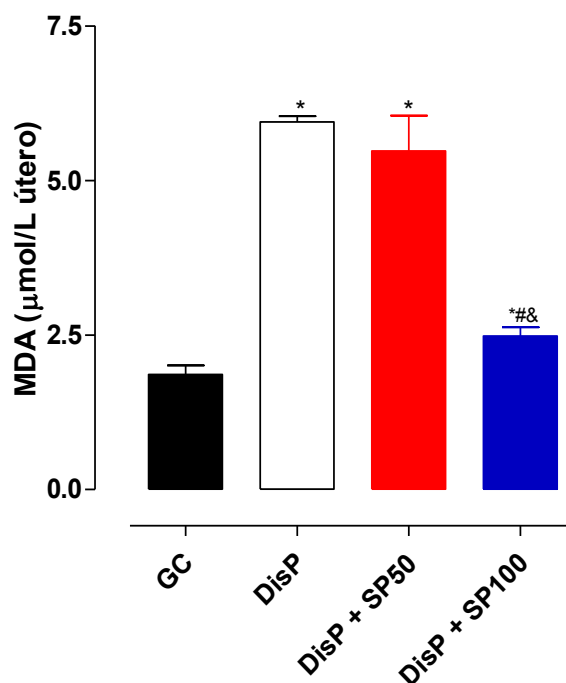
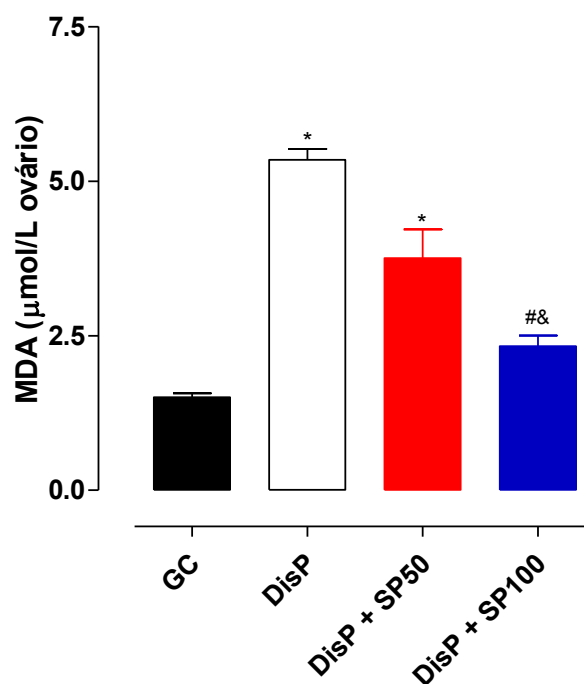
5.6.6 Efeito da dismenorreia primária e suplementação com *Spirulina platensis* sobre a concentração de malondialdeído (MDA) no útero e ovário de rata

Nas ratas do grupo DisP ($6,0 \pm 0,1\%$), verificou-se um aumento nos níveis de MDA em útero de ratas quando comparado ao GC ($1,9 \pm 0,2\%$). Quando as ratas foram suplementadas com *Spirulina platensis* na dose de 50 mg/kg, grupo DisP + SP50 ($5,5\% \pm 0,6\%$) a alga não preveniu o aumento de MDA, diferentemente a suplementação com a dose de 100 mg/kg (DisP + SP100) ($2,5\% \pm 0,1$) preveniu o aumento dos níveis de MDA quando comparado ao grupo DisP (Gráfico 15A).

Nos ovários, foi demonstrado que o grupo DisP ($5,4 \pm 0,2\%$) aumentou os níveis de MDA quando comparado ao GC ($1,5 \pm 0,1\%$). E as ratas quando suplementadas com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg (DisP + SP50 e DisP + SP100), preveniram o aumento dos níveis de MDA quando comparado ao grupo DisP ($3,8 \pm 0,5\%$ e $2,3 \pm 0,2\%$) respectivamente (Gráfico 15B).

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 15 – Efeito da dismenorreia primária e suplementação com *Spirulina platensis* sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

A**B**

Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. **p* < 0,05 (GC vs. DisP); #*p* < 0,05 (DisP vs. DisP + SP50; DisP + SP100), e &*p* < 0,05 (DisP + SP100 vs. DisP + SP50).

Fonte: Autor, 2022.

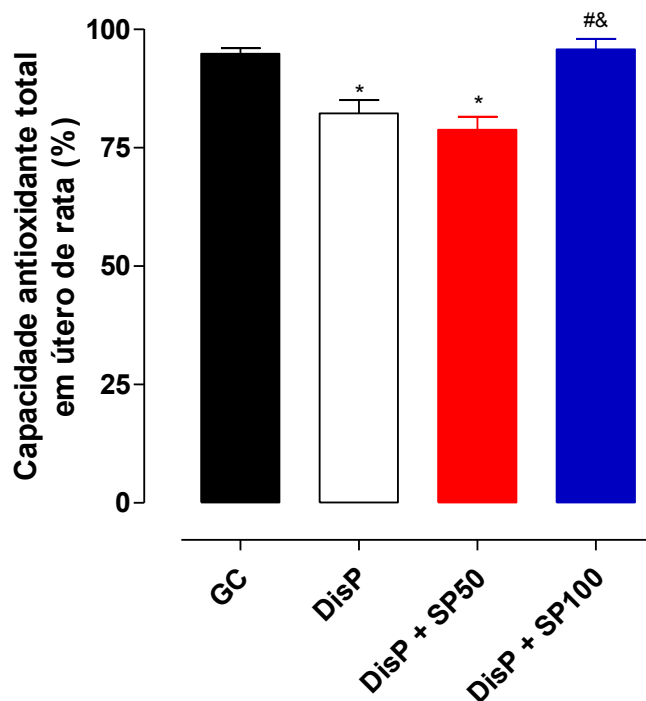
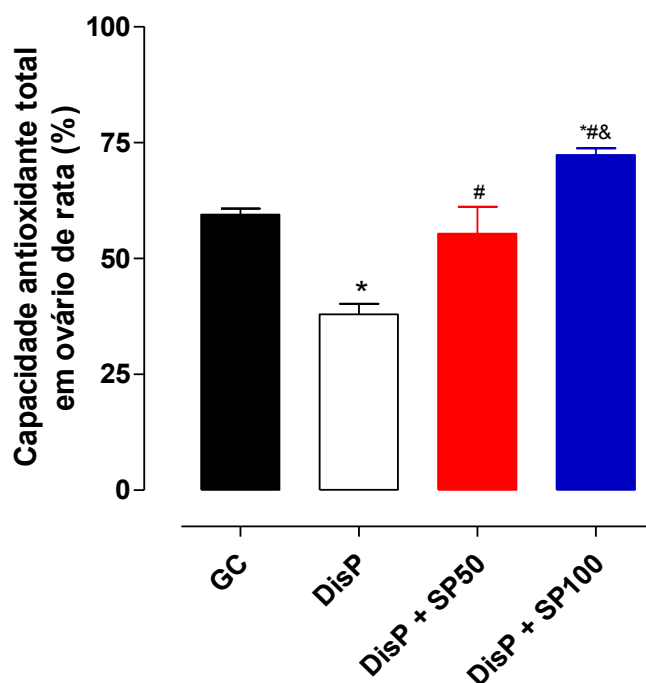
5.6.7 Efeito da dismenorreia primária e suplementação com *Spirulina platensis* sobre a capacidade antioxidante total (CAT) no útero e ovário de rata

Em útero de ratas, observou-se que o grupo DisP diminuiu a CAT ($82,2 \pm 2,9\%$) quando comparada ao controle ($94,8 \pm 1,2\%$). A suplementação com *Spirulina Platensis* na dose de 50 mg/kg ($78,8 \pm 2,8\%$) não preveniu a diminuição da CAT quando comparado ao grupo DisP, diferentemente a suplementação com a alga na dose de 100 mg/kg (DisP + SP100) ($95,7 \pm 2,2\%$) preveniu a diminuição da CAT (Gráfico 16A).

Nos ovários, verificou-se que o grupo DisP promoveu uma diminuição da CAT ($37,9 \pm 2,3\%$) quando comparada ao GC ($59,5 \pm 1,3\%$). Quando as ratas foram suplementadas com a alga nas doses de 50 mg/kg ($55,3 \pm 5,8\%$) e 100 mg/kg ($72,3 \pm 1,4\%$), ambas preveniram a diminuição da CAT quando comparados ao DisP (Gráfico 16B).

Lacerda-Júnior, 2022

Gráfico 16 – Efeito da dismenorreia primária e suplementação com *Spirulina platensis* sobre a capacidade antioxidante total no útero (A) e em ovário (B) de rata, nos GC, DisP, DisP + SP50 e DisP + SP100.

A**B**

Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP); # $p < 0,05$ (DisP vs. DisP + SP50; DisP + SP100), e & $p < 0,05$ (DisP + SP100 vs DisP + SP50).

Fonte: Autor, 2022.

Discussão

No presente trabalho, foi implantado o modelo de dismenorreia primária experimental induzido pela administração de dietilestilbestrol e ocitocina em ratas Wistar apresentado no capítulo 1, e foi observado que *Spirulina platensis* diminuiu a pontuação de contorções nas ratas em estudos *in vivo*, apresentando efeito anti-dismenorreico e nos parâmetros analisados *in vitro* SP preveniu o aumento da camada miometrial e danos a camada endometrial uterina, bem como preveniu o aumento da reatividade contrátil e aumento da relaxante em útero de ratas, adicionalmente a alga diminuiu o estresse oxidativo em útero e ovários de ratas promovido pela DisP.

