

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

Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades

Mecanismo de ação preventivo da *Spirulina platensis* na hipercontratilidade induzida por ocitocina em útero de ratas Wistar com dismenorreia primária

João Pessoa-PB

2024

Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades

Mecanismo de ação preventivo da *Spirulina platensis* na hipercontratibilidade induzida por ocitocina em útero de ratas Wistar com dismenorrea primária

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos

Coorientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa

João Pessoa-PB

2024

Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

M518m Melchiades, Matheus Kelvin do Nascimento.
Mecanismo de ação preventivo da *Spirulina platensis*
na hipercontratibilidade induzida por ocitocina em útero
de ratas Wistar com dismenorreia primária / Matheus
Kelvin do Nascimento Melchiades. - João Pessoa, 2024.
110 f. : il.

Orientação: Luiz Henrique César Vasconcelos.
Coorientação: Bagnólia Araújo Costa.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Dismenorreia primária - *Arthrospira platensis*. 2.
Cólicas uterinas. 3. Estresse oxidativo. 4. *Spirulina*
platensis - Reatividade contrátil. 5. Processo
inflamatório - Dor pélvica crônica. I. Vasconcelos,
Luiz Henrique César. II. Costa, Bagnólia Araújo. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 618.175(043)

Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades

Mecanismo de ação preventivo da *Spirulina platensis* na hipercontratilidade induzida por ocitocina em útero de ratas Wistar com dismenorrea primária

Aprovada em 26/09/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **BAGNOLIA ARAUJO COSTA**
Data: 20/02/2025 14:02:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa
(Universidade Federal da Paraíba)

Supervisora

Documento assinado digitalmente
 **MARIA DA CONCEICAO CORREIA SILVA**
Data: 19/01/2025 10:43:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Maria da Conceição Correia Silva
(Universidade Federal de Pernambuco)

Examinadora Externa

Documento assinado digitalmente
 **CICERO FRANCISCO BEZERRA FELIPE**
Data: 28/01/2025 07:36:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno

Dedicatórias

Aos meus pais,

Aurileide Gonçalves do Nascimento e Ivanildo Melchiades Bento, por todo cuidado, zelo e amor comigo. Em todos os momentos foram a minha fortaleza, fazendo inúmeros esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e chegasse até aqui, sem o incentivo de vocês eu jamais teria conseguido, muito obrigado. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos,

Amália Beatriz do Nascimento Melchiades e João Lucas do Nascimento Melchiades, por sempre se fazerem presentes em minha vida, me apoiando e vibrando por todas conquistas. À vocês minha eterna gratidão, respeito e amor.

Ao meu companheiro,

Joelson Barbosa da Silva, por ter me apoiado durante todo esse tempo, me escutando com paciência e me dando forças para eu seguir em frente. Amo você.

À toda minha família, por toda ajuda e torcida para que eu chegasse até aqui.

Foi por vocês.

Agradecimientos

Primeiramente, quero agradecer à Deus, sem seu amparo, proteção e misericórdia eu não teria chegado até aqui, agradeço por todas as vezes que eu me encontrava sem forças e era nos braços dEle que eu conseguia me recuperar. Gratidão à espiritualidade que me guia, que me orienta e me ajuda a discernir qual caminho seguir, sem meus guias espirituais eu não chegaria até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Cesar Vasconcelos, por todo ensinamento construído durante esse tempo, por seu compromisso e dedicação, que foram essenciais na construção deste trabalho, obrigado pela sua disponibilidade em tirar minhas dúvidas. Você é um exemplo de profissional, sua confiança e incentivo constante foram fundamentais para a minha evolução como profissional.

À minha coorientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo Costa, por ter me aceitado no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas (LFF), por todas as advertências e ensinamentos, que muitos deles eram além da sala de aula, me fazendo enxergar minhas prioridades de vida. Seu cuidado com os detalhes, o compromisso com a excelência científica e a prontidão para ensinar em todos os momentos foram essenciais. Muito obrigado pelo constante apoio e por acreditar em mim desde o início.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por sua responsabilidade dentro do laboratório e sua disponibilidade para ajudar em qualquer momento que fosse preciso, muito obrigado pelos conselhos que serviram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros titulares da Banca Examinadora professores doutores Maria da Conceição Correia Silva da Universidade Federal de Pernambuco e Cícero Francisco Bezerra Felipe (UFPB), agradeço pela disponibilidade em participar da banca, assim como aos suplentes os professores doutores Rafael de Almeida Travassos e Adriano Francisco Alves, ambos da UFPB, obrigado por aceitarem fazer parte desse importante momento da minha formação.

Aos mestrandos Maxsyara Felismino da Silva Soares e João Marcos Araújo da Silva, por todas as vezes que me apoiaram e me incetivaram a continuar, por todas as conversas científicas e não científicas, pela amizade construída durante o mestrado. Vocês conseguiam deixar tudo mais leve e engraçado, tenho uma grande admiração por vocês e foi um prazer dividir a bancada durante esse tempo.

Aos doutorandos Ray Ravilly Alves Arruda e Bárbara Cavalcanti Barros, por todas as correções nos *slides*, animações e escrita, pela dedicação que vocês

possuem em fazer ciência, através da calma e precisão que vocês costumavam lidar com tudo da pós-graduação, eu conseguia sentir confiança e a certeza de que tudo iria dar certo, obrigado por todo incentivo.

Aos alunos de iniciação científica Thais Rosa de Sousa, José Edvaldo Cavalcanti de Sousa Filho e Michel Benício de Melo, por toda a ajuda prestada antes e durante os experimentos, sem o apoio de vocês eu não teria conseguido, obrigado por todas as conversas e momentos de descontrações, dividir a bancada com vocês deixava tudo mais leve e tranquilo.

A todos que fizeram ou fazem parte do LFF, entre eles: Alexya Cavalcanti, Alissa Maria de Oliveira Martins, Anderson Fellyp Avelino Diniz, Brena Freire de Oliveira Claudino, Bruno Fernandes, Daiany Maria Claudino, Gabriel Nunes, Indyra Alencar Duarte Figueiredo, Isabela Motta, Jayne Muniz, Karen Cordeiro, Lucas Nóbrega, Ludmila Gomes, Luísa Baracho, Mateus Vieira, Samyra Oliveira, pela boa convivência, ajuda e companheirismo durante esse tempo.

A todos que integram a família da Escola Politécnica de Saúde Cristo Rei, especialmente nas pessoas de Iluska e Marx Alves, que além de chefes, se tornaram amigos, muito obrigado pela flexibilidade nos horários e por todas as vezes que vocês me apoiaram, torcendo por mim.

À Microlins, na pessoa de Mayra Rodrigues, que há mais de cinco anos acreditou em mim e no meu potencial como profissional, muito obrigado pela valorização e reconhecimento prestado durante esses anos.

A todos que fazem parte da Instituição Espírita Seara do Bem, minha segunda casa, onde desde o momento que eu decidi me inscrever para a prova de seleção do mestrado, me apoiaram e, mesmo que durante alguns momentos eu precisasse me ausentar das atividades, ao retornar sempre era bem acolhido. Muito obrigado por toda torcida, e por não desistirem de mim.

Ao meu companheiro de jornada, Joelson Barbosa da Silva, pessoa que escolhi para passar os meus melhores e piores momentos, não foi fácil trilhar esse caminho até aqui, mas você sempre esteve presente, com sua gentileza, fazendo eu enxergar o que há de melhor em mim, mostrando que sou capaz de alcançar tudo aquilo que um dia eu sonhei, muito obrigado por estar ao meu lado e nunca ter soltado a minha mão, sou muito grato e feliz por te ter comigo.

À minha mãe, Aurileide Gonçalves do Nascimento, por sempre ter feito o possível e impossível para que tudo desse certo, não tenho palavras para descrever

o quanto sou grato por tanto cuidado, muito obrigado por todas as vezes que encontrei forças para continuar no seu exemplo, sempre lhe tive como modelo e, assim, eu pude concretizar mais esse sonho, muito obrigado.

Ao meu pai, Ivanildo Melchiades Bento, por ter acreditado que eu era capaz de alcançar os meus sonhos, antes de eu perceber isso, muito obrigado por toda força e apoio que eu tive durante esses anos, a realização desse sonho não teria sido possível sem a sua ajuda e incentivo.

Aos meus irmãos Amália Beatriz do Nascimento Melchiades e João Lucas do Nascimento Melchiades, por em meio a inúmeros compromissos vocês se prontificavam para me ajudar em algum seminário, por deixarem cada viagem entre Itabaiana e João Pessoa mais leve, seja com brincadeiras ou conversas paralelas, muito obrigado por todo apoio.

À minha avó Áurea Gonçalves do Nascimento, por desde quando eu era criança ser uma das minha maiores incetivadoras para fazer um curso superior, quando juntamente do meu avô, criou uma poupança “para a minha faculdade”, muito obrigado por acreditarem no meu potencial.

Às minhas tias e tios, em especial à Aurilene Gonçalves do Nascimento, Aurilete Vitória Gonçalves do Nascimento, Ana Cláudia Bento Melchiades e Rosélia Bento Melchiades, por sempre torcerem por mim e de todas as formas buscarem se fazer presente durante esse período.

À toda minha família e amigos que de alguma forma contribuíram e torceram para que eu chegasse até aqui, muito obrigado.

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

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pela minha formação no mestrado.

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

À Coordenadora do PPgPNSB, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, e ao vice coordenador, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, pelo trabalho em busca de crescimento e melhorias para o programa.

À Caroline Mangueira e Nilmar Níncia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, por toda dedicação e paciência em nos atender.

À Dra. Roberta Parentoni pelo trabalho em conduzir a Unidade de Produção Animal (UPA).

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

À Mônica R. da Silva, pelo seu trabalho na limpeza e apoio necessário.

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

Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades

Resumo

RESUMO

A dismenorreia primária (DisP) é responsável pela dor pélvica crônica que afeta mulheres, podendo estar relacionada a fatores genéticos, sociais e comportamentais. O tratamento medicamentoso dessa condição inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais e antiespasmódicos; porém, um número significativo de mulheres não obtêm resposta satisfatória com essas terapias. Em estudos anteriores foi observado que a DisP aumentou a eficácia contrátil da ocitocina e a suplementação com *Spirulina platensis* (SP) na dose 100 mg/kg preveniu esse aumento em útero de ratas Wistar. Dessa forma, decidiu-se investigar o mecanismo de ação pelo qual a SP preveniu as alterações de reatividade contrátil farmacomecânica induzidas pela DisP em útero de rata. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância quando $p < 0,05$. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB - CEUA/UFPB (certidão 4080310124). Ratas Wistar virgens foram separadas nos grupos: 1) controle (GC); 2) Ratas com DisP (DisP), 3) Ratas com DisP e suplementadas com SP 100 mg/kg (DisP + SP) e 4) Ratas com DisP que receberam a droga padrão escopolamina + dipirona (DisP + DP). Os animais receberam, 24 horas antes da eutanásia, o dietilestilbestrol (1 mg/kg, s.c.) para indução do estro. Após a eutanásia, o útero foi isolado, limpo e suspenso em cubas de banho para órgãos em condições experimentais apropriadas. As contrações isométricas induzidas pela ocitocina eram monitoradas por meio de transdutores de força isométricos. Inicialmente, foram realizadas curvas concentrações resposta cumulativa à ocitocina para os demais grupos, os resultados mostraram que os animais do grupo DisP apresentaram uma maior reatividade contrátil, enquanto que os animais que receberam a suplementação com SP apresentaram uma prevenção desta hipercontratibilidade uterina. Assim, foram avaliados a participação das vias da ciclo-oxigenase (COX), do estresse oxidativo e do óxido nítrico (NO). Com base nos resultados obtidos, observou-se que a DisP aumentou a eficácia contrátil uterina devido ao aumento da atividade dos prostanoídes contráteis, diminuição da atividade da superóxido dismutase e aumento da atuação da enzima NADPH oxidase, além de favorecer a reação do NO com o ânion superóxido formando peroxinitrito. Ademais, esses efeitos são prevenidos pela suplementação com SP, por meio da inibição da via das COX, diminuição na expressão das espécies reativas de oxigênio (ROS), modulação negativa da NADPH oxidase e modulação negativa da síntese de óxido nítrico. Esses dados evidenciam que no útero de ratas há alterações na contratilidade uterina provenientes da DisP prevenidas pela suplementação com SP, cujo mecanismo se dá pela diminuição dos prostanoídes contráteis, diminuição do estresse oxidativo e diminuição da síntese do peroxinitrito. Sendo assim, caso esses resultados sejam reproduzidos em mulheres, a *S. platensis* poderia ser utilizada como suplemento alimentar na prevenção de danos oxidativos e das desregulações contráteis uterinas em mulheres com DisP.

Palavras-chave: 1. *Arthrospira platensis*; 2. Cólicas uterinas; 3. Reatividade contrátil; 4. Processo inflamatório; 5. Estresse oxidativo; 6. Óxido nítrico.

Abstract

Preventive mechanism of action of *Spirulina platensis* on oxytocin-induced hypercontractility in the uterus of Wistar rats with primary dysmenorrhea

MELCHIADES, M. K. N.

PPgPNSB, Dissertação de Mestrado, CCS, UFPB (2024).

ABSTRACT

Primary dysmenorrhea (DysP) is responsible for chronic pelvic pain that affects women and may be related to genetic, social and behavioral factors. The pharmacological treatment of this condition includes the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and antispasmodics; however, a significant number of women do not obtain a satisfactory response to these therapies. In previous studies, it was observed that DisP increased the contractile efficacy of oxytocin and supplementation with *Spirulina platensis* (SP) at a dose of 100 mg/kg prevented this increase in the uterus of Wistar rats. Therefore, it was decided to investigate the mechanism of action by which SP prevented the alterations in pharmacomechanical contractile reactivity induced by DisP in the uterus of rats. Data were expressed as mean and standard error of the mean, with significance level set at $p < 0.05$. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Use of UFPB - CEUA/UFPB (certificate 4080310124). Virgin Wistar rats were separated into the following groups: 1) control (GC); 2) rats with DysP (DisP), 3) rats with DysP and supplemented with SP 100 mg/kg (DisP + SP); and 4) rats with DysP that received the standard drug scopolamine + dipyrone (DisP + DP). The animals received, 24 hours before euthanasia, diethylstilbestrol (1 mg/kg, s.c.) for estrus induction. After euthanasia, the uterus was isolated, cleaned and suspended in organ baths under appropriate experimental conditions. Isometric contractions induced by oxytocin were monitored by isometric force transducers. Initially, cumulative concentration response curves to oxytocin were performed for the other groups. The results showed that animals in the DisP group presented greater contractile reactivity, while animals that received SP supplementation presented prevention of this uterine hypercontractility. Thus, the participation of the cyclooxygenase (COX), oxidative stress and nitric oxide (NO) pathways were evaluated. Based on the results obtained, it was observed that DisP increased uterine contractile efficacy due to increased activity of contractile prostanoids, decreased activity of superoxide dismutase and increased activity of the enzyme NADPH oxidase, in addition to favoring the reaction of NO with the superoxide anion forming peroxynitrite. Furthermore, these effects are prevented by SP supplementation, through inhibition of the COX pathway, decreased expression of reactive oxygen species (ROS), negative modulation of NADPH oxidase and negative modulation of nitric oxide synthase. These data show that in the uterus of rats there are changes in uterine contractility caused by DysP that are prevented by supplementation with SP, the mechanism of which is the decrease in contractile prostanoids, decrease in oxidative stress and decrease in peroxynitrite synthesis. Therefore, if these results are reproduced in women, *S. platensis* could be used as a dietary supplement to prevent oxidative damage and uterine contractile dysregulation in women with DysP.

Keywords: 1. *Arthrospira platensis*; 2. Uterine cramps; 3. Contractile reactivity; 4. Inflammatory process; 5. Oxidative stress; 6. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia uterina humana	27
Figura 2 - Morfologia uterina de roedores.	28
Figura 3 - Acoplamento elemecânico de contração uterina.....	29
Figura 4 - Esquema do acoplamento farmacomecânico no útero desencadeado por ocitocina ou PGF _{2α} no receptor acoplado à proteína G _{q/11}	31
Figura 5 - Mecanismos de aumento da expressão das proteínas pró-contração através do estrogênio	35
Figura 6 - Esquema da via de formação das prostaglandinas pelas ciclo-oxigenases	356
Figura 7 - Regulação da produção de prostaglandinas pela progesterona.....	38
Figura 8 - Formação de radicais livres a partir da cadeia transformadora de elétrons.	39
Figura 9 - Mecanismo de relaxamento do músculo liso uterino mediado pela via do cGMP	43
Figura 10 - Formação do peroxinitrito a partir da NOS2.....	44
Figura 11 - Imagem microscópica da forma externa da <i>S. platensis</i>	46
Figura 12 - Constituintes da <i>Spirulina platensis</i>	47
Figura 13 - Grupos experimentais.....	55
Figura 14 -Protocolo da indução da dismenorreia primária em ratas.....	56
Figura 15 - Mapa conceitual da DisP induzida por diestilbestrol em ratas e o mecanismo farmacomecânico da prevenção da DisP através da suplementação com <i>Spirulina platensis</i> na dose de 100 mg/kg.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da suplementação alimentar com <i>Spirulina platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + SP	63
Gráfico 2 - Efeito da suplementação alimentar com SP sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + Esc + Dip	64
Gráfico 3 – Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença da indometacina em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + SP.	67
Gráfico 4 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença do tempol em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + SP	70
Gráfico 5 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença da apocinina em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + SP.	73
Gráfico 6 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com <i>S. platensis</i> sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença do L-NAME em útero isolado de ratas do GC, DisP e DisP + SP	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ações do sistema enzimático nas espécies reativas de oxigênio	41
Tabela 2 - Valores de E_{max} e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata do GC, DisP, DisP + SP e DisP + DP.....	65
Tabela 3 - Valores de E_{max} e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + indometacina, DisP, DisP + indometacina, DisP + SP e DisP + SP + indometacina.....	68
Tabela 4 - Valores de $E_{máx}$ e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + tempol, DisP, DisP + tempol, DisP + SP e DisP + SP + tempol.....	71
Tabela 5 - Valores de $E_{máx}$ e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + apocinina, DisP, DisP + apocinina, DisP + SP e DisP + SP + apocinina	74
Tabela 6 - Valores de $E_{máx}$ e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + L-NAME, DisP, DisP + L-NAME, DisP + SP e DisP + SP + L-NAME.....	77

Lista de abreviaturas e siglas

[Ca²⁺]_c	Concentração citosólica de íons cálcio
AA	Ácido araquidônico
AC	Ciclase de adenilil
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	Canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
COX	Ciclo-oxigenase
DAG	Diacilglicerol
DisP	Grupo com dismenorreia primária
DisP + SP	Grupo com dismenorreia primária e suplementado com <i>Spirulina platensis</i>
DisP + DP	Grupo com dismenorreia primária que recebeu a droga padrão
e.p.m.	Erro padrão da média
E_{max}	Efeito máximo
FP	Receptor da prostaglandina F _{2α}
G_{12/13}	Proteínas G ₁₂ ou G ₁₃
G_{q/11}	Proteína G _q ou G ₁₁
α_{q/11}	Subunidade α das proteínas G _q ou G ₁₁
GC	Grupo controle
GDP	Difosfato de guanosina
GMP	Monofosfato de guanosina
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Radical hidroxila
HO₂[•]	Radical peridroxila
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃R	Receptor de IP ₃

KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	Cloridrato de <i>N_ω</i> -nitro-L-arginina metil éster
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da MLC
MLCP	Fosfatase da MLC
MYPT1	Subunidade catalítica da MLCP
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCX	Trocador 3Na ⁺ /Ca ²⁺
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do NO
OCI	Ocitocina
ONO₂⁻	Peroxinitrito
O₂^{-•}	Ânion superóxido
OT	Receptor da ocitocina
pCE₅₀	Logaritmo negativo, na base 10, da concentração molar de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLCβ₁	Fosfolipase C β ₁
PMCA	ATPase de Ca ²⁺ da membrana plasmática
RhoA	Proteína G monomérica da família Rho do tipo A
ROCK	Proteína cinase associada à Rho
SERCA	ATPase de Ca ²⁺ do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	Ciclase de guanilil solúvel
SOD	Superóxido dismutase
SP	<i>Spirulina platensis</i>
TxA₂	Tromboxano A ₂

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

SUMÁRIO

1	Introdução	24
2	Fundamentação teórica.....	27
2.1	Anatomia do útero humano.....	27
2.2	Anatomia do útero de roedores.....	27
2.3	Fisiologia uterina.....	29
2.3.1	Fisiologia da contração uterina	29
2.3.2	Ciclo menstrual.....	31
2.4	Dismenorreia primária.....	32
2.4.1	Aspectos gerais.	32
2.4.2	Fisiopatologia da DisP.	34
2.4.2.1	Aumento na expressão de receptores para ocitocina e PGF _{2α}	34
2.4.2.2	Mecanismo inflamatório na DisP.....	35
2.4.2.3	Estresse oxidativo.....	39
2.4.2.4	Aumento da síntese de óxido nítrico e peroxinitrito	42
2.5	Tratamento da DisP.....	44
2.6	Produtos naturais.	45
2.6.1	<i>Spirulina platensis</i>	45
2.6.2	<i>Spirulina platensis</i> e músculo liso	45
3	Objetivos	52
3.1	Geral.....	52
3.2	Específicos	52
4	Material e métodos	54
4.1.	Material.....	54
4.1.1	Produto-teste	54
4.1.2	Animais.....	54
4.1.3	Grupos experimentais	54

4.1.4	Protocolo de indução da dismenorreia primária	55
4.1.5	Preparo e administração da <i>Spirulina platensis</i>	56
4.1.6	Substâncias e reagentes.....	57
4.1.7	Soluções nutritivas	57
4.1.8	Aparelhos	57
4.2	Métodos.....	58
4.2.1	Preparação do útero isolado de ratas.....	58
4.2.2	Efeito da suplementação com SP sobre a reatividade contrátil farmacomecânica induzida por ocitocina nas alterações em útero de ratas induzidas pela dismenorreia primária	58
4.2.3	Investigação da participação da via dos prostanoides.....	59
4.2.4	Investigação da participação da superóxido dismutase (SOD).....	59
4.2.5	Investigação da participação da enzima NADPH oxidase	59
4.2.6	Investigação da participação da via do óxido nítrico (NO).....	60
4.3	Análise estatística.....	60
5	Resultados	62
5.1	Efeito da suplementação alimentar com <i>Spirulina platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas.	62
5.2	Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação alimentar com <i>Spirulina platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença da indometacina em útero isolado de ratas.....	66
5.3	Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação alimentar com <i>Spirulina platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença do tempol em útero isolado de ratas.	69
5.4	Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação alimentar com <i>Spirulina platensis</i> sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença de apocinina em útero isolado de rata.	72
5.5	Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação alimentar com	

Spirulina platensis sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à
ocitocina na ausência e na presença de L-NAME em útero isolado de rata..75

6 Discussão.....	79
7 Conclusões	87
Referências.....	89
Anexos.....	108

1 Introdução

A dismenorreia primária (DisP), conhecida popularmente como cólica menstrual, atinge entre 50 à 70% das mulheres com menos de trinta anos, ela é caracterizada por dores que surgem durante o período menstrual e são localizadas na região inferior do abdômen ou na parte inferior das costas. Em muitos casos, essas dores vêm acompanhadas de outros sintomas, como dor de cabeça, inchaço abdominal e sensibilidade nos seios, podendo persistir ao longo de todo o período menstrual (Santos *et al.*, 2023). Entretanto, complicações menstruais como menorragia e dismenorreia não recebem a devida atenção mundial e são vistas como uma crise silenciosa nos países em desenvolvimento (Wijeratne; Fiander, 2018).

Nesse sentido, este distúrbio pode ser classificado como primário, quando não é originado por alguma doença; ou secundário, quando está associado à doenças existentes, como endometriose, adenomiose ou miomas, que podem originar as cólicas na região do ventre (Nagy; Khan, 2022). Aproximadamente metade das mulheres em idade reprodutiva enfrentam a dismenorreia primária, e cerca de 10% resultam em impactos negativos em suas atividades diárias, incluindo dificuldades que podem levar à ausências na escola ou no trabalho e custos indiretos relacionados à perda de produtividade (Silva *et al.*, 2022).

De acordo com o estudo de Rodrigues *et al.* (2023), as dores causadas pela DisP podem afetar todo o corpo, sendo relatadas dores abdominais em 90,4%, onde 82,2% ocorrem na região lombar, 54,7% relataram cefaleia, além de dores nas mamas (32,9%), abdômen superior (31,5%) e nos membros inferiores (28,8%).

A fisiopatologia da DisP é principalmente atribuída ao aumento na produção e liberação de prostaglandinas (PGs), como a $PGF_{2\alpha}$, que levam a uma contração excessiva do miométrio, resultando em isquemia e hipóxia no músculo uterino, causando dor. Sendo assim, normalmente se faz o uso terapêutico dos inibidores das ciclo-oxigenases (COX) em aliviar a dor (Guimarães; Pova, 2020).

No entanto, é importante notar que esses medicamentos podem ter limitações em termos de eficácia e podem causar efeitos colaterais, incluindo impactos no aumento da acidez gástrica e/ou sobre a pressão arterial (López-Liria *et al.*, 2021; Oladosu; Tu; Hellman, 2018).

Assim, a investigação de novas alternativas terapêuticas para o enfrentamento da DisP se faz essencial para o controle da dor evidenciada por esse público no período menstrual. Desse modo, destacam-se os produtos naturais, que desempenham um importante papel nos processos de descoberta e desenvolvimento

dos novos medicamentos (Newman; Cragg, 2020).

Neste contexto, a *Spirulina platensis* (SP) desperta interesse no campo da pesquisa devido ao seu notável valor nutricional, com um alto teor de proteínas, aproximadamente 70% (Zahra *et al.*, 2018). Em nosso laboratório de pesquisa, diversos estudos já evidenciaram o efeito da suplementação com a SP em ratos Wistar em diferentes modelos experimentais de músculo liso, incluindo o íleo (DINIZ, *et al.* 2024), aorta (Brito *et al.*, 2019), corpo cavernoso (Souza, 2018; Diniz *et al.*, 2020) e útero (Ferreira, 2019; Barros, 2021).

Além disso, em um estudo realizado por Lacerda-Júnior (2022), em ratas com DisP, a suplementação por dias intercalados com SP foi eficaz em prevenir o aumento das contorções uterinas, evitando o aumento da contratilidade uterina nos acoplamentos farmacomecânico e eletromecânico, além de reduzir o estresse oxidativo no útero e nos ovários.

Nesse contexto, são necessários estudos que mostrem como a DisP causa alterações *in vitro* e *in vivo*, bem como entender em detalhes como a SP atua na prevenção desses efeitos. Diante disso, nesse trabalho, objetivou-se investigar como suplementação alimentar diária com SP previne essas alterações da reatividade contrátil em ratas Wistar.

2 Fundamentação teórica

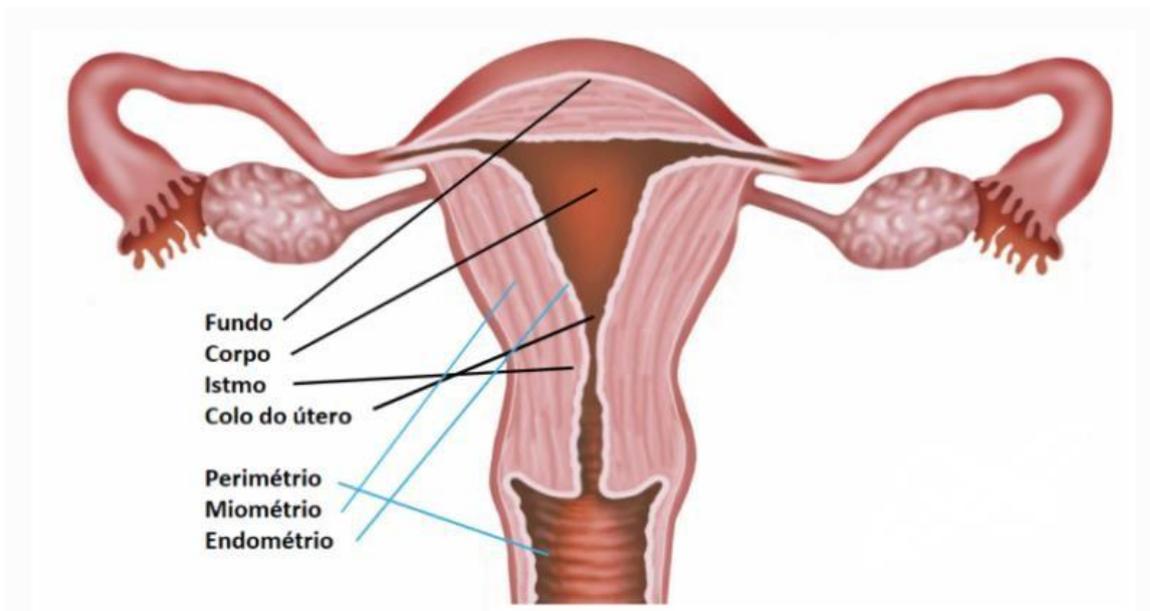
2.1 Anatomia do útero humano

O útero é o órgão principal da reprodução, ele possui formato de pêra, com paredes musculares espessas, medindo cerca de 7 cm de comprimento e 4-5 cm de largura em sua parte mais larga. Funcional e estruturalmente, é dividido em quatro partes: o fundo do útero, colo do útero, o istmo e o corpo principal do útero. Além de apresentar três camadas diferentes, perimétrio, miométrio e endométrio (Figura 1) (Symonds; Arulkumaran, 1998).

A camada intermediária e mais espessa do útero é conhecida como miométrio, formada por fibras musculares lisas organizadas em três camadas: uma interna circular, uma intermediária em formato de malha e uma externa longitudinal. É na camada intermediária que estão localizadas as principais artérias uterinas (Abrahamsohn, 2016; Pawlina, 2021).

O perimétrio é a camada externa do útero, composta por tecido conjuntivo seroso e a camada interna é chamada de endométrio, formado por glândulas uterinas e vasos sanguíneos, cuja espessura muda durante o ciclo menstrual devido a variações hormonais (Myers, Elad, 2017).

Figura 1 – Morfologia uterina humana.



Fonte: educarsaude.com/utero. Acesso em: 05 de agosto de 2024.

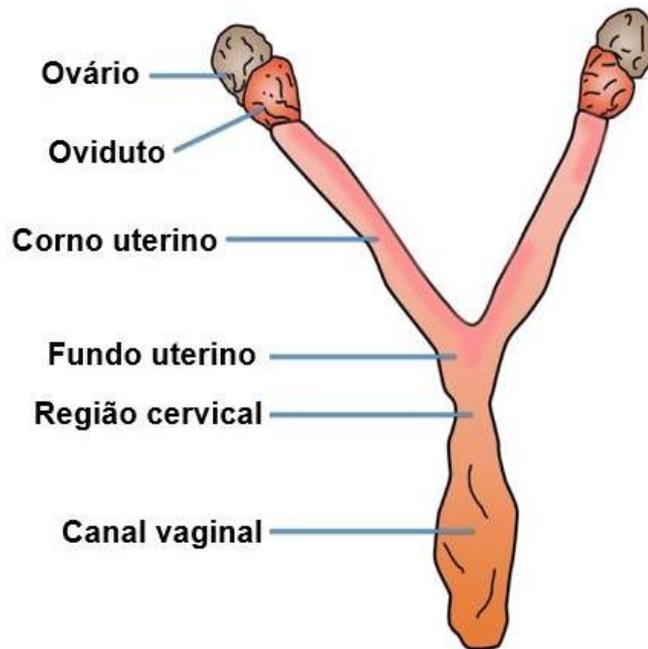
2.2 Anatomia do útero de roedores

Embora existam grandes diferenças na estrutura do útero entre humanos e

roedores, eles compartilham semelhanças nas camadas, inervação e função (Maul *et al.*, 2003; Garfield; Maner, 2007) . Nos humanos, o útero é composto por: corpo, istmo e colo, com uma única cavidade cervical que se conecta a uma vagina simples (Figura 1). Por outro lado, nos roedores, o útero é dividido em dois cornos uterinos que se estendem de uma única cérvix para a vagina (Figura 2), essa divisão dupla nos roedores permite que eles acomodem múltiplos embriões (Bittencourt, 2021).

O útero da rata é classificado como duplex (Figura 2), consistindo em dois cornos uterinos separados, com uma fusão parcial na parte caudal, formando o corpo, e duas cérvices. Embora o útero esteja quase totalmente dentro da cavidade abdominal, seu colo se estende para a parte peritoneal da cavidade pélvica, sendo sustentado pelo mesométrio, que se origina da parede dorsolateral da pelve e da região lombar (Akinloye; Oke, 2010).

Figura 2 – Morfologia uterina de roedores.



Fonte: Adaptado de Cueto *et al*, 2018

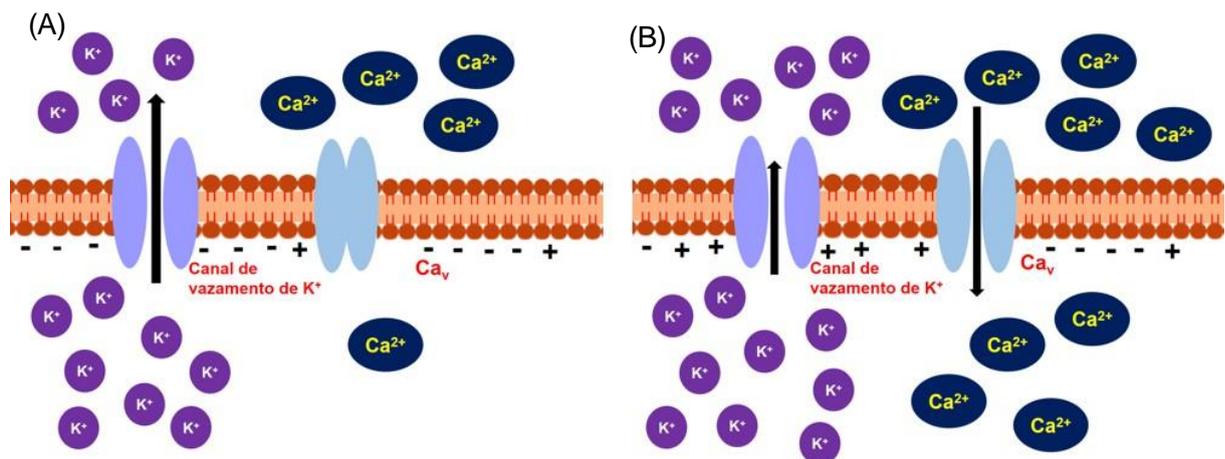
2.3 Fisiologia Uterina

2.3.1 Fisiologia da contração uterina

O útero tem uma atividade contrátil que ocorre de forma natural e pode ser observada tanto em mulheres grávidas quanto em mulheres que não estão grávidas, essas contrações não precisam de sinais hormonais ou nervosos, se apresentando de forma cíclica, com períodos de repouso e contratilidade que variam em ritmo, força e duração (Wray; Arrowsmith, 2012).

A excitação da musculatura uterina começa espontaneamente com a geração de potenciais de ação, o que desencadeia a entrada de íons Ca^{2+} por meio dos canais de cálcio dependente de voltagem do tipo 1 (Ca_v1) (Figura 3). Esses potenciais de ação levam à ativação do complexo cálcio-calmodulina e da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), resultando em contrações (Wray; Arrowsmith, 2020).

Figura 3 – Acoplamento elemecânico de contração uterina.



(A) Em estado de repouso, o gradiente eletroquímico facilita o efluxo de íons K^+ através de canais de vazamento, o que faz com que a parte interna da membrana das células musculares lisas fiquem polarizadas negativamente; (B) quando a concentração de K^+ extracelular aumenta, seu efluxo diminui, resultando em um acúmulo de cargas positivas na parte interna da membrana. Isso despolariza a célula, ativando os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), que permite o influxo de Ca^{2+} , resultando na contração.

Fonte: Autor, 2024.

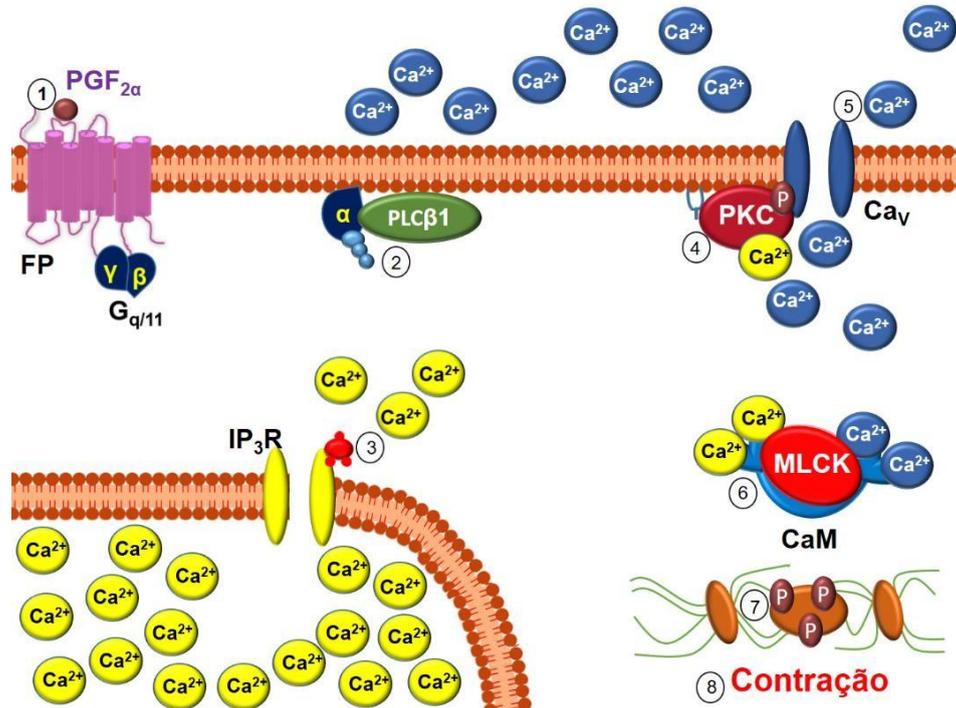
Os Ca_v são cruciais para o influxo de Ca^{2+} no miométrio uterino, eles são formados por cinco subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ e γ), e são divididos em três subtipos: Ca_v1 (subdividido em $\text{Ca}_v1.1$, $\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v1.3$ e $\text{Ca}_v1.4$), Ca_v2 ($\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ e $\text{Ca}_v2.3$) e Ca_v3 ($\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Ca}_v3.3$). No miométrio uterino, os canais $\text{Ca}_v1.2$

têm uma abertura prolongada e são a principal fonte de cálcio para a contração uterina, enquanto os canais Cav2 têm uma abertura transitória (Williams *et al.*, 1992; Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Erez-Reys *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Catteral, 2011; Arrowsmith; Wray, 2014; Zamponi *et al.*, 2015).

