UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BACHARELADO EM BIOMEDICINA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Gabriel Nunes Machado de Oliveira

Efeito da suplementação com *Arthrospira platensis* sobre a reatividade da traqueia e a capacidade antioxidante pulmonar de ratos asmáticos

João Pessoa – PB

2024

Gabriel Nunes Machado de Oliveira

Efeito da suplementação com *Arthrospira platensis* sobre a reatividade da traqueia e a capacidade antioxidante pulmonar de ratos asmáticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos

João Pessoa – PB

2024

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48e Oliveira, Gabriel Nunes Machado de.
Efeito da suplementação com Arthrospira platensis sobre a reatividade da traqueia e a capacidade antioxidante pulmonar de ratos asmáticos / Gabriel Nunes Machado de Oliveira. - João Pessoa, 2024.
58 f. : il.

Orientação: Luiz Henrique César Vasconcelos.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Asma - Tratamento. 2. Arthrospira platensis - Suplementação. 3. Reatividade traqueal. I. Vasconcelos, Luiz Henrique César. II. Título.

UFPB/CCS CDU 616.248(043.2)

Elaborado por Jadson Videres Pamplona - CRB-15/366

Gabriel Nunes Machado de Oliveira

Efeito da suplementação com *Arthrospira platensis* sobre a reatividade da traqueia e a capacidade antioxidante pulmonar de ratos asmáticos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em 19 de abril de 2024.

gov.br Documento assinado digitalmente
LUIZ HENRIQUE CESAR VASCONCELOS
Data: 06/05/2024 12:19:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos

Departamento de Fisiologia e Patologia – DFP/CCS

Orientador

gov.br Documento assinado digitalmente
CAMILLE DE MOURA BALARINI
Data: 06/05/2024 14:52:46-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Camille de Moura Balarini

Departamento de Fisiologia e Patologia – DFP/CCS

Examinadora I

gov.br Documento assinado digitalmente
TEMILCE SIMOES DE ASSIS CANTALICE
Data: 06/05/2024 14:34:30-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice

Departamento de Fisiologia e Patologia – DFP/CCS

Examinadora II

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Tânia Regina, que sempre fez de tudo pela minha educação, abrindo mão de muitas coisas para que, em meio a tantas dificuldades, eu pudesse estudar.

À minha tia, Kátia Maria, que desde criança sentava comigo todos os dias para tentar me ajudar com os assuntos da escola, sempre me dando segurança.

À minha avó, Dona Zeza, por ser a pessoa mais digna de admiração em minha vida, uma mulher guerreira que conseguiu criar nove filhos com muita luta, e me criou como seu décimo filho, me proporcionando a experiência do que é ser amado, em sua forma mais pura.

À minha madrinha, Viviane Nunes, que sempre me acolheu como seu filho, me ajudando em qualquer dificuldade, de todas as formas, sendo presente em minha vida e me ensinando muito sobre solidariedade.

Ao meu pai, Josemar Tavares, um homem forte, batalhador, que sempre incentivou os meus estudos, acreditando em mim, apesar da distância.

A vocês eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos, um homem digno de muita admiração, que me introduziu ao desafiador mundo da pesquisa científica, sempre sendo muito compreensível com minhas dificuldades, pegando na minha mão para que eu sempre entendesse o que estava fazendo, puxando minha orelha sempre que necessário e mostrando que o caminho correto nunca é o mais fácil, mas sempre é o mais recompensador.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa, por todas suas contribuições na minha trajetória acadêmica, me ensinando a ter senso crítico, como sempre estar evoluindo e por ser um exemplo de pesquisadora, referência em sua área, com uma linda história de vida.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira, por todas suas observações e contribuições, sempre bastante educada em suas palavras, e por ser uma grande pesquisadora e professora.

Aos membros titulares da banca, Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice, por ter me proporcionado umas das melhores experiências que já tive em uma disciplina da graduação, fazendo eu me apaixonar pela fisiologia humana e dando início à minha trajetória acadêmica na área. À Profa. Dra. Camille de Moura Balarini, por me ensinar os desafios da pesquisa científica e como ter postura em sala de aula, tenho muito respeito por você. Assim como a suplente Profa. Dra. Karla Veruska Marques Cavalcante Costa, sendo minha professora em três disciplinas diferentes durante todos esses anos, resultando em uma ótima relação dentro e fora de sala de aula. Agradeço a todas por terem aceitado o convite de participar desse momento tão especial na minha vida acadêmica.

Ao meu colega de orientação, Mateus Mendes Vieira, por todo companheirismo durante esses anos. Obrigado por me ensinar sobre solidariedade, dedicação, perseverança, empatia, bondade e amor ao próximo, sou muito grato por ter tido você como parceiro de pesquisa e fico muito feliz que continuaremos juntos nessa nova jornada no Mestrado.

À doutoranda Indyra Alencar Duarte Figueiredo, que me acompanhou desde minha entrada no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, me ensinando sobre a rotina de trabalho, técnicas, protocolos, programas de estatística, e principalmente, a como ser forte. Você é uma das pessoas mais fortes que eu conheço, espero que um dia eu possa retribuir tudo isso.

Ao doutorando Ray Ravilly Alves Arruda, que tem uma característica valiosíssima: de alegrar todo ambiente que está presente. Você tornou mais fácil todos os dias difíceis, com sua alegria e espontaneidade. Sempre me ajudou

quando precisei, indo até nos finais de semana para ajudar em experimentos quando não era sua obrigação. Você é iluminado, sempre lembrarei de você com muito carinho.

À doutorando Isabela Motta Felício, por me ajudar com todas minhas dificuldades, segurando minha mão e acreditando em mim nos momentos mais difíceis. Admiro bastante a mulher que você é, sempre muito responsável, dedicada e forte. Sou muito feliz por sua amizade.

Aos demais colegas e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Alissa Maria, Anderson Diniz, Brena Freire, Daiany Francelino, Edvaldo Filho, João Marcos Araújo, Matheus Melchiades, Michel Benício, Thais Sousa, Yara Soares. Obrigado por toda ajuda durante a rotina de trabalho.

Aos meus amigos de infância: Breno Falcão, Giovani Trevizolo, Luciana Trevizolo, Rafaela Perruci, Maria Clara, Daniel Arruda, Caio Cartaxo e Rayssa Dália, por sempre estarem presentes em minha vida, acompanhando de perto todas as mudanças, todos os momentos de desabafo, todos os momentos de comemoração, todos os momentos de superação. Sou muito grato e feliz pelos amigos que tenho.

Aos meus colegas e amigos de graduação: Ana Beatriz, Maria Caroline, Matheus Laurentino, Ryta de Kássia, Vytor Lucas, Pedro Soares, Mayara Falcão, Claudiana Gomes e Maria Eduarda Santana, por todo o convívio durante todos esses anos na batalha diária da graduação.

À minha amiga Mariana de Assis Valverde, que conviveu comigo durante toda minha graduação, me dando forças sempre que necessário. Você foi uma das pessoas que mais acreditou em mim, sempre terei muito carinho por você.

À Universidade Federal da Paraíba, pela infraestrutura e gestão, que tornaram esse sonho possível. Tenho orgulho da Instituição que faço parte.

Ao Programa Institucional de Bolsistas em Iniciação Científica (PIBIC/UFPB), que me deu a oportunidade de viver a experiência da pesquisa científica.

À coordenação do curso de Biomedicina, representada pelo Prof. Dr. Vinícius Perez, por todo suporte acadêmico durantes esses anos.

A todos os professores que me acompanharam até aqui. O ensino abre portas para que possamos enxergar o mundo de forma mais ampla, com senso crítico, e por isso, tenho muita admiração por todos os professores.

Obrigado.

Gabriel Nunes Machado de Oliveira

“Viver e ser livre, saber dar valor para as coisas mais simples, só o amor constrói pontes indestrutíveis”

Chorão

RESUMO

A asma é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pela constrição e inflamação das vias aéreas, causando sintomas como tosse, sibilos e falta de ar. O tratamento convencional da asma é responsável por diversos efeitos adversos, tornando relevante a busca por terapias alternativas. Nesse contexto, insere-se a *Arthrospira (Spirulina) platensis* (AP), uma microalga conhecida pelos seus efeitos anti-inflamatório, antiespasmódico e antioxidante, tornando-a uma forte candidata ao tratamento da asma. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com AP sobre a reatividade traqueal e a capacidade antioxidante dos pulmões de ratos Wistar sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). Para isso, os animais foram divididos em grupo controle (GC), grupo asmático (GA), GA + AP 30 mg/kg (GAAP30), GA + AP 100 mg/kg (GAAP100) e GA + AP 300 mg/kg (GAAP300). A asma era induzida por sensibilização e desafio com OVA por 21 dias e a AP era administrada diariamente por via oral (gavagem) (CEUA/UFPB: 3255100522). Observou-se que a potência contrátil do carbacol não diferiu entre os grupos, enquanto houve um aumento da sua eficácia no GA (E_{max}= 130,8±6,9%; CE_{50}= 1,3±0,6x10^{-6} M), comparado ao GC (E_{max}= 100%; CE_{50}= 9,6±1,7x10^{-7} M) que foi prevenida no GAAP30 (E_{max}= 94,7±7,8%; CE_{50}= 2,4±0,6x10^{-7} M), GAAP100 (E_{max}= 61,7±7,9%; CE_{50}= 9,5±2,7x10^{-7} M) e no GAAP300 (E_{max}= 105,7±6,8%; CE_{50}= 4,8±0,5x10^{-7} M). Além disso, tanto a eficácia quanto a potência relaxante da aminofilina foi diminuída no GA (E_{max}= 85.1±1.5%; CE_{50}= 1.0±0.05x10^{-3} M), comparada ao GC (E_{max} = 95.8±2.8%; CE_{50} = 7.8±0.6x10^{-4} M), e foi prevenida no GAAP100 (E_{max}= 98,1±1,2%; CE_{50}= 7,4±0,2x10^{-4} M) e no GAAP300 (E_{max}= 86,9±3,6%; CE_{50}= 8,4±0,4x10^{-4} M), enquanto o GAAP30 preveniu apenas a redução da eficácia (E_{max}= 87,1±7,5%; CE_{50}= 1,1±0,03x10^{-3} M). Diferentemente, não houve diferença na eficácia e na potência relaxante do nitroprussiato de sódio entre o GC (E_{max}= 74,2±12,0%; CE_{50}= 4,2±1,5x10^{-4} M) e o GA (E_{max}= 66,8±4,6%; CE_{50}= 1,7±0,3x10^{-3} M), assim como não houve diferença entre os grupos tratados GAAP30 (E_{max}= 68,9 ± 8,2%; CE_{50}= 1,3±0,3x10^{-3} M), GAAP100 (E_{max}= 83,3±6,7%; CE_{50}= 2,7±0,7x10^{-3} M) e GAAP300 (E_{max}= 87,6±6,5%; CE_{50}= 3,6±1,4x10^{-3} M). Por fim, a capacidade antioxidante total foi reduzida no GA (13,4±1,2%) comparada ao GC (22,2±0,5%), e essa redução foi prevenida no GAAP30 (20,9±1,7%) e GAAP300 (34,5±2,1%), enquanto o GAAP100 não preveniu (12,9±1,8%). Esses resultados sugerem uma modulação da AP no acoplamento farmacomecânico de contração e relaxamento, assim como no aparato antioxidante pulmonar de ratos asmáticos, indicando a AP como um produto natural candidato para o tratamento da asma.

Palavras-Chave: *Arthrospira platensis*; asma; reatividade traqueal; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease characterized by constriction and inflammation of the airways, causing symptoms such as coughing, wheezing and shortness of breath. Conventional asthma treatment is responsible for several adverse effects, making the search for alternative therapies relevant. In this context, it is included the species *Arthrospira (Spirulina) platensis* (AP), a microalga known for its anti-inflammatory, antispasmodic and antioxidant effects, making it a strong candidate for treating asthma. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of AP supplementation on the tracheal reactivity and pulmonary antioxidant capacity of Wistar rats sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). For this, the animals were divided into control group (GC), asthmatic group (GA), GA + AP 30 mg/kg (GAAP30), GA + AP 100 mg/kg (GAAP100) and GA + AP 300 mg/kg (GAAP300). Asthma was induced by sensitization and challenge with OVA for 21 days and AP was administered daily orally (gavage) (CEUA/UFPB: 3255100522). It has been observed that the contractile potency to carbachol did not differ between the groups, while there was an increase in efficacy in GA (E_{max}= 130.8±6.9%; EC_{50}= 1.3±0.6x10^{-6} M) compared to CG (E_{max}= 100%; EC_{50}= 9.6±1.7x10^{-7} M) which was prevented in GAAP30 (E_{max}= 94.7±7.8%; EC_{50}= 2.4±0.6x10^{-7} M), GAAP100 (E_{max}= 61.7±7.9%; EC_{50}= 9.5±2.7x10^{-7} M) and GAAP300 (E_{max}= 105.7±6.8%; EC_{50}= 4.8±0.5x10^{-7} M). Furthermore, both the efficacy and the relaxing potency of aminophylline were reduced in GA (E_{max}= 85.1±1.5%; EC_{50}= 1.0±0.05x10^{-3} M), compared to CG (E_{max} = 95.8±2.8%; EC_{50} = 7.8±0.6x10^{-4} M), and was prevented in GAAP100 (E_{max}= 98.1±1.2%; EC_{50}= 7.4±0.2x10^{-4} M) and in GAAP300 (E_{max}= 86.9±3.6%; EC_{50}= 8.4±0.4x10^{-4} M), while GAAP30 only prevented efficacy (E_{max}= 87.1±7.5%; EC_{50}= 1.1±0.03x10^{-3} M). Differently, there was no difference in the efficacy and relaxing potency of sodium nitroprusside between GC (E_{max}= 74.2±12.0%; EC_{50}= 4.2±1.5x10^{-4} M) and GA (E_{max}= 66,8±4.6%; EC_{50}= 1.7±0.3x10^{-3} M), just as there was no difference between the GAAP30 (E_{max}= 68.9 ± 8.2%; EC_{50}= 1.3±0 .3x10^{-3} M), GAAP100 (E_{max}= 83.3±6.7%; EC_{50}= 2.7±0.7x10^{-3} M) and GAAP300 groups (E_{max}= 87.6±6.5%; EC_{50}= 3.6±1.4x10^{-3} M). Total antioxidant capacity was reduced in GA (13.4±1.2%) compared to GC (22.2±0.5%) and was prevented in GAAP30 (20.9±1.7%) and GAAP300 (34.5±2.1%), while GAAP100 did not prevent (12.9±1.8%). These results suggest a modulation of AP in the pharmacomechanical coupling of contraction and relaxation, as well as in the pulmonary antioxidant apparatus of asthmatic rats, indicating AP as a candidate natural product for the treatment of asthma..