A dismenorreia primária é a principal causa de dor pélvica crônica e acomete mulheres jovens e em idade fértil, causando absenteísmo de atividades essenciais. A DisP é considerada um problema de saúde público pela OMS e é caracterizada pela hipercontratibilidade uterina exacerbada durante o período menstrual, o tratamento farmacológico da DisP envolve o uso de AINEs e antiespasmódicos, o uso por tempo prolongado desses medicamentos pode desencadear o aparecimento de efeitos indesejáveis, como distúrbios no trato gastrointestinal (PARKER; SNEDDON; ARBON., 2010; LIDH; ELLSTRON; MILSON., 2012). Dessa forma, evidencia-se o interesse em compreender os processos bioquímicos envolvidos na fisiopatologia da DisP e na busca por novas substâncias para se estabelecer um tratamento eficaz para esse distúrbio.

Estudos recentes realizados por Ferreira et al. (2021) demonstrou que em útero de ratas Wistar submetidas ao treinamento intenso de força houve aumento da eficácia e diminuição da potência do componente eletromecânico da contração promovida pelo KCl e aumento da eficácia no componente farmacomecânico de contração induzida pela ocitocina, além de promover o aumento da camada miometrial uterina e do estresse oxidativo. Ferreira et al. (2021), relatou que a suplementação com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg preveniu o aumento da eficácia e diminuição da potência na contração induzida pelo KCl e previniu parcialmente o aumento da eficácia do componente farmacomecânico de contração induzida pela ocitocina, por inibição da via Rho/ROCK e diminuição dos níveis do ânion superóxido, bem como preveniu as alterações histológicas uterinas causadas

Lacerda-Júnior, 2022

pelo exercício intenso de força, como aumento da camada miometrial. Diante disso, sugeriu-se que a suplementação com a SP promove benefícios frente a problemas no sistema reprodutor feminino, envolvendo hipercontratibilidade uterina como aborto e dismenorreia primária.

Nesse contexto, a *S. platensis*, que é uma alga verde-azulada com alto valor nutricional, que vem chamando atenção como fonte potencial para o tratamento de diferentes doenças. Visto que a suplementação com a alga promoveu efeitos benéficos em útero de rata frente as alterações causadas pelo exercício de força, decidiu-se avaliar se a suplementação com *S. platensis* preveniria as alterações desenvolvidas pela dismenorreia primária em útero e ovário de ratas Wistar. Diante dessa premissa, decidimos avaliar se a suplementação com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg preveniria o aumento das contorções promovidas pela DisP em útero de ratas Wistar, esperávamos que caso a hipótese fosse verdadeira, observaríamos uma redução da pontuação de contorções.

Nos resultados de pontuação de contorções frente ao modelo experimental de DisP, observamos que a suplementação com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg durante 8 semanas, preveniu o aumento da pontuação de contorções quando comparado ao grupo DisP, sugerindo dessa forma que a alga apresenta um efeito antidismenorreico, possivelmente apresentando um efeito anti-inflamatório ou antiespasmódico.

Essas atividades farmacológicas já foram atribuídas a esta alga em outros estudos, como demonstrado por Ferreira et al. (2021) e Barros (2021) nos quais a alga, promoveu diminuição da eficácia do KCl no acoplamento eletromecânico de contração em útero de ratas treinadas por promover inibição das ciclooxigenases e diminuir dessa forma a produção de prostanoídes contráteis, como a $\text{PGF}_{2\alpha}$. Além disso, em outros modelos de músculo liso como em íleo e corpo cavernoso de ratos, verificou-se que a alga também melhorou a reatividade relaxante prejudicada pela obesidade, por possivelmente inibir as ciclooxigenases, desencadeando a diminuição da formação de prostaglandinas contráteis. Adicionalmente esse efeito anti-inflamatório da SP é atribuído aos compostos presentes na composição dessa alga, um desses constituintes é a ficocianina, um pigmento fotossintético majoritário da alga, que é descrita como um potente inibidor seletivo da COX-2 em humanos (REDDY et al., 2021).

Durante o período menstrual, em que ocorre a DisP há um aumento na produção de mediadores inflamatórios e contráteis no útero, promovidas pelo aumento dos níveis de estradiol e diminuição da progesterona. A hipercontratilidade uterina, característica da DisP tem sua gênese envolvida com o aumento da espessura da camada miometrial, que ocorre durante o período menstrual proporcionado assim, aumento na área de músculo liso que é o tecido responsável por contrair e relaxar este órgão. Observa-se também nesse período, aumento dos danos ocasionados pela esfoliação no endométrio uterino, sendo essa camada conhecida por acumular e funcionar como estoques de ácido araquidônico, um substrato para ação de enzimas como a PLA₂ que induz a produção de agentes pró-inflamatórios (BONNEY, 1985; GUIMARÃES; PÓVORA, 2020).

Dessa forma, decidimos avaliar se a suplementação com SP preveniria o aumento da camada miometrial e os danos provocados pela DisP ao endométrio uterino. E esperávamos que se a hipótese fosse verdadeira, observaríamos uma diminuição da área miometrial e desorganização glandular no endométrio. Observamos nos nossos resultados, que a alga na dose de 50 e 100 mg/kg preveniu o aumento da camada miometrial e levou a organização parcial e prevenção de danos na camada endometrial uterina. Na histomorfometria dos ovários a alga promoveu a preservação de folículos secundários e de Graaf que são folículos maduros envolvidos nos processos fisiológicos desse órgão, como a ovulação. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Osman et al., (2012) e Abdel-Aziem (2018) que sugerem que a SP causa manutenção das funções ovarianas, promovendo maturação dos folículos maduros, preservando principalmente a presença de folículos secundários e de graaf nesse órgão, dessa forma garantindo o processo de ovulação e diminuindo danos a fertilidade feminina induzidos pelo glutamato monossódico.

Esses resultados em útero, podem ser atribuídos a modulação negativa das ações do estrogênio, podendo a alga estar diminuindo os efeitos desse hormônio sobre a proliferação celular da camada miometrial e endometrial. Ademais a SP pode estar modulando negativamente a sinalização da via das MAPK que sofre superativação em quadros inflamatórios como a DisP, e pode estar envolvida com o aumento da contratilidade uterina e espessamento miometrial (THONG et al., 2021). Outros estudos também sugeriram a SP como um possível agente inibidor

Lacerda-Júnior, 2022

da via das MAPK em corpo cavernoso de ratos obesos e em útero de ratas submetidas ao treinamento físico (SOUZA et al., 2018; FERREIRA, 2019). Esses efeitos podem ser atribuídos a ficocianina presente na composição da SP, estudos realizados por Khan et al., (2006) e Soni et al., (2015) demonstram que este pigmento fotossintético presente na alga, se apresenta como um possível inibidor da via das MAPK promovendo diminuição da proliferação e crescimento do músculo cardíaco promovendo citoproteção.

Visto isso, a hipercontração uterina é o principal fator que ocasiona a cólica menstrual em mulheres, diversos estudos mostram que em quadros de DisP há aumento de hormônios que regulam a contração uterina como ocitocina e estradiol em líquidos menstruais e sangue de mulheres com esse distúrbio. Segundo Susan e Arrowsmith (2012) o aumento dos níveis de estradiol durante a menstruação, pode levar através de ações transcricionais desse hormônio ao aumento da expressão de receptores envolvidos na contração uterina como o da ocitocina (OT), $\text{PGF}_{2\alpha}$, de proteínas associadas a contração como proteínas da via da Rho/ROCK, proteína cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e miosina, além de modular positivamente a expressão de canais de Ca_v .

Visto isso, a contração uterina pode ser desencadeada pelo acoplamento farmacomecânico, que ocorre por exemplo quando um agonista como a ocitocina se liga ao seu receptor (OT) e leva a ativação de cascatas de sinalização, resultando no aumento das concentrações citosólicas de Ca^{2+} , promovendo a contração uterina. Diante dessa premissa, decidimos avaliar se a suplementação com a alga preveniria o aumento da contratilidade uterina no acoplamento farmacomecânico induzido pela ocitocina ou $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Na avaliação de reatividade uterina, observamos que a alga na dose de 50 mg/kg não preveniu o aumento de potência e eficácia promovidas pela DisP no acoplamento farmacomecânico de contração, diferentemente a SP na dose de 100 mg/kg preveniu totalmente o aumento da potência e parcialmente do efeito máximo da ocitocina. Resultados similares foram observados por Ferreira et al. (2021) nos quais a alga na dose de 100 mg/kg preveniu o aumento da potência e eficácia da ocitocina em ratas submetidas ao treinamento de força. Possivelmente, os efeitos observados pela alga na dose de 100 mg/kg sugerem que a prevenção pode estar

ocorrendo a nível de receptor ou por mecanismos subsequentes de transdução celular do acoplamento farmacomecânico (NEUBIG et al., 2003).

Já é bem elucidado que as contrações uterinas exarcebadas no quadro de cólica uterina, pode ser mediada pela produção excessiva de prostaglandinas. Pickles et al. (1965) observou que um dos fatores que contribuem para a dismenorreia é o aumento na concentração de prostaglandinas antes da menstruação, essas sugestões foram confirmadas por outros autores que demonstraram que as prostaglandinas são superproduzidas na dismenorreia e que essas substâncias causam contração em vasos que suprem o útero e promovem atividade contrátil anormal uterina (FAJRIN; ALAM; USMAN, 2020). Diante dessa premissa, levantamos a hipótese que a suplementação com SP poderia prevenir o aumento da reatividade contrátil induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ em útero de ratas com DisP.

Observamos que no acoplamento farmacomecânico de contração utilizando a $\text{PGF}_{2\alpha}$, a SP na dose de 50 mg/kg não preveniu o aumento de potência e eficácia da $\text{PGF}_{2\alpha}$ promovido pela DisP, já na dose de 100 mg/kg a SP preveniu parcialmente o aumento da potência, mas não preveniu o aumento da eficácia da $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzida pela DisP. Esses resultados sugerem que a suplementação com a alga na dose de 50 mg/kg não previne as alterações na via pela qual a PG promove a contração uterina desencadeadas pela DisP, mas na dose de 100 mg/kg a prevenção parcial do aumento da potência da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sugere que esse efeito da alga pode está relacionado a uma modulação negativa a nível de receptor da PG.