A transmissão do sinal da membrana plasmática para a contração muscular ocorre através de dois mecanismos principais: o acoplamento eletromecânico (Figura 3) e o farmacomecânico (Figura 4), ambos aumentando a concentração de cálcio intracelular (Paiva; Faria, 2005).

O acoplamento farmacomecânico ocorre quando agonistas, como a ocitona e a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), interagem com receptores acoplados à proteína $G_{q/11}$, ativando a fosfolipase $C\beta 1$ ($PLC\beta 1$), que hidrolisa o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 libera Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, enquanto o DAG, juntamente com o Ca^{2+} , ativa a proteína cinase C (PKC), o que aumenta ainda mais a condutância ao Ca^{2+} pela membrana. A elevação deste íon no citosol, aumenta a afinidade do Ca^{2+} pela proteína citoplasmática calmodulina (CaM), que se liga à 4 íons cálcio formando um complexo ($4Ca^{2+}$ -CaM), ativando a MLCK, isso faz com que a MLCK fosforile a miosina, o que faz com que as pontes cruzadas do filamento fino de actina deslize ao longo do filamento grosso de miosina, gerando uma força que é transmitida em direção ao centro da célula, desencadeando assim contrações do músculo liso uterino (Figura 4) (Bursztyn *et al.*, 2007; Wray; Prendergast, 2019; Wang *et al.*, 2019).

Figura 4 – Esquema do acoplamento farmacomecânico no útero desencadeado por ocitocina ou $\text{PGF}_{2\alpha}$ no receptor acoplado à proteína $\text{G}_{q/11}$.



A ocitocina e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ se ligam a seus receptores, respectivamente OT e FP (1), e com isso ocorre a atração da proteína $\text{G}_{q/11}$ para a segunda ou terceira alça citosólica do receptor, fazendo a troca do difosfato de guanina (GDP) por trifosfato de guanina (GTP), em seguida, por impedimento estérico, a subunidade α -GTP ligada se dissocia do dímero $\beta\gamma$ e ativa a fosfolipase $\text{C}\beta_1$ (2), que vai catalisar a conversão do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 ao se ligar em receptores de IP_3 no retículo sarcoplasmático vai favorecer a liberação de cálcio (3). Este íon ajuda na translocação da proteína cinase C (PKC) para a região perimembranar, esta que é ativada pelo DAG e fosforila os Ca_v (4), favorecendo o influxo de cálcio (5). Este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ favorece a formação do complexo $4\text{Ca}^{2+} + \text{CaM}$, que é responsável pela ativação da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) (6). Sendo assim, a MLCK fosforila a cabeça da miosina (7), favorecendo o deslizamento da actina sobre a miosina, ocasionando assim, a contração do músculo uterina (8).

Fonte: Autor, 2024.

2.3.2 Ciclo menstrual

O sistema reprodutivo feminino normal se caracteriza por variações cíclicas nas taxas de secreção dos hormônios femininos, estradiol e progesterona, que causam alterações nos ovários e em outros órgãos sexuais. Em média, estes ciclos duram 28 dias, podendo variar entre 20 e 45 dias em algumas mulheres. Durante cada mês do ciclo, ocorre variações cíclicas nos níveis de FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (Guyton; Hall, 2006).

As fases do ciclo menstrual são a fase folicular (proliferativa) e a fase lútea (secretora), sendo separadas pelo período da ovulação. A fase folicular começa no primeiro dia do ciclo menstrual e termina ao final da ovulação, durante essa fase, ocorre um aumento gradual do hormônio folículo estimulante (FSH), baixos níveis de progesterona e um pico de estrogênio próximo ao período da ovulação. A fase lútea inicia-se após a ovulação e vai até o início do próximo ciclo menstrual, com um aumento nas concentrações de progesterona (Cunha *et al.*, 2021).

Em ratas, o ciclo estral é dividido em quatro fases, com uma duração média de quatro a cinco dias. A primeira fase se chama proestro, onde ocorre o aumento dos níveis de estrogênio, o que regula positivamente a expressão de receptores para ocitocina (OTR) nos tecidos sensíveis, como o miométrio e o endométrio. A alta expressão desses receptores prepara o útero para as contrações necessárias durante a ovulação.

Durante o estro, segunda fase, os níveis de estrogênio continuam altos, e a expressão dos OTR também é elevada, essa alta expressão é importante para a coordenação das contrações uterinas e para facilitar a migração do esperma no trato reprodutivo. No metaestro, os níveis de progesterona começam a aumentar, fazendo uma regulação negativa da expressão dos OTR, resultando em uma redução desses receptores no útero. O diestro, é marcado por altos níveis de progesterona, que inibem a expressão de OTR no útero. Isso reduz a sensibilidade do útero à ocitocina, mantendo o órgão em um estado relaxado durante a fase luteal. (Marcondes *et al.*, 2002; VILELA *et al.*, 2007; Carrasco-Garcia *et al.*, 2019).

2.4 Dismenorreia primária (DisP)

2.4.1 Aspectos gerais

A dismenorreia, palavra de origem grega, é um termo que descreve o desconforto causado por dores pélvicas ou abdominais inferiores que ocorrem de forma cíclica ou recorrente durante o período menstrual. É uma queixa ginecológica frequente entre mulheres, caracterizada por dificuldades no fluxo menstrual associado a dor (Silva *et al.*, 2022).

Podendo ser categorizada como primária (DisP) ou secundária, a dismenorreia

primária é classificada como natural, acometendo geralmente as mulheres que estão nos primeiros anos pós-menarca, sem possuir uma doença que a justifique, diferentemente da dismenorreia secundária, sendo esta o resultado de alterações no sistema reprodutor feminino, como a endometriose, adenomiose, doenças inflamatórias ou malformações uterinas (Silva *et al.*, 2022).

A DisP é conhecida popularmente como cólica menstrual, e está presente em metade das mulheres em idade fértil. O principal sintoma associado ao distúrbio é a dor pélvica, localizada no baixo ventre ou na lombar, podendo apresentar também dores na cabeça e nas mamas, edemas abdominais, entre outros, que podem acompanhar todo o ciclo menstrual (Santos *et al.*, 2023). Na maioria dos casos, as cólicas podem prejudicar atividades diárias, além de causar efeitos emocionais, mentais e funcionais de grande relevância para a saúde (Nagy; Khan, 2022).

O desenvolvimento da DisP está associado com os mecanismos de inflamação que ocorrem durante o ciclo menstrual. A fosfolipase A₂ (PLA₂) hidrolisa os fosfolípidios da membrana celular (fosfatidilserina e fosfatidilcolina) em ácido araquidônico (AA), sendo este o precursor das prostaglandinas (PGs) (Rowe; Corey; Archer, 2020).

Durante a fase ovulatória, os níveis adequados de progesterona mantêm a estabilidade dos lisossomos nas células. No entanto, quando a fase lútea chega ao fim e os níveis de progesterona diminuem, os lisossomos sofrem ruptura, liberando a enzima PLA₂, isso resulta em um aumento na liberação dos prostanoides, substância lipídicas derivadas do AA (prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina) (Rowe; Corey; Archer, 2020).

De acordo com Nagy e Khan (2022) o mecanismo capaz de desenvolver a DisP ainda não é bem elucidado, porém, a causa identificada está relacionada à produção excessiva de prostaglandinas na camada interna do útero. A prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e prostaglandina E₂ (PGE₂) são as principais envolvidas na DisP (Rowe; Corey; Archer, 2020).

O processo de hipóxia e isquemia, que ocorre durante a contração uterina, diminui o fluxo sanguíneo para a região e, com isso acarreta no acúmulo de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ROS). De acordo com estudos, nos casos de DisP ocorre o aumento das ROS, ocasionado pela diminuição do fluxo sanguíneo no miométrio (Sirmali *et al.*, 2007; Dikensoy *et al.*, 2008).

Portanto, quando há um desequilíbrio nos níveis de oxidação no sistema

reprodutor feminino, isso leva a mudanças causadas pelo aumento das ROS nas proteínas e no DNA das células. Essas mudanças podem resultar na alteração da função das células ou na ativação de cascatas de sinalização que, por sua vez, provocam danos e inflamação no endométrio e miométrio (Guney *et al.*, 2008; Guney, 2012).

2.4.2 Fisiopatologia da DisP

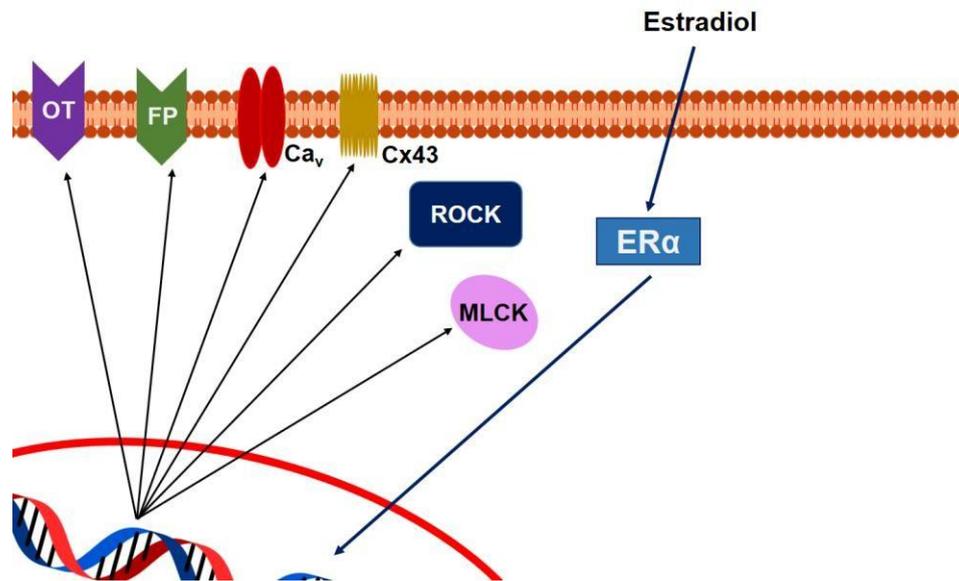
2.4.2.1 Aumento na expressão de receptores para ocitocina e PGF_{2α}

As vias de sinalização associadas a dor em pacientes com DisP estão relacionadas com o aumento de receptores OT, estes que podem ter a sua expressão estimulada pelo estrogênio (Figura 5), e ocasionar a contração do miométrio. Além disso, a ocitocina pode causar constrição das artérias uterinas, o que pode resultar em isquemia e aumento do desconforto doloroso. (Soloff, 1975; Phaneuf *et al.*, 1993; Mithcell *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016).

Em relação a progesterona, este hormônio possui um efeito duplo, podendo exercer um efeito inibitório sobre a contração uterina, ocasionando o relaxamento, ou pode atuar por meio de mecanismos de autoregulação, diminuindo seus próprios efeitos sobre os receptores do tipo B (Wray; Arrowsmith, 2021).

A ocitocina pode estimular as células do endométrio a produzir prostaglandinas, como a PGF_{2α}, que também têm efeito uterotônico e ajudam a aumentar a produção de receptores de ocitocina, sugerindo assim, a existência de um mecanismo de *feedback* positivo entre os receptores de ocitocina e as prostaglandinas. A ocitocina é também empregada para induzir contrações em modelos *in vitro*, fundamentais para a triagem de medicamentos para o tratamento da dismenorreia (Mitchell *et al.*, 1998; Hua *et al.*, 2008).

Figura 5 - Mecanismos de aumento da expressão das proteínas pró-contração através do estrogênio.



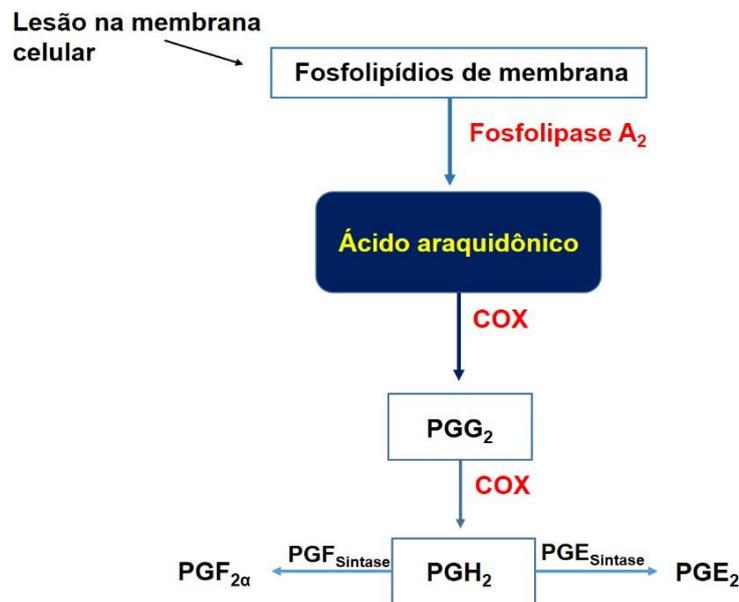
O estradiol é um hormônio lipossolúvel e atravessa a membrana celular livremente e se liga ao seu receptor ER α , e assim é translocado para o núcleo celular, alterando a expressão gênica e aumentando a expressão de receptores para ocitocina (OT), PGF_{2 α} (FP), canais de cálcio dependente de voltagem (Ca_v), conexinas (Cx43), Rho cinase (ROCK) e a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), o aumento dessas proteínas, permite o aumento do cálcio citosólico e consecutivamente a contração uterina.

Fonte: Autor, 2024.

2.4.2.2 Mecanismo inflamatório na DisP

Quando a membrana celular é submetida a um estímulo ocorre a ativação da fosfolipase A2, este que libera o ácido araquidônico (AA). Após a liberação, o AA é convertido pela enzima citosólica prostaglandina G/H sintase, também conhecida como ciclo-oxigenase (COX), gerando os intermediários prostaglandina G2 (PGG2) e, posteriormente, prostaglandina H2 (PGH2). Esta última pode ser transformada em prostaglandina E2 (PGE2) pela ação da prostaglandina sintase E ou em prostaglandina F2 α (PGF2 α) pela ação da prostaglandina sintase F (Figura 6) (Kumer, Coelho, 2002).

Figura 6 – Esquema da via de formação das prostaglandinas através das ciclo-oxigenases.



Quando a membrana celular sofre algum tipo de lesão, ocorre a liberação de fosfolipídios de membranas e a ativação da PLA₂, esta enzima é responsável por clivar ainda mais os fosfolipídios da membrana, produzindo assim o AA, que vai servir de substrato para as COX transformando-o em PGG₂ e PGH₂, estas que podem sofrer ação da PGE_{sintase} e PGF_{sintase}, produzindo assim, as prostaglandinas E₂ e F_{2α}.

Fonte: Autor, 2024.

O AA, encontrado principalmente como parte de fosfolipídios nas membranas celulares, é liberado pela PLA₂, uma enzima chave que controla a produção de eicosanoides. Existem duas isoformas de PLA₂, uma secretora e outra citoplasmática, que podem ser ativadas por diversos estímulos, como fator de necrose tumoral α (TNF-α) e fatores de crescimento, como a proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK) (Lemos *et al.*, 2021; Ribeiro, 2020).

Existem dois tipos de COX no organismo: a COX-1 e a COX-2, sendo a primeira constitutiva e desempenha um papel fisiológico, sendo responsável pela síntese de prostaglandinas que regulam funções normais do corpo e a segunda induzida por mediadores inflamatórios, responsável por desencadear o processo inflamatório (Oliveira *et al.*, 2024).

A COX-1 é uma enzima encontrada em quase todos os tecidos, como vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino e rins, e está associada à produção de prostaglandinas com funções fisiológicas essenciais, incluindo proteção gástrica, agregação plaquetária, manutenção da homeostase vascular e fluxo sanguíneo renal (Hilário *et al.*, 2006; Willoughby, *et al.*, 2000).

Em contraste, a COX-2 é uma enzima indutiva que aparece principalmente em locais de inflamação e é expressa por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos. Embora predominante em locais inflamatórios, também pode ser encontrada em outros tecidos e órgãos, como rins, cérebro, ovário, cartilagem, ossos, endotélio vascular e útero (Hilário *et al.*, 2006; Willoughby, *et al.*, 2000).

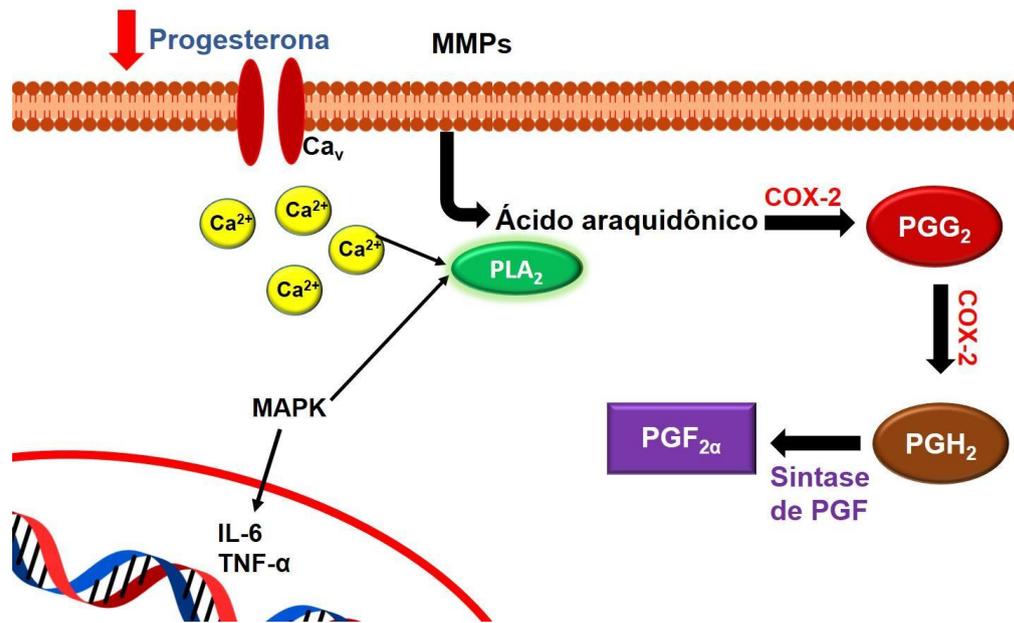
Em algumas desordens uterinas, como a DisP, observa-se uma elevação na expressão de prostaglandinas contráteis (TXA₂ e PGF_{2α}) e relaxantes (PGE₂), isto promove a produção das prostaglandinas, as principais que são expressas no útero são a PGF_{2α} e a PGE₂ (Harel, 2012; Morrow; Naumburg, 2019). A PGE₂ tem uma atividade dual, podendo levar ao relaxamento do miométrio quando o útero não está gravídico e à contração do miométrio quando está grávido, isso ocorre devido às diferentes isoformas de seus receptores, que variam conforme as fases uterinas. Por outro lado, a PGF_{2α} promove a contração uterina aumentando a concentração de íons Ca²⁺ no citosol uterino (Wray; Arrowsmith, 2012).