Keywords: *Arthrospira platensis*; asthma; tracheal reactivity; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta imunológica da asma alérgica. 21
Figura 2 - Alterações morfológicas causadas pela asma 22
Figura 3 - Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC β_1 23
Figura 4 - Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP 25
Figura 5 - Reações do ânion superóxido e atuação do sistema antioxidante.. 28
Figura 6 - Protocolo de indução da asma em ratos e suplementação com AP 30/100/300 mg/kg..... 35
Figura 7 - Registros originais representativos da reatividade traqueal induzida por 100 µg/mL de OVA em ratos do GC (A), GA (B), GAAP30 (C), GAAP100 (D) e GAAP300 (E)..... 38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva cumulativa concentração-resposta (A), valores de E_{max} (B) e valores de CE_{50} (C) ao CCh do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼). 39

Gráfico 2 - Curvas cumulativas concentração-resposta (A), valores de E_{max} (B) e valores de CE_{50} (C) à aminofilina do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼). 41

Gráfico 3 - Curvas cumulativas concentração-resposta (A), valores de E_{max} (B) e valores de CE_{50} (C) ao NPS do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼). 42

Gráfico 4 - Capacidade Antioxidante Total (CAT) dos animais do GC, GA, GAAP30, GAAP100 e GAAP300..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS

$^{\bullet}NO$	Óxido nítrico
$^{1}O_2$	Oxigênio singleto
AC	Ciclase de adenilil
ACh	Acetilcolina
$Al(OH)_3$	Hidróxido de alumínio
Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
AP	*Artrospira platensis*
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca^{2+}	Íon cálcio
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CaM	Calmodulina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosine
CAT	Capacidade antioxidante total
CAT	Catalase
Ca_v	Canais de cálcio dependentes de voltagem
CBiotec	Centro de biotecnologia da UFPB
CCh	Carbacol
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
DAG	Diacilglicerol
DPPH	1,1-difenil-2- picril hidrazil
E_{max}	Efeito máximo
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GA	Grupo asmático
GAAP100	Grupo asmático suplementado com AP100 mg/kg
GAAP30	Grupo asmático suplementado com AP30 mg/kg
GAAP300	Grupo asmático suplementado com AP300 mg/kg
GC	Grupo controle
GDP	Difosfato de guanina
GHS	Glutationa redutase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de 18 granulócitos e macrófagos
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GTP	Trifosfato de guanina
GTS	Glutationa S-transferase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HCLO	Ácido hipocloroso
HETE	Ácido 15-hidroxicossatetraenóico
$HO^{\bullet}$	Radical hidroxila
$HO_2^{\bullet}$	Radical peridroxila
$HO_2^{\bullet}$	Radical peroxila
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

ILC	Células linfoides inatas
IP_3	1,4,5-trisfosfato de Inositol
IP_3R	Receptor de IP_3
IPeFarM	Instituto de pesquisa em fármacos e medicamentos
K^+	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato de potássio
LACONCHA	Laboratório de controle neural da circulação e hipertensão arterial
LFF	Laboratório de farmacologia funcional prof. George Thomas
LTC_4	Leucotrieno C_4
MBP	Proteína eosinofílica básica maior
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCX	Trocador $3Na^+/1Ca^{2+}$
NO	Óxido Nítrico
NO_2	Dióxido nítrico
NOX4	NAPH oxidase 4
NPS	Nitroprussiato de sódio
$O_2^{-\bullet}$	Ânion superóxido
O_3	Ozônio
OMS	Organização mundial da saúde
$ONOO^-$	Peroxinitrito
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PDE	Fosfodiesterase
PGD_2	Prostaglandina D_2
PIP_2	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína Cinase C
PKG	Proteína cinase G
PLC-β_1	Fosfolipase Cβ_1
PMCA	Bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática
$ROOH^\bullet$	Radical hidroperoxila
RS	Retículo Sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
sCG	Ciclase de guanilil solúvel
SERCA	Bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático
SOD	Superóxido desmutase
SUS	Sistema único de saúde
TGF-α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TH	Células T *helper*
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSLP	Linfopoietina estromal tímica

UFPB	Universidade federal da paraíba
UPA	Unidade de produção animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REFERENCIAL TEÓRICO 19

2.1 Asma 19

2.1.1 Patogênese 19

2.1.2 Tratamento 28

2.2 *Arthrospira platensis* 29

3 OBJETIVOS 31

3.1 Geral 31

3.2 Específicos 31

4 METODOLOGIA 32

4.1 MATERIAL 32

4.1.1 Animais 32

4.1.2 Substâncias 32

4.1.3 Produto-teste 33

4.1.4 Solução nutritiva 33

4.1.5 Equipamentos 33

4.2 MÉTODOS 34

4.2.1 Grupos experimentais 34

4.2.2 Sensibilização e desafio com ovalbumina (indução da asma) ... 34

4.2.3 Administração da *Artrospira platensis* 35

4.2.4 Obtenção dos anéis de traqueia e dos pulmões 36

4.2.5 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de SchultzDale 36

4.2.6 Avaliação da reatividade contrátil ao CCh em traqueia de ratos 36

4.2.7 Avaliação da reatividade relaxante ao nitroprussiato de sódio (NPS) e a aminofilina em traqueia de rato pré-contraída com CCh 36

4.2.8 Avaliação do balanço oxidativo em pulmão de ratos 37

4.2.9 Análise estatística 37

5 RESULTADOS 38

5.1 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de Schultz-Dale 38

5.2 Avaliação da reatividade contrátil ao CCh em traqueia de ratos 39

5.3 Avaliação da reatividade relaxante à aminofilina em traqueia de rato pré-contraída com CCh 40

5.4 Avaliação da reatividade relaxante ao nitroprussiato de sódio (NPS) em traqueia de rato pré-contraída com CCh 42

5.5 Avaliação do balanço oxidativo em pulmão de ratos 43

6 DISCUSSÃO 45

7 CONCLUSÕES 51

REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença crônica não transmissível que se manifesta através de episódios reversíveis de constrição e inflamação das vias aéreas em resposta a infecções, alérgenos ambientais e irritantes. É um processo complexo, multifatorial, imunomediado e relacionado a diversos fenótipos clínicos, causando sintomas recorrentes, como sibilos, aperto no peito, tosse e falta de ar (Papi *et al*., 2018).

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde, a asma afeta cerca de 6,4% da população, o que corresponde a cerca de 13 milhões de pessoas, e é responsável por cerca de 100 mil internações hospitalares e mais de 2 mil mortes por ano no Brasil. As regiões Norte e Nordeste possuem as maiores taxas de hospitalizações e de óbitos por asma, com os estados do Pará e da Bahia apresentando o maior número de hospitalizações por 100 mil habitantes (Cardoso *et al*., 2017).

Em casos de asma grave, os custos com o manejo da doença e com internações chegam a comprometer cerca de um quarto da renda familiar dos pacientes que utilizam o SUS (Cardoso *et al.,* 2017). Todavia, esse custo pode diminuir bastante quando a doença é controlada de maneira adequada, mas apenas 12,3% dos asmáticos no Brasil alcançam esse controle (Cançado *et al*., 2019). Esses dados refletem o grande problema de saúde pública causado pela asma, que gera enormes gastos com o custeio de despesas médicas em internações, absenteísmo e mortalidade.

A asma pode ser classificada de forma resumida em alérgica e não alérgica. A asma alérgica tem por característica inflamações que envolvem linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2), resultando em um aumento da contração do músculo liso, descamação epitelial, hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e edema de mucosa (Gina, 2023). Enquanto que a asma não alérgica é mais comum em pessoas mais velhas, com baixa resposta do tipo Th2 e ausência de eosinófilos (Peters *et al.,* 2019).

Atualmente, o tratamento de primeira escolha da asma é feito com broncodilatadores inalatórios, como o salbutamol, um agonista adrenérgico-β_2 de ação curta, junto a corticosteroides inalatórios de baixa dose, que atuam por

meio do bloqueio de citocinas pró-inflamatórias. Caso a asma seja persistente, os agentes broncodilatadores escolhidos são de ação longa, e em casos mais graves, são administrados glicocorticoides em altas doses por via oral (Gina, 2023; Lee *et al*., 2017).

Apesar dos tratamentos convencionais da asma serem efetivos, a qualidade de vida dos pacientes a longo prazo tende a diminuir bastante devido aos diversos efeitos colaterais induzidos por esses medicamentos. Portanto, torna-se de grande relevância a busca por terapias alternativas que minimizem as alterações causadas pela asma, de forma que traga uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

Nesse contexto, os produtos naturais têm se destacado cada vez mais no combate de diversas doenças, por ser o ponto de partida no desenvolvimento de novos medicamentos. Um grande representante dos produtos naturais, sendo uma alternativa promissora para o tratamento da asma é a espécie *Artrospira platensis* (AP), conhecida popularmente como *Spirulina platensis*. Trata-se de uma microalga verde-azulada, pertencente ao filo das cianobactérias, conhecida por seus diversos efeitos benéficos à saúde (Salokhe, 2022).

Seus efeitos terapêuticos estão intimamente relacionados a sua composição, em que 60-65% do seu peso seco é composto por proteínas, contendo também aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, vitaminas B12 e E, minerais, polissacarídeos e pigmentos como clorofila, ficocianina, aloficocianina e betacaroteno (Zhang *et al*., 2019), conferindo propriedade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, antidiabética e imunoestimulatória (Salokhe, 2022).

Diante dessas premissas, a suplementação com AP demonstra ter um papel promissor no combate de doenças crônicas de caráter inflamatório, com hipercontratilidade da musculatura lisa e desbalanço oxidativo, como é o caso da asma. Portanto, este trabalho visa investigar um possível efeito da AP em modelo de asma induzida por ovalbumina em ratos, a fim de se descobrir um novo produto com capacidade de combater doenças ligadas à hiper-reatividade muscular lisa.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Asma

Uma das principais doenças que afeta crianças e adultos, a asma é uma doença não transmissível caracterizada por um quadro inflamatório das pequenas vias aéreas dos pulmões, causando seu estreitamento, limitando o fluxo de ar, o que leva o paciente a ter sintomas como tosse, falta de ar, respiração ofegante e aperto no peito. Alguns estímulos externos, como fumaça de cigarro, pelo de animais, infecções virais e atividade física, podem piorar esses sintomas (WHO, 2021)

A asma é uma doença crônica que afeta 300 milhões de indivíduos no mundo, sendo mais prevalente em países pobres e em desenvolvimento, além de ser mais comum em crianças e mulheres na fase adulta (Gina, 2023). No Brasil, a taxa de mortalidade hospitalar decorrente da asma passou de 0,4% em 2008 para 0,5% em 2013, aumentando cerca de 25%. Em 2019, foram notificados 350 mil internações e 2.072 mil óbitos ocasionadas pela asma (Brasil, 2019).

Dentre os 23,2% da população que é acometida pela doença, variando entre as regiões do Brasil, apenas 12,3% dos asmáticos estão controlados, dados esses que são alarmantes, visto a alta taxa de morbidade da asma, evidenciando a dificuldade do controle da doença (Cançado *et al*., 2019; Ministério da Saúde, 2022). Além do impacto social, consequência dessa falta de controle, o custo financeiro para lidar com a doença gerado para as famílias e ao Sistema Único de Saúde (SUS) se torna alto, principalmente nos casos de asma grave, podendo comprometer mais de um quarto da renda familiar (Costa *et al*., 2018)

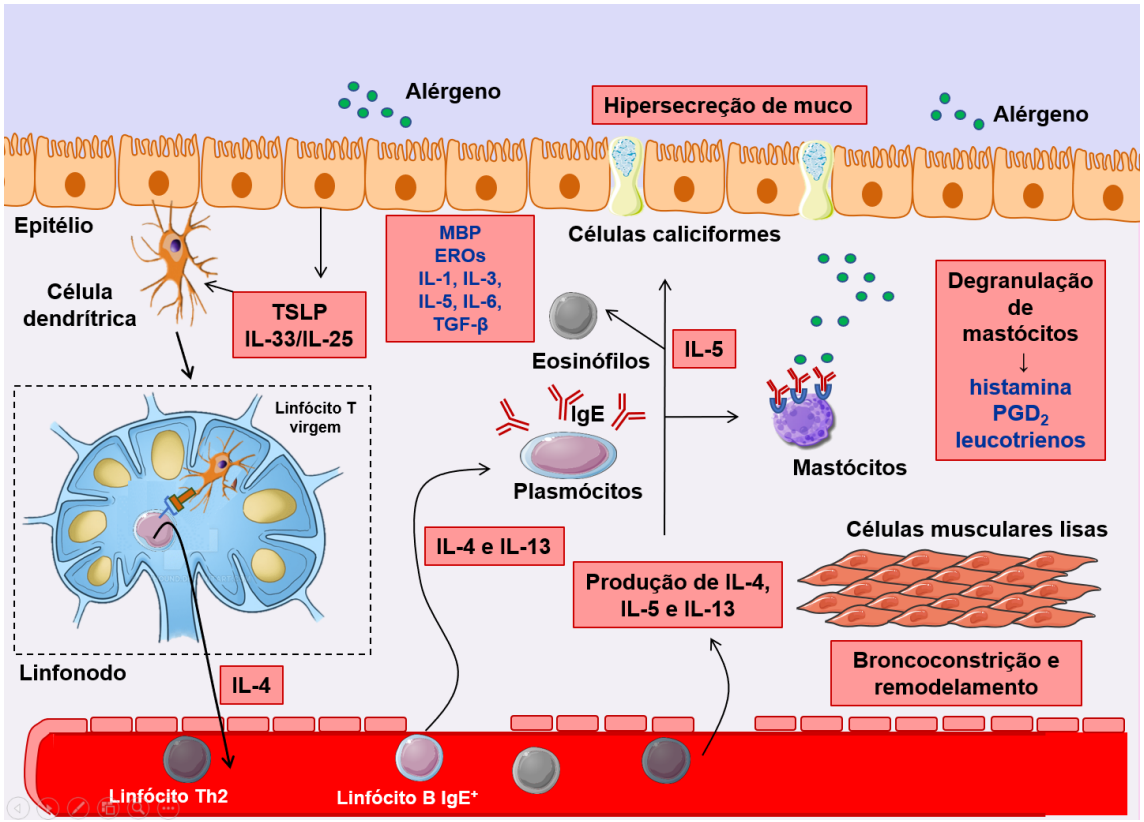
2.1.1 Patogênese

O diagnóstico e tratamento da asma apresenta algumas dificuldades, pois indivíduos que apresentam fenótipos semelhantes podem responder de maneira diferente ao mesmo tipo de tratamento, fazendo-se necessário a classificação da asma de acordo com o tipo de fenótipo (Kuruvilla; Lee; Lee, 2019). De forma simplificada, a asma pode ser classificada em alérgica e não alérgica. A asma

alérgica, também chamada de extrínseca, é uma forma hiperativa de reação alérgica, acometendo cerca de 80% dos casos, onde há o início precoce e mais grave, com inflamações que envolvem linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2). Ela está associada à atopia/IgE e o aumento de eosinófilos nas vias aéreas e sistêmicas. Nesses casos ocorre uma melhor resposta a tratamento convencionais que inibem a inflamação Th2, como é o caso dos corticosteroides (Peters *et al*., 2019). No caso dos pacientes com asma não alérgica, ou intrínseca, há uma resposta do tipo Th2 baixa, com ausência de eosinófilos, tornando o tratamento com corticosteroides menos eficaz. Esse caso é mais comum em fases mais tardias da vida e pode ser causada por estresse, infecção, obesidade e exercícios (Fahy, 2015; Maslan; Mims, 2014)

Na asma alérgica, quando o indivíduo asmático entra em contato o alérgeno, as células epiteliais liberam uma subclasse de citocinas, chamadas alarminas, que desencadeiam diversas vias de sinalização. As alarminas principais são a linfopoietina estromal tímica (TSLP), e as interleucinas IL- 25 e IL-33. A TSLP inicialmente ativa células dendríticas, para que recrutem linfócitos Th2 até as vias aéreas, ao passo que as interleucinas IL-25 e IL-33 ativam as células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s), que, por sua vez, liberam IL-5 e IL-13. As células Th2 recrutadas são responsáveis pela secreção de IL-4 e IL-13, que levam ao aumento do número de células caliciformes, produção de muco e hiper-responsividade das vias aéreas, além de estimularem a ativação de linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos, capazes de produzir IgE, os quais se fixam na superfície de mastócitos, basófilos e eosinófilos, mediando o processo de degranulação. Após essa sensibilização, quando houver uma exposição adicional das vias aéreas ao alérgeno, a degranulação de histamina, prostaglandina D_2 (PGD_2) e leucotrieno C_4 (LTC_4), vai resultar em uma resposta broncoconstritora e formação de edema (Yamauchi; Ogasawara, 2019; Kuruvilla; Lee; Lee, 2019; Barnes, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Resposta imunológica da asma alérgica.