Adicionalmente, outra forma de induzir o aumento na contratilidade uterina é através do influxo de Ca^{2+} . O aumento da concentração desses íons pode se dá pela ativação do acoplamento eletromecânico de contração. Esse evento pode ocorrer por exemplo, pela abertura dos canais de Ca^{2+} na membrana da célula muscular lisa como os Ca_v . Nesse contexto, estudos recentes vêm correlacionando um aumento nos níveis de íons Ca^{2+} em tecidos uterinos isolados de camundongos e ratos submetidos a modelos experimentais de DisP (WANG et al., 2010; XIAO et al., 2019). Ademais BANCUI et al. (2013) demonstrou que a expressão dos Ca_v pode ser modulada positivamente pela ação do estrogênio em ratas com DisP, fato que este que pode estar relacionado com a patogênese da DisP. Diante disso, decidimos avaliar se a suplementação com a alga SP prevenia as alterações promovidas pela DisP no acoplamento eletromecânico de contração.

Curiosamente, frente ao acoplamento eletromecânico de contração induzida pelo KCl, a suplementação com a alga nas doses de 50 e 100 mg/kg preveniram o aumento da potência, mas na dose de 50 mg/kg a suplementação com SP preveniu parcialmente o aumento da eficácia, já na dose de 100 mg/kg a alga preveniu totalmente esse aumento promovido pela DisP. Esses resultados indicam que a alga pode estar modulando negativamente a expressão dos Ca_v inibindo os efeitos do estradiol ou atuando promovendo inibição direta destes canais. Resultados semelhantes foram descritos por Ferreira (2017) em íleo de ratos obesos e Ferreira et al (2021) em útero de ratas treinadas, sugerindo que a alga pode estar diminuindo o influxo de Ca^{2+} e diminuindo a contratilidade do músculo liso.

Baseado nesse cenário, a contratilidade uterina desregulada pode ser promovida pelo aumento das $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ou pela inibição das vias que levam ao relaxamento uterino. Visto isso, o relaxamento uterino pode ocorrer pelo acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico. O acoplamento farmacomecânico de relaxamento pode ser mediado por alguns agentes, como por exemplo agonistas β -adrenérgicos como a isoprenalina. Dessa forma, a isoprenalina ao se ligar aos seus receptores na célula muscular lisa, desencadeia uma série de reações que resultam na diminuição de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ levando ao relaxamento uterino (BERNAL, 2007).

Já é bem descrito na literatura que a progesterona é o hormônio sexual feminino que regula majoritariamente a expressão de proteínas envolvidas na sinalização adrenérgica uterina, além disso, mais recentemente vem sendo associada a regulação positiva da expressão dos canais de K^+ no útero. Perante o exposto, em quadros de DisP, observa-se uma relação do menor nível de progesterona em mulheres com maior intensidade da dor. Essa diminuição dos níveis de progesterona ocorre durante o início da menstruação, e observa-se um aumento das ações estrogênicas, o que dificulta o relaxamento uterino (BERNADI et al., 2017; WRAY et al., 2021). Diante do exposto, decidimos avaliar se a SP preveniria as alterações de reatividade no acoplamento farmacomecânico de relaxamento provocadas pela DisP.

Verificamos que no acoplamento farmacomecânico de relaxamento, a alga na dose de 50 mg/kg não preveniu a diminuição da potência relaxante induzida pela DisP, mas preveniu a diminuição da eficácia da isoprenalina. Diferentemente a

Lacerda-Júnior, 2022

suplementação com a alga na dose de 100 mg/kg preveniu totalmente a diminuição da potência e eficácia da isoprenalina. Esses resultados sugerem que a alga pode estar possivelmente prevenindo essas alterações por promover potencialização das ações da progesterona, aumentando a expressão de proteínas da via adrenérgica como as proteínas G_s e adenilil ciclase, ou ainda modulando positivamente vias que podem culminar com o relaxamento uterino como o envolvimento da via das ciclooxygenases, do NO e de espécies reativas de oxigênio.

O relaxamento uterino, também pode ser realizado através do acoplamento eletromecânico. Uma forma de produzir o relaxamento uterino é a utilização de bloqueadores dos Ca_v como o nifedipino, que atua promovendo o bloqueio destes canais ao se ligar no seu sítio N. Nesse sentido, o relaxamento uterino pode ser prejudicado pela ação dos hormônios ovarianos como estradiol, que apresenta seus níveis aumentados em mulheres com DisP. WRAY (2021) relata que esse hormônio pode regular a expressão de canais iônicos na musculatura lisa uterina, promovendo a diminuição da expressão dos canais de K^+ e aumento da expressão dos Ca_v . Dessa forma, decidimos avaliar se a suplementação com alga SP preveniria as alterações de reatividade no acoplamento eletromecânico de relaxamento promovidas pela DisP.

Observamos que no acoplamento eletromecânico de relaxamento, a alga na dose de 50 mg/kg não preveniu a diminuição da potência relaxante do nifedipino induzida pela DisP, mas preveniu a diminuição da eficácia do nifedipino. Porém a suplementação com a alga na dose de 100 mg/kg preveniu totalmente a diminuição da potência e eficácia da isoprenalina. Esses resultados corroboram os resultados obtidos no acoplamento eletromecânico de contração, sugerindo que a alga pode está regulando negativamente a ativação dos Ca_v ou a expressão destes canais, além disso a alga pode possivelmente está inibindo enzimas que ativam esses canais como a proteína cinase C (PKC), o mesmo efeito foi observado em outros modelos de músculo liso, em que a alga diminuiu contração em íleo de ratos obesos induzida pelo KCl (FERREIRA, 2017) e por Ferreira (2019) e Barros (2021) em útero de ratas treinadas.

Nesse sentido, ativação de proteínas como PKC, Rho/ROCK e a via das MAPK podem estar envolvidas com ativação dos Ca_v e aumento das concentrações de Ca^{2+} resultando na contração uterina. Recentemente as EROs

Lacerda-Júnior, 2022

vêm sendo descritas como espécies sinalizadoras que regulam processos fisiológicos e patológicos no sistema reprodutor feminino, como por exemplo a contração uterina que é vital para a fertilidade feminina, movimentos estes essenciais para implantação dos óvulos fecundados, movimentação dos espermatozoides, além da realização dos processos de renovação tecidual que ocorre durante o período menstrual (DIKENSOY et al., 2008; SZMIDT et al., 2020).

Durante o período menstrual o aumento da contração uterina ocasionada pelo aumento na produção de PGs leva a contração nos vasos que irrigam o útero, além do aumento na contração uterina. Esses eventos culminam em processo de hipóxia, que desencadeia o aumento na produção de EROs essas espécies reativas podem levar a ativação de proteínas envolvidas na contração uterina, como a PKC e inibição da ciclase de guanilil solúvel, enzima envolvida no relaxamento uterino promovido pelo NO, além disso a produção exagerada das EROs podem levar a produção de danos ao tecido uterino, através de reações de peroxidação lipídica. O aumento das EROs vem sendo recentemente descritas como um dos principais mediadores envolvidos na patogênese da DisP, atribuindo-se a estas um papel importante na exacerbação da contração uterina levando ao aparecimento da dor em mulheres com DisP. Diante dessa premissa, decidimos avaliar se a suplementação com SP preveniria o desbalanço do estresse oxidativo causado pela DisP (ORIMADEGUN et al., 2019; SZMIDT et al., 2020).

Observamos nos resultados obtidos que a alga promoveu melhora nos parâmetros do estresse oxidativo. A suplementação com SP na dose de 50 mg/kg preveniu o aumento dos níveis de MDA em ovários e a diminuição da CAT, mas não preveniu esses efeitos no útero. Curiosamente a suplementação com a alga na dose de 100 mg/kg preveniu o aumento de MDA e a diminuição da CAT em útero e ovários promovido pela DisP.

Há descrito na literatura muitos estudos mostrando os efeitos antioxidantes da *S. platensis*, por distintos mecanismos Bashandy et al. (2016) mostraram que, em ratos, a *S. platensis* aumenta a expressão das enzimas antioxidantes como a CAT e SOD. Outros estudos apontam compostos antioxidantes como a ficocianina presente na *S. platensis* como uma poderosa ferramenta envolvida no sequestro de radicais livres, devido sua alta estabilidade demonstrando grande capacidade antioxidante (BHAT et al., 2001). A composição da SP por carotenoides, vitaminas

Lacerda-Júnior, 2022

do complexo B e vitamina E, podem regular positivamente SOD, CAT, e diminuir radicais livres por reações de quelação, podendo prevenir a peroxidação lipídica, e captar radicais livres (SHALABY; SHANAB, 2013). Efeitos antioxidantes semelhantes também foram observados em outros modelos experimentais de músculo liso, como em aorta, íleo e corpo cavernoso de ratos obesos (BRITO et al., 2014; FERREIRA, 2017; SOUZA, 2018) e mais recentemente em úteros de ratas treinadas (FERREIRA et al., 2021).

A partir desse estudo, frente aos efeitos antidismenorreicos, como diminuição da pontuação das contorções, diminuição da reatividade contrátil e aumento da reatividade relaxante, além da diminuição do estresse oxidativo no útero, sugere-se um potencial papel para a alga na promoção de benefícios para mulheres com DisP. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para elucidar o mecanismo de ação pelo qual a SP exerce seus efeitos. Ademais, esse estudo reforça que a inserção de alimentos com alto valor nutricional, potencial antioxidante e antiinflamatório como a *Spirulina platensis* na alimentação podem melhorar os danos promovidos pela dismenorreia primária em mulheres.