As prostaglandinas são moléculas sinalizadoras, presentes em praticamente todos os tecidos dos animais, e desempenham papéis fundamentais em diversas funções fisiológicas e patológicas. Elas são produzidas a partir do ácido araquidônico por meio da ação da enzima COX (Cunha, 2024).

Com o aumento da produção e liberação de prostaglandinas no útero, as contrações uterinas se intensificam para expulsar o endométrio necrosado, que está sendo substituído, essa variação constante nos níveis de estrogênio e progesterona pode causar distúrbios no organismo feminino, levando às manifestações da síndrome pré-menstrual (SPM), caracterizada por dores durante a menstruação (Halbe 2000; Suzana, 2024).

Sendo assim, a fisiopatologia da DisP é explicada pelo aumento na síntese e liberação de prostaglandinas durante a fase menstrual, após a ovulação, ocorre a regressão do corpo lúteo, o que leva a uma redução na concentração de progesterona, essa queda resulta em um aumento na produção de prostaglandinas, que, juntamente com a descamação do endométrio durante a menstruação, causa uma alta contratilidade do miométrio, provocando isquemia muscular uterina, hipóxia, e, conseqüentemente, dor (Andrews; Coco, 1999,, Iacovides; Avidon; Baker, 2015; Guimarães; Póvoa, 2020; Suzana, 2024).

Figura 7 – Regulação da produção de prostaglandinas pela progesterona no útero.



A progesterona é responsável por inibir a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), na fase final do ciclo menstrual, os níveis deste hormônio são diminuídos, favorecendo a atividade das MMPs, estas que degradam as proteínas da matriz extracelular, causando instabilidade na membrana plasmática e, liberando os fosfolípidios de membrana, como o fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, estes que vão servir de substrato para a fosfolipase A₂, que pode ser ativada pelo Ca²⁺ citosólico e MAPK, a PLA₂ vai clivar ainda mais a membrana plasmática, liberando o ácido araquidônico, que é convertido em PGF_{2α}, um dos prostanoides responsáveis por causar a contração uterina.

Fonte: Autor, 2024.

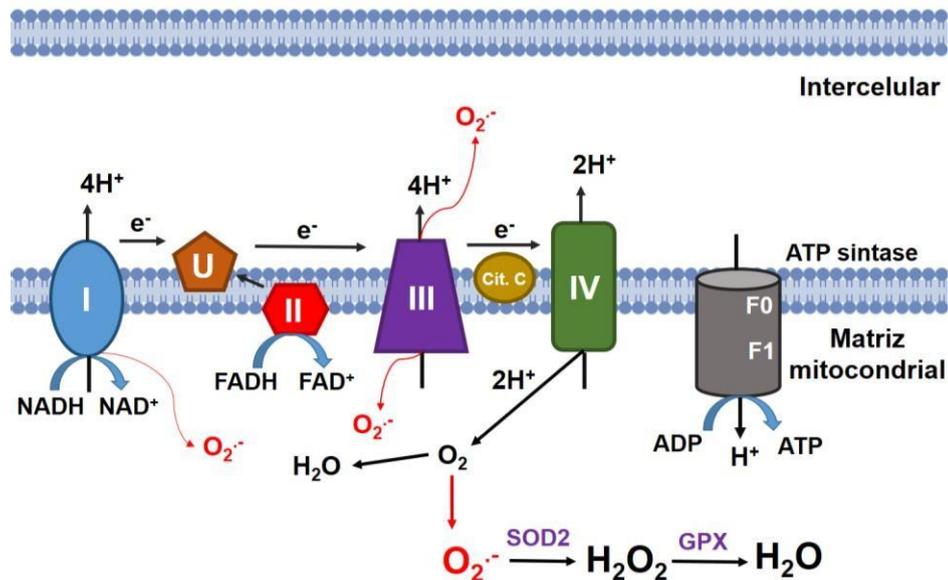
Portanto, mulheres com DisP apresentam níveis mais elevados de PGF_{2α} nos dois primeiros dias da menstruação, o que explica a maior intensidade das dores, além disso, o AA pode servir de substrato para as lipoxigenases, originando os leucotrienos, que contribuem para os sintomas sistêmicos, como náuseas, vômitos e cefaleias, que podem acompanhar as dores menstruais. A intensificação das contrações endometriais e a vasoconstrição causam isquemia uterina, falta de oxigênio nos tecidos e a formação de metabólitos anaeróbios, isso provoca uma sensibilidade acentuada nas fibras nervosas que transmitem a dor, culminando em dor pélvica, principal sintoma da dismenorreia primária (Bernardi *et al.*, 2017; Ryan, 2017; Guimarães; Póvoa, 2020; Itani *et al.*, 2022; Ferreira, 2024).

2.4.2.2 Estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados na camada mais externa, o que os torna altamente reativos, eles são constantemente gerados no corpo e podem ser formados por diversos motivos, incluindo o metabolismo nas mitocôndrias (Figura 8), a atividade da enzima xantina oxidase na via do ácido úrico, a função dos peroxissomos, processos inflamatórios, a ação de fagócitos, e também em situações de isquemia e durante a prática de exercícios físicos (Kumar; Pandey, 2015; Radi, 2018; Velloso *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a maior produção de radicais livres formados no organismo ocorre principalmente durante a redução do oxigênio (O_2) em água na cadeia transportadora de elétrons, dentro das mitocôndrias. Apesar de 85 a 90% do oxigênio ser metabolizado nas mitocôndrias, cerca de 2 a 5% deste O_2 é desviado para outras vias, resultando na formação de radicais livres (Figura 8). (Barbosa *et al.*, 2010).

Figura 8 – Formação de radicais livres a partir da cadeia transportadora de elétrons.



Após a formação do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e do $FADH_2$ (flavina adenina dinucleotídeo reduzido) em vias metabólicas como o ciclo de Krebs, essas moléculas participam da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. O NADH doa seus elétrons ao Complexo I (NADH desidrogenase), enquanto o $FADH_2$, gerado durante a oxidação do succinato, doa seus elétrons ao Complexo II (succinato-desidrogenase). Ambos os complexos transferem os elétrons para o Complexo III (citocromo bc1) por meio da coenzima Q (ubiquinona). Do Complexo III, os elétrons são transferidos para o Complexo IV (citocromo C oxidase) através do citocromo C. Ao transferir os elétrons, os complexos I, III e IV bombeiam prótons para a região intermembranar e, de acordo com o gradiente eletroquímico, os íons de hidrogênio irão ser bombeados para a matriz mitocondrial, através da ATP sintase. Ao passar através da subunidade F_0 da ATP sintase, os íons de hidrogênio ocasionam uma rotação nesta região da bomba, com isso, a subunidade F_1 altera sua conformação permitindo a

fosforilação da difosfato de adenosina (ADP), gerando trifosfato de adenosina (ATP). Diferentemente do complexo I e III, o complexo IV bombeia dois prótons para a região perimembranar e dois para a matriz mitocondrial, isso pode facilitar a formação do ânion superóxido, além disso, durante a transferência de elétrons pode ocorrer vazamentos no complexo I e III, favorecendo também a formação dos radicais livres, para controlar isto, a superóxido dismutase do tipo 2, pode dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e a glutatona peroxidase, convertê-lo em água.

Fonte: Autor, 2024

Outra fonte significativa de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), essas proteínas transmembranares transferem elétrons através das membranas celulares, geralmente para o oxigênio, resultando na formação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Barbosa *et al.*, 2010). A função básica da NADPH oxidase é transportar elétrons de um doador citosólico, como o NADPH, para um aceptor, sendo o oxigênio o principal, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (Bedard, 2007).

As Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) podem se originar de duas fontes principais: endógena, por meio de processos como NADPH oxidase, peroxissomos, mitocôndrias, citocromo P-450 e xantina oxidase, ou exógena, por estímulos como radiação ultravioletas, infecções, poluentes e outros agentes oxidantes (Filippin *et al.*, 2008).

Apesar de possuir papéis importantes na regulação de processo metabólicos, uma produção excessiva de ROS, pode ser causada por uma série de fatores, como uma ativação intensa de fagócitos, problemas na transferência normal de elétrons na cadeia respiratória, alta concentração de íons metálicos em doenças metabólicas ou lesões, essa superprodução de espécies reativas de oxigênio pode ocasionar danos nas estruturas celulares ao interagir com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, causando alterações funcionais ou até mesmo destruição das células (Radi, 2018; Brieger *et al.*, 2012; Velloso, 2021).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante, cuja finalidade é de reduzir ou prevenir os danos causados pelos radicais livres, sua atuação se dá pelo impedimento da formação das ROS, além de neutralizar sua ação e promover o reparo das estruturas celulares danificadas. Essas defesas podem ser classificadas como enzimáticas (Tabela 1) ou não enzimáticas, sendo a última, uma variedade de substâncias que devem ser obtidas da dieta, como as vitaminas E e C (Barbosa, 2010; Zatti *et al.*, 2022).

Tabela 1 – Ações do sistema antioxidante enzimático nas espécies reativas de oxigênio.

Sistema enzimático	Espécies reativas de oxigênio
SOD	$O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2
CAT	H_2O_2 em H_2O
GPx	H_2O_2 em H_2O
Prx	H_2O_2 em H_2O $ONOO^-$

SOD: Superóxido dismutase; CAT: Catalase; GPx: Glutathiona peroxidase; Prx: Peroxiredoxinas; $O_2^{\cdot -}$: Ânion superóxido; H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio; H_2O : Água; $ONOO^-$: Peroxinitrito

Fonte: Autor, 2024.

Em condições normais, níveis baixos de espécies reativas de oxigênio são importantes para a comunicação entre as células, resposta imune, regulação do tônus vascular e homeostase, porém quando há uma produção excessiva de ROS, pode resultar em danos ao organismo, afetando várias funções fisiológicas e levando à morte celular. Para lidar com esses danos, o sistema antioxidante é ativado. No entanto, durante a isquemia e reperfusão, que acontece em processos fisiopatológicos, pode comprometer a capacidade do sistema antioxidante, devido à redução dos níveis de ATP, fazendo com que enzimas como as peroxirredoxinas fiquem inativas (Malek, Nematbakhsh, 2015; Tretter *et al.*, 2022; Pagano *et al.*, 2023; Guo; Walz, 2023; Lima, 2024).

Recentemente, o estresse oxidativo tem sido identificado como um fator relevante na fisiopatologia da DisP. No entanto, os detalhes sobre como o desbalanço oxidativo contribui para a patogênese da DisP ainda estão em desenvolvimento, e algumas etapas dessa sinalização ainda não estão completamente esclarecidas. Estudos sugerem que a isquemia e a hipóxia causadas por contrações uterinas intensas durante a dismenorreia podem reduzir o fluxo sanguíneo para o miométrio, resultando no acúmulo de radicais livres, incluindo ROS (Dikensoy *et al.*, 2008; Lacerda-Junior, 2022).

O sistema enzimático antioxidante, inclui principalmente superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), que desempenham um papel crucial na proteção contra danos celulares causados por ROS, que são produzidas principalmente a partir da NADPH oxidases, xantina oxidase e mitocôndrias. Além do sistema enzimático, os tecidos também podem utilizar antioxidantes não enzimáticos,

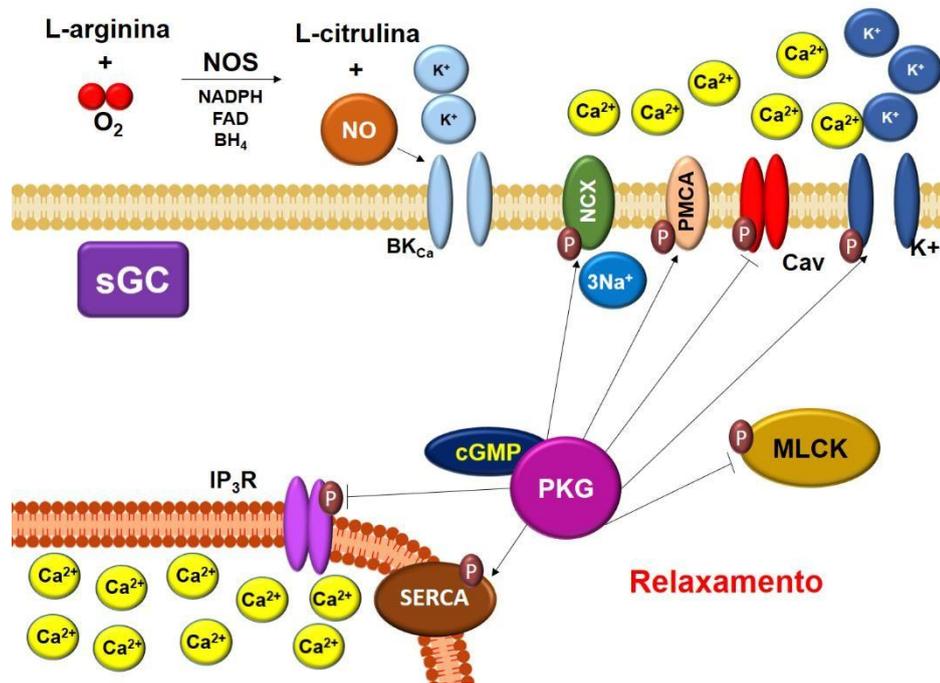
como a glutathiona reduzida, para ajudar na defesa contra o estresse oxidativo (Comhair; Erzurum, 2002; Roy *et al.*, 2017; Tasca, 2022).

2.4.2.3 Aumento da síntese do óxido nítrico e peroxinitrito

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização essencial que influencia em respostas vasculares, neuronais, inflamatórias e imunes, sua produção é regulada por três isoformas da enzima sintase de óxido nítrico (NOS). Duas dessas isoformas são constitutivas: a neuronal (nNOS/NOS1) e a endotelial (eNOS/NOS3), que desempenham papéis importantes na neurotransmissão, citotoxicidade e controle vascular. A terceira isoforma, a NOS induzível (iNOS/NOS2), é produzida pelo sistema imunológico em resposta a endotoxinas e citocinas durante a inflamação, gerando quantidades muito maiores de NO em comparação com as isoformas constitutivas (Bath *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2024).

Os efeitos diretos do NO incluem a ativação da ciclase de guanilil solúvel (sGC), o que leva à produção de monofosfato cíclica de guanosina (cGMP) a partir da trifosfato de guanosina (GTP) (Perez-Zoghbi *et al.*, 2010; Berridge, 2012). Esses nucleotídeos cíclicos ativam suas respectivas proteínas cinases, dependentes de cGMP (PKG), que, por sua vez, fosforilam diversos alvos, resultando em: 1) ativação de canais para potássio, que indiretamente inibem os Cav ; 2) inibição direta dos Cav (Rembold, 1996); 3) aumento da atividade da Ca²⁺-ATPase tanto do retículo sarcoplasmático (SERCA) quanto da membrana plasmática (PMCA); 4) ativação do trocador de sódio/cálcio (NCX) (Blaustein, 1989); 5) inibição da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), impedindo a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), tudo isso vai culminar na diminuição da concentração de cálcio citosólica, o que leva ao relaxamento uterino (Figura 9) (Rembold, 1996).

Além disso, diversos estudos têm associado o efeito relaxante do NO no miométrio humano a vias diretas envolvendo cGMP e/ou PKG, bem como a mecanismos indiretos, como a ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}), que resultam na hiperpolarização da membrana. Esse processo aumenta a condutância ao potássio (K⁺) e diminui a excitabilidade celular, o que promove uma alteração no potencial de membrana, levando à redução das contrações (Okawa *et al.*, 1999; Modzelewska *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020).

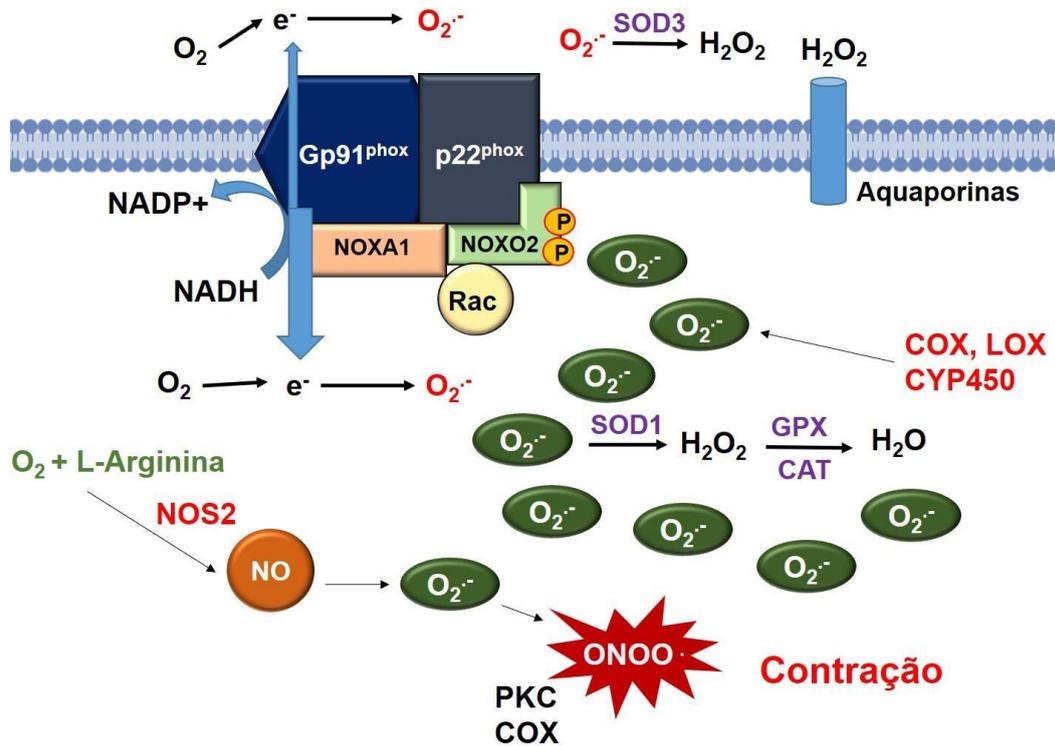
Figura 9 - Mecanismo de relaxamento do músculo liso uterino mediado pela via do cGMP.