Quando exposto ao alérgeno, o epitélio libera citocinas como TSLP, IL-25 e IL-33, que ativam células dendríticas (CDs), responsáveis pela apresentação do antígeno. Então as CDs são direcionadas para os linfonodos locais, estimulando as células T virgens, convertendo-as em células Th2 ativadas capazes de produzir IL-4. As células Th2 migram para áreas onde estão presentes as células B e, posteriormente, entram na circulação para completar sua maturação. As citocinas Th2 interagem com as células B localmente, promovendo sua maturação em plasmócitos produtores de IgE, que por sua vez, se ligam aos receptores específicos nos mastócitos, sensibilizando-os. Em contatos subsequentes com o alérgeno, irá ocorrer a ligação do alérgeno ao complexo IgE-receptor, desencadeando a degranulação dos mastócitos, que liberam mediadores inflamatórios e contráteis. A IL-9 também atua estimulando os mastócitos. Além disso, as células Th2 migram para o epitélio das vias aéreas e para a camada submucosa, onde secretam IL-5 e IL-13, desencadeando uma resposta inflamatória caracterizada pelo acúmulo de mastócitos e eosinófilos, aumento da produção de muco, remodelamento das vias aéreas e hiper-reatividade brônquica.

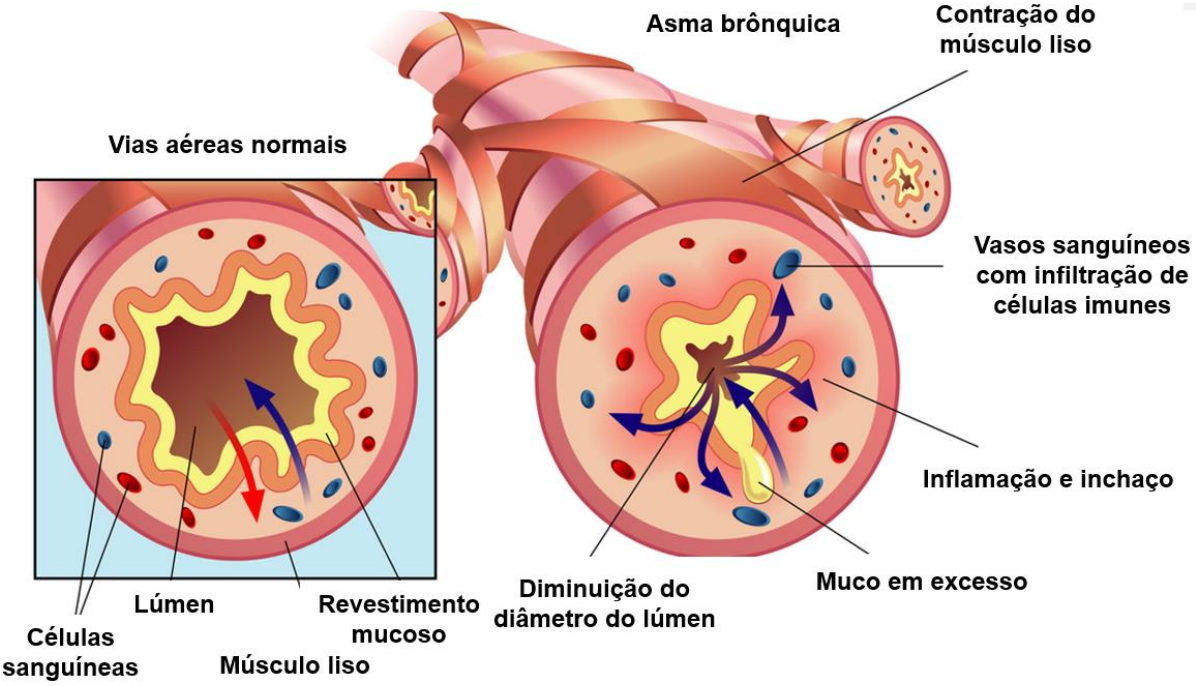
Fonte: Adaptado de Figueiredo *et al*., 2023

As células Th2 também são responsáveis pela secreção de IL-5 que, por sua vez, estimula a produção de eosinófilos na medula óssea, além de ajudar no recrutamento e na manutenção dessas células no trato respiratório, amplificando o processo inflamatório nessa região, pois os eosinófilos liberam proteínas citotóxicas quando ativados. Os eosinófilos também são responsáveis pela liberação de diversos mediadores com IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, fator de crescimento transformador alfa (TGF-α), beta (TGF-β) e fator estimulador de colônias de

granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que estimulam a inflamação das vias aéreas, além de leucotrieno C_4 (LTC_4), fator de ativação plaquetária (PAF) e ácido 15-hidroxicossatetraenóico (HETE), responsáveis por induzir a hiper-responsividade e hipertrofia do músculo liso das vias aéreas (Sulaiman *et al*., 2016) (Figura 2).

O espessamento da camada muscular lisa das vias aéreas, junto a outros fatores, como anormalidades intrínsecas do músculo liso, uma resposta amplificada da inervação parassimpática e dos mastócitos a estímulos exógenos, acaba gerando um quadro de hiper-responsividade, que resulta em uma resposta contrátil anormal a um estimulo broncoconstritor e dificuldade de relaxamento perante um estímulo broncodilatador (Meurs; Maarsingh; Zaagsma, 2003).

Figura 2 - Alterações morfológicas causadas pela asma

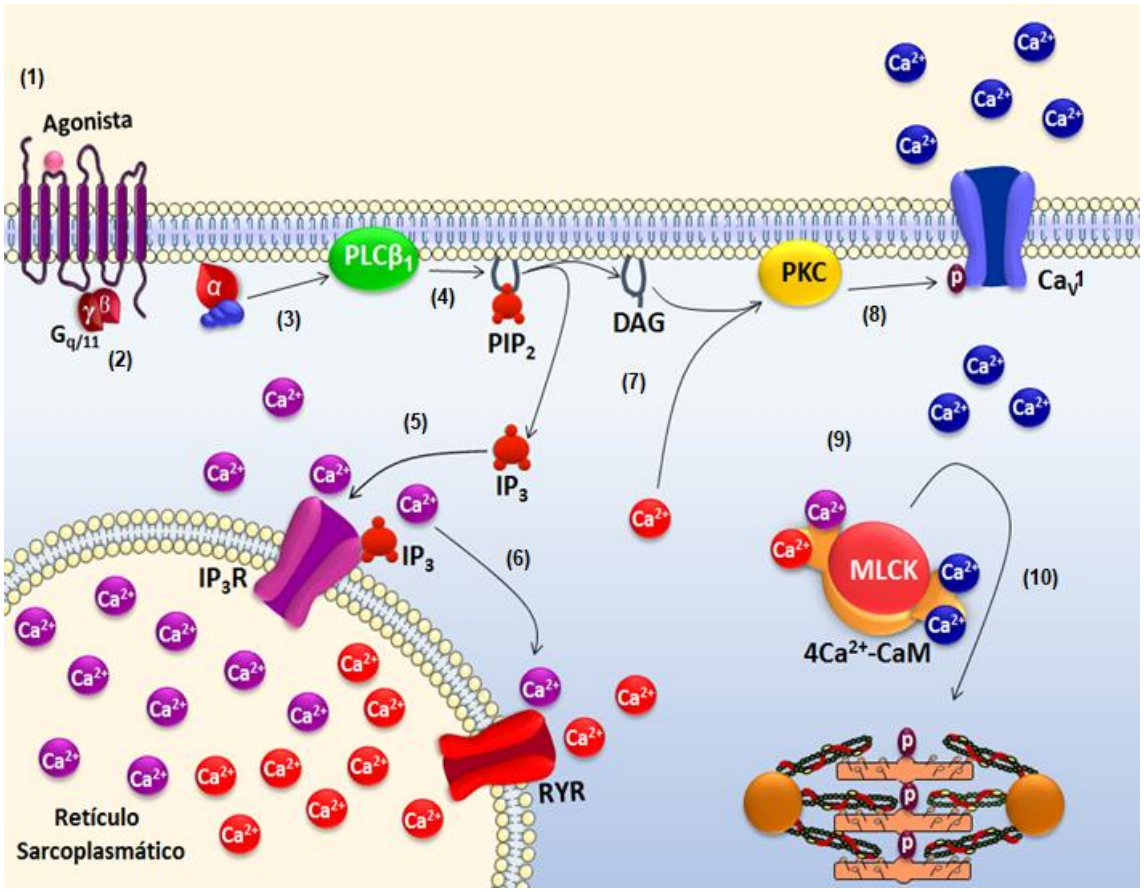


Fonte: Adaptado de Hildreth, 2017

O controle do tônus das vias aéreas é dado principalmente pelo nervo vago, quando os neurônios parassimpáticos liberaram acetilcolina (ACh) que se liga em seu receptor muscarínico, principalmente o M_3, acoplado às proteínas $G_{q/11}$, causando a contração do músculo liso, gerando broncoconstrição. Esse receptor acopla às proteínas $G_{q/11}$, proporcionando a ativação da enzima

fosfolipase $C_{\beta 1}$ (PLC-β_1), uma enzima que irá converter o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 é responsável por liberar o Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citosol. O aumento de cálcio no citosol fará com que a proteína cinase C (PKC) seja translocada até a membrana, onde será ativada pelo DAG. Essa ativação permite à PKC fosforilar canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_V), promovendo o influxo de mais Ca^{2+}, que se ligarão à proteína calmodulina, formando o complexo $4Ca^{2+}$-calmodulina; este complexo, por sua vez, irá ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que tem por função fosforilar a cadeia leve da miosina, permitindo a formação de pontes cruzadas, gerando a contração do músculo liso (Sanderson; Delmotte; Bai; Perez-Zogbhi, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC β_1



(**1**) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (**2**) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (**3**) A subunidade $\alpha_{q/11}$-GTP ativa a PLCβ_1; (**4**) A PLCβ_1 cliva o fosfolipídio de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (**5**) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando

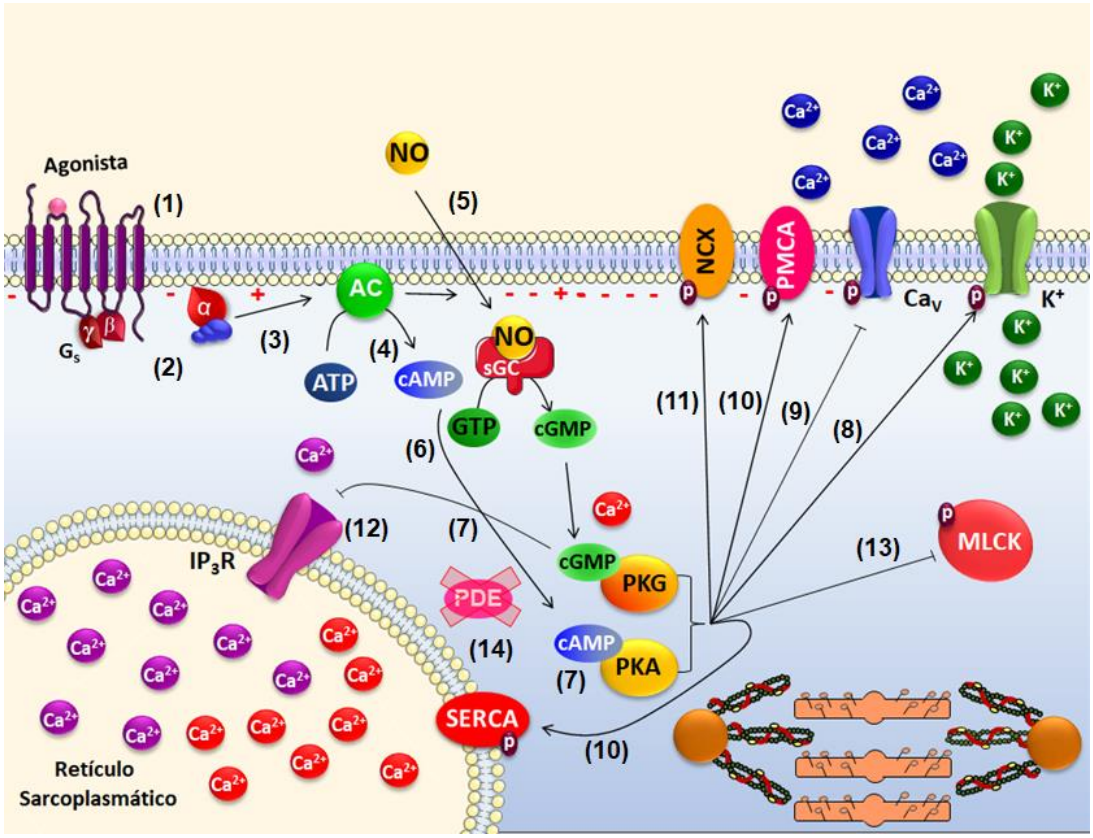
o Ca^{2+} dos estoques; (**6**) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR, fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (**7**) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (**8**) A PKC ativada fosforila os Ca_V1 promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (**9**) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$-CaM e ativando a MLCK; (**10**) A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Ferreira, 2022.