6- Conclusões

Dessa forma, o modelo experimental de dismenorreia primária objeto desse estudo, foi validado promovendo no estudo *in vivo* os sinais clínicos da doença, que foram atenuados pelas drogas-padrão utilizadas na prática clínica, bem como promoveu nos estudos *in vitro* hipercontratibilidade uterina e aumento no estresse oxidativo, que são aspectos implicados na fisiopatologia da DisP, sugerindo que este estudo conseguiu replicar o modelo de DisP validando a implantação e padronização do método.

Na avaliação dos efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* em ratas com DisP é possível concluir:

- Preveniu o aumento das contorções uterinas (*in vivo*).
- Diminuiu o crescimento da camada miometrial e danos a camada endometrial em ratas com DisP;
- Não alterou a maturação dos folículos ovarianos;
- Preveniu o aumento da contratilidade uterina no acoplamento farmacomecânico e eletromecânico;
- Precaveu a diminuição do relaxamento no acoplamento farmacomecânico e eletromecânico;
- Reduziu o estresse oxidativo em útero e ovários.

Referências

ABDEL-AZIEH, S. H; ABD EL-KADER, H. A; IBRAHIM, F. M; SHARAF, H. A. Evaluation of the alleviative role of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* extract against ovarian dysfunctions induced by monosodium glutamate in mice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 653-660, 2018.

AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.

AGUNDEZ, J. A., BLANCA, M., CORNEJO-GARCIA, J. A., & GARCIA-MARTIN, E.. Pharmacogenomics of cyclooxygenases. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 5, p. 501-522, 2015.

AKERLAND M. Pathophysiology of dysmenorrhea. **Acta Obstet Gynecol.** 1979. V. 27, n. 32, 1979.

AKERLUND M. Vasopressin and oxytocin in normal reproduction and in the pathophysiology of preterm labour and primary dysmenorrhoea. **Development of receptor antagonists for therapeutic use in these conditions.** Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku. V. 2004, n. 49, v. 18-21, 1995.

ALASALVAR, C; MIYASHITA, K; SHAHIDI, F; WANASUNDARA, U. (Eds.). Handbook of seafood quality, safety and health applications. **John Wiley & Sons**, 2011.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. **Garland Publishing; 2nd edition, New York**, London, 1989.

AMINI L; SHAMI M; CHEGINI R. The Relationship between Serum Levels of Oxidative Stress Biomarkers and Dysmenorrhea, Dyspareunia and Pelvic Pain in Women with Endometriosis. **Iran Journal Nursing**, v. 33, n. 126, p. 58-68, 2020.

ARITONANG, T. R.; RAHAYU, S.; SIRAIT, L. I.; KARO, M. B.; SIMANJUNTAK, T. P.; NATZIR, R.; SINRANG, A. W.; MASSI, M. N.; HATTA, M.; KAMELIA, E. The role of FSH, LH, estradiol and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)**, v. 35, n.1, p. 92-100, 2017.

ARMOUR, M.; DAHLEN, H. G.; ZHU, X., FARQUHAR, C.; SMITH, C. A. The role of treatment timing and mode of stimulation in the treatment of primary dysmenorrhea with acupuncture: an exploratory randomised controlled trial. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180177, 2017.

ARMOUR, M; PARRY, K; MANOHAR, N; HOLMES, K; FERFOLJA, T; CURRY, C; SMITH, C. A. The prevalence and academic impact of dysmenorrhea in 21,573 young women: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Women's Health**, v. 28, n. 8, p. 1161-1171, 2019.

ARROWSMITH, S; KENDRICK, A; WRAY, S. Drogas agindo no útero grávido. **Obstetrícia, Ginecologia e Medicina Reprodutiva**, v. 20, n. 8, p. 241-247, 2010.

ARROWSMITH, S1; WRAY, S. Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of neuroendocrinology**, v. 26, n. 6, p. 356-369, 2014.

BANCIU, A; DANIEL D. B; COSMIN C. M; MIHAI R; DRAGOS C; JUNJIE X; SANDA M. C; NICOLAE S; BEATRICE M. R. "Beta-Estradiol Regulates Voltage-Gated Calcium Channels and Estrogen Receptors in Telocytes from Human Myometrium". **International Journal of Molecular Sciences**. V. 19, n. 5, p. 1413, 2018.

BARCIKOWSKA, Z; RAJKOWSKA-LABON, E; GRZYBOWSKA, M. E; HANSDORFER-KORZON, R; ZORENA, K. Inflammatory markers in dysmenorrhea and therapeutic options. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 4, p. 1191, 2020.

BASHANDY, S. A; EL AWDAN, S. A; EBAID, H; ALHAZZA, I. M. Antioxidant potential of *Spirulina platensis* mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016.

BERNAL, A. L. The regulation of uterine relaxation. **In Seminars in cell & developmental biology**. V. 18, N. 3, p. 340-347, 2007.

BERNARDI, M; LAZZERI, L; PERELLI, F; REIS, F. M; PETRAGLIA, F. Dysmenorrhea and related disorders. **F1000Research**, v. 6, 2017.

BERRIDGE, M. J. Calcium signalling remodelling and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 2, p. 297-309, 2012.

BHAT, V. B; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 285, n. 2, p. 262-266, 2001.

BI, W; ZHOU, J; ZHAO, L; WANG, C; WU, W; ZHANG, L; ZHOU, F. Preventive effect of different citrus essential oils on primary dysmenorrhea: in vivo and in vitro study. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101135, 2021.

BLANKS A. M, THORNTON S. The role of oxytocin in parturition. **Brazilian Journal Obstetric and Gynecology**, v.110, n. 20, p. 4651, 2013.

BLESSON, C. S., BÜTTNER, E., MASIRONI, B., & SAHLIN, L. Prostaglandin receptors EP and FP are regulated by estradiol and progesterone in the uterus of ovariectomized rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2012.

BLEY, K. R; HUNTER, J. C; EGLEN, R. M; SMITH, J. A. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. **Trends in pharmacological sciences**, v. 19, n. 4, p. 141-147, 1998.

BONNEY, R. C. Measurement of phospholipase A2 activity in human endometrium during the menstrual cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 183-189, 1985.

BREYER, M. D; BREYER, R. M. Prostaglandin E receptors and the kidney. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 279, n. 1, p. F12-F23, 2000.

BROWN, A; CORNWELL, T.; KORNIYENKO, I; SOLODUSHKO, V; BOND, C. T.; ADELMAN, J. P.; TAYLOR, M. S.; Myometrial expression of small conductance Ca²⁺- activated K channels depresses phasic uterine contraction. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, p. 832–840, 2007.

BURDYGA T, WRAY S, NOBLE K. In situ calcium signaling: no calcium sparks detected in rat myometrium. **Ann NY Acad Sci**, v. 1101, p. 8596, 2007.

BURNETT; LEMYRE, M. Diretriz de consenso de dismenorrea primária. **Journal of Obstetrics and Gynecology Canada**. n. 435, p. 585-595. 2007.

BURNS, P. D; MENDES JR, J. O; YEMM, R. S; CLAY, C. M; NELSON, S. E; HAYES, S. H; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F_{2α} synthesis: role of Gi proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1150-1155, 2001.

BYTAUTIENE, E.; VEDERNIKOV, Y. P.; SAADE, G. R.; ROMERO, R.; GARFIELD, R. E. Effect of histamine on phasic and tonic contractions of isolated uterine tissue from pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 3, p. 774-778, 2003.

CAMARGO, I. C. C; NERES, W. E; MELLO, A. P. Q; SIMÃO, V. A. Avaliação do ciclo estral, tecido ovariano e uterino e parâmetros fetais de ratas Wistar tratadas com Topiramato. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 2, p. 55-70, 2012.

CARRASCO-GARCIA, A. A; CAMACHO, M. A; PACHECO, P; CARRILLO, P; CORIA-AVILA, G. A; PAREDES-RAMOS, P. Artificial vagino-cervical stimulation modifies the frequency of uterine contractions during the estrous cycle of the female rat/La estimulación vaginocervical artificial modifica la frecuencia de contracciones uterinas durante el ciclo estral de la rata hembra. **eNeurobiologia**, v. 10, n. 25, p. 155-167, 2019.

CARRIZZO, A., CONTE, G. M., SOMMELLA, E., DAMATO, A., AMBROSIO, M., SALA, M., ... & VECCHIONE, C. Novel potent decameric peptide of *Spirulina platensis* reduces blood pressure levels through a PI3K/AKT/eNOS-dependent mechanism. **Hypertension**, v. 73, n. 2, p. 449-457, 2019.

CARROQUINO-GARCIA, P; JIMÉNEZ-REJANO, J. J; MEDRANO-SANCHEZ, E; DE LA CASA-ALMEIDA, M; DIAZ-MOHEDO, E; SUAREZ-SERRANO, C.

Therapeutic exercise in the treatment of primary dysmenorrhea: A systematic review and meta-analysis. **Physical therapy**, v. 99, n. 10, p. 1371-1380, 2019.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 8, 2011.

CHAPRON C, BORGHESE B, STREULI I, et al. Markers of adult endometriosis detectable in adolescence. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2017. Supl. 12.

CHEN, J; WANG, H; GAO, C; LIU, D; FAN, Y; LI, W; PAN, S. Tetramethylpyrazine alleviates LPS-induced inflammatory injury in HUVECs by inhibiting Rho/ROCK pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 514, p. 1, 329-335.

CICCONE, M. M; CORTESE, F; GESUALDO, M; CARBONARA, S; ZITO, A., RICCI, G; RICCIONI, G Dietary intake of carotenoids and their antioxidant and anti-inflammatory effects in cardiovascular care. **Mediators of inflammation**, 2013.

COHEN-TANNOUDJI, J.; VIVAT, V.; HEILMANN, J.; LEGRAND, C.; MALTIER, J. P. Regulation by progesterone of the high-affinity state of myometrial β -adrenergic receptor and of adenylate cyclase activity in the pregnant rat. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 137-145, 1991.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRIBBS, L. L; LEE, J. H; YANG, J; SATIN, J; ZHANG, Y; DAUD, A; BARCLAY, J; WILLIAMSON, M. P; FOX, M; REES, M; PEREZ-REYES, E. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p. 103-109, 1998.