O óxido nítrico é produzido a partir da NOS e por ser um gás lipossolúvel, consegue atravessar a membrana plasmática e se ligar ao seu receptor ciclase de guanilil solúvel (sGC), esta que vai fazer a conversão do GTP (guanosina trifosfato) em cGMP (guanosina monofosfato cíclica). O nucleotídeo cGMP ativa a proteína cinase G (PKG) que vai fosforilar os seus alvos, (+) ativando ou (-) inibindo: (+) Canais de potássio, (-) canais de cálcio dependente de voltagem, (+) bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA), (+) trocador sódio/cálcio (NCX), (+) bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), (-) receptor de IP_3 (IP_3R) e (-) cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), além disso, o NO pode ativar os canais de potássio sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}), desencadeando o influxo de mais íons potássio na célula. Todas essas atividades vão culminar na diminuição da concentração de cálcio citosólica e aumento de potássio, ocasionando assim, o relaxamento da musculatura lisa uterina.

Fonte: Autor, 2024

A DisP também provoca disfunção endotelial nos vasos uterinos devido à menor disponibilidade de NO, isso ocorre porque o NO reage com o O_2^- , formando $ONOO^-$, que pode ativar enzimas e proteínas, elevando a contratilidade uterina, como a ativação da PKC, ativação das ciclo-oxigenases (Figura 10), além de inibir a síntese de PGI_2 e ativar a síntese de TxA_2 , no útero esses mecanismos favorecem a contração (Guliaeva *et al.*, 1998; Higashi *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 1997; Alanazi *et al.*, 2018).

Figura 10 – Formação do peroxinitrito a partir da NOS2.



A sintase de óxido nítrico pode converter o oxigênio + L-arginina em óxido nítrico, em quadros de inflamações a síntase de óxido nítrico 2, é responsável por fazer essa conversão, aumentando a produção do NO, este que pode reagir com o ânio superóxido e formar o peroxinitrito, uma espécie altamente reativa, que pode ativar PKC e COX, ocasionando a contração uterina.

Fonte: Autor, 2024.

2.4.5 Tratamentos da DisP

A farmacoterapia para a DisP é voltada para o alívio dos sintomas dessa condição. As principais intervenções medicamentosas incluem anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), como o ibuprofeno, além de antiespasmódicos, como a escopolamina, e contraceptivos hormonais. Além disso, podem ser adotadas abordagens não farmacológicas, como ajustes na alimentação com maior ingestão de antioxidantes, prática regular de atividades físicas e aplicação de compressas na região dolorida (Marjoribanks *et al.*, 2010; Proctor; Ryan, 2017).

Embora existam muitos medicamentos disponíveis para tratar a DisP, o uso prolongado desses medicamentos pode causar diversos efeitos colaterais, como problemas gastrointestinais (gastrite e náusea), retenção de líquidos e complicações cardiovasculares (maior risco de trombose) (Ryan, 2017; Guimarães; Pova, 2020).

Diante disso, a busca por novas opções terapêuticas para a DisP tem aumentado, visando reduzir os efeitos colaterais que afetam as mulheres nas terapias tradicionais e encontrar alternativas capazes de aliviar os sintomas dessa condição. Nesse cenário, os produtos naturais, especialmente aqueles de origem aquática, têm mostrado grande potencial farmacológico para o tratamento de doenças inflamatórias como a dismenorreia, devido à presença de vários metabólitos e compostos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Aruselvan *et al.*, 2016).

2.5 Produtos Naturais

Ao longo da história, substâncias naturais são utilizadas como remédio para tratar uma ampla gama de enfermidades humana, desde a década de 1980, aproximadamente 65% das drogas aprovadas e disponíveis no mercado são derivadas de produtos naturais, seja em sua forma pura ou modificada com base em estruturas encontradas na natureza (Newman; Cragg, 2020). O interesse por substâncias naturais provenientes do ambiente aquático aumentou consideravelmente, impulsionado pela crescente percepção da vasta biodiversidade, bem como pelos avanços significativos em técnicas de pesquisa e nas abordagens estratégicas para superar os principais obstáculos na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos a partir de produtos naturais (Gerwick; Moore, 2012; Montaser; Luesch, 2011).

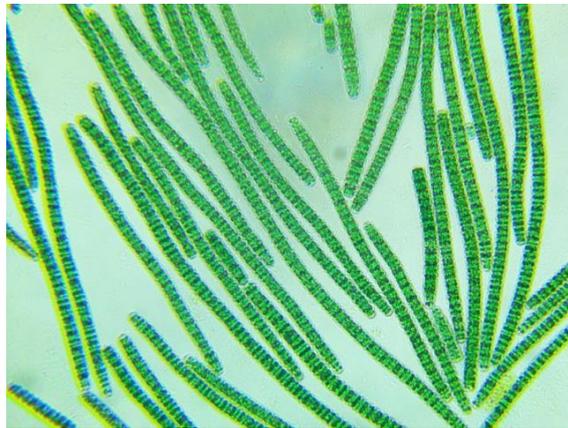
A investigação abrangente das algas trouxe à luz compostos bioativos de grande importância extraídos desses organismos, muitos dos metabólitos isolados exibiram atividades biológicas que contribuem para a saúde. Entre os principais constituintes dessas algas, estão os pigmentos fotossintéticos, como a ficocianina, que além de suas funções na fotossíntese e pigmentação, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Outro pigmento notável, o β -caroteno, foi identificado por suas capacidades anti mutagênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Cicccone *et al.*, 2013; Izadi; Fazilati, 2018).

2.5.1 *Spirulina platensis*

Dentro desse cenário, as cianobactérias, especificamente as microalgas verde-azuladas do filo *Cyanophyta* e da família *Spirulinaceae*, representam um grupo de

procariontes fotossintetizantes presentes nos ambientes aquáticos. Algumas espécies, como *Spirulina maxima*, *Arthrospira fusiformis* e *Arthrospira platensis*, têm sido consumidas por seres humanos há muitos séculos (Chaouachi *et al.*, 2020). A microalga *Spirulina platensis* (SP), também conhecida como *Arthrospira platensis* (*A. platensis*), é um organismo verde-azulado que pode atingir um comprimento de 0,2 a 0,5 mm e possui uma estrutura helicoidal (Figura 11). Essa microalga prospera em águas salinas alcalinas com pH de até 11,0, assim como em rios e lagos de água doce, sendo encontrada em uma variedade de habitats, incluindo solos, águas frescas, salobras, oceanos, e também em águas residuais, tanto industriais quanto domésticas (Hosein *et al.*, 2013).

Figura 11 – Imagem microscópica da forma externa da *Spirulina platensis*.



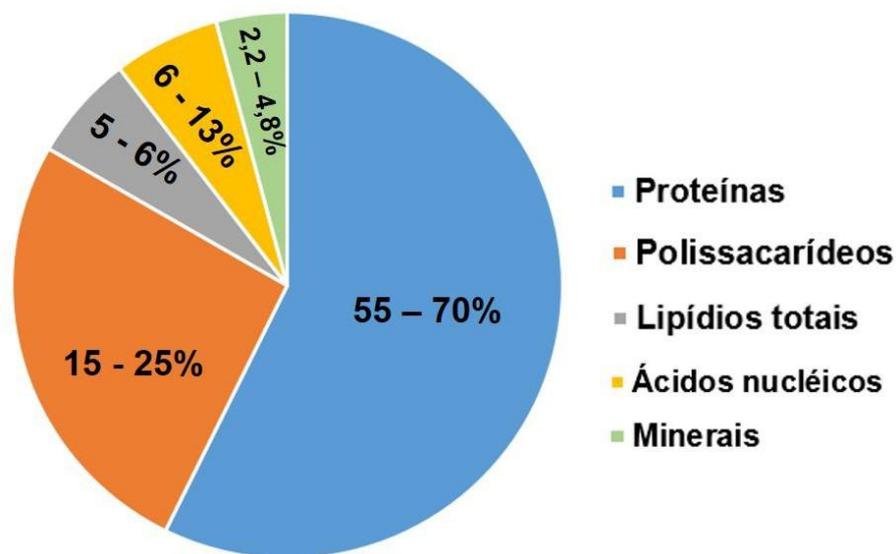
Fonte: sciencelearn.org.nz (Acesso em: 08/09/2024)

Imagem microscópica detalhada da morfologia externa da *Spirulina platensis*, evidenciando sua característica estrutura filamentoza helicoidal, esta organização formada por uma única camada de células cilíndricas, é responsável pela sua estabilidade estrutural.

A análise fitoquímica revelou que SP possui diversos componentes essenciais que caracterizam o superalimento ideal, como polissacarídios (15–20%), proteínas (60–70%), carboidratos, ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais, clorofila e β -caroteno (Figura 12) (Chaiklahan *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2022). Por essa razão, SP é amplamente reconhecida como um suplemento alimentar nutracêutico ao redor do mundo, com destaque especial no México e na África (Sibiya *et al.*, 2022). No Brasil é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como novo alimento desde 2013 e, a partir de 2017, foi incluída na lista de alimento funcional (Brasil, 2013; Brasil, 2017).

Entre os ácidos graxos insaturados, que compõem 1,5 a 2,0% do total lipídico, destacam-se o ácido γ -linolênico (GLA, representando 30-35% do total), o ácido estearidônico (SDA), o ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido araquidônico (AA). Além disso, as algas têm um baixo teor de colesterol (32,5 mg/100 g) e são de fácil digestão, com uma digestibilidade de até 90%, devido à ausência de celulose em suas paredes celulares (Belay, 2002; El-Sheekh; Hamad; Gomaa, 2014; Habib *et al.*, 2008; Reboleira *et al.*, 2019).

Figura 12 – Constituintes da *Spirulina platensis*.



Fonte: Adaptado de Hosseini *et al.*, 2013.

As ficobiliproteínas, como a ficocianina-C e a aloficocianina, estão presentes em quantidades expressivas na fração proteica da alga, compondo cerca de 20 a 25% do peso seco total, elas desempenham papéis importantes em várias funções biológicas e farmacológicas benéficas, tais como atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, antiangiogênicas, neuroprotetoras e de controle da obesidade, além disso, a ficocianobilina na *Spirulina* age como um potente inibidor da NOX, ajudando na eliminação de radicais livres e na redução de radicais oriundos das EROs, assim como radicais hidroxila, peroxila, hipoclorito e peroxinitrito (Romay *et al.*, 2003; Serban *et al.*, 2016; Shokri *et al.*, 2014; Liwa *et al.*, 2017 Reboleira *et al.*, 2019).

A C-ficocianina possui um potente efeito antioxidante e anti-inflamatório, demonstrado em estudos que apontam sua capacidade de preservar as membranas

celulares e reduzir o estresse oxidativo, principalmente em transplantes de fígado. Ela inibe a formação de espécies reativas de oxigênio, aumenta os níveis de grupos tiol, e melhora a atividade da fosfatase alcalina, especialmente em concentrações mais elevadas. Além disso, a C-ficocianina inibe a enzima COX-2 e mediadores inflamatórios, como o TNF- α , sendo eficaz na redução da hiperalgisia inflamatória, destacando seu potencial como agente analgésico em condições inflamatórias (Shih *et al.*, 2009; Lemos *et al.*, 2020; Dias, 2021).

O ácido γ -linolênico (GLA) é um ácido graxo poli-insaturado bioativo que, após ser metabolizado no organismo, é convertido em ácido di-homo- γ -linolênico (DGLA) e posteriormente em ácido araquidônico (AA), esses compostos são precursores de eicosanoides de diferentes séries, desempenhando papéis importantes na modulação de processos fisiológicos. O GLA influencia a expressão gênica de funções imunológicas, promove a apoptose celular e exerce efeitos inibitórios sobre o ciclo celular em células tumorais, além disso, a suplementação dietética com GLA tem mostrado benefícios na melhoria do perfil lipídico, tanto no sangue quanto na pele, além de contribuir para a prevenção de condições inflamatórias e outras doenças relacionadas (Kapoor; Huang, 2006; Guil-Guerrero, 2007; Kawamura *et al.*, 2011; Tso *et al.*, 2012; Tasset-Cuevas *et al.*, 2013).

As principais fontes naturais de GLA são os lipídios das membranas fotossintéticas de algumas plantas, como as sementes de borragem e primula, além de algas verde-azuladas, como *Spirulina platensis* e *Nostoc commune*. Estudos indicam que o GLA, pode reduzir o estresse oxidativo e inflamações ao inibir as vias de citocinas inflamatórias, sendo eficaz no tratamento de doenças como artrite e asma, sendo amplamente valorizado como suplemento dietético por suas propriedades terapêuticas, sendo útil na prevenção e tratamento de condições como câncer, diabetes, infecções virais e obesidade. Além disso, extratos de GLA da SP têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antialérgicos, favorecendo a cicatrização de feridas em modelos animais (O'donovan; Fernandes, 2000; Novak *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2021).

Células que absorvem quantidades aumentadas de GLA integram esse ácido graxo em suas membranas fosfolipídicas e posteriormente, ele é hidrolizado pela enzima PLA₂, sendo transformado em eicosanoides através da ação da COX-2, essa enzima é responsável por gerar PGs e prostaciclina, e também converte o AA em eicosanoides da série 2, como a PGE₂. O AA livre pode ser metabolizado em diversos

compostos, incluindo prostaglandinas e hidroperoxieicosatetraenoicos, por meio das enzimas COX, LOX e epoxigenases CYP450. No entanto, o GLA compete com o AA e, ao ser metabolizado pela COX-2 (Colquhoun *et al.*, 2009; Hawcroft *et al.*, 2012; Ensign *et al.*, 2013).

2.8.1 *Spirulina platensis* e músculo liso

A SP é conhecida por possuir amplos efeitos capazes de melhorar a saúde, alguns estudos demonstram que a alga tem papel importante na redução dos triglicerídios e da glicose, além de possuir efeitos anticâncer e anti-inflamatórios (Panday *et al.*, 2015). Sendo assim, o laboratório de Farmacologia Funcional tem se dedicado ao estudo dessa alga e de seus diversos efeitos na musculatura lisa, destacando suas propriedades farmacológicas em modelos experimentais.

No que diz respeito ao efeito da SP no músculo liso, estudos mostraram que a suplementação com essa alga: diminui o estresse oxidativo e aumenta a capacidade de relaxamento em aorta de ratos (Brito *et al.*, 2019); melhora a biodisponibilidade de NO e reduz a inflamação em tecido de corpo cavernoso de ratos obesos (Diniz *et al.*, 2020); em ratas submetidas ao protocolo de treinamento de força previne o aumento do estresse oxidativo (Ferreira *et al.*, 2021) e hipercontratilidade uterina (Barros, 2021); além de impedir a redução da contratilidade intestinal (Diniz *et al.*, 2021), reduzindo a inflamação e melhorando as defesas antioxidantes do íleo (Diniz *et al.*, 2024).

Lacerda-Junior (2022) desenvolveu um modelo experimental de DisP que reproduziu os sinais clínicos da doença em estudos *in vivo*, estes que foram atenuados pelas drogas padrão empregadas na prática clínica. Além disso, o modelo evidenciou hipercontratilidade uterina e aumento do estresse oxidativo em estudos *in vitro*, aspectos chave na fisiopatologia da DisP.

A avaliação dos efeitos da suplementação com SP por dias alternados em ratas com DisP, revelou que a alga preveniu o aumento das contorções uterinas *in vivo*; reduziu o crescimento da camada miometrial e os danos na camada endometrial; não influenciou a maturação dos folículos ovarianos; evitou o aumento da contratilidade uterina no acoplamento farmacomecânico e eletromecânico; preveniu a diminuição do relaxamento nesses acoplamentos; e reduziu o estresse oxidativo no útero e nos ovários (Lacerda-Junior, 2022).

Sendo assim, a *Spirulina platensis* demonstra-se como uma substância

promissora para prevenir alterações ocasionadas pela DisP, com base nisso este trabalho objetiva-se em investigar o efeito da SP através de sua administração diária, afim de mimetizar o uso da alga por seres humanos, além do seu mecanismo de ação preventivo sobre o aumento da reatividade contrátil farmacomecânica do músculo liso uterino em ratas Wistar.

3 Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o efeito da suplementação a *Spirulina platensis* sobre a contratilidade de útero de ratas submetidas a modelo de DisP

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos da DisP e da suplementação de ratas Wistar com *S. platensis* sobre a resposta contrátil uterina à ocitocina em relação à(s):

- ✓ Via das ciclo-oxigenases;
- ✓ Via do óxido nítrico;
- ✓ Vias de formação e metabolização das espécies reativas de oxigênio.

4 Material e métodos

4.1. Material

4.1.1 Produto teste

A *Spirulina platensis* foi adquirida do laboratório INFINITY Pharma (Hong Kong – China lote nº 17J11-B004-020541). Uma amostra foi fracionada e certificada pela Farmácia de Manipulação Roval - lote nº 20121025 (João Pessoa-PB).

4.1.2 Animais

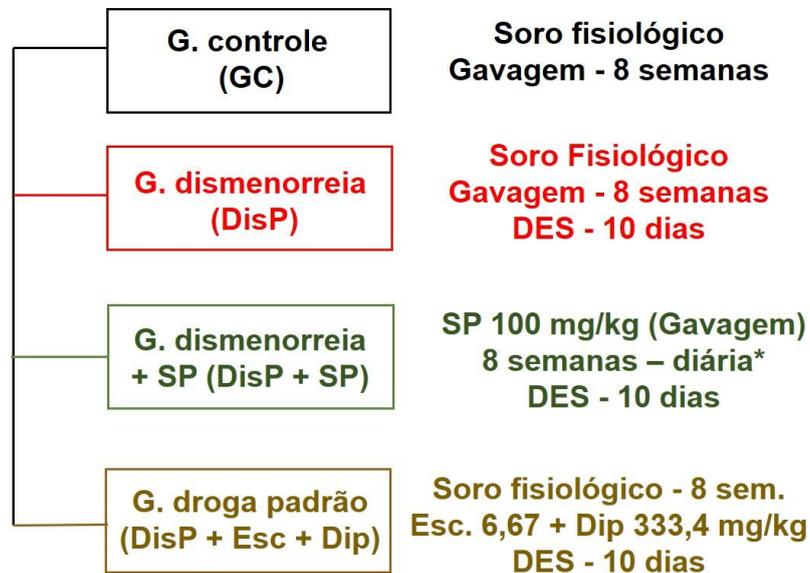
Eram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens provenientes da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e mantidas na Unidade de Produção Animal da UFPB (UPA/UFPB), com oito semanas de idade e pesando $209,4 \pm 5,6$ g. Antes dos experimentos, os animais recebiam uma dieta balanceada em forma de *pellets* (marca Nuvilab®) com acesso ilimitado a água. Eram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (21 ± 1 °C), ventilação adequada e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 06 às 18 h. Foram utilizados um total de 57 animais para realização dos experimentos.

Os experimentos eram realizados das 08 às 20 h. Todas as práticas experimentais seguiam o “*Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies*” (Sherwin et al., 2003) e 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). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFPB, sob o número 408031012 (Anexo 3).