O contrário acontece através dos receptores adrenérgicos presentes no músculo liso, como o receptor β_2, que ao ser ativado pela adrenalina ou noradrenalina, causa o relaxamento do músculo, gerando broncodilatação (Matera *et al*., 2020; Kistemaker, 2019). Esses receptores estão acoplados à proteína G_s, e quando ativados, promovem a ativação da ciclase de adenilil (AC), que irá aumentar os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Esse segundo mensageiro ativa a proteína cinase A (PKA), responsável por ativar diversos alvos, como a bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA), a bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática (PMCA), o trocador $3Na^+/1Ca^{2+}$ (NCX), e os canais de K^+. Irá também bloquear Ca_v e inibir a MLCK, causando uma diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e impedir a formação de pontes cruzadas, resultando no relaxamento do músculo liso (Somlyo *et al*., 1999) (Figura 4).

Outra via de relaxamento bastante presente no músculo liso traqueal é a do óxido nítrico (NO), que é produzido pelo epitélio e se difunde até o músculo liso adjacente, onde ativa a enzima ciclase de guanilil solúvel (sCG), responsável por aumentar os níveis citosólicos de monofosfato cíclico de guanosina (cGMC). Esse segundo mensageiro ativa a proteína cinase dependente do cGMP (PKG), que irá fosforilar diversos alvos intracelulares, de maneira similar a via da PKA, hiperpolarizando a célula e causando a diminuição dos níveis citosólicos de Ca^{2+}, impedindo a formação de pontes cruzadas, resultando no relaxamento do músculo liso (Rembold, 1996) (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelas vias efetoras 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 (processo não mostrado 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 nucleotídios cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG, respectivamente. 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. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, consequentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso; (**14**) Uma inibição das PDEs leva ao aumento dos nucleotídios cíclicos, também ocasionando relaxamento. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Ferreira, 2022.

O espessamento da camada muscular lisa das vias aéreas, junto a outros fatores, como anormalidades intrínsecas do músculo liso, uma resposta amplificada da inervação parassimpática e dos mastócitos a estímulos exógenos, acaba gerando um quadro de hiper-responsividade, que resulta em uma resposta contrátil anormal a um estimulo broncoconstritor e dificuldade de

relaxamento perante um estímulo broncodilatador (Meurs; Maarsingh; Zaagsma, 2003).

Outra alteração causada pela asma responsável por causar dano ao tecido é o aumento do estresse oxidativo, sendo este um desbalanço decorrente do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em relação a uma diminuição da capacidade do sistema biológico de reparar os danos gerados pelos radicais oxidativos ou de desintoxicar os intermediários reativos. O metabolismo celular anormal é responsável por produzir substâncias oxidantes a partir do oxigênio molecular, assim como também, é possível que haja o aumento dessas moléculas oxidantes por fontes externas, através de fumaça de cigarro, poluentes, radiação ionizante, íons de metais pesados, dentre outros fatores (Mishra; Banga; Silveyra, 2018).

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

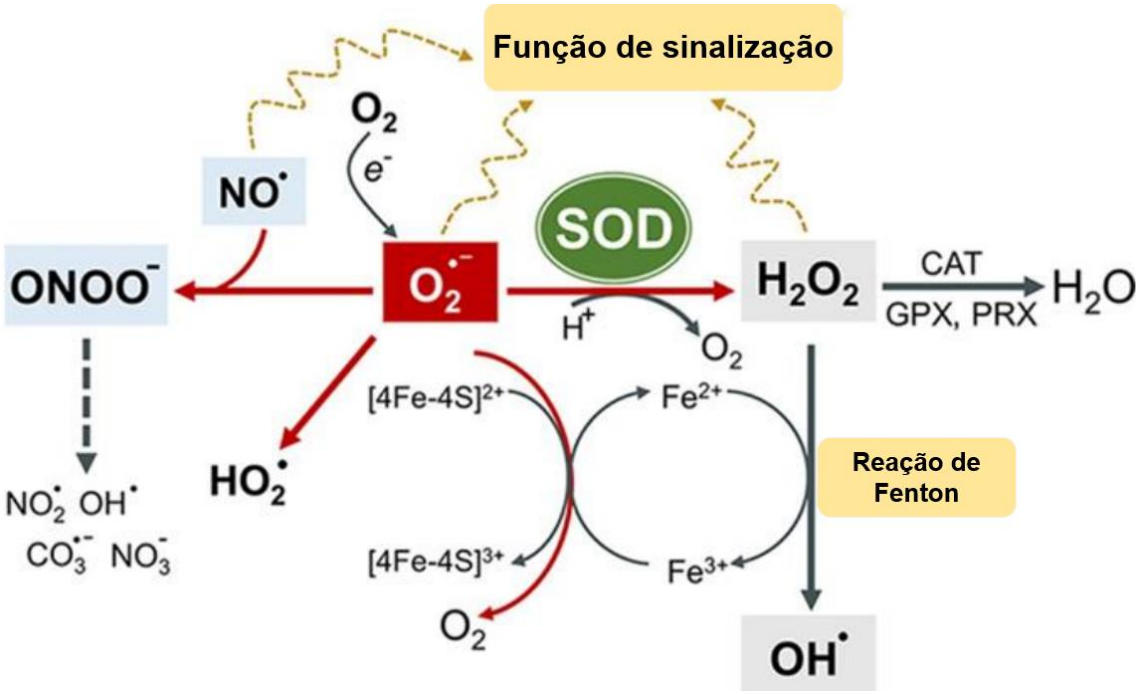
A principal via de geração de radicais livres em sistemas biológicos é a cadeia respiratória mitocondrial, por meio da utilização de oxigênio para produção de ATP. O complexo enzimático da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH) é responsável por dar início a cascata de reações oxidativas, produzindo O^{2-}, que será dismutado a H_2O_2, por meio de reações espontâneas ou catalização enzimática. Tanto o O^{2-} quanto o H_2O_2 podem formar o radical OH^-, na presença de ferro ou outros metais. As mitocôndrias também podem gerar o óxido nítrico, que pode reagir com o O_2^-, formando o peroxinitrito $ONOO^-$, outro potente oxidante (Liu *et al*., 2016; Silva *et al*., 2013).

O quadro inflamatório da asma alérgica está intimamente associado a atividade das células imunes inflamatórias, como neutrófilos, monócitos e eosinófilos, que são responsáveis por aumentar os níveis de EROs, resultando em lesão do tecido pulmonar e aumento da inflamação. Além dessas células inflamatórias, as células epiteliais das vias aéreas, também são capazes de produzir EROs (Groot *et al*., 2019).

A presença de EROs nos tecidos biológicos em baixos níveis é considerada normal, visto que são derivados de processos celulares fisiológicos, participando da modulação da expressão de genes e na sinalização das vias de transdução celulares relacionadas a uma ampla gama de funções antioxidantes, antiinflamatórias e citoprotetoras, as quais são capazes de restaurar a homeostase do tecido. Porém, quando os estímulos oxidativos se encontram em altos níveis, são desencadeados conjuntos adicionais de sinalização que são potencialmente pró-inflamatórias, que podem resultar em danos às estruturas celulares, causando alteração de suas funções, além de que nas vias aéreas, promovem o remodelamento e espessamento da camada de músculo liso, e aumento da hiper-responsividade (Lloyd; Saglani, 2015; Sahiner *et al*., 2018).

As formas de neutralização desses radicais livres, incluem sistemas elaborados de defesa agrupados em sistemas enzimáticos (primeiros a agir) e não enzimáticos. Dentre as enzimas antioxidantes principais, temos a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as enzimas dependentes da glutationa, como a glutationa peroxidase (GSH-Px), a glutationa S-transferase (GTS), a glutationa redutase (GHS) e a glutationa sintetase (Raha; Robinson, 2000; Powers; Jackson, 2008). Uma outra forma de controle do estresse oxidativo consiste na interceptação de radicais livres, impedindo que eles reajam com as estruturas celulares, nesse caso, através de antioxidantes advindos da dieta. (Bloomer, 2008).

Figura 5 - Reações do ânion superóxido e atuação do sistema antioxidante.



O oxigênio (O_2) é reduzido a superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que pode ser reduzido a peróxido de hidrogênio(H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) ou convertido em radical hidroxila ($HO^{\bullet}$). O H_2O_2 pode sofrer a reação de Fenton e é transformado em $HO^{\bullet}$ ou reduzido a água (H_2O) pela catalase (CAT) ou pelo sistema glutationa (GSH)/glutationa peroxidase (GPx). A reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) produz $ONOO^-$, cuja decomposição, por sua vez, dá origem a alguns intermediários altamente oxidantes incluindo $NO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ e $CO_3^{\bullet}$ e NO_3^- . Assim sendo, quando os níveis de $O_2^{\bullet-}$ aumentam, pode diminuir a biodisponibilidade de $NO^{\bullet}$ e gerar $ONOO^-$. $O_2^{\bullet-}$ por si só pode reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}) ao ferro ferroso (Fe^{2+}) no centros ferro-enxofre de proteínas, levando à inativação enzimática e concomitante perda de Fe_2^+ das enzimas, que por sua vez alimenta a protonação de $O_2^{\bullet-}$ que pode formar o radical hidroperoxil mais reativo ($HO_2^{\bullet}$).

Fonte: Adaptado de Wang *et al*., 2018.

2.1.2 Tratamento

A terapia convencional de primeira escolha para o tratamento da asma é a utilização de agonistas adrenérgicos-β_2 de ação curta, por inalação, como o salbutamol, que atua promovendo broncodilatação, e que muitas vezes são combinados com corticosteroides, como a flusinolida e budesonida, que bloqueiam a expressão de moduladores pró-inflamatórios (Lee *et al*., 2017). Em quadros de asma persistente, são administrados corticosteroides junto a agonistas adrenérgicos-β_2 de ação longa, como salmeterol ou formoterol. Já em casos de asma grave, as doses de glicocorticoides inalatórios e orais são altas, junto à administração de um agente antileucotrieno (Gina, 2021).

Todavia, o uso prolongado desses medicamentos pode trazer efeitos colaterais prejudiciais a saúde dos pacientes asmáticos. A utilização de glicocorticoides sistêmicos pode causar quadros de imunossupressão, osteoporose e catarata, assim como o uso prolongado dos agonistas adrenérgicos-β_2 de longa duração pode gerar um processo de dessensibilização dos receptores, culminando na exacerbação da asma e até a morte (Townsend; Emala, 2013).

Dessa forma, o estudo da asma e a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos assim como a busca por terapias alternativas que minimizem os efeitos indesejados causados pelo tratamento convencional e aumentem a qualidade de vida dos pacientes asmáticos se torna extremamente necessário.

2.2 *Arthrospira platensis*

A alga *Arthrospira platensis* (AP) é um procarionte fotossintético encontrado nos ecossistemas aquáticos que tem demonstrado efeitos biológicos em modelos de músculo liso. A AP foi regulamentada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como um novo alimento desde 2013 e foi incluída na lista de suplementos alimentares em 2017, recebendo selo de segurança dado pela OMS (Brasil, 2013; 2017; OMS, 2017). A segurança em seu consumo é enfatizada a partir de estudos toxicológicos em ratos que comprovam a ausência de toxicidade crônica ou subcrônica, mutagenicidade, teratogenicidade ou efeitos adversos na reprodução e lactação (Salazar *et al*., 1998; Bin-Jumah *et al*., 2021)

A AP possui um alto valor nutricional, sendo constituída majoritariamente por proteínas, que compreendem cerca de 60 a 70% do seu peso seco, vitaminas B12, C e E, aminoácidos, ácidos graxos, ácido gama-linoleico e minerais, pigmentos antioxidantes, como carotenoides e ficocianina, glicolipídios e outros compostos fenólicos (Hoseini *et al*., 2013; Jung *et al*., 2019). Essa riqueza nutricional está relacionada ao seu papel na prevenção do surgimento e progressão de várias doenças.

Dentre suas atividades biológicas, já foram descritos efeitos benéficos relacionados à redução do desbalanço oxidativo (Diniz *et al*., 2020), atividade anti-inflamatória e antioxidante em modelo murino de diabetes (Obeidavi *et al*., 2018) e em ratos submetidos a exercício físico de força (Brito *et al*., 2020), atividade antioxidante e anti-espasmódica em íleo de ratos (Araujo et al., 2020), bem como efeito anti-inflamatório em modelo de colite em ratos (Abdel-Daim *et al*., 2015).

Portanto, todos esses estudos sustentam a hipótese de que a suplementação com AP pode ser considerada uma candidata promissora para o tratamento de patologias de caráter inflamatório, com desbalanço oxidativo e hiper-contratilidade muscular lisa, como é o caso da asma.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a atividade antiasmática da *Artrospira platensis* em modelo de asma induzida por ovalbumina em rato.

3.2 Específicos

• Investigar os efeitos da suplementação com AP sobre a resposta da traqueia de rato à estimulação, *in vitro*, com ovalbumina;

• Avaliar os efeitos da suplementação com AP sobre as curvas cumulativas concentrações-resposta induzidas pelo agente contrátil carbacol em traqueia de ratos asmáticos sensibilizados e desafiados com ovalbumina;

• Investigar os efeitos da suplementação com AP sobre as curvas cumulativas concentrações-resposta induzidas pelos agentes relaxantes aminofilina e nitroprussiato de sódio em traqueia de ratos asmáticos sensibilizados e desafiados com ovalbumina;

• Avaliar os efeitos da suplementação com AP sobre a capacidade antioxidante total dos pulmões de ratos asmáticos sensibilizados e desafiados com ovalbumina;

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL

4.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade entre 90 e 120 dias, pesando inicialmente de 250 a 300g, obtidos e mantidos na Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB, os quais eram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 1º C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. A escolha do modelo animal se deu pela sua fisiologia, mais próxima da humana, bem como das vantagens de seu uso como modelo de doença humana, comparado com camundongo e outros organismos (Iannaccone; Jacob, 2009), o que possibilita a avaliação da eficácia de drogas sobre órgãos e sistemas do animal.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais, de acordo com o *Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies* (Sherwin *et al*., 2003), o *Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals* (Zimmermann, 1983), o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Brasil, 2016) e a Diretriz para prática de eutanásia do CONCEA (Brasil, 2018), e foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (protocolo No 3255100522). Os procedimentos experimentais descritos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas (LFF/IPeFarM) e no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA/CBiotec).

4.1.2 Substâncias

O cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de potássio (KCl), o sulfato de magnésio ($MgSO_4$), o fosfato de potássio (KH_2PO_4), o cloreto de cálcio ($CaCl_2$), a glicose, o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil). O hidróxido de

alumínio ($Al(OH)_3$), a ovalbumina (OVA) (grau II e V), o cloridrato de carbamilcolina (CCh), a aminofilina, o nitroprussiato de sódio e o 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) foram obtidos na Sigma-Aldrich (Brasil). A cetamina e a xilazina foram adquiridas da Syntec (Barueri, São Paulo, Brasil). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil). As substâncias (exceto a mistura carbogênica) foram dissolvidas e diluídas com água destilada para a obtenção de cada solução-estoque, exceto a OVA, que foi dissolvida em soro fisiológico (NaCl 0,9%). Quando necessário, as substâncias foram diluídas em água destilada para a obtenção das concentrações apropriadas.