CSAPO, A.I. Smooth muscle as a contractile unit. **Physiological Reviews. Supplement**, v. 5, p.7-33, 1962.

DAWOOD, M. Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. **Obstetrics & Gynecology**, v. 108, n. 2, p. 428-441, 2006.

DAWOOD, M. Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. **Obstetrics & Gynecology**, v. 108, n. 2, p. 428-441, 2006.

DE FREITAS BRITO, A; SILVA, A. S; DE SOUZA, A. A; FERREIRA, P. B; DE SOUZA, I. L. L; DA CUNHA ARAUJO, L. C; SILVA, B. A. Supplementation with *Spirulina platensis* modulates aortic vascular reactivity through nitric oxide and antioxidant activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

DE SANCTIS, V; SOLIMAN, A; BERNASCONI, S; BIANCHIN, L; BONA, G; BOZZOLA, M; PERISSINOTTO, E. Primary dysmenorrhea in adolescents: Prevalence, impact and recent knowledge. **Pediatric endocrinology reviews: PER**, v. 13, n. 2, p. 512-520, 2015.

- DIKENSOY, E; BALAT, O; PENÇE, S; BALAT, A; ÇEKMEN, M; YUREKLI, M. Malondialdehyde, nitric oxide and adrenomedullin levels in patients with primary dysmenorrhea. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 34, n. 6, p. 1049-1053, 2008.
- DINIZ, A. F. A; DE SOUZA, I. L. L; DOS SANTOS FERREIRA, E; DE LIMA CARVALHO, M. T; BARROS, B. C; FERREIRA, P. B; DA SILVA, B. A. Potential Therapeutic Role of Dietary Supplementation with *Spirulina platensis* on the Erectile Function of Obese Rats Fed a Hypercaloric Diet. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2020.
- DIXON, D.; ALISON R.; BACH, U.; COLMAN, K.; FOLEY, G. L.; HARLEMAN, J. H.; HAWORTH, R.; HEBERT, R.; HEUSER, A.; LONG, G.; MIRSKY, M.; REGAN, K.; ESCH, E. V.; WESTWOOD, F. R.; VIDAL, J.; YOSHIDA, M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *Jornal of Toxicologic Pathology*, v. 27, n. 3–4, p. 1S-107S, 2014.
- DRAPER, C. F; DUISTERS, K.; WEGER, B.; CHAKRABARTI, A.; DANOS, A. C; BRENNAN, L.; HANKEMEIER, T.; GOULET, L.; KONZ, T.; MARTINHO, FP. Ritmicidade do ciclo menstrual: Padrões metabólicos em mulheres saudáveis. **Sci. Rep.** V.8, p. 1–15, 2018.
- DRAPER, C.F.; DUISTERS, K.; WEGER, B.; CHAKRABARTI, A.; HARMS, A.C.; BRENNAN, L.; HANKEMEIER, T.; GOULET, L.; KONZ, T.; Martin, F.P.; et al. Menstrual cycle rhythmicity: Metabolic patterns in healthy women. *Sci.* v. 8, p. 1–15. 2018.
- ELWARDY-MEREZAK, J.; MALTIER, J. P.; COHEN-TANNOUDJI, J.; LECRIVAIN, J. L.; VIVAT, V.; LEGRAND, C. Pregnancy-related modifications of rat myometrial Gs proteins: ADISP ribosylation, immunoreactivity and gene expression studies. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 23-37, 1994.
- ETTEN V. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species. *Inst for Anim Stud*; v. 460, p. 839-7100. 2002.
- FAJRIN, I; ALAM, G; USMAN, A. N. Prostaglandin level of primary dysmenorrhea pain sufferers. **Enfermería Clínica**, v. 30, p. 5-9, 2020.
- FERREIRA, E. D. S. Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* promove efeito antiobesidade e restaura a reatividade contrátil de íleo em ratos Wistar. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- FERREIRA, P. B. Avaliação dos efeitos do exercício de força agudo e crônico sobre a reatividade uterina de ratas Wistar e efeito preventivo da *Spirulina platensis*. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, 2019.
- FERREIRA, P. B., DINIZ, A. F. A., LACERDA JÚNIOR, F. F., SILVA, M. D. C. C., CARDOSO, G. A., SILVA, A. S., & DA SILVA, B. A. Supplementation with *Spirulina platensis* Prevents Uterine Diseases Related to Muscle Reactivity and Oxidative Stress in Rats Undergoing Strength Training. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3763, 2021.

FERRIES-ROWE, E; COREY, E; ARCHER, J. S. Primary dysmenorrhea: diagnosis and therapy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 136, n. 5, p. 1047-1058, 2020.

FISCHER, D. P; GRIFFITHS, A. L; LUI, S; SABAR, U. J; FARRAR, D; O'DONOVAN, P. J; MARSHALL, K. M. Distribution and function of prostaglandin E2 receptors in mouse uterus: translational value for human reproduction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 373, n. 3, p. 381-390, 2020.

FURCHGOTT, R. F; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GARFIELD R. E; SIMS S; DANIEL E. E. Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. **Science**, v.198, n. 9586, p. 4, 2009.

GRUBER, C. W; O'BRIEN, M. Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p.207-220, 2011.

GUIMARÃES, I., & PÓVOA, A. M. Primary dysmenorrhea: assessment and treatment. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 42, 501-507, 2020.

GUIMARÃES, I., & PÓVOA, A. M. Primary dysmenorrhea: assessment and treatment. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 42, p. 501-507, 2020.

GULIAEVA, N. V; LUZINA, N. L; LEVSHINA, I. P; KRYZHANOVSKIĬ, G. N. The inhibition stage of lipid peroxidation during stress. **Biull. Eksp. Biol. Med.** V. 106, n. 660–663, 1988.

GÜNEY, M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Biological trace element research**, v. 149, n.2, 234-240, 2012.

GÜNEY, M. Selenium-vitamin E combination modulates endometrial lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Biological trace element research**, v. 149, n. 2, p. 234-240, 2012.

GÜNEY, M., ORAL, B., KARAHAN, N., & MUNGAN, T. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. **Fertility and sterility**, v. 89, n.4, p. 934-942, 2008.

GUNST, S. J; ZHANG, W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 3, p. C576-C587, 2008.

GUO, S. W; MAO, X; MA, Q; LIU, X. A dismenorreia e sua gravidade estão associadas ao aumento da contratilidade uterina e à superexpressão do receptor de ocitocina (OTR) em mulheres com adenomiose sintomática. **Fertilidade e esterilidade**, v. 99, n. 1, p. 231-240.

GUTIÉRREZ-SALMEÁN, G; FABILA-CASTILLO, L; CHAMORRO-CEVALLOS, G.. Aspectos nutricionales y toxicológicos de Spirulina (arthrospira). **Nutricion hospitalaria**, v. 32, n.1, p. 34-40, 2015.

H. LEE; C. KANG; E. S; JUNG, J. S; KIM, E.KIM. Atividade antimetastática do extrato rico em polifenóis de *Ecklonia cava* através da inibição da via Akt em células de câncer de pulmão humano A549. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p 1229-1236, 2011.

HAHM, T. S., AHN, H. J., BAE, C. D., KIM, H. S., LIM, S. W., CHO, H. S., ... & CHOI, S. J. Protective effects of gabapentin on allodynia and $\alpha 2\delta 1$ -subunit of voltage-dependent calcium channel in spinal nerve-ligated rats. **Journal of Korean medical science**, v. 24, n. 1, p. 146-151, 2009.

HAREL, Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: an update on pharmacological treatments and management strategies. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 13, n. 15, p. 2157-2170, 2012.

HASCHEK, W; ROUSSEAU, C. G; WALLIG, M. Female reproductive system. **Fundamentals of Toxicologic Pathology; Academic Press**: New York, NY, USA, 2010.

HELLMAN KM, YU PY, OLADOSU FA, et al. The Effects of Platelet-Activating Factor on Uterine Contractility, Perfusion, Hypoxia, and Pain in Mice. **Reproductive Sciences**, v.7 2017.

HERINGTON, J. L; O'BRIEN, C; ROBUCK, M. F; LEI, W; BROWN, N; SLAUGHTER, J. C; REESE, J. Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 mediates the timing of parturition in mice despite unhindered uterine contractility. **Endocrinology**, v. 159, n. 1, p. 490-505, 2018.

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.

HIGASHI, Y.; MARUHASHI, T.; NOMA, K.; KIHARA, Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. **Trends Cardiovasc. Med.** 2014, v. 24, p. 165–169, 2014.

HOFMEYR, G. J; SINGATA, M; LAWRIE, T. A. Copper containing intra-uterine devices versus depot progestogens for contraception. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, 2010.

HOLLINGSWORTH, Michael et al. Estratégias farmacológicas para relaxamento uterino. In: **Controle da contratilidade uterina** . Routledge, 2019. p. 401-431.

HORI, M; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life sciences**, v. 62, n. 17-18, p. 1629-1633, 1998.

HU, J. Y; JIN, G. Z. Supraspinal D2 receptor involved in antinociception induced by l-tetrahydropalmatine. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 20(8), p. 715–719. 1999.

HUSZAR, G; NAFTOLIN, F. The myometrium and uterine cervix in normal and preterm labor. **New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 9, p. 571-581, 1984.

HUXLEY, A. F, NIEDERGERKE, R. Structural changes in muscle during contraction. **Nature**, v. 173, p. 971-3, 1954.

IACOVIDES, Stella; AVIDON, Ingrid; BAKER, Fiona C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. **Human reproduction update**, v. 21, n. 6, p. 762-778, 2015.

IZADI, M; FAZILATI, M. Extraction and purification of phycocyanin from spirulina platensis and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. **Asian Journal of Green Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 364-379, 2018.