4.1.3 Grupos experimentais

As ratas eram separadas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: (1) controle (GC); (2) ratas com dismenorreia primária (DisP); (3) ratas com DisP e suplementadas *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg (DisP + SP), (4) ratas com DisP e tratadas com as drogas padrão escopolamina + dipirona nas concentrações de 6,67 e 333,4 mg/mL, respectivamente (DisP + Esc + Dip) (Figura 13).

Figura 13. Grupos experimentais

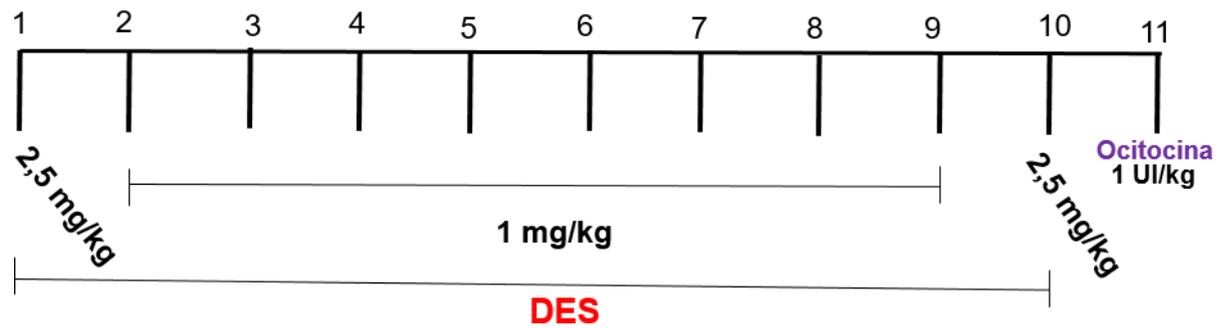


4.1.4 Protocolo de indução da dismenorrea primária

O dietilestilbestrol (DES) foi diluído em álcool absoluto para obtenção da solução mãe de 10 mg/mL. Em seguida, foi preparada uma solução de 1 mg/mL em salina. Para o preparo de 1 mL era retirado 0,1 mL da solução mãe de DES e adicionado em 0,1 mL de polissorbato 80 e, em seguida, era adicionado salina (NaCl 0,9% m/v) q.s.p 1 mL, seguido de agitação em vórtex.

Para induzir a dismenorrea primária, as ratas recebiam injeções subcutâneas de dietilestilbestrol uma vez ao dia durante 10 dias consecutivos. A dose era de 2,5 mg/kg no 1º e 10º dias e de 1 mg/kg do 2º ao 9º dias. 24 horas após a última injeção do hormônio, era administrada ocitocina por via intraperitoneal na dose de 1 UI/kg (Figura 14) (Lacerda-Junior, 2022).

Figura 14 - Protocolo da indução da dismenorreia primária em ratas



Fonte: Autor, 2024

Os animais do grupo controle receberam soro fisiológico (NaCl 0,9% m/v) durante todo o período de tratamento e, 24 horas antes do experimento, era administrado 1 mg/kg de dietilestilbestrol para padronizar o ciclo estral na fase de estro. Já os animais tratados com os fármacos-padrão receberam por via oral, pela técnica de gavagem, uma combinação de butilbrometo de escopolamina e dipirona uma hora antes da injeção de ocitocina.

As ratas com dismenorreia primária e suplementadas com *Spirulina platensis* receberam a alga na dose de 100 mg/kg (DisP + SP100), durante 8 semanas por via oral, pela técnica de gavagem. Nos últimos 10 dias, a dismenorreia primária foi induzida (Lacerda-Júnior, 2022). Após os tratamentos, os animais eram eutanasiados com uma sobredose dos anestésicos cetamina (180 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) (BRASIL, 2018).

4.1.5 Preparo e administração da *Spirulina platensis*

O pó de *Spirulina platensis* era suspenso diariamente em soro fisiológico (NaCl 0,9%) para preparar a dose de 100 mg/kg. Essa dose era administrada às ratas logo após ser preparada (Ferreira *et al.*, 2021). A suplementação era realizada ao longo de um período de oito semanas (Modificado de Lacerda-Junior, 2022).

A administração oral ocorria por meio da técnica de gavagem, das 12h às 14h, com o auxílio de agulhas de aço inoxidável para gavagem (modelo BD-12, Insight, Ribeirão Preto, SP) e seringas descartáveis de 5 mL com uma precisão de 0,2 mL (marca BD, Higilab, João Pessoa, PB).

4.1.6 Substâncias e reagentes

O ácido clorídrico (HCl), o bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O), cloreto de magnésio di-hidratado (MgCl₂.2H₂O), cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), glicose e, o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Êxodo Científica (Brasil). O dietilestilbestrol foi obtido da Sigma-Aldrich (Brasil). A apocinina, o cloridrato de *N*_ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), indometacina e o tempol, foram adquiridos da Cayman Chemical Company (EUA), eram mantidos em um “freezer” à temperatura de -20 °C, solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o dietilestilbestrol, que era dissolvido em álcool etílico absoluto para obtenção da solução-estoque. Caso necessário, essas soluções-estoque eram diluídas.

4.1.7 Solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada era a Locke Ringer (Revuelta; Catabrana; Hidalgo, 1997), ajustada ao pH 7,4 com uma solução de HCl ou NaOH 1M, aerada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 32 °C, cuja composição está descrita abaixo:

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

4.1.8 Aparelhos

Para registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados, modelo BOI-04 e conectados à transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F.

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

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

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do útero isolado de rata

Após a eutanásia das ratas, conforme descrito na seção 4.1.4, a cavidade abdominal era aberta com um corte longitudinal, o útero era removido e cuidadosamente limpo de qualquer tecido conjuntivo ou adiposo. Em seguida, os dois cornos uterino eram separados por meio de uma incisão abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva de Locke Ringer, mantidas a 32 °C e aerada com carbogênio.

O órgão era mantido sob tensão de repouso de 1 g por 40 minutos, tempo necessário para estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (Revuelta; Cantabrana; Hidalgo, 1997).

Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. Decorridos 15 minutos, era induzida uma contração com concentrações cumulativas de ocitocina (10^{-6} - 3×10^{-1} UI).

A reatividade do útero era calculada pela determinação do efeito máximo (E_{max}), de acordo com a amplitude máxima da resposta contrátil do útero, e do logaritmo negativo na base 10 da concentração que a ocitocina produz 50% do seu efeito máximo (pCE_{50}).

4.2.2 Efeitos da suplementação com *Spirulina platensis* sobre as contrações induzidas por ocitocina em útero de ratas com DisP

O útero era suspenso em cubas de banho para órgão isolado, como descrito no item 4.2.1 e, após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas cumulativas concentração-resposta consecutivas à ocitocina (10^{-6} – 3×10^{-1} UI).

A resposta contrátil do útero era calculada com base na amplitude média da curva obtida no grupo GC. A reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina entre os grupos GC, DisP, DisP + SP100 e DisP + Esc + Dip.

4.2.3 Investigação da participação da via das COX na contração uterina

O útero era suspenso em cubas de banho para órgão isolado, como descrito no item 4.2.1 e, após o período de estabilização, a indometacina, um inibidor não seletivo da COX na concentração de 10^{-5} M, era incubado por 20 minutos (Cartledge; Eardley; Morrison, 2000). Em seguida, eram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina (10^{-6} – 3×10^{-1} UI) na ausência e na presença do inibidor.

A resposta contrátil do útero na presença do inibidor foi calculada de acordo com a curva na ausência do inibidor. A reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina, na ausência e na presença dos inibidores, e comparada entre os grupos GC, DisP e DisP+SP100.

4.2.4 Investigação da participação do radical superóxido (SOD)

O útero era suspenso em cubas de banho para órgão isolado, como descrito no item 4.2.1 e, após o período de estabilização, foi incubado, por 20 minutos, o tempol (10^{-3} M), um sequestrador do radical superóxido e, em seguida, foram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença do tempol.

A resposta contrátil do útero na presença dos inibidores foi calculada com base na amplitude média da curva obtida na ausência do bloqueador, em cada grupo, e a reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina, na ausência e na presença do inibidor, e comparada entre os grupos.

4.2.5 Investigação da participação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) na DisP

O útero era suspenso em cubas de banho para órgão isolado, como descrito no item 4.2.1 e, após o período de estabilização, foi incubado, por 20 minutos, a apocinina (10^{-4} M), inibidora da NADPH oxidase (Côco *et al.*, 2016) em preparações distintas e, em seguida, foram induzidas curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina, na ausência e na presença do inibidor.

A resposta contrátil do útero na presença dos inibidores foi calculada com base

na amplitude média da curva obtida na ausência do bloqueador, em cada grupo, e a reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina, na ausência e na presença do inibidor, e comparada entre os grupos.

4.2.6 Investigação da participação da via do óxido nítrico (NO)

O útero era suspenso em cubas de banho para órgão isolado, como descrito no item 4.2.1 e, após o período de estabilização, foi incubada, por 20 minutos, o L-NAME (10^{-4} M), um inibidor não seletivo da NOS (Vignozzi *et al.*, 2006) e, em seguida, foram induzidas curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença do inibidor.

A resposta contrátil do útero na presença dos inibidores foi calculada com base na amplitude média da curva obtida na ausência do bloqueador, em cada grupo, e a reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e de pCE_{50} da ocitocina, na ausência e na presença do inibidor, e comparada entre os grupos.

4.2.7 Análises estatísticas

para verificar a distribuição normal foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, os resultados, então foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e os dados foram analisados estatisticamente usando o teste t (não pareado) ou análise de variância de um fator (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. Diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A reatividade contrátil do útero das ratas foi avaliada através da determinação do efeito máximo (E_{max}) e do pCE_{50} da ocitocina, comparando os resultados dos animais com dismenorreia primária com o grupo controle.

Os valores de E_{max} foram obtidos pela média das percentagens máximas de contração. Já os valores de pCE_{50} foram calculados por regressão não linear. Todos os dados foram analisados com o software GraphPad Prism® versão 8.0.1 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

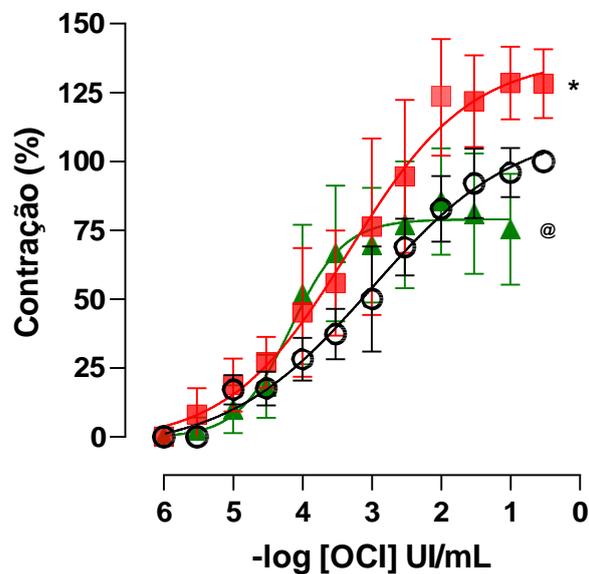
5 Resultados

5.1 Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas com DisP

Observou-se que a curva de contração da ocitocina do grupo DisP foi deslocada para a esquerda, indicando aumento da potência contrátil ($pCE_{50} = 3,36 \pm 0,20$), e houve aumento do efeito máximo ($E_{max} = 130,8 \pm 5,98\%$) da ocitocina quando comparado com o GC ($E_{max} = 100\%$, $pCE_{50} = 3,14 \pm 0,14$), apresentando diferença significativa entre os dois grupos (Gráfico 1 e Tabela 2).

Quando os animais eram suplementados com a *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg (Disp + SP), a alga preveniu o aumento da potência e eficácia contrátil da ocitocina ($pCE_{50} = 3,64 \pm 0,15$; $E_{max} = 87,6 \pm 8,36\%$) quando comparado ao DisP (Gráfico 1 e Tabela 2), os grupos apresentaram diferença significativa em relação à eficácia contrátil. No grupo DisP + Esc + Dip ($E_{max} = 105,8 \pm 8,43\%$, $pCE_{50} = 3,84 \pm 0,14$), não houve diferença estatística quando comparado aos demais grupos (Gráfico 2 e tabela 2).

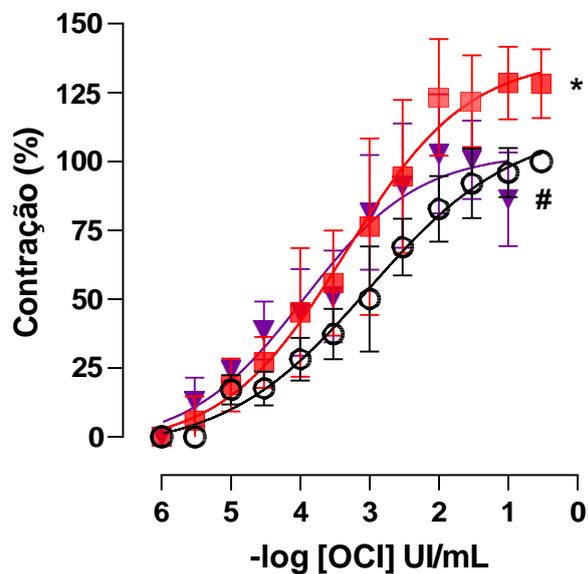
Gráfico 1 - Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas em GC (○), DisP (■), DisP + SP (▲)



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n=5). ANOVA *one-way*, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP). @ $p < 0,05$ (DisP + SP vs. DisP). GC = grupo controle; DisP = grupo com dismenorrea primária; DisP + SP = grupo com dismenorrea primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg.

Fonte: Autor, 2024.

Gráfico 2 - Efeito da suplementação alimentar com *Spirulina platensis* sobre as curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina em útero isolado de ratas em GC (○), DisP (■) e DisP + Esc + Dip (▼).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n=5). ANOVA *one-way*, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ (GC vs. DisP). # $p < 0,05$ (DisP + Esc + DisP vs. DisP). GC = grupo controle; DisP = grupo com dismenorrea primária; DisP + Esc + Dip = grupo com dismenorrea primária e tratado com a droga padrão (escopolamina + dipirona 1,2 mg/kg).

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 2 - Valores de E_{max} e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata em GC, DisP, DisP + SP e DisP + DP.

Grupos	E_{max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,14 ± 0,14
DisP	130,8 ± 5,98*	3,36 ± 0,20
DisP + SP	87,6 ± 8,36 [@]	3,64 ± 0,15
DisP + Esc + Dip	105,8 ± 8,43 [#]	3,84 ± 0,14

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ (GC vs DisP); [@] $p < 0,05$ (DisP vs. DisP + SP) [#] $p < 0,05$ (DisP vs. DisP + Esc + Dip), (n = 5). GC = grupo controle; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + SP = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg; DisP + Esc + Dip = grupo com dismenorreia primária e tratados com a droga padrão (escopolamina + dipirona 1,2 mg/kg).

Fonte: Autor, 2024.

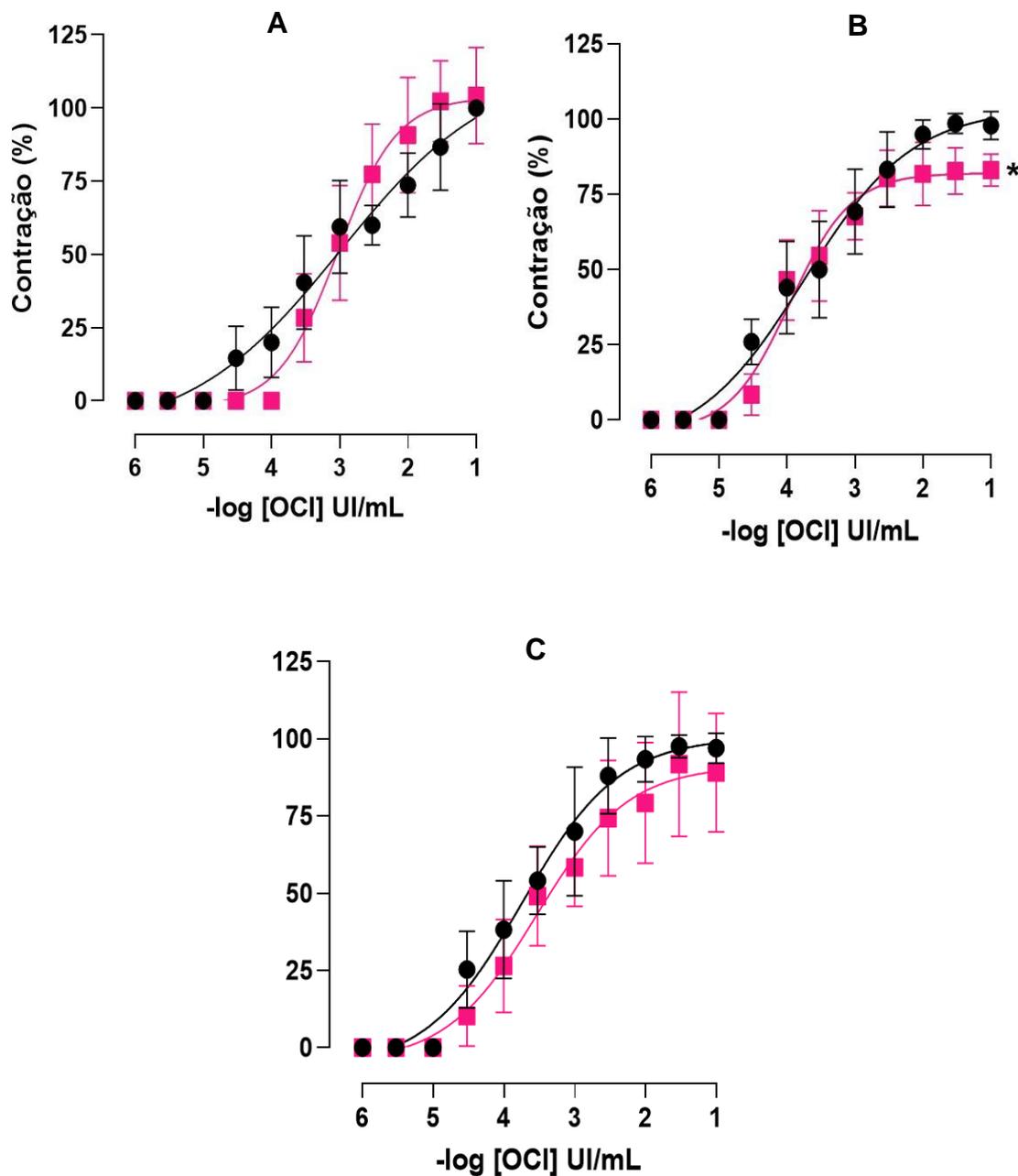
5.2 Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença da indometacina em útero isolado de ratas

Não houve diferença significativa entre as curvas cumulativas de contração da ocitocina com relação aos parâmetros de eficácia e potência na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,05 \pm 0,2$, respectivamente) e na presença ($E_{\max} = 105 \pm 7,2\%$; $pCE_{50} = 2,96 \pm 0,06$, respectivamente) da indometacina no GC (Gráfico 3 e Tabela 3).