4.1.3 Produto-teste

A AP foi adquirida do laboratório INFINITY Pharma. (HONG KONG - China). Uma amostra foi analisada para a certificação de que o material correspondia a alga, em seguida foi fracionada pela Farmácia de Manipulação Roval (João Pessoa-PB). A caracterização química do pó da alga foi realizada por nosso grupo de pesquisa (Diniz et al., 2024).

4.1.4 Solução nutritiva

Para os protocolos de reatividade traqueal, foi utilizada solução nutritiva de Krebs, ajustada ao pH 7,4 (com solução de HCl ou NaOH, 1 N), gaseificada com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida a 37 °C, com a seguinte composição, em mM: NaCl (118,0), KCl (4,5), $MgSO_4$ (5,7), KH_2PO_4 (1,1), $CaCl_2$ (2,5), glicose (11,0) e $NaHCO_3$ (25,0).

4.1.5 Equipamentos

Para o registro das contrações isométricas, os anéis de traqueia eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados de 6 mL, modelo BOI-04, e conectada a transdutores de força isométricos, modelo TIM 05, acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição digital de dados com o software AQCAD versão 2.1.6, que foram analisados pelo programa ANCAD. O sistema possui uma bomba termostática modelo 11 BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Para indução da asma, era utilizado um nebulizador ultrassônico (Soniclear®, São Paulo/SP), com um fluxo variável entre 0,7 a 1,25 mL/min e tamanho médio da partícula de 4 µm, conectado a um recipiente fechado de poliacrílico (20x13x15 cm) contendo um orifício para a renovação do ar.

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

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

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos randomicamente em 5 grupos experimentais, com 6 animais cada:

1) Grupo controle (GC): não sensibilizados;

2) Grupo asmático (GA): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA);

3) Grupo asmático + AP30 (GAAP30): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e suplementados com AP na dose de 30 mg/kg;

4) Grupo asmático + AP100 (GAAP100): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e suplementados com AP na dose de 100 mg/kg;

5) Grupo asmático + AP300 (GAAP300): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e suplementados com AP na dose de 300 mg/kg;

4.2.2 Sensibilização e desafio com ovalbumina (indução da asma)

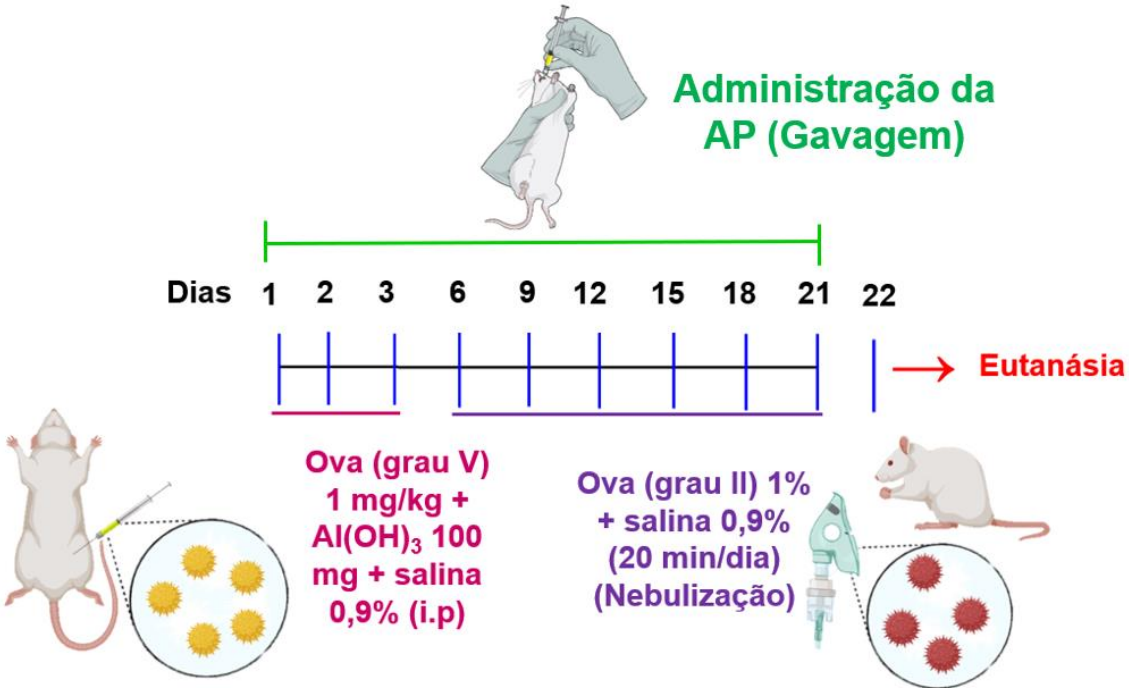
Inicialmente, para o protocolo de sensibilização, nos dias 1-3 do experimento os animais recebiam injeção intraperitoneal (i.p.) de 1 mg/kg/dia de ovalbumina (OVA) (grau V) solubilizada em solução salina 0,9% estéril e utilizando como adjuvante 100 mg de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$). Nos dias 6, 9, 12, 15, 18 e 21 os animais eram colocados individualmente em uma caixa poliacrílica fechada acoplada a um nebulizador ultrassônico. Logo após, eram desafiados com OVA 1% (grau II), por até 20 minutos diários. Os animais não sensibilizados eram submetidos ao mesmo processo, porém utilizando apenas solução salina 0,9% estéril, tanto para as administrações i.p. quanto para as

nebulizações. Todos os animais eram eutanasiados 24 horas após o último desafio com OVA ou solução salina (dia 22) (Salmon *et al*., 1999; Adaptado de Galvão *et al*., 2017).

4.2.3 Administração da *Artrospira platensis*

A alga era dissolvida diariamente em água destilada para obtenção da solução de partida na concentração de 10 mg/mL. A suplementação era realizada por via oral, utilizando-se a técnica de gavagem, durante o período de 3 semanas, referente ao tempo de indução da asma nos ratos, na dose de 30, 100 ou 300 mg/kg, tendo como referência para a escolha da dose de partida de 100 mg/kg, estudos nos quais foram avaliados os efeitos da alga em disfunções do músculo liso (Araújo *et al*., 2020; Brito *et al*., 2018; Diniz *et al*., 2020), as demais doses foram feitas baseadas nos resultados da dose de partida. Os animais dos grupos não suplementados passaram pelo mesmo processo, recebendo solução salina 0,9% em substituição ao produto-teste.

Figura 6 - Protocolo de indução da asma em ratos e suplementação com AP 30/100/300 mg/kg.



4.2.4 Obtenção dos anéis de traqueia e dos pulmões

Os animais eram eutanasiados com overdose de cetamina (180 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), por via intraperitoneal (CFMV, 2013; UNIFESP, 2019).

Após a eutanásia, a cavidade torácica era aberta, a traqueia era isolada, para os estudos de reatividade muscular lisa. A traqueia era limpa do tecido adjacente, segmentada e suspensa individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de banho para órgão isolado (6 mL) contendo solução nutritiva, à temperatura de 37 °C, gaseificada com carbogênio e mantida sob tensão de repouso de 1 g. O órgão permanecia em repouso por um período de 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos para evitar a influência de metabólitos liberados pelo órgão no meio (Tschirhart *et al*., 1987).

4.2.5 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de SchultzDale

Os anéis de traqueia eram suspensos nas cubas como descrito no item 4.2.4. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantia constante, os anéis de traqueia eram estimulados com OVA 100 µg/mL e a amplitude da contração era comparada entre os grupos (Chand; Eyre, 1978; Lima; Silva, 1998).

4.2.6 Avaliação da reatividade contrátil ao CCh em traqueia de ratos

Os anéis de traqueia foram suspensos nas cubas como descrito no item 4.2.4. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantia constante, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa com CCh, um agonista de receptores muscarínicos M_3, até atingir seu E_{max} (Ouedraogo; Roux, 2014).

4.2.7 Avaliação da reatividade relaxante ao nitroprussiato de sódio (NPS) e a aminofilina em traqueia de rato pré-contraída com CCh

Os anéis de traqueia eram suspensos nas cubas como descrito no item 4.2.4. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantinha constante, uma nova contração com 10^{-5} M de CCh era induzida e, sobre o componente tônico dessa contração, o NPS, um doador de óxido nítrico, ou a

aminofilina, um inibidor inespecífico de fosfodiesterase, foram adicionados em concentrações cumulativas até atingirem o seu E_{max}.

4.2.8 Avaliação do balanço oxidativo em pulmão de ratos

4.2.8.1 Obtenção do homogenato pulmonar

Após a eutanásia dos animais, os pulmões eram isolados conforme item 4.2.4 e congelados a em nitrogênio líquido até o preparo do homogenato. Para isso, o órgão era pesado, macerado e homogeneizado com KCl 10% na proporção de 1:1. Em seguida, as amostras eram centrifugadas (1.198 x g/10 min) e o sobrenadante separado para análise posterior

4.2.8.2 Análise da capacidade antioxidante total (CAT) no pulmão

A medida da capacidade antioxidante total (CAT) era feita utilizando-se o método colorimétrico da redução do 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995), que se baseia na habilidade da amostra em reduzir o radical DPPH, que apresenta coloração roxa, a 1,1-difenil-2-picril hidrazina, de cor transparente, a qual é detectada por espectrofotometria (Floegel *et al*., 2011). As análises eram feitas comparando-se os níveis da CAT (%) entre os grupos.

4.2.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e e.p.m, a comparação dos dados foi feita com análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Tukey, para comparação entre três ou mais grupos.

A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism®, versão 8.04 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

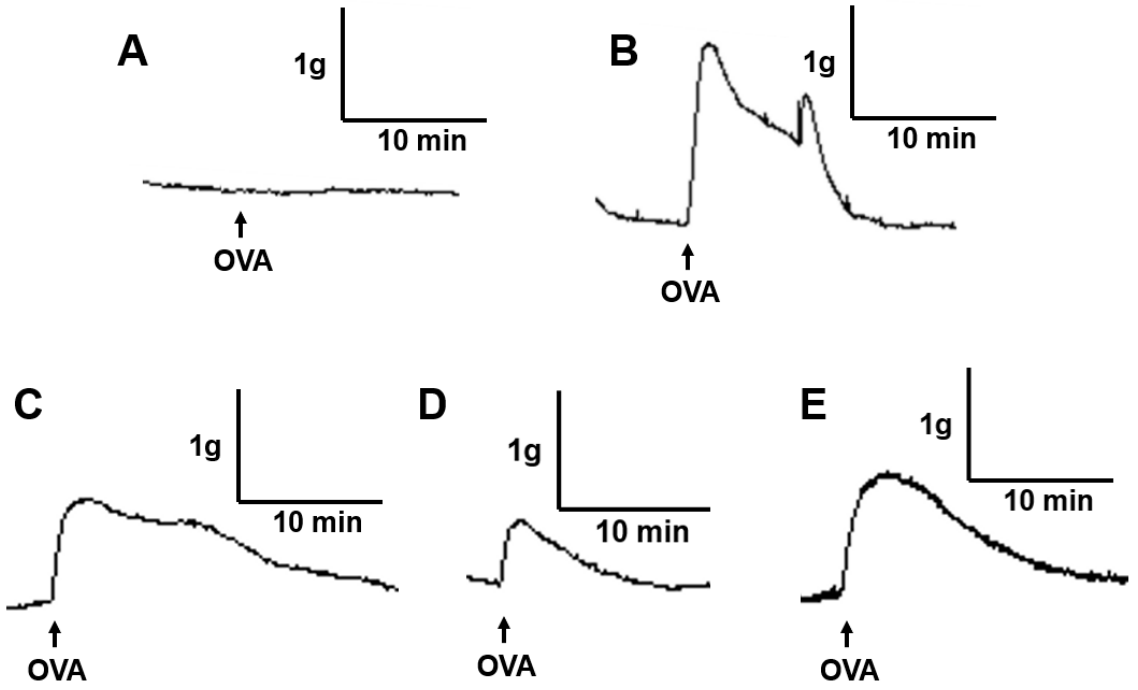
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de Schultz-Dale

Após estimulação com 100 µg/mL de OVA, foi observado que no GA, a sensibilização e desafio prévio com OVA desencadearam uma resposta contrátil na traqueia, enquanto o GC não apresentou nenhuma contração, como esperado.

Por sua vez, o tratamento com AP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg diminuiu a amplitude de contração da traqueia em resposta à OVA (Figura 7), evidenciando que o modelo de asma induzida pela OVA foi realmente instaurado e a suplementação com AP diminuiu a resposta contrátil em decorrência da liberação de mediadores contráteis induzida por uma reação alérgica.

Figura 7 - Registros originais representativos da reatividade traqueal induzida por 100 µg/mL de OVA em ratos do GC (A), GA (B), GAAP30 (C), GAAP100 (D) e GAAP300 (E).



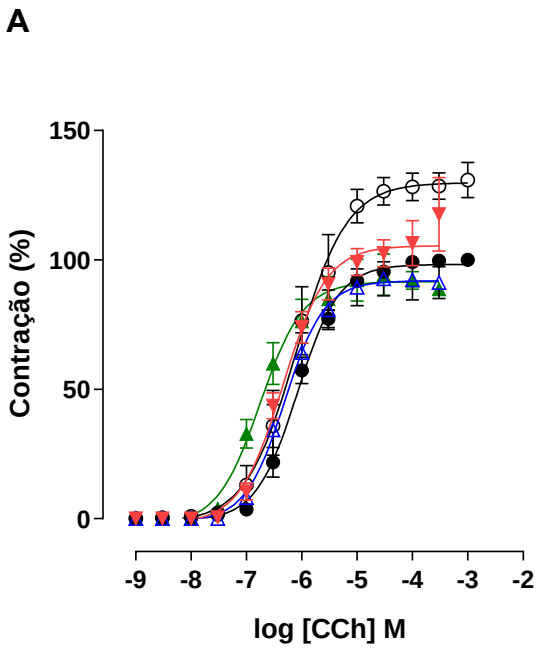
As setas para cima indicam a adição de ovalbumina (OVA) à cuba.