JAMIESON D. J, STEEGE J. F. The prevalence of dysmenorrhea, dyspareunia, pelvic pain, and irritable bowel syndrome in primary care practices. **Obstet Gynecol** 1996.

JESUÍNO, F. W. D; REIS, J. P; WHITAKER, J. C. P. Effect of *Synadenium grantii* and its isolated compound on dysmenorrhea behavior model in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 613–620, 2019.

JU, H; JONES, MARK; MISHRA; GITA. The prevalence and risk factors of dysmenorrhea. **Epidemiologic reviews**, v. 36, n. 1, p. 104-113, 2014.

JUANG, C. M; YEN, M. S; TWU, N. F; HORNG, H. C; YU, H. C; CHEN, C. Y. Impact of pregnancy on primary dysmenorrhea. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 92, n. 3, p. 221-227, 2006.

JUNG H. A; JIN, S. E; AHN, B. R; LEE, C. M; CHOI J. S. Atividade anti-inflamatória da alga marrom comestível *Eisenia bicyclis* e seus constituintes fucosterol e florotaninos em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 199-206, 2013.

KIMURA, T.; IVELL, R. O receptor de ocitocina. **Peptídeos Reguladores e Receptores Cognatos**, p. 135-168, 1996.

KAHRAMAN, E; CEVIK, B; T. SARACOGLU, K. The effects of pre-emptive intravenous ibuprofen on the thiol/disulfide homeostasis and C-reactive protein level as the markers of oxidative stress and inflammation during gynecologic laparoscopy: A randomised clinical trial. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 11, p. 14872, 2021.

KAPLAN O; MUSTAFA N; MEHMET G; MEHMET A., Non-steroidal anti-inflammatory drug modulates oxidative stress and calcium ion levels in the neutrophils of patients with primary dysmenorrhea, **Journal of Reproductive Immunology**, v. 100, n. 2, p. 87-92, 2013.

KHAN, M; VARADHARAJ, S; GANESAN, L. P; SHOBHA, J. C; NAIDU, M. U; PARINANDI, N. L; KUPPUSAMY, P. C-phycocyanin protects against ischemia-

reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 5, p. 2136-2145, 2006.

KULMANN-LEAL, B; KAMINSKI, V. L; VALVERDE-VILLEGAS, J. A. C. Q. U. E. L. I. N. E; VEIGA, A. B. G; SPILKI, F. R; CHIES, J. A. B. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In Bárány, M. (Ed.) **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 203-219, 1996.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Fisiologia**, Elsevier, 6ª ed., 2009.

KONÍCKOVÁ, R; VANKOVÁ, K; VANÍKOVÁ, J; VÁNOVÁ, K; MUCHOVÁ, L; SUBHANOVÁ, I; VÍTEK, L. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. **Annals of Hepatology**, v. 13, n. 2, p. 273-283, 2014.

KONINCKX, Philippe R. et al. Primary dysmenorrhea. **Journal Obstetry Gynaecology Canadá**, v. 39, n. 7, p. 578-9, 2017.

LAL, N; KUMAR, J; ERDAHL, W. E; PFEIFFER, D. R; GADD, M. E; GRAFF, G; YANNI, J. M. Differential effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on mitochondrial dysfunction during oxidative stress. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 490, n. 1, p. 1-8, 2009.

LEE, J. H; GOMORA, J. C; CRIBBS, L. L; PEREZ-REYES, E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block α_1H . **Biophysical Journal**, v. 77, p. 3034–3042, 1999.

LI, R., LI, B; KREHER, D. A; BENJAMIN, A. R; GUBBELS, A; SMITH, S. M. Association between dysmenorrhea and chronic pain: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. **American journal of obstetrics and gynecology**, 2020.

LINDH, I., ELLSTRÖM, A. A., & MILSOM, I. The effect of combined oral contraceptives and age on dysmenorrhoea: an epidemiological study. **Human Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 676-682, 2012.

LIU, L.N., LI, J. C., LV, Y. Z.; ZONG, S. B.; ZHOU, J.; WANG, Z. Z.; KOU, J.P.; XIAO, W. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl inhibits oxytocin-induced uterine contraction in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 107-114, 2017.

LIU, P., DUAN, J. A., HUA, Y. Q., TANG, Y. P., YAO, X., & SU, S. L. Effects of xiang-fu-si-wu decoction and its main components for dysmenorrhea on uterus contraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 591–597. 2011.

LOPES, K. N. Avaliação dos limiares sensitivo e doloroso em mulheres com dismenorrea primária moderada ou grave. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2016.

LU, J., WANG, Z., CAO, J., CHEN, Y., & DONG, Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.16, n. 1, p. 1-18, 2018.

LU, Jiayin et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2018.

MAIA, JR, Hugo et al. Effect of the menstrual cycle and oral contraceptives on cyclooxygenase-2 expression in the endometrium. **Gynecological endocrinology**, v. 21, n. 1, p. 57-61, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MARJORIBANKS, J.; PROCTOR, M.; FARQUHAR, C.; DERKS, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhea. **Cochrane Database of Systemic Reviews**, v. 1, p. 1751, 2010.

MARJORIBANKS, Jane et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, 2003.

MARKOU, G. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2758-2768, 2014.

MARNETT, L. J. Peroxidação lipídica - dano ao DNA pelo malondialdeído. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. V. 424, n. 1-2, p. 83-95, 199.

MAYBIN, J. A.; CRITCHLEY, Hilary OD. Progesterone: a pivotal hormone at menstruation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, n. 1, p. 88-97, 2011.

MECHSNER, S.; GRUM, B.; GERICKE, C.; LODDENKEMPER, C.; DUDENHAUSEN, J. W.; EBERT, A. D. Possible roles of oxytocin receptor and vasopressin-1 α receptor in the pathomechanism of dyspareunia and dysmenorrhea in patients with adenomyosis uteri. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 7, p. 2541-2546, 2010.

MESSING, K; SAUREL-CUBIZOLLES, M. J; BOURGINE, M; KAMINSKI, M. Factors associated with dysmenorrhea among workers in French poultry slaughterhouses and canneries. **Journal of Occupational Medicine**, 493-500, 1993.

MICHALAKIS, K. G.; SEGARS, J. H. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 1949-1957, 2010.

MIDDHA, P., WEINSTEIN, S. J., MÄNNISTÖ, S., ALBANES, D., & MONDUL, A. M. β -carotene supplementation and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, Beta-carotene cancer prevention study: The role of tar and nicotine. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 21, n. 8, p. 1045-1050, 2019.

MILSOM I, ANDERSCH B. Effect of ibuprofen, naproxen sodium and paracetamol on intrauterine pressure and menstrual pain in dysmenorrhoea. **Br J Obstet Gynaecol**. v. 91 p. 1129–1135. 1984.

MITTAL, R. Medical management of Dysmenorrhea. **Int J Adv Res Ideas Innov Tech**, v. 5, n. 1, p. 5-8, 2019.

MOHY S. M; EL-DIN; A. M. D EL-AHWANY. Bioatividade e constituintes fitoquímicos de algas marinhas vermelhas (*Jania rubens*, *Corallina mediterrânea* e *Pterocladia capillacea*). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p.471-484, 2016.

MORGAN, K. G; GANGOPADHYAY, S. S. Calponin is required for agonist-induced signal transduction—evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle. **The Journal of physiology**, v. 537, n. 2, p. 567, 2001.

MORROW, C; NAUMBURG, E. H. Dysmenorrhea. *Primary care: Clinics in office practice*, v. 36, n. 1, p. 19-32, 2019.

MULLER, J. C. Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná, 2007.

MVONDO, M. A; MINKO ESSONO, S; BOMBA TATSINKOU, F. D; ATEBA, S. B; NJAMEN, D. The root aqueous extract of *Entada africana* Guill. Et Perr. (Mimosaceae) inhibits implant growth, alleviates dysmenorrhea, and restores ovarian dynamic in a rat model of endometriosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

MVONDO, M. A; MINKO ESSONO, S; BOMBA TATSINKOU, F. D; ATEBA, S. B; NJAMEN, D. The root aqueous extract of *Entada africana* Guill. Et Perr.(Mimosaceae) inhibits implant growth, alleviates dysmenorrhea, and restores ovarian dynamic in a rat model of endometriosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017.

MYERS, K. M.; ELAD, D. Biomechanics of the human uterus. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1388, 2017.

NASIRIAN, F., DADKHAH, M., MORADI-KOR, N., & OBEIDAVI, Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in

diabetic rats. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v.11, p. 375, 2018.

NORMAN, J. E; CAMERON, I. T. Óxido nítrico no útero humano. **Críticas de reprodução**, n. 1, p. 61-68, 1996.

O'BRIEN, M. Uterine contractility of plants used to facilitate childbirth in Nigerian ethnomedicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 377-382, 2012.

ORIMADEGUN, B. E; AWOLUDE, O. A; AGBEDANA, E. O. Markers of lipid and protein peroxidation among Nigerian university students with dysmenorrhea. **Niger J Clin Pract**, v. 22, n. 2, p. 174-180, 2019.

OSAYANDE, A. S MEHULIC, S. Diagnosis and initial management of dysmenorrhea. **American family physician**, v. 89, n. 5, p. 341-346, 2014.

OWEN PR. Prostaglandin synthetase inhibitors in the treatment of primary dysmenorrhea. Outcome trials reviewed. *Am J Obstet Gynecol.* v. 148 p.96-103. 1984.

OSMAN M. A. H; SHEEKH M. M, FARRAG A. H; ELSAEED G. S. M; KASSEM D. A. Hepato-protective effect induced by NaCl stressed *Spirulina platensis*: Histopathological, biochemical and histochemical studies. **World Appl Sci J**, v. 18, p.1370–80, 2012.

P. BURTIN. Nutritional value of seaweeds Electronic **Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 498-503, 2003.