No grupo DisP houve uma diminuição significativa da eficácia contrátil da ocitocina, mas não da potência, na presença da indometacina ($E_{\max} = 83,1 \pm 3,4\%$; $pCE_{50} = 3,87 \pm 0,2$, respectivamente) quando comparado à curva desse mesmo grupo na ausência desse inibidor ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,61 \pm 0,2$, respectivamente) (Gráfico 3 e Tabela 3).

Por sua vez, no grupo DisP + SP100, observou-se que as curvas de contração à ocitocina foram sobrepostas na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,6 \pm 0,1$) e na presença ($E_{\max} = 92,0 \pm 10,4\%$; $pCE_{50} = 3,48 \pm 0,2$) da indometacina, sem alteração da eficácia e da potência contrátil da ocitocina, sem diferença significativa entre as duas curvas (Gráfico 3 e Tabela 3).

Gráfico 3 – Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência (●) e na presença (■) da indometacina em útero isolado de ratas; (A) GC; (B) DisP; (C) DisP + SP.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5). Teste *t* de student. **p* < 0,05 (curva na ausência vs. curva na presença da indometacina).

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 3 - Valores de E_{max} e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + indometacina, DisP, DisP + indometacina, DisP + SP e DisP + SP + indometacina.

Grupos	$E_{máx}(\%)$	pCE_{50}
GC	100	3,05 ± 0,2
GC + indometacina	105 ± 7,2	2,96 ± 0,06
DisP	100	3,61 ± 0,2
DisP + indometacina	83,1 ± 3,4*	3,87 ± 0,2
DisP + SP	100	3,60 ± 0,1
DisP + SP + indometacina	92,0 ± 10,4	3,48 ± 0,2

Test t * $p < 0,05$ (DisP vs DisP + indometacina), (n=5). GC = grupo controle; GC + indometacina = grupo controle na presença de inibidor; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + indometacina = grupo com dismenorreia primária na presença do inibidor; DisP + SP = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg; DisP + SP + indometacina = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg na presença do inibidor.

Fonte: Autor, 2024

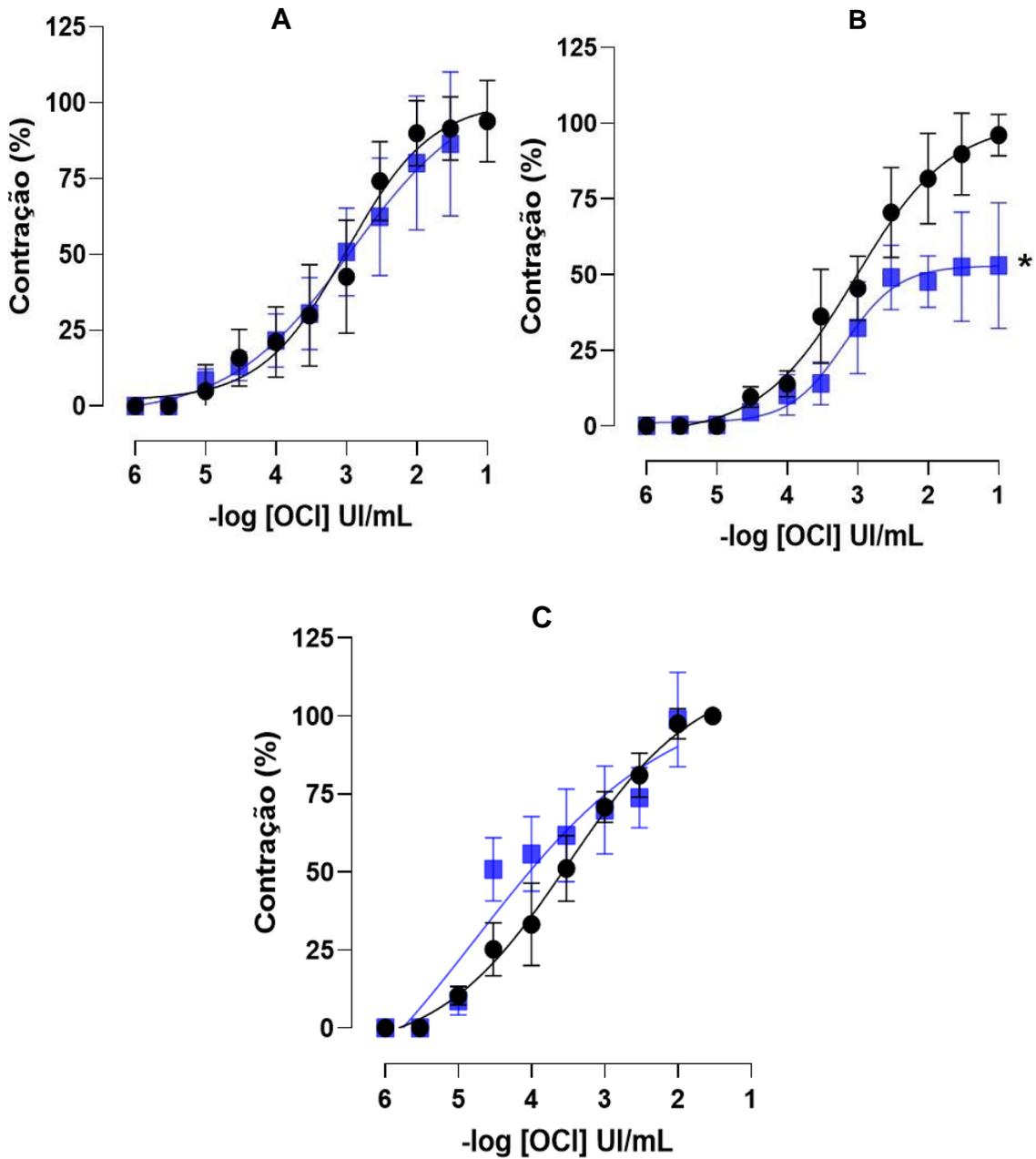
5.3 Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença do tempol em útero isolado de ratas

Não houve diferença entre as curvas cumulativas de contração da ocitocina com relação aos parâmetros de eficácia e potência na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,1 \pm 0,1$, respectivamente) e na presença ($E_{\max} = 86,4 \pm 10,6\%$; $pCE_{50} = 3,30 \pm 0,17$) do tempol no GC (Gráfico 4 e Tabela 4).

No grupo DisP houve uma diminuição da eficácia contrátil da ocitocina, mas não da potência, na presença do tempol ($E_{\max} = 52,8 \pm 8,06\%$; $pCE_{50} = 3,22 \pm 0,1$) quando comparado à curva na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 2,95 \pm 0,15$) (Gráfico 4 e Tabela 4).

Por sua vez, no grupo DisP + SP100, observou-se que as curvas de contração à ocitocina foram sobrepostas na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,60 \pm 0,1$) e na presença ($E_{\max} = 98,8 \pm 6,8\%$; $pCE_{50} = 3,97 \pm 0,16$) do tempol, sem alteração da eficácia e da potência contrátil da ocitocina (Gráfico 4 e Tabela 4).

Gráfico 4 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência (●) e na presença (■) do tempol em útero isolado de ratas; (A) GC; (B) DisP; (C) DisP + SP



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5), Teste $t^*p < 0,05$ (curva na ausência vs. curva na presença do tempol).

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 4 - Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + tempol, DisP, DisP + tempol, DisP + SP e DisP + SP + tempol.

Grupos	$E_{m\acute{a}x}(\%)$	pCE_{50}
GC	100	$3,10 \pm 0,10$
GC + tempol	$86,4 \pm 10,6$	$3,30 \pm 0,17$
DisP	100	$2,95 \pm 0,15$
DisP + tempol	$52,8 \pm 8,06^*$	$3,22 \pm 0,10$
DisP + SP	100	$3,60 \pm 0,10$
DisP + SP + tempol	$98,8 \pm 6,8$	$3,97 \pm 0,16$

Test *t* de *student* * $p < 0,05$ (DisP vs DisP + tempol), (n=5). GC = grupo controle; GC + tempol = grupo controle na presença de mimético; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + tempol = grupo com dismenorreia primária na presença do mimético; DisP + SP = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg; DisP + SP + tempol = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg na presença do mimético.

Fonte: Autor, 2024

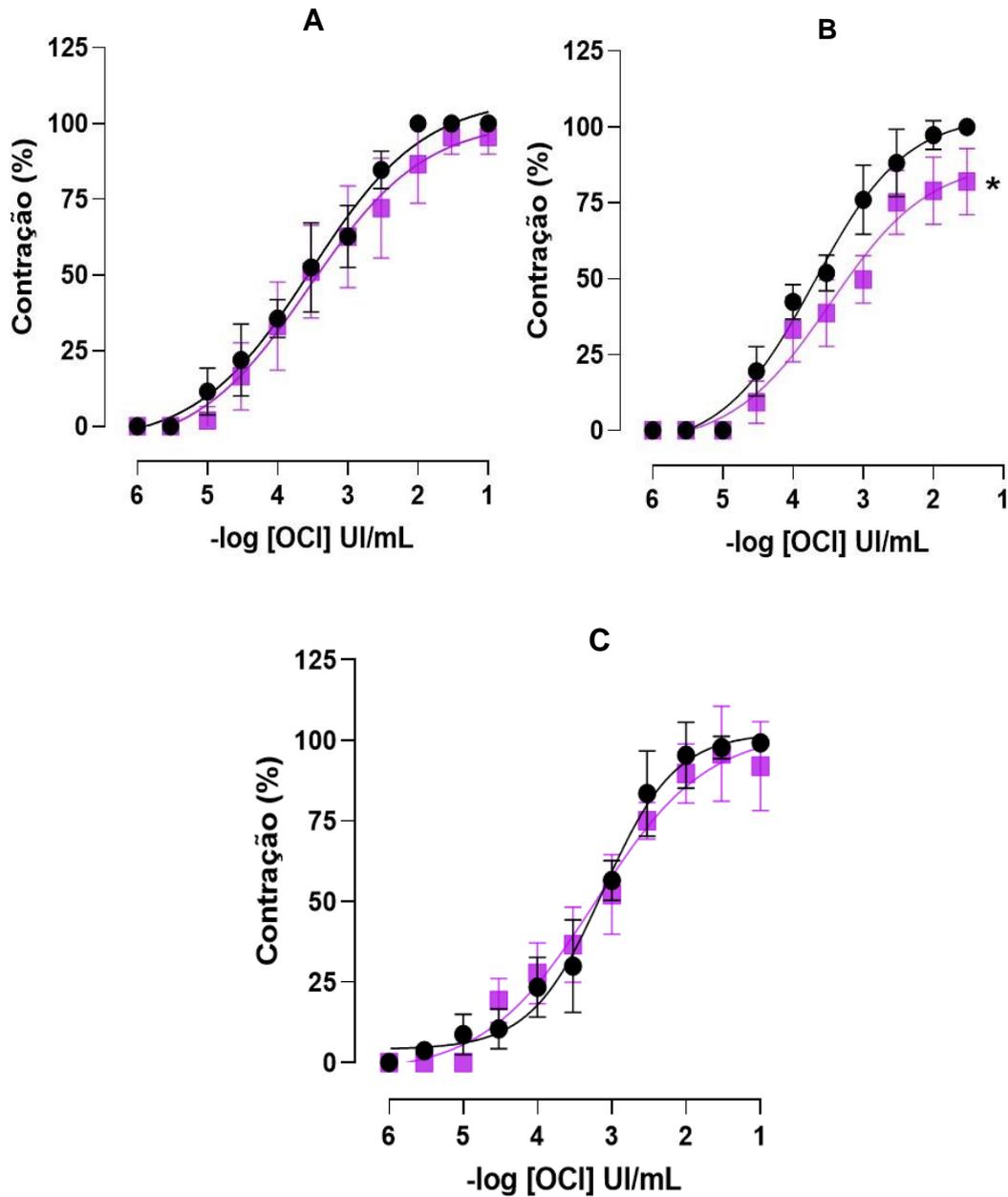
5.4 Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença da apocinina em útero isolado de ratas

Não houve diferença entre as curvas cumulativas de contração da ocitocina com relação aos parâmetros de eficácia e potência na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,54 \pm 0,06$; respectivamente) e na presença ($E_{\max} = 95,9 \pm 2,5\%$; $pCE_{50} = 3,45 \pm 0,14$) da apocinina no GC (Gráfico 5 e Tabela 5).

No grupo DisP houve uma diminuição da eficácia contrátil da ocitocina, mas não da potência, na presença da apocinina ($E_{\max} = 81,98 \pm 4,9\%$; $pCE_{50} = 3,51 \pm 0,09$) quando comparado à curva na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,64 \pm 0,06$) (Gráfico 5 e Tabela 5).

Por sua vez, no grupo DisP + SP100, observou-se que as curvas de contração à ocitocina foram sobrepostas na ausência ($E_{\max} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,23 \pm 0,10$) e na presença ($E_{\max} = 95,8 \pm 6,5\%$; $pCE_{50} = 3,31 \pm 0,17$) da apocinina, sem alteração da eficácia e da potência contrátil da ocitocina (Gráfico 5 e Tabela 5).

Gráfico 5 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência (●) e na presença (■) da apocinina em útero isolado de ratas; (A) GC; (B) DisP; (C) DisP + SP.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5), Teste $t^*p < 0,05$ (curva na ausência vs. curva na presença da apocinina).

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 5 - Valores de E_{\max} e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + apocinina, DisP, DisP + apocinina, DisP + SP e DisP + SP + apocinina.

Grupos	E_{\max} (%)	pCE_{50}
GC	100	3,54 ± 0,06
GC + apocinina	95,9 ± 2,5	3,45 ± 0,14
DisP	100	3,64 ± 0,06
DisP + apocinina	81,9 ± 4,9*	3,51 ± 0,09
DisP + SP	100	3,23 ± 0,10
DisP + SP + apocinina	95,8 ± 6,5%	3,31 ± 0,17

Test t * $p < 0,05$ (DisP vs DisP + apocinina), (n=5). GC = grupo controle; GC + apocinina = grupo controle na presença de inibidor; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + apocinina = grupo com dismenorreia primária na presença do inibidor; DisP + SP = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg; DisP + SP + apocinina = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg na presença do inibidor.

Fonte: Autor, 2024

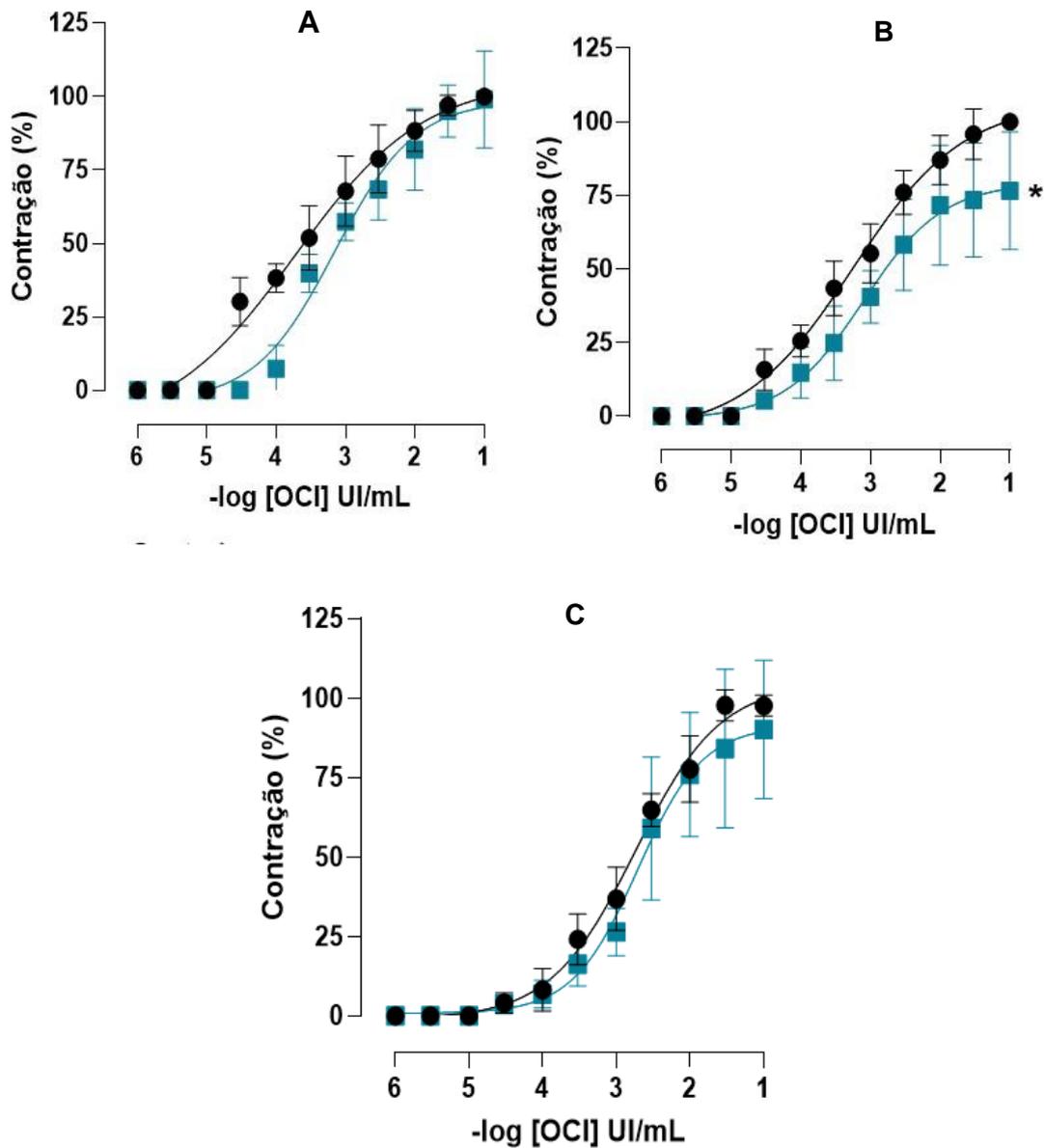
5.5 Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência e na presença do L-NAME em útero isolado de ratas

Não houve diferença entre as curvas cumulativas de contração da ocitocina com relação aos parâmetros de eficácia e potência na ausência ($E_{\text{máx}} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,56 \pm 0,10$, respectivamente) e na presença ($E_{\text{max}} = 99 \pm 7,32\%$; $pCE_{50} = 3,08 \pm 0,13$) do L-NAME no GC (Gráfico 6 e Tabela 6).

No grupo DisP houve uma diminuição da eficácia contrátil da ocitocina, mas não da potência, na presença do L-NAME ($E_{\text{max}} = 76,4 \pm 9,03 \%$; $pCE_{50} = 3,14 \pm 0,09$) quando comparado à curva na ausência ($E_{\text{max}} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,25 \pm 0,07$) (Gráfico 6 e Tabela 6).

Por sua vez, no grupo DisP + SP, observou-se que as curvas de contração à ocitocina foram sobrepostas na ausência ($E_{\text{max}} = 100\%$; $pCE_{50} = 3,56 \pm 0,10$) e na presença ($E_{\text{max}} = 91,6 \pm 9,07\%$; $pCE_{50} = 3,69 \pm 0,10$) do L-NAME, sem alteração da eficácia e da potência contrátil da ocitocina (Gráfico 6 e Tabela 6).