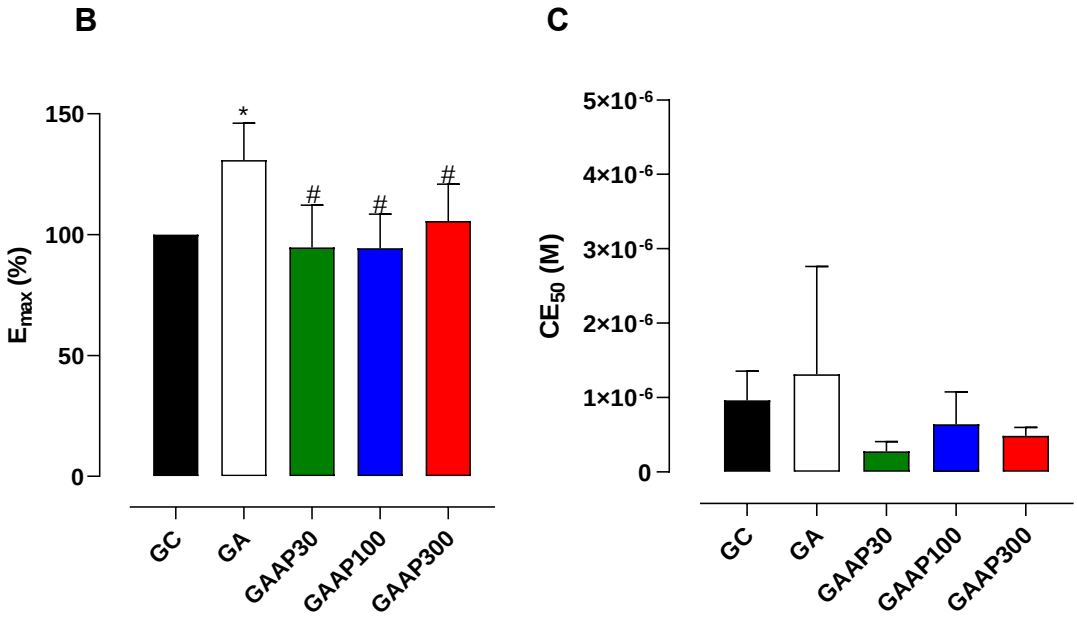
5.2 Avaliação da reatividade contrátil ao CCh em traqueia de ratos

A potência contrátil do CCh não diferiu entre os grupos, enquanto houve um aumento da sua eficácia no GA (E_{max}= 130,8 ± 6,9%; CE_{50} = 1,3 ± 0,6 x 10^{-6} M) em comparação ao GC (E_{max}= 100%; CE_{50} = 9,6 ± 1,7 x 10^{-7} M).

Esse aumento, por sua vez, foi prevenido no GAAP30 (E_{max}= 94,7 ± 7,8%; CE_{50}= 2,4 ± 0,6 x 10^{-7} M), assim como no GAAP100 (E_{max}= 61,7 ± 7,9%; CE_{50}= 9,5 ± 2,7 x 10^{-7} M), e no GAAP300 (E_{max} = 105,7 ± 6,8%; CE_{50} = 4,8 ± 0,5 x 10^{-7} M) (n = 5) (Figura 8).

Gráfico 1 - Curva cumulativa concentração-resposta (**A**), valores de E_{max} (**B**) e valores de CE_{50} (**C**) do CCh do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼).





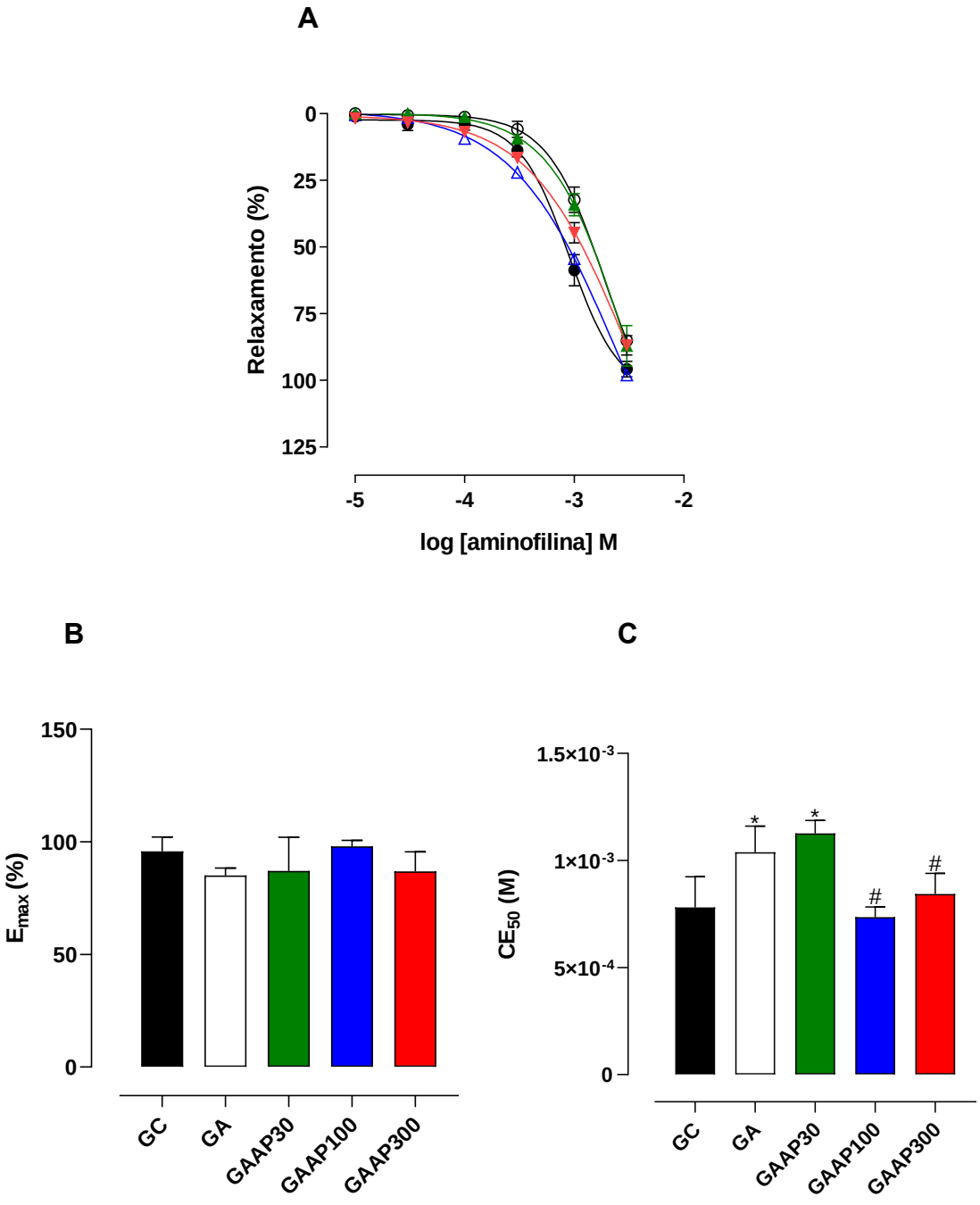
Os símbolos (**A**), as colunas (**B**; **C**) e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey: *p < 0,05 (GC vs. GA); #p < 0,05 (GA vs. GAAP30; GA vs. GAAP100; GA vs. GAAP300). Fonte: Oliveira, 2024

5.3 Avaliação da reatividade relaxante à aminofilina em traqueia de rato pré-contraída com CCh

A potência relaxante da aminofilina foi diminuída no GA (E_{max} = 85,1 ± 1,5%; CE_{50} = 1,0 ± 0,05 x 10^{-3} M) quando comparado ao GC (E_{max}= 95,8 ± 2,8%; CE_{50} = 7,8 ± 0,6 x 10^{-4} M). Todavia, não houve alterações na eficácia relaxante.

Essa diminuição da potência relaxante foi prevenida no GAAP100 (E_{max} = 98,1 ± 1,2%; CE_{50} = 7,4 ± 0,2 x 10^{-4} M), assim como no GAAP300 (E_{max} = 86,9 ± 3,6%; CE_{50} = 8,4 ± 0,4 x 10^{-4} M); porém, no GAAP30, a diminuição da potência relaxante não foi prevenida (E_{max} = 87,1 ± 7,5%; CE_{50} = 1,1 ± 0,03 x 10^{-3} M). Não houve influência da suplementação com AP sobre a eficácia relaxante.

Gráfico 2 - Curvas cumulativas concentração-resposta (**A**), valores de E_{max} (**B**) e valores de CE_{50} (**C**) da aminofilina do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼).



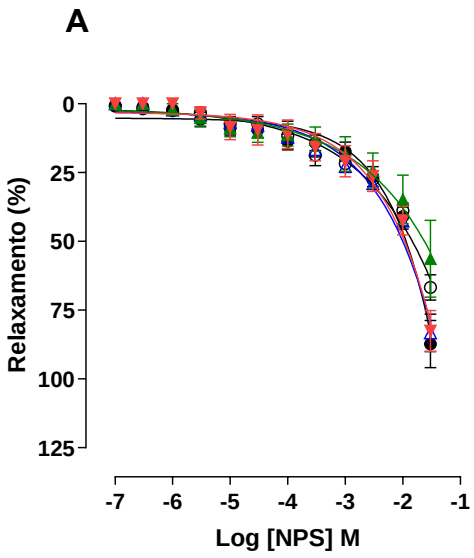
Os símbolos (**A**), as colunas (**B**; **C**) e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5-6). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey: *p < 0,05 (GC vs. GA; GC vs. GAAP30); #p < 0,05 (GA vs. GAAP100; GA vs. GAAP300). Fonte: Oliveira, 2024

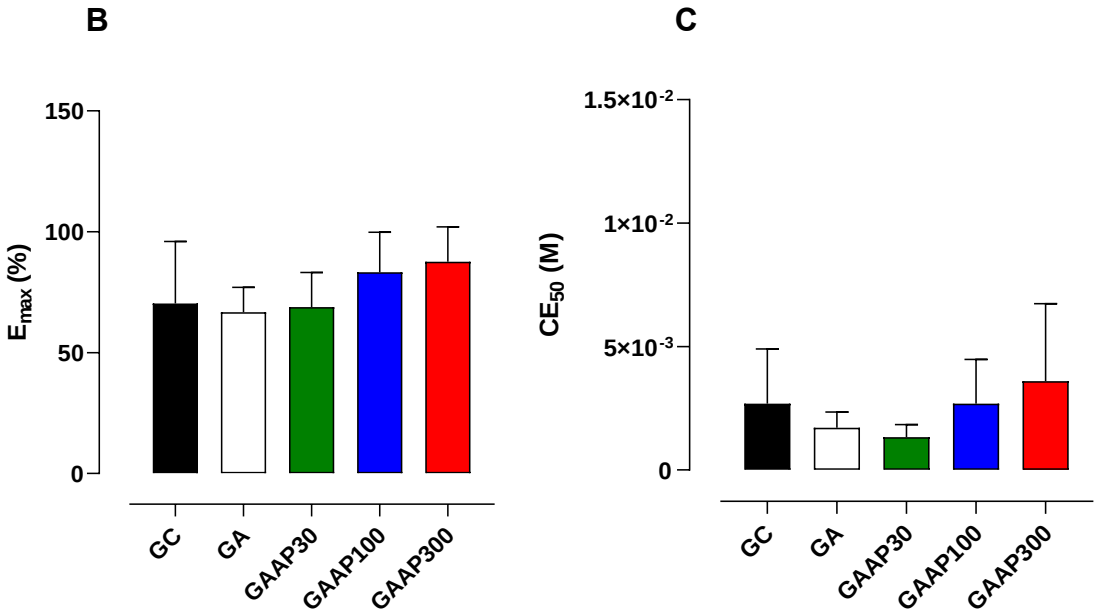
5.4 Avaliação da reatividade relaxante ao nitroprussiato de sódio (NPS) em traqueia de rato pré-contraída com CCh

Diferentemente, o NPS não teve sua eficácia e potência alteradas no GA (E_{max} = 66,8 ± 4,6%; CE_{50} = 1,7 ± 0,3 x 10^{-3} M) quando comparado ao GC (E_{max} = 74,2 ± 12,0%; CE_{50} = 4,2 ± 1,5 x 10^{-4} M)

Assim como, os animais suplementados com AP na dose de 30mg/kg (E_{max} = 68,9 ± 8,2%; CE_{50} = 1,3 ± 0,3 x 10^{-3} M), 100 mg/kg (E_{max} = 83,3 ± 6,7%; CE_{50} = 2,7 ± 0,7 x 10^{-3} M) e 300 mg/kg (E_{max} = 87,6 ± 6,5%; CE_{50} = 3,6 ± 1,4 x 10^{-3} M) não apresentaram diferença na eficácia e potência relaxante quando comparada aos demais grupos (Figura 9) (n = 3-6).

Gráfico 3 - Curvas cumulativas concentração-resposta (**A**), valores de E_{max} (**B**) e valores de CE_{50} (**C**) do NPS do GC (●), GA (○), GAAP30 (▲), GAAP100 (Δ) e GAAP300 (▼).





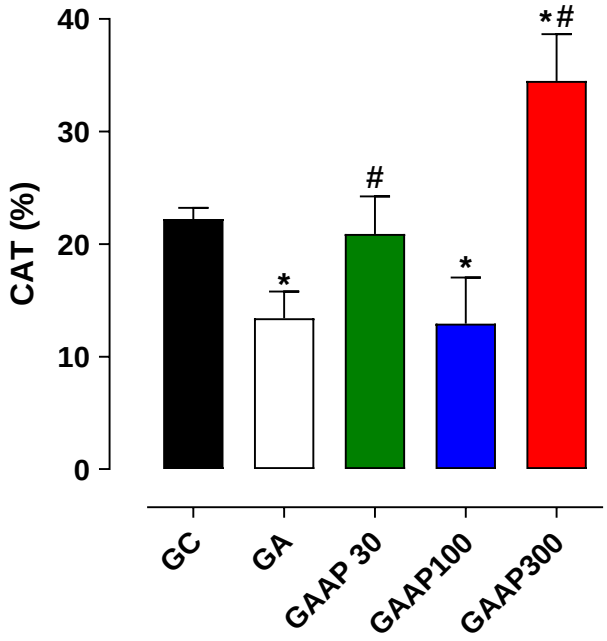
Os símbolos (**A**), as colunas (**B**;**C**) e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3-6). Fonte: Oliveira, 2024

5.5 Avaliação do balanço oxidativo em pulmão de ratos

A capacidade antioxidante total foi reduzida no GA (13,4 ± 1,2%) quando comparado ao GC (22,2 ± 0,5%).

Por sua vez, a suplementação com AP na dose de 30 mg/kg (20,9 ± 1,7%) e 300mg/kg (34,5 ± 2,1%) preveniu essa diminuição, tornando a CAT ainda maior que a do GC. Já a dose de 100 mg/kg (12,9 ± 1,8%) não preveniu essa diminuição.