PACCOLA, C. C.; RESENDE, C. G.; STUMPP, T.; MIRAGLIA, S. M.; CIPRIANO, I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 677-683, 2018.

PAN, H; ZHAO, X; LEI, S; CAI, C; XIE, Y. Z; YANG, X. The immunomodulatory activity of polysaccharides from the medicinal mushroom *Amauroderma rude* (Agaricomycetes) is mediated via the iNOS and PLA2-AA pathways. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 21, n. 8, 2019.

PARAZZINI, F., TOZZI, L., MEZZOPANE, R., LUCHINI, L., MARCHINI, M., & FEDELE, L. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of primary dysmenorrhea. **Epidemiology**, p. 469-472, 1994.

PARKER, M. A; SNEDDON, A. E; ARBON, P. The menstrual disorder of teenagers (MDOT) study: determining typical menstrual patterns and menstrual disturbance in a large population-based study of Australian teenagers. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 117, n. 2, p. 185-192, 2010.

PEREZ-REYES, E; CRIBBS, L. L; DAUD, A; LACERDA, A. E; BARCLAY, J; WILLIAMSON, M. P; FOX, M; REES, M.; LEE, J. H. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 896, 1998.

PHILLIPPE, M. Protein Kinase C, an Inhibitor of Oxytocin-Stimulated Phasic Myometrial Contractions. **Biology of Reproduction**. v. 50, p. 855-859, 1994.

PHILLIPPE, M.; SAUNDERS, T.; BASA, A. Intracellular mechanisms underlying prostaglandin F₂ α -stimulated phasic myometrial contractions. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 4, p. E665-E673, 1997.

PIERCE, J. D; CACKLER, A. B; ARNETT, M. G. Why should you care about free radicals? Because these molecules appear to play a role in the development of heart disease, cancer, diabetes, and other diseases. **Understanding how free radicals form and what you can do to help keep them in balance is essential to maximizing the care you provide now--and in the future**. *Rn*, v. 67, n. 1, p. 38-44, 2004.

PROCTOR, M.; FARQUHAR, C. Diagnosis and management of dysmenorrhoea. **British Medical Journal**, v. 332, n. 7550, p. 1134-1138, 2006.

QU, M.; LU, P.; BEVELL, K.; FOGARTY, K.; LIFSHITZ, L.; SHI, F.; ZHUGE, R. Smooth muscle cell-specific TMEM16A deletion does not alter Ca²⁺ signaling, uterine contraction, gestation length or litter size in mice. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 2, p. 318-327, 2019.

REDDY, C. M., BHAT, V. B., KIRANMAI, G., REDDY, M. N., REDDANNA, P., & MADYASTHA, K. M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 277, n. 3, p. 599-603, 2021.

RENDI, M. H; MUEHLENBACHS, A; GARCIA, R. L; BOYD, K. L. Female reproductive system. In **Comparative anatomy and histology**, p. 253-284, 2013.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Despolarization dependente effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. *General Pharmacology*, v. 29, n.5, p. 847-857, 1997.

RIBEIRO F. P. R. A. Investigação da atividade espasmogênica de *Erythroxylum caatingae* plowman em útero isolado de ratas. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade do Vale do São Francisco.

RUAN, Y. C; ZHOU, W; CHAN, H. C. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. **Physiology**, 2011.

RUOFF, G; LEMA, M. Strategies in pain management: new and potential indications for COX-2 specific inhibitors. **Journal of pain and symptom management**, v. 25, n. 2, p. 21-31, 2003.

Ryan, S. A. The treatment of dysmenorrhea. **Pediatr Clin North Am**, v. 64, n. 2, p. 331-342, 2017.

RYAN, S. A. The Treatment of Dysmenorrhea. *Pediatric Clin. N. Am.* v. 64 , p. 331–342. 2017.

S. KHAN, C; KONG, J; KIM, S; KIM. Protective effect of *Amphiroa dilatata* on ROS induced oxidative damage and MMP expressions in HT1080 cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p.191-198, 2010.

SAKURADA, K.; SETO, M.; SASAKI, Y. Dynamics of myosin light chain phosphorylation at Ser19 and Thr18/Ser19 in smooth muscle cells in culture. **American Journal of Physiology-Cell Physiolog**, v. 274, p.1563–1572, 1998.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y. Ca²⁺ -dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization–induced and receptor stimulation–induced vascular smooth muscle contraction. **Circulation Research**, v. 93, n. 6, p. 548-556, 2003.

SANBORN B. M. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. **Journal Society Gynecology Investigantion**; v. 7, p. 411, 2010.

SANBORN, B. M., DODGE, K., MONGA, M., QIAN, A., WANG, W., & YUE, C. Molecular mechanisms regulating the effects of oxytocin on myometrial intracellular calcium. **Vasopressin and Oxytocin**, p. 277-286, 1998.

Santanam, N.; Kavtaradze, N.; Murphy, A.; Dominguez, C.; Parthasarathy, S. A suplementação antioxidante reduz a dor pélvica relacionada à endometriose em humanos. *Trad. Res.* **2013** , 161 , 189-195.

SAVINEAU, J. P.; MARTHAN, R. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 289-299, 1997.

SCHMAUSS, C.; YAKSH, T. L. In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 228, n.1, p. 1–12. 1984.

SCOTT, P. A; TREMBLAY, A; BROCHU, M; ST-LOUIS, J. Ação vasorrelaxante do 17β-estradiol em artérias uterinas de ratos: papel das sintases do óxido nítrico e dos receptores de estrogênio. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, p. 3713-3719, 2007.

SHALABY, E. A; SHANAB, S. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African journal of pharmacy and pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528-539, 2013.

SHERWIN, B. B. Estrogen and cognitive functioning in women. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 2, p. 133-151, 2003.

SHIH, C. M., CHENG, S. N., WONG, C. S., KUO, Y. L., & CHOU, T. C. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. **Anesthesia & Analgesia**, v. 108, n. 4, p. 1303-1310, 2009.

SMITH, R. P. The Physiology of Menstruation. **Dysmenorrhea and Menorrhagia**, p. 1–17, 2018.

SMITH, Roger P. The Clinical Classification and Causes of Dysmenorrhea. In: **Dysmenorrhea and Menorrhagia**. Springer, Cham. p. 55-64. 2018.

SNELGROVE, P. V. An ocean of discovery: Biodiversity beyond the census of marine life. **Planta medica**, v. 82(09/10), p. 790-799, 2016.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**. v. 372, p. 231-236, 1994.

SONG, Q. Y; ZHOU, Y. L; Bin, Z. H. O. U; CHEN, X. Y; ZHANG, R. Y; CHEN, Y. J. Study progress on the mechanism of acupuncture for primary dysmenorrhea. **World Journal of Acupuncture-Moxibustion**, 2021.

SONI, A; DUBEY, M; VERMA, M; DHANKHAR, R; KAUSHAL, V; ATRI, R; SABHARWAL, R. Revisiting the role of phycocyanin in current clinical practice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 1, p. 4950-4600, 2015.

SOUZA, I. L. L. D. Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* previne o desenvolvimento da disfunção erétil em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, 2018.

SUN, L; LIU, L. N; LI, J. C; LV, Y. Z; ZONG, S. B; ZHOU, J; XIAO, W. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl inhibits oxytocin-induced uterine contraction in vitro and in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 206, p. 107-114, 2017.

SUNDELL, G; MILSOM, I. A. N; ANDERSCH, B. Factors influencing the prevalence and severity of dysmenorrhoea in young women. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 97, n. 7, p. 588-594, 1990.

SUT, Necdet; KAHYAOGU-SUT, Hatice. Effect of aromatherapy massage on pain in primary dysmenorrhea: A meta-analysis. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 27, p. 5-10, 2017.

SUT, Necdet; KAHYAOGU-SUT, Hatice. Effect of aromatherapy massage on pain in primary dysmenorrhea: A meta-analysis. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 27, p. 5-10, 2017.

SZMIDT M. K; GRANDA D; SICINSKA E; KALUZA J. Primary Dysmenorrhea in Relation to Oxidative Stress and Antioxidant Status: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Antioxidants*, v. 9, n. 10, p. 994, 2020.

T. K. MAO, J. VAN DE WATER, AND M. E. GERSHWIN, "Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients," **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 27–30, 2015.

TAGGART, M. J; MORGAN, K. G. Regulação do aparelho contrátil uterino e do citoesqueleto. In: **Seminários em biologia celular e do desenvolvimento**. Academic Press, 2007. p. 296-304.

TAYLOR, E. J; BERNARD, W. G; TAYLOR, C. W. Ca²⁺ signals evoked by histamine H1 receptors are attenuated by activation of prostaglandin EP2 and EP4 receptors in human aortic smooth muscle cells. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 7, p. 1624-1634, 2013.

TELFER, J. F; LYALL, F; NORMAN, J. E; CAMERON, I. T. Identificação da óxido nítrico sintase no útero humano. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 19-23, 1995.

TENÓRIO, M. B; FERREIRA, R. C; MOURA, F. A; BUENO, N. B; DE OLIVEIRA, A. C. M; GOULART, M. O. F. Cross-talk entre estresse oxidativo e inflamação na pré-eclâmpsia. **Medicina oxidativa e longevidade celular**, 2019.

TOM, N.; ASSINDER, S. J. Oxytocin in health and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 2, p. 202-205, 2010.

TONG, H; YU, M; FEI, C; DE, J. I; DONG, J., SU, L; ZENG, B. Bioactive constituents and the molecular mechanism of Curcuma Rhizoma in the treatment of primary dysmenorrhea based on network pharmacology and molecular docking. **Phytomedicine**, v. 86, p. 153558, 2021.

TROINA, A. A. Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their offspring. **Life sciences**, v. 85, n. 9-10, p. 365-371, 2009.