Gráfico 6 - Efeito da dismenorreia primária e/ou da suplementação com *S. platensis* sobre a curva cumulativa de ocitocina na ausência (●) e na presença (■) do L-NAME em útero isolado de ratas; (A) GC; (B) DisP; (C) DisP + SP



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5), Teste $t^*p < 0,05$ (curva na ausência vs. curva na presença da apocinina).

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 6 - Valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pCE_{50} de ocitocina em útero isolado de rata, nos GC, GC + L-NAME DisP, DisP + L-NAME, DisP + SP e DisP + SP + L-NAME.

Grupos	$E_{m\acute{a}x}(\%)$	pCE_{50}
GC	100	$3,56 \pm 0,10$
GC + L-NAME	$99 \pm 7,32$	$3,08 \pm 0,13$
DisP	100	$3,25 \pm 0,07$
DisP + L-NAME	$76,4 \pm 9,03^*$	$3,14 \pm 0,09$
DisP + SP	100	$3,56 \pm 0,10$
DisP + SP + L-NAME	$91,6 \pm 9,07$	$3,69 \pm 0,10$

Test $t^*p < 0,05$ (DisP vs DisP + L-NAME), (n=5). GC = grupo controle; GC + L-NAME = grupo controle na presença de inibidor; DisP = grupo com dismenorreia primária; DisP + L-NAME = grupo com dismenorreia primária na presença do inibidor; DisP + SP = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg; DisP + SP + L-NAME = grupo com dismenorreia primária e suplementado com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg na presença do inibidor.

Fonte: Autor, 2024

6 Discussão

Neste estudo, o modelo de DisP foi induzido por meio da administração do dietilestilbestrol durante 10 dias em ratas, o que resultou em uma hipercontratibilidade uterina, sendo possível observar que o mecanismo fisiopatológico envolvido na DisP provavelmente está associado ao aumento de prostanoídes contráteis, ao aumento da produção de O_2^- e NO gerando, provavelmente, o $ONOO^-$, causando assim por estes mecanismos o aumento da contração uterina.

Essa hipercontratibilidade uterina foi prevenida quando os animais com DisP foram suplementados com *Spirulina platensis*, na dose de 100 mg/kg. Seu mecanismo de ação envolve uma possível diminuição da produção de prostanoídes contráteis, além da sua atuação numa provável modulação negativa da NADPH oxidase e sequestro do radical superóxido, e reduzindo a atividade da NOS, que possivelmente levaria à diminuição da formação de $ONOO^-$ e, conseqüentemente, a hipercontratibilidade uterina na DisP.

A fisiopatologia da DisP é atribuída, principalmente, ao aumento da produção de prostaglandinas, que provocam contrações excessivas no miométrio, levando à isquemia e hipóxia do músculo liso uterino, causando dor. Esse quadro é semelhante às contrações uterinas induzidas por prostaglandinas durante o parto, com observações do aumento de prostaglandinas no fluido menstrual de mulheres com DisP (Guimarães; Póvoa, 2020).

Em útero de ratas Wistar com DisP, Lacerda-Júnior (2022) observou que houve um aumento da reatividade contrátil para o agonista ocitocina, enquanto a suplementação por dias alternados com a *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg promoveu uma prevenção do aumento da eficácia contrátil da ocitocina.

Diferentemente do que foi feito por Lacerda-Junior (2022), e a fim de mimetizarmos a frequência de uso da SP, como suplemento alimentar em seres humanos, a administração diária foi adotada para garantir a manutenção dos níveis de nutrientes e compostos bioativos no organismo, conforme descrito por estudos que demonstram os efeitos positivos da suplementação diária em parâmetros como inflamação e estresse oxidativo (Khan *et al.*, 2005). De acordo com os resultados, os animais com DisP apresentaram uma maior hipercontratibilidade uterina quando comparados aos animais do grupo controle (Gráfico 1 e tabela 2), quando os animais

com DisP receberam a suplementação diária com SP, os resultados mostraram que provavelmente, a SP previne totalmente as alterações ocasionadas pela DisP.

A partir dos resultados prévios de Lacerda-Júnior (2022), decidiu-se prosseguir com a avaliação das alterações causadas pela DisP e a prevenção desses efeitos com a suplementação alimentar com *S. platensis* na dose de 100 mg/kg, realizando curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença de ferramentas farmacológicas envolvidas nas vias de sinalização da inflamação, do estresse oxidativo e do óxido nítrico.

De acordo com Nagy e Khan (2022), a produção excessiva de prostanoídes na camada endometrial é um fator chave para a DisP, tendo destaque principal a $PGF_{2\alpha}$. Além disso, a contração uterina reduz o fluxo sanguíneo, resultando em hipóxia e acúmulo de ROS que, quando em níveis elevados, desencadeiam alterações oxidativas nas células do sistema reprodutor, contribuindo para inflamação e danos ao endométrio e miométrio (Sirmali et al., 2007; Guney et al., 2008; Dikensoy et al., 2008).

Sendo assim, decidimos investigar se o aumento de prostanoídes contráteis, estariam envolvidos na hipercontratilidade uterina nas ratas do modelo experimental de DisP. Para isso, realizamos curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença da indometacina, um inibidor não seletivo de COX (Cartledge; Eardley; Morrison, 2000).

De acordo com os resultados, no GC não houve alteração de contratilidade na presença da indometacina (Gráfico 3A), diferentemente do grupo DisP, onde a curva na presença do inibidor apresentou uma diminuição da eficácia, comparado à curva na ausência da indometacina (Gráfico 3B). Esses resultados sugerem que, provavelmente, no modelo experimental de DisP o aumento da contração envolve a ativação da COX e o aumento da síntese de prostanoídes contráteis, como a $PGF_{2\alpha}$, já que a curva de contração na presença da indometacina apresentou uma menor eficácia contrátil que a curva de contração na ausência da indometacina, sugerindo assim, que os animais com DisP apresentam uma maior atividade das ciclo-oxigenases e a indometacina foi capaz de diminuir esta atuação. Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que na DisP há um aumento

de $\text{PGF}_{2\alpha}$, que eleva a pressão intrauterina e causa contrações intensas, resultando em vasoconstrição, redução do fluxo sanguíneo e dor aguda no útero (Falciroli; Souza, 2015; Bernardi *et al.*, 2017; Silva, 2022).

Na avaliação do efeito da SP sobre as COX nos questionamos se a alga previne a hipercontratibilidade uterina em ratas com DisP por meio dessa via; para isso, realizamos curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença da indometacina (Gráfico 3C), e observou-se que as curvas de contração foram sobrepostas, indicando que, possivelmente, os constituintes da SP atuam sobre as COX, alterando o padrão de liberação e síntese de prostanoídeos contráteis. Esse achado pode ser atribuído à presença do seu principal pigmento antioxidante, a C-ficocianina (Reddy *et al.*, 2000).

Com base no que já foi descrito, o estresse oxidativo tem sido cada vez mais reconhecido como um fator crucial na fisiopatologia da DisP. A isquemia e a hipóxia, resultantes das contrações uterinas intensas durante o ciclo menstrual, desempenham um papel importante. Essas condições diminuem o fluxo sanguíneo para o miométrio, levando ao acúmulo de radicais livres, destacando-se as ROS, que estão associadas aos sintomas dolorosos, sugerindo, assim, que o desequilíbrio oxidativo pode agravar a intensidade e a frequência das cólicas menstruais, o entendimento de como o estresse oxidativo contribui para a DisP continua em desenvolvimento, mas os dados disponíveis apontam para uma relação significativa entre o aumento dos radicais livres e a manifestação dos sintomas da DisP (Dikensoy *et al.*, 2008).

Sendo assim, decidimos investigar se o aumento de ROS e o consequente aumento do estresse oxidativo estariam envolvidos na hipercontratibilidade uterina nas ratas do modelo experimental com DisP (Gráfico 4). Para isso, realizamos curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença do tempol, um sequestrador do ânion superóxido (Peixoto *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados, no GC não houve alteração de na presença do tempol (Gráfico 4A), diferente do grupo DisP, em que a curva de contração à ocitocina na presença do sequestrador apresentou uma diminuição da eficácia (Gráfico 4B). Este último resultado mostra que no modelo experimental de DisP, provavelmente, ocorreu um aumento do estresse oxidativo, provavelmente pelo aumento na produção do ânion superóxido, já que as curvas na presença do tempol apresentou uma menor

eficácia contrátil que a curva na ausência, isso nos leva a entender que o mimético foi capaz de neutralizar o excesso de ânion superóxido e com isso apresentar uma menor eficácia contrátil. Esse resultado pode ser corroboração com o que é relatado na literatura, em que o estresse oxidativo tem sido identificado como um fator relevante na fisiopatologia da DisP (Dikensoy *et al.*, 2008).

Caso a suplementação alimentar com a SP na dose de 100 mg/kg alterasse os níveis intracelulares de O_2^- nos cornos uterinos de ratas, a curva concentração-resposta cumulativa da ocitocina na presença do tempol deveria apresentar magnitude similar ao observado no grupo DisP + SP na ausência do mimético e observou-se que não houve mudança contrátil nas duas curvas, este resultado reforça a ideia que a SP diminuiu o estresse oxidativo por diminuir a formação do ânion superóxido.

Essa diminuição do estresse oxidativo pode estar relacionado com a C-ficocianina presente na SP, já que de acordo com a literatura, ela reduz o estresse oxidativo, agindo de forma similar à outros antioxidantes, impede a formação de ROS e neutraliza as que já estão presentes, contribuindo para a redução do risco de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Gdara *et al.*, 2018; Mohammadi-Gouraji *et al.*, 2019; Dias, 2021).

O ânion superóxido desempenha um papel crucial no agravamento da DisP, pois promove a ativação do NF- κ B e, subsequente, a produção de citocinas que aumentam a inflamação e o desconforto uterino. Estudos confirmam que a ativação de NF- κ B pelas ROS está diretamente relacionada ao aumento dos sintomas inflamatórios e dolorosos observados na dismenorreia primária (LU *et al.*, 2018; TENÓRIO *et al.*, 2019).

Sendo assim, para confirmar se no modelo experimental de DisP ocorre o aumento na produção ROS através da NADPH oxidase, enzima responsável pela produção do O_2^- , decidimos investigar a sua participação ao realizarmos curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência e na presença da apocinina, inibidora da NADPH oxidase (Sovari; Morita; Karagueuzian, 2008).

De acordo com os resultados, no GC não houve alteração de contratilidade na presença da apocinina (Gráfico 5A), diferentemente do grupo DisP, onde a curva na presença do inibidor apresentou uma diminuição da eficácia (Gráfico 5B). Este

resultado então, nos mostra que no modelo experimental de DisP, provavelmente, ocorreu um aumento do estresse oxidativo por meio da atividade da enzima NADPH oxidase, aumentando a produção do O_2^- , pois a curva de contração na presença da apocinina apresentou uma menor eficácia contrátil quando comparada a curva na ausência do inibidor, isto sugere então, que a apocinina foi inibiu a enzima NADPH oxidase e, assim, diminuiu a produção do ânion superóxido.

Na avaliação do efeito preventivo da SP, nos questionamos se a alga poderia de alguma forma diminuir a atividade da NADPH oxidase e assim afetar a hipercontatibilidade em ratas com DisP através da diminuição da produção de ROS. Para isso, realizamos curvas concentração-resposta cumulativas à ocitocina na ausência a na presença da apocinina (Gráfico 5C), e observamos que as curvas foram sobrepostas, este resultado reforça a ideia que a SP diminuiu o estresse oxidativo, provavelmente por atuar na expressão do ânion superóxido. Vale destacar ainda, que as ficobiliproteínas, como a C-ficocianina e a aloficocianina, desempenham funções essenciais em diversas atividades biológicas e farmacológicas benéficas, incluindo efeitos antioxidantes, sendo um potente inibidor das enzimas NOX, contribuindo para a neutralização de radicais livres e redução de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxila, peroxila, hipoclorito e peroxinitrito (Romay *et al.*, 2003; Serban *et al.*, 2016; Shokri *et al.*, 2014; Liwa *et al.*, 2017 Reboleira *et al.*, 2019).

O NO pode reagir com o ânion superóxido e formar o peroxinitrito, uma molécula reativa que pode desencadear uma série de reações prejudiciais, incluindo a ativação de enzimas e proteínas que aumentam a contratilidade uterina (ativação da PKC, estimulação da atividade das COXs, além da inibição da sintase de PGI_2 e a ativação da sintase de TxA_2) (Guliaeva *et al.*, 1998; Higashi *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 1997; Alanazi *et al.*, 2018).

Nesse sentido, a produção do NO pode ser mediada por três isoformas da enzima NOS, sendo as isoformas NOS1 e a NOS3 constitutivas e envolvidas no controle da neurotransmissão e na regulação do fluxo sanguíneo, respectivamente, enquanto que a isoforma NOS2, é sintetizada pelas células do sistema imune em resposta a estímulos como citocinas e endotoxinas, resultando em uma produção muito mais elevada de NO durante processos inflamatórios (Bath *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2024).

Esse aumento na produção de NO e a sua reação com o O_2^- , forma o $ONOO^-$, este que é responsável pela ativação de vias que, em conjunto, favorecem o aumento das contrações uterinas, agravando os sintomas dolorosos da DisP (Guliaeva *et al.*, 1998; Higashi *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 1997; Alanazi *et al.*, 2018).

Dessa forma, decidimos investigar se a maior produção de NO e sua subsequente reação com o O_2^- estariam envolvidos na hipercontratilidade uterina observada nas ratas do modelo experimental de DisP. Para isso, realizamos experimentos utilizando curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina, tanto na ausência quanto na presença do L-NAME, uma substância inibidora não seletiva da NOS (Gráfico 6) (Vignozzi *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados, no GC não houve alteração de contratilidade na presença do L-NAME (Gráfico 6A), diferentemente do grupo DisP, onde a curva na presença do inibidor apresentou uma diminuição da eficácia (Gráfico 6B), este resultado então, nos mostra que no modelo experimental de DisP, provavelmente, ocorreu um aumento na produção do NO e este ao reagir com o ânion superóxido, formou o peroxinitrito, o que leva ao aumento da contratilidade uterina, já que a curva na presença do L-NAME apresentou uma menor eficácia contrátil quando comparada com a curva na ausência.

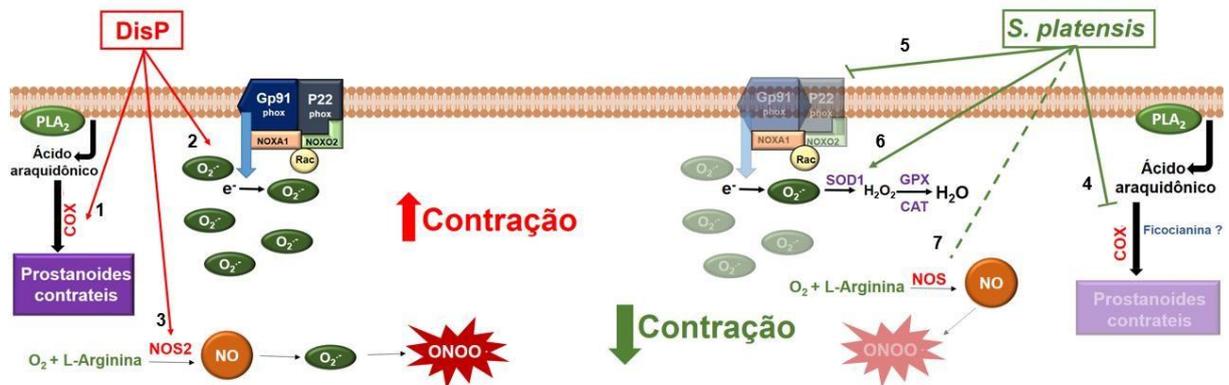
Sendo estes achados de acordo com as informações encontradas na literatura, sugerindo assim, que o peroxinitrito é um fator relevante na fisiopatologia da DisP, pois através da reação do NO com o O_2^- , vai ocorrer a formação do $ONOO^-$, o que pode ativar enzimas e proteínas, como a PKC, aumentando a contratilidade uterina (Guliaeva *et al.*, 1998; Higashi *et al.*, 2014; Zou *et al.*, 1997; Alanazi *et al.*, 2018).

Então, resolvemos avaliar se o feito preventivo pela qual a SP impede o aumento da hipercontratilidade uterina em ratas com DisP se dá através da sua ação sobre NOS. Para isso, realizamos curvas cumulativas concentração-resposta à ocitocina na ausência e na presença do L-NAME, um inibidor não-seletivo das NOS (Vignozzi *et al.*, 2006). Os resultados demonstraram que não houve mudança na eficácia contrátil nas duas curvas, sugerindo então, que a SP modula a produção de óxido nítrico.

Diante dos resultados expostos, é possível observar que a DisP, induzida por diestilestilbestrol, pode ser desenvolvida através do aumento na produção de prostanoides contráteis, como a $\text{PGF}_{2\alpha}$, uma maior produção de ROS, principalmente o ânion superóxido, e uma maior atividade da NOS2 (Figura 15), levando ao aumento da contratilidade uterina, ocasionando assim os sintomas associados a DisP.

Além disso, foi possível compreender o efeito preventivo da SP em diminuir a contração uterina à ocitocina por atuar em diversas vias, como uma provável diminuição da atividade da COX, exercer uma modulação negativa da NADPH oxidase e atuar como antioxidante, dismutando o ânion superóxido, diminuindo o estresse oxidativo, e possivelmente evitando a formação do peroxinitrito, através da diminuição da formação de NO pela NOS2, estes eventos vão diminuir a eficácia contrátil uterina e assim, diminuir os sintomas associados a DisP (Figura 15).

Figura 15 - Mapa conceitual da DisP induzida por diestilestilbestrol em ratas e o mecanismo farmacomecânico da prevenção da DisP através da suplementação com *Spirulina platensis* na dose de 100 mg/kg.



A modulação da reatividade contrátil uterina pela dismenorreia primária (DisP) em ratas envolve: 1. ativação da via dos prostanoides contráteis; 2. aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS); 3. Óxido nítrico reagindo com ROS e formando peroxinitrito. A *Spirulina platensis* (SP) previne o aumento da reatividade contrátil em ratas com DisP por: 4. inibição das ciclo-oxigenases (COX); 5. modulação negativa da enzima NADPH oxidase; 6. dismutação do ânion superóxido. 7. A SP modula a síntese de óxido nítrico (NOS).

Fonte: Autor, 2024

7 Conclusões

Na investigação do mecanismo fisiopatológico envolvido nas alterações de reatividade contrátil em útero de ratas Wistar com DisP, conclui-se que há um aumento da resposta contrátil provavelmente por:

- aumento dos prostanoídes contráteis a partir do AA;
- diminuição da atividade da SOD;
- aumento da produção de ânion superóxido;
- aumento da síntese de NO e formação do peroxinitrito.

Já na investigação do mecanismo de ação pelo qual a suplementação com *Spirulina platensis* previne as alterações de reatividade contrátil induzidas pela DisP no acoplamento farmacomecânico