Gráfico 4 - Capacidade Antioxidante Total (CAT) dos animais do GC, GA, GAAP30, GAAP100 e GAAP300.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 4-5). ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey: *p < 0,05 (GC vs. GA; GC vs. GAAP100; GC vs. GAAP300); $^{\#}$p < 0,05 (GA vs. GAAP30; GA vs. GAAP300). Fonte: Oliveira, 2024

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, ratos Wistar foram submetidos a um protocolo de indução de asma alérgica através da sensibilização e do desafio com ovalbumina, para investigar os possíveis efeitos preventivos da AP sobre a reatividade contrátil da traqueia desses animais frente ao alérgeno ovalbumina e ao carbacol (CCh), assim como a reatividade relaxante frente à aminofilina e ao nitroprussiato de sódio (NPS). Além disso, foi feito a mensuração da capacidade antioxidante pulmonar desses animais, a fim de se avaliar a influência da AP sobre o estresse oxidativo.

A asma alérgica é caracterizada pela liberação de mediadores contráteis, como histamina, prostaglandinas e leucotrienos, por células inflamatórias, portanto, para avaliarmos o sucesso da indução da asma, foi realizada a reação de Schult-Dale, que se trata de uma técnica padrão para comprovar um modelo de resposta anafilática local. Essa técnica se baseia na liberação desses mediadores contráteis nos animais sensibilizados antigenicamente após reexposição à OVA, que vai resultar na constrição da musculatura lisa traqueal, que será evidenciada pelo aumento da tensão do órgão. (Schultz, 1910; Dale, 1913).

Dessa forma, após o órgão dos animais que foram sensibilizados e desafiados com OVA ser novamente exposto novamente à OVA na concentração de 100 µg/mL, *in vitro*, foi observado aumento de sua tensão, evidenciando que o modelo de asma foi realmente instaurado. Os animais que foram tratados com AP em todas as doses, apresentaram uma diminuição da amplitude de contração, quando comparado ao GA, mostrando que a microalga está modulando negativamente essa via de contração induzida pelos mediadores contráteis liberados pelas células inflamatórias após exposição ao alérgeno.

Na asma alérgica, o diâmetro das vias aéreas se torna extremamente comprometido devido as diversas alterações que ocorrem em detrimento da inflamação proveniente dos eventos celulares, causando mudanças estruturais, como hipertrofia das células caliciformes epiteliais, aumento da deposição de colágeno e hiperplasia das paredes dessas vias (Barnes, 2017). Outro fator de grande relevância no diâmetro das vias aéreas são as células musculares lisas, que além de apresentarem aumento de sua espessura, possuem capacidade de

contrair e relaxar alteradas, decorrente à uma resposta anormalmente amplificada da inervação parassimpática e dos mastócitos das vias aéreas a estímulos exógenos, como alérgenos (Meurs; Maarsingh; Zaagsma, 2003).

Pode-se dizer que pacientes asmáticos apresentam duas características distintas relacionados às modificações na contratilidade muscular lisa das vias aéreas: a hipersensibilidade, que torna o músculo liso mais reativo a baixos estímulos de contração, e a hiper-reatividade, que gera uma resposta broncoconstritora exagerada (Dulin, 2003).

O controle do tônus das células musculares lisas das vias aéreas é feito pelo nervo vago, que libera acetilcolina (ACh), o qual irá se ligar em seus receptores muscarínicos M_3, acoplados a proteínas $G_{q/11}$, causando contração da musculatura lisa e secreção de muco (Cazzola; Calzetta; Matera, 2021; Matera *et al*., 2020). Por isso, receptores acoplados a proteína G (GPCRs) são importantes alvos dos fármacos utilizados para o tratamento da asma, visto que a ativação desses receptores está diretamente relacionada com a resistência das vias aéreas e hiper-responsividade (Penn, 2008; Penn *et al*., 2014).

Nesse contexto, avaliaram-se inicialmente os efeitos da suplementação com AP sobre as curvas cumulativas concentrações-resposta induzidas pelo agente contrátil carbacol (CCh), um análogo da acetilcolina (ACh), em traqueia de ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina.

O aumento da eficácia contrátil observada no GA em relação ao GC, reflete o quadro de hiperresponsividade gerado pela asma, a partir das diversas alterações inflamatórias, estruturais e no balanço oxidativo nas vias aéreas, assim como pela hipertrofia do músculo liso, decorrente da ação dos mediadores inflamatórios (Hirota, 2013).

Estudos semelhantes, com ratos suplementados com AP que foram submetidos a exercício de força, também observaram uma prevenção do aumento da eficácia contrátil do CCh em traqueia (Brito *et al*., 2018). Esses resultados se relacionam com os de Xiong *et al*. (2018), que observaram efeito anti-inflamatório nas vias aéreas de ratos com asma induzida por ovalbumina, a partir da redução de infiltrado de células inflamatórias no parênquima pulmonar

e no lavado broncoalveolar, apresentando diminuição de citocinas Th1 e Th2, inibição da expressão de quimiocinas e diminuição da concentração de IgE.

A hiper-reatividade da traqueia em doenças respiratórias alérgicas está associada com o aumento de marcadores inflamatórios, como a IL-4, IL-5 e fator de necrose tumoral (TNF-α) (Joskova et al., 2013; Franova et al., 2016). Essas citocinas estão envolvidas no recrutamento de eosinófilos, que promovem estímulos hipertróficos do músculo liso e liberação de agentes contráteis pelos mastócitos, assim como o TNF-α e o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-β1), que são responsáveis por aumentar a expressão da NADPH oxidase 4 (NOX4), uma enzima que produz EROs. O aumento da contração, proliferação e aumento de massa do músculo liso está diretamente relacionada à presença dessas substâncias nas vias aéreas (Kuruvilla; Lee; Lee, 2019; Lambrecht; Hammad; Fahy, 2019; Liu *et al*., 2016).

Apesar de todas essas alterações causadas pela asma, a suplementação com AP em todas as doses, preveniu o aumento da reatividade contrátil dos animais asmáticos frente ao CCh. Dessa forma, a AP está possivelmente modulando de forma negativa essa via farmacomecânica de contração induzida pelo CCh.

Os mecanismos de relaxamento das vias aéreas também são afetados em decorrência dessas mudanças estruturais induzidas pela asma, como as vias farmacomecânicas dos receptores adrenérgicos- β_2, acopladas a proteína Gs e a via do NO, formado pelo epitélio, que se liga ao seu receptor $_s$GC no citosol do músculo liso (Krishnan; Fredberg, 2011). Nesse contexto, avaliamos os efeitos da suplementação com AP sobre as curvas cumulativas concentrações-resposta induzidas pelos agentes relaxantes aminofilina ou nitroprussiato de sódio (NPS) em traqueia de ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina.

As fosfodiesterases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos cíclicos, como a exemplo, o cAMP e o cGMP, gerando uma diminuição de seus níveis citosólicos, reduzindo sua função. Nesse contexto, a aminofilia é um fármaco responsável por inibir as fosfodiesterases de maneira não seletiva, resultando no relaxamento muscular (Fan Chung, 2006).

Nossos resultados mostraram que a eficácia e a potência relaxantes frente à aminofilina foram reduzidas no GA quando comparado ao GC, ao passo

que a suplementação com AP na dose de 100 mg/kg e 300 mg/kg preveniu essa diminuição.

Esses resultados corroboram aos estudos de Brito *et al*. (2022), que observou um aumento da potência relaxante em traqueia de ratos, induzida pela aminofilina em ratos que foram tratados com AP na dose de 500 mg/kg, porém, discordam dos dados de Ferreira *et al*. (2022), que observou nenhuma diferença no relaxamento induzido pela aminofilina entre os grupos controle asmático em modelo de asma exacerbada pela obesidade. Possivelmente, a maior dificuldade do músculo liso das vias aéreas relaxar frente à aminofilina, pode estar relacionada a um aumento dos níveis de PDE induzida pelo modelo de asma instaurada.

A prevenção da diminuição da reatividade relaxante induzida pela aminofilina nos ratos asmáticos causada pela suplementação com AP, mostra que a microalga está possivelmente modulando de maneira positiva essa via farmacomecânica de relaxamento. Porém, assim como nos resultados da reatividade contrátil, para se descobrir em quais etapas das vias de relaxamento e contração, a suplementação com AP esteja influenciando, é necessário a execução de novos protocolos experimentais utilizando bloqueadores de alvos específicos.

Para avaliarmos a influência da suplementação com AP em ratos asmáticos sobre o relaxamento induzido pelo óxido nítrico (NO), utilizamos o NPS, que é um sal de sódio solúvel em água, composto de Fe^{2+} complexado a um NO e cinco ânions cianeto. No tecido, irá agir como um pró-fármaco, liberando o NO, que por sua vez se ligará a sCG, gerando relaxamento no músculo liso (Ivankovich, 1978).

Já nos resultados referentes ao relaxamento induzido pelo NPS, nenhuma diferença foi observada no GC, GA, GAAP30, GAAP100 e GAAP300. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, em condições basais, as células epiteliais próximas ao músculo liso são responsáveis pela produção de NO (Barnes; Belvisi, 1993). Portanto, apesar da asma causar alterações nessas células, influenciando a produção de NO, o que levaria a uma maior dificuldade no relaxamento muscular, como o NPS é um doador exógeno de NO que atua diretamente na musculatura lisa, possivelmente, essas mudanças nas células

epiteliais terão uma menor influência no relaxamento induzido por esse agente relaxante.

Além da inflamação, o aumento do estresse oxidativo também é característico na asma alérgica, em decorrência a um desequilíbrio entre as EROs e a capacidade do sistema tecido de interceptar as moléculas reativas e de reparar os danos causados pelos radicais oxidantes. A capacidade antioxidante do tecido é dada pelo sistema de enzimas antioxidantes, dentre elas a SOD, que converte o O_2^- (íon superóxido) em H_2O_2 (peróxido de hidrogênio); a catalase, a qual converte o H_2O_2 em água e oxigênio molecular; e as glutationas peroxidase e redutase, que inativam o H_2O_2 e outros hidroperóxidos, sendo a SOD mais expressa nos pulmões (Rahal et al., 2014; loxham; Davies; Blume, 2014).

Para avaliação do estresse oxidativo, foi feito uma quantificação relativa da capacidade antioxidante total (CAT) do pulmão dos animais, a partir da reação de tecido com o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), que é uma espécie reativa de coloração arroxeada. Essa cor se torna mais clara, à medida que as defesas antioxidantes da amostra reduzem o DPPH, tornando possível a análise da CAT por espectrofotometria (Kedare; Singh; 2011).

Foi observado que o tratamento com a AP conseguiu prevenir a diminuição da capacidade antioxidante do pulmão, ocasionada pelas alterações nas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas induzidas pela asma. Esses resultados são similares aos estudos de Brito *et al.* (2022), que observou que a suplementação de ratos Wistar com AP nas doses de 150 e 500 mg/kg aumentou a capacidade antioxidante no plasma, traqueia e pulmão desses animais. Brito (2020) também observou o mesmo efeito nas doses de 150 e 500 mg/kg sobre a capacidade antioxidante em ratos Wistar que foram submetidos a treinamento de força, que é conhecido por aumentar o estresse oxidativo devido à alta intensidade dos exercícios.

Outro modelo de doença crônica caracterizada pelo desbalanço oxidativo que a AP demonstrou grande efeito benéfico, foi a obesidade. Animais que foram submetidos a uma dieta hipercalórica tiveram a sua CAT reduzida, ao passo que os grupos suplementados com AP na dose de 25 mg/kg tiveram a CAT aumentada (Diniz, 2023). Nesse mesmo estudo, foi observado que os animais obesos tiveram uma redução da enzima antioxidante superóxido desmutase

(SOD) e do sistema não enzimático glutationa redutase (GHS), enquanto que o tratamento com AP aumentou os níveis dessas enzimas. Outros estudos demonstraram também o efeito positivo da AP sobre o aumento dos níveis da enzima antioxidante catalase (Bashandy, 2016).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o tratamento com AP reduz o estresse oxidativo, previne a peroxidação lipídica e os danos ao DNA, por eliminar radicais livres e estimular a atividade do sistema antioxidante das células. Esse efeito preventivo associado a AP está intimamente relacionado a sua composição nutricional, por conter pigmentos naturais, como ficocianina, carotenoides e xantofilas, moléculas essas que são conhecidas por suas atividades antioxidantes e modulação inflamatória (Abdel-Daim et al., 2013).

7 CONCLUSÕES

A suplementação com AP de ratos submetidos a modelo de asma induzida por ovalbumina demonstrou-se benéfica para a prevenção dessa doença, visto que preveniu o aumento da reatividade contrátil e a diminuição da reatividade relaxante na traqueia desses animais, sugerindo uma modulação da AP no acoplamento farmacomecânico de contração e relaxamento de ratos asmáticos.

Além disso, a AP preveniu a diminuição da capacidade antioxidante total induzida pelo modelo de asma estudado, possivelmente devido a suas estruturas com alto valor biológico, conferindo efeito protetor contra o desbalanço oxidativo, demonstrando assim, o potencial terapêutico da AP no tratamento da asma.

REFERÊNCIAS

ABDEL-DAIM, M. M., ABUZEAD, S. M., & HALAWA, S. M. Protective role of Spirulinaplatensis against acute deltamethrin-induced toxicity in rats. **Plos one**, v. 8, n. 9, p. 72991, 2013.

ABDEL-DAIM, M. M., *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Spirulina platensis in comparison to Dunaliella salina in acetic acidinduced rat experimental colitis. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 37, n. 2, pp. 126-139, 2015.

ARAUJO, L. C. C. *et al*. Spirulina Platensis Supplementation Coupled to Strength Exercise Improves Redox Balance and Reduces Intestinal Contractile Reactivity in Rat Ileum. **Marine Drugs**, v. 18, n. 2, p. 89. 2020.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200- 216, 2021.

BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical Science**, v. 131, n. 13, p. 1541-1558, 2017.

BASHANDY, S. A. E. *et al*. Antioxidant potential of Spirulina platensis mitigates oxidative stress and reprotoxicity induced by sodium arsenite in male rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

BIN-JUMAH, M. N., et al. Potential protective effects of Spirulina platensis on liver, kidney, and brain acrylamide toxicity in rats. **Environ Sci Pollut Res Int**. 2021.

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

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Banco de dados do Sistema Único de Saúde **DATASUS**. 2019. Disponível em:. Acessado em 15 de março de 2024,

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica: fascículo 1: introdução geral. Brasília-DF, 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz para prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília-DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para comprovação da segurança de alimentos e ingredientes**, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Suplementos alimentares:** documentos de base para discussão regulatória, 2017.

BRITO, A. F. *et al*. Aortic response to strength training and Spirulina platensis dependent on nitric oxide and antioxidants. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, pp. 1522-1535, 2018.

BRITO, A. F. *et al*. Supplementation with Spirulina platensis Modulates Aortic Vascular Reactivity through Nitric Oxide and Antioxidant Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–12. 2019.

BRITO, A. F., *et al*. Spirulina platensis prevents oxidative stress and inflammation promoted by strength training in rats: dose-response relation study. **Scientific Reports**, V. 10, N. 1, pp. 1-8, 2020.