TSAI, A. L; PALMER, G; KULMACZ, R. J. Prostaglandin H synthase. Kinetics of tyrosyl radical formation and of cyclooxygenase catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 17753-17759, 1992.

TSENG L, GURPIDE E. Induction of human endometrial estradiol dehydrogenase by progestins. *Endocrinology*. V. 97, p. 825-833, 1975.

TURHAN, N; ÇELİK, H; DUVAN, C.İ; ONARAN, Y; AYDIN, M; ARMUTCU, F. Investigação do equilíbrio oxidativo em pacientes com dismenorréia por múltiplos marcadores séricos. **J. Turk. Ger. Gynecol. Associação**, v. 13, n. 233-236, 2013.

U. V. MANI, S. DESAI, AND U. IYER, "Studies on the long-term effect of *Spirulina* supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients," **Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods**, v. 2, n. 3, p. 25–32, 2000.

VILELA M. G; SANTOS-JUNIOR J. L. S; SILVA J. G. C. Determination of estrous cycle in rats by vaginal lavage. *Femina*, v. 35, n. 10, p. 667-670, 2007.

VIVAT, V.; COHEN-TANNOUDJI, J.; REVELLI, J. P.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J. P.; MALTIER, J. P.; LEGRAND, C. Progesterone transcriptionally regulates the beta 2-adrenergic receptor gene in pregnant rat myometrium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 12, p. 7975-7978, 1992.

WANG, H; TANG, Y; GUO, J; DING, A; LI, W; JIANG, W; DUAN, J. Antidysmenorrheic effects of Radix angelica and Rhizoma Chuanxiong with different proportions and preparation methods on dysmenorrhea model mice. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, v. 35, n. 7, p. 892-895, 2010.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, nº. 4, p.201-206, 2003.

WEI, Y; MA, T; WANG, H; XING, J; WANG, Y., GU, Z; WANG, C. Extracts of compound Muniziqi granule suppressed uterus contraction and ameliorated oxytocin-induced primary dysmenorrhea. **Journal of ethnopharmacology**, v. 223, p. 33-40, 2018.

WILLIAMS, M. E; FELDMAN, D. H; MCCUE, A. F; BRENNER, R; VELICELEBI, G; ELLIS, S. B; HARPOLD, M. M. Structure and functional expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 71-84, 1992.

WILSON, T; LIGGINS, G. C; WHITTAKER, D. J. Oxytocin stimulates the release of arachidonic acid and prostaglandin F2 α from human decidual cells. **Prostaglandins**, v. 35, n. 5, p. 771-780, 1988.

WOODRUM, David A.; BROPHY, Colleen M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

WORD, R. A. Myosin phosphorylation and the control of myometrial contraction/relaxation. In: **Seminars in Perinatology**. WB Saunders, v. 19, n. 1, p. 3- 14, 1995.

WORD, R. A.; STULL, J. T.; CASEY, M. L.; KAMM, K. E. Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 29-37, 1993. WRAY S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **Am J Physiol**, v. 264, p.118, 1993.

WRAY, L. Randall. **Modern money theory: A primer on macroeconomics for sovereign monetary systems**. Springer, 2015.

WRAY, S; ARROWSMITH, S. Uterine Excitability and Ion Channels and Their Changes with Gestation and Hormonal Environment. **Annual Review of Physiology**, v. 83. 2002.

- WRAY, S; ARROWSMITH, S. Uterine smooth muscle. In **Muscle**, p. 1207-1216. Academic Press, 2012.
- WRAY, S; KUPITTAYANANT, S; SHMIGOL, A; SMITH, R. D; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239-246, 2001.
- WRAY, S; PRENDERGAST, C. O miométrio: da excitação às contrações e ao parto. **Smooth Muscle Spontaneous Activity**, v. 1124, p. 233-263, 2019.
- WRAY, S; PRENDERGAST, C. The myometrium: from excitation to contractions and labour. **Smooth Muscle Spontaneous Activity**, p. 233-263, 2019.
- WRAY, Susan; ARROWSMITH, Sarah. Uterine Excitability and Ion Channels and Their Changes with Gestation and Hormonal Environment. **Annual Review of Physiology**, v. 83, p. 331-357, 2021.
- XIAO, H., SHI, T., HAN, L., TONG, R., LIAO, Z. Mechanism of penehyclidine hydrochloride on a dysmenorrhea rat model. **Drug development research**, v. 80, n. 3, p. 325-332. 2019.
- YALLAMPALLI, C; GARFIELD, R. E. E; BYAM-SMITH, M. O óxido nítrico inibe a contratilidade uterina durante a gravidez, mas não durante o parto. **Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 1899-1902, 1993.
- YANG, L., CAO, Z., YU, B., & CHAI, C. An in vivo mouse model of primary dysmenorrhea. **Experimental animals**. 2015.
- YULIA, A.; JOHNSON, M. R. Myometrial oxytocin receptor expression and intracellular pathways. **Minerva Ginecologica**, v. 66, n. 3, p. 267-280, 2014.
- ZAHRA, R; MAHDI, P; HOSSEIN, A. Features of Spirulina platensis cultivated under autotrophic and mixotrophic conditions. **Харчова наука і технологія**, v.12, n. 4, p. 33-42, 2018.
- ZAMPONI, G. W; STRIESSNIG, J; KOSCHAK, A; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.
- ZEWEIL P. V. Reproductive performance, oxidative status and blood metabolites of doe rabbits administrated with spirulina alga. **Egyptian Poultry Science Journal**, v. 37, n. 4, 2017.
- ZHANG, N; KONG, F; ZHAO, L; YANG, X; WU, W., ZHANG, L; ZHOU, F. Essential oil, juice, and ethanol extract from bergamot confer improving effects against primary dysmenorrhea in rats. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 2, p.13614, 2021.
- ZOU, M. H; ULLRICH, V. O peroxinitrito formado pela geração simultânea de óxido nítrico e superóxido inibe seletivamente a prostaciclina sintase aórtica bovina. **Cartas FEBS** , v. 382, n.1-2, p. 101-104, 1996.

ZOU, M; MARTIN, C; ULLRICH, V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. **Biological chemistry**, v. 378, n. 7, p. 707-714, 1997.

Anexos

Anexo 1 – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animal.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação dos efeitos preventivos da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* e do seu mecanismo de ação nas alterações de acoplamento eletromecânico induzidas pela dismenorreia primária em útero de ratas Wistar", protocolada sob o CEUA nº 2240150621 (ID 001533), sob a responsabilidade de **Bagnólia Araújo Costa e equipe; Bagnólia Araújo Costa; Francisco Fernandes Lacerda Junior** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 10/12/2021.

We certify that the proposal "Investigation of preventive effects of dietary supplementation with *Spirulina platensis* and its mechanism of action on electromechanical coupling changes induced by primary dysmenorrhea in Wistar rat uterus", utilizing 160 Heterogenics rats (160 females), protocol number CEUA 2240150621 (ID 001533), under the responsibility of **Bagnólia Araújo Costa and team; Bagnólia Araújo Costa; Francisco Fernandes Lacerda Junior** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 12/10/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2022** a **10/2022**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **160**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **150 a 250 g**

Local do experimento: O citado projeto será realizado no Laboratório de Farmacologia Funcional (LFF) e na Unidade de Produção Animal, localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob responsabilidade da orientadora.

João Pessoa, 21 de janeiro de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 2 – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animal.

Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das alterações de reatividade uterina induzidas pela dismenorreia em útero de ratas Wistar", protocolada sob o CEUA nº 1886010520 (ID 001066), sob a responsabilidade de **Bagnólia Araújo Costa e equipe; Bagnólia Araújo Costa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of changes in uterine reactivity induced by dysmenorrhea in the uterus of Wistar rats", utilizing 100 Heterogenics rats (100 females), protocol number CEUA 1886010520 (ID 001066), under the responsibility of **Bagnólia Araújo Costa and team; Bagnólia Araújo Costa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2020** a **07/2021**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **100**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **150 a 250 g**

Local do experimento: O citado projeto será realizado no Laboratório de Farmacologia Funcional (LFF) e na Unidade de Produção Animal, localizados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) onde funciona o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPB), todos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), sob responsabilidade da orientadora.

João Pessoa, 21 de janeiro de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivya Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo 3 – Certificado de análise da *Spirulina platensis*.

1

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/ 105°C/ Peso constante)	4,44	%	Fabricante
Proteína	>= 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 FARMACÉUTICOS 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
Olívia Neiva Mesquita Mendes
CRF-GO: Nº 5227


Responsável Técnico
Ana Lígia Boer Barbosa
CRF-SP: 72.656


Responsável Técnico
Eliene Ribeiro de Lima
CRF-GO: Nº 11.361

Fim do Documento

Anexo 4 - Certificado de análise do pó de *Spirulina platensis*.

		PREFEITURA MUNICIPAL DE JOÃO PESSOA		NÚMERO 1002781	
		SECRETARIA DE RECEITA MUNICIPAL		CÓDIGO DE VERIFICAÇÃO	
		NOTA FISCAL DE SERVIÇOS ELETRÔNICA - NFS-e		275BRCLC3	
DADOS BÁSICOS					
DATA 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					
ROVAL		NOME / NOME EMPRESARIAL		NOME DE FANTASIA	
		VTO COMERCIO FARMACEUTICO LTDA			
INSCRIÇÃO MUNICIPAL		EXIGIBILIDADE TRIBUTÁRIA		Nº DO PROCESSO	
833126		Exigível		Nº	
				OPTANTE PELO SIMPLES NACIONAL	
				NÃO	
				Nº	
				NÃO	
LOGRADOURO				NÚMERO	
AV DOM PEDRO II				00687	
COMPLEMENTO				BAIRRO	
LOJAS / 101 A 106				CENTRO	
MUNICÍPIO				ESTADO	
João Pessoa				PB	
				PAÍS	
				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	
João Pessoa				PB	
				PAÍS	
				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) Versão 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					