BRITO, A. F., *et al*. Supplementation with Spirulina platensis Improves Tracheal Reactivity in Wistar Rats by Modulating Inflammation and Oxidative Stress. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 826649, 2022.

CANÇADO, J. E. D. *et al*. Respira project: Humanistic and economic burden of asthma in Brazil. **Journal of Asthma**, v. 56, n. 3, p. 244-251, 2019.

CARDOSO, T. A., *et al.* The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 43, p. 163-168, 2017.

CAZZOLA, M.; CALZETTA, L.; MATERA, M. G. Long-acting muscarinic antagonists and small airways in asthma: Which link? **Allergy**, v. 76, p. 1990–2001, 2021.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais** – Conceitos e procedimentos recomendados, Brasília – DF, 2012.

CHAND, N.; EYRE, P. The Schultz-Dale reaction: a review. **Agents and Actions**, v. 8, n. 3, p. 171-184, 1978.

COSTA, E. *et al*. Estimated cost of asthma in outpatient treatment: a real-world study. **Revista de Saúde Pública**, v. 52. 2018

DALE, H. H. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 4, p. 167-223, 1913.

DINIZ, A. F. A. *et al*. Arthrospira platensis prevents contractile reactivity damage in obese rats fed a hypercaloric diet by positive modulating the Rho-A/Rho-kinase pathway, inflammation and oxidative stress. **Journal of Functional Foods**, v. 115, p. 106116, 2024.

DINIZ, A. F. A. *et al*. 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**, v. 2020, p. 1–14. 2020.

DULIN, N. O. *et al*. What Evidence Implicates Airway Smooth Muscle in the Cause of BHR? **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 24, n. 1, p. 73– 84, 2003.

FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57-65, 2015.

FERREIRA, S. R. D. *et al*. Functional and morphologic dysfunctions in the airways of rats submitted to an experimental model of obesity-exacerbated asthma. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1. 2022.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011.

FRANOVA, S. *et al*. Bronchodilatory, antitussive and anti-inflammatory effect of morin in the setting of experimentally induced allergic asthma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1064–1072. 2016.

GALVÃO, J. G. F., CAVALCANTE-SILVA, L. H. A., CARVALHO, D. C. M., FERREIRA, L. K. D., MONTEIRO, T. M., ALVES, A. F., FERREIRA, L. A. M. P.; GADELHA, F. A. A. F.; PIUVEZAM, 17 M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117-1130, 2017.

GIERA M.; LINGEMAN H.; NIESSEN W. M. A. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. **Chromatographia**, v. 75, n. 9-10, p. 433-440, 2012.

GINA. GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global strategy for asthma management and prevention. 2023. Disponível em: <http://www.ginathma.org> Acesso em: 10 de fevereiro de 2024

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA. Global strategy for asthma management and prevention, 2021. Disponivel em: https://ginasthma.org/wpcontent/uploads/2021/05/GINA-Main-Report-2021-V2-WMS.pdf Acessado em 15 de março de 2024

GROOT, L. E.; VAN DER VEEN, T. A.; MARTINEZ, F. O.; HAMANN, J.; LUTTER, R.; MELGERT, B. N. Oxidative stress and macrophages: driving forces behind exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease?. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 316, n. 2, p. L369-L384, 2019.

HIROTA, N.; MARTIN, J. G. Mechanisms of Airway Remodeling. **Chest**, v. 144, n. 3, p. 1026–1032. 2013.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of Spirulina microalgae. **MiniReviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231– 1237, 2013.

IANNACCONE, P. M.; JACOB, H. J. Rats! **Disease Models and Mechanisms**, v. 2, n. 5-6, p. 206-210, 2009.

JAESCHKE, H., RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress and lipid peroxidation inacetaminophen hepatotoxicity. **Reactive oxygen species**, v. 5, n. 15, p. 145, 2018.

JOSKOVA, M. *et al*. Polyphenols and Their Components in Experimental Allergic Asthma. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 91–98. 2012.

JUNG, F., *et al*. Spirulina platensis, a super food? **Journal of Cellular Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 43-54, 2019.

KEDARE, S.B., SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **J Food Sci Technol,** v. 48, p. 412–422, 2011.

KISTEMAKER, L. E. M.; PRAKASH, Y. S. Airway innervation and plasticity in asthma. **Physiology**, v. 34, n. 4, p. 283-298, 2019.

KIVRAK, E. G. *et al*. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. **Journal of microscopyand ultrastructure**, v. 5, n. 4, p. 167-176, 2017.

KRISHNAN, R.; FREDBERG, J. J. In Bronchospasm, Fluctuations Come to Life. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 12, p. 1321–1322. 2011.

KURUVILLA, M. E.; LEE, F. E.; LEE, G. B. Understanding asthma phenotypes, endotypes, and mechanisms of disease. **Clinical reviews in Allergy & Immunology**, v. 56, n. 2, p. 219-233, 2019.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The cytokines of asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975-991, 2019.

LEE, Y.-S. *et al*. Understanding Mind-Body Interaction from the Perspective of East Asian Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–6, 2017.

LIMA, W. T.; SILVA, Z. L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 5, p. 689-695, 1998.

LIU, Q., HUANG, Y., ZHANG, R., CAI, T., & CAI, Y. Medical application of Spirulina platensis derived C-phycocyanin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2016(7803846), 1–14, 2016.

LIU, X. *et al*. The Expression of NOX4 in Smooth Muscles of Small Airway Correlates with the Disease Severity of COPD. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–17. 2016.

LLOYD, C.M.; SAGLANI, S. Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 34, p. 52-58, 2015.

LOXHAM, M.; DAVIES, D. E.; BLUME, C. Epithelial function and dysfunction in asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 44, n. 11, p. 1299-1313, 2014.

MASLAN, J.; MIMS, J. W. What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 47, n. 1, p. 13- 22, 2014.

MATERA, M. G., *et al*. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators revisited. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 218-252, 2020.

MEURS, H.; MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J. Arginase and asthma: novel insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. **Trends in Pharmacological Science**, v. 24, p. 450-455, 2003.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBSletters**, v. 586, n. 5, p. 585-595, 2013.

MISHRA, V.; BANGA, J.; SILVEYRA, P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: Therapeutic strategies and pharmacological targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 181, p. 169-182, 2018.

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, n. 375, pp. 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA).** 2017.

OUEDRAOGO, N.; ROUX, E. Physiology of airway smooth muscle contraction: an overview. **Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine**, v. 4, n. 2, 2014.

PAPI *et al*., Physiology of airway smooth muscle contraction: an overview. **Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine**, v. 4, n. 2, 2014. The Lancet, v. 391, n. 10122, p. 783–800, 2018

PENN, R. B.; BENOVIC, J. L. Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, p. 47–57, 2008.

PENN, R. B.; BOND, R. A.; WALKER, J. K. GPCRs and arrestins in airways: Implications for asthma. In: **Arrestins Pharmacology and Therapeutic Potential**. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 387-403, 2014.

PETERS, M. C. *et al*. Refractory airway type 2 inflammation in a large subgroup of asthmatic patients treated with inhaled corticosteroids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 1, p. 104-113.e14. 2019.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Pshysiological Reviews**, v. 88, n.4, p. 1234-1276, 2008.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Pshysiological Reviews**, v. 88, n.4, p. 1234-1276, 2008.

QUEIROZ, L. Em 2021, SUS registrou 1,3 milhão de atendimentos a pacientes com asma na Atenção Primária à Saúde. **Ministério da Saúde**. 03 de maio de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/maio/em-2021-sus-registrou-1-3-milhao-de-atendimentos-a-pacientes-com-asma-na-atencao-primaria-a-saude-1#:~:text=A%20asma%20%C3%A9%20um%20dos> Acesso em: 15 de março de 2024

RAHA, S., & ROBINSON, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in biochemical sciences**, v.25, p.502-508, 2000.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SAHINER, U. M. *et al*. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 29, n. 8, p. 789-800, 2018

SALAZAR, M. *et al*. Subchronic toxicity study in mice fed Spirulina maxima. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 3, p. 235-241, 1998.

SALMON, M. *et al*. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 5, p. 1151-1158, 1999

SALOKHE, K. Applications of Arthrospira Platensis. **International Journal of Innovative Science and Research Technology**, v. 7, n. 3. 2022.

SANDERSON, M. J. *et al*. Regulation of Airway Smooth Muscle Cell Contractility by Ca2+ Signaling and Sensitivity. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, n. 1, p. 23–31. 2008.

SCHULTZ, W. H. Physiological studies in anaphylaxis. I. The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 1, p. 549-567, 1910.

SHERWIN, C. M. *et al*. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, n. 3, p. 291-305, 2003.

SILVA, F. H.; MÓNICA, F. Z.; BÁU, F. R.; BRUGNEROTTO, A. F.; PRIVIERO, F.; TOQUE, H. A.; ANTUNES, E. Superoxide anion production by NADPH oxidase plays a major role in erectile dysfunction in middle aged rats: Prevention by antioxidant therapy. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 10, n. 4, p. 960-971, 2013.

SOMLYO, A. P. Kinases, myosin phosphatase and Rho proteins: curiouser and curiouser. **The Journal of Physiology**, v. 516, n. 3, p. 630-630, 1999.

SULAIMAN, I.; LIM, J. C.; SOO, H. L.; STANSLAS, J. Molecularly targeted therapies for asthma: current development, challenges and potential clinical translation. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 52– 68, 2016.

TOWNSEND, E. A.; EMALA, S. R.; Charles, W. Quercetin acutely relaxes airway smooth muscle and potentiates β-agonist-induced relaxation via dual phosphodiesterase inhibition of PLCβ and PDE4. **American Journal of PhysiologyLung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 5, p. L396-L403, 2013.

TSCHIRHART, E. *et al*. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 11, p. 310-316

UNIFESP. Universidade Federal de São Paulo. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa.** 1ª edição, 2019.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Asthma. 2021. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma. Acessado em 15 de abril de 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Obesity and overweight (2017), disponível em: < https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> acessado em 15 de março de 2024.

XIONG, J. *et al.* Combination of fish oil and ethanol extracts from Spirulina platensis inhibits the airway inflammation induced by ovalbumin in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 707–714. 2018.

YAMAUCHI, K.; OGASAWARA, M. The role of histamine in the pathophysiology of asthma and the clinical efficacy of antihistamines in asthma therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1733, 2019.

ZHANG, F. *et al*. Application of Spirulina in aquaculture: a review on wastewater treatment and fish growth. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 582–599. 2019.

ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ANEXOS

Anexo 1 – Certidão de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA/UFPB)

Universidade Federal da Paraíba

CEUA

Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO : EMENDA v31/01/2024

Certificamos que a EMENDA (versão de 31/01/2024) da proposta intitulada "Avaliação do mecanismo de ação antiasmático da alga Spirulina platensis em ratos Wistar sensibilizados com ovalbumina", CEUA nº 3255100522 (ID 033028), sob a responsabilidade de **Luiz Henrique César Vasconcelos** *e equipe; Gabriel Nunes Machado de Oliveira; Mateus Mendes Vieira* - 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 vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) em 15/02/2024.

Pedido apresentado à CEUA: Solicito aumento no número de animais devido à inclusão de novos protocolos experimentais que irão compor o trabalho de conclusão de curso de um dos alunos que compõe a equipe de pesquisa.

Considerações da CEUA: O pesquisador solicita, através de emenda, aumento do número de animais, considerando que novos protocolos experimentais que irão compor o projeto de pesquisa. O projeto intitula-se Avaliação do mecanismo de ação antiasmático da alga Spirulina platensis em ratos Wistar sensibilizados com ovalbumina. O projeto foi aprovado pela CEUA/UFPB em 20/05/2022. Em 17/08/2023, uma emenda foi apresentada com a inclusão dos seguintes objetivos: - Investigar os efeitos da suplementação com S. platensis sobre a morfologia e morfometria do pulmão de ratos asmáticos; - Avaliar os efeitos da suplementação com S. platensis sobre os níveis de citocinas IL-4 e IL13 no homogenato pulmonar de ratos asmáticos; - Investigar os efeitos da suplementação com S. platensis sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase; - Mensurar, in vitro, a participação da NADPH oxidase, SOD, CAT, ciclo-oxigenase (COX), 5- lipoxigenase (5-LOX) e sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) no mecanismo de ação da S. platensis em ratos asmáticos. O pesquisador informou que serão usados ratos Wistar (Rattus norvegicus) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba Os animais serão divididos randomicamente em três grupos experimentais, com 5 animais cada, totalizando 15 animais para cada análise. Os grupos são: 1) grupo controle (GC): não sensibilizados; 2) grupo asmático (GASM): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA); 3) Grupo asmático + SP (GASM +SP): sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e suplementados com SP na melhor dose dos estudos prévios; Serão realizadas as seguintes análises: - Morfometria com HE e Tricrômico de Masson - Medida de citocinas IL-4 e IL-13 - Medida da atividade de SOD (superóxido dismutase), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx); - Avaliação da reatividade contrátil ao cloridrato de carbamilcolina (CCh) na ausência e na presença de tempol - Avaliação da reatividade contrátil ao CCh na ausência e na presença de apocinina - Avaliação da reatividade contrátil ao CCh na ausência e na presença de catalase - Avaliação da reatividade contrátil ao CCh na ausência e na presença de 1400W; - Avaliação da reatividade contrátil ao CCh na ausência e na presença de indometacina; - Avaliação da reatividade contrátil ao CCh na ausência e na presença de zileutona; O tamanho da amostra foi definido por cálculo amostral, com acréscimo de 20% para possíveis perdas, totalizando 162 animais. A emenda foi aprovada em 23/08/2023. Em nova emenda apresentada em 31/01/2024, o pesquisador informa que serão necessários mais 36 animais para atender as seguintes novas análises: - Registro direto da Pressão Arterial (mmHg) e da Frequência Cardíaca (bpm) - Avaliação do quimiorreflexo, barorreflexo e ativação ganglionar A emenda contribui para avanço no conhecimento científico e está de acordo com as normas estabelecidas pelo Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diante do exposto, somos de parecer favorável a aprovação da emenda. Este é o meu parecer, salvo melhor juízo.

Término previsto: 08/2023

Origem:	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 90 a 120 dias	Quantidade solicitada: 36
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar		Peso: 250 a 300 g	
Origem:	Biotérios do Departamento de Fisiologia e Farmacologia			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 90 a 120 dias	Quantidade mantida: 0
Linhagem:	Wistar		Peso: 250 a 300 g	

ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Ratos heterogênicos	Machos	14	0
Ratos heterogênicos	Machos	237	0

Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III Prédio da Reitoria - Gabinete da Vice-reitoria - CEP 58051-085 - João Pessoa/PB - tel: 55 (83) 3216-7155
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 14 às 17h : e-mail: sistemaceua@avisos.ufpb.br
CEUA N 3255100522_33028

Universidade Federal da Paraíba

CEUA

Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no Uso de Animais

João Pessoa, 16 de fevereiro de 2024

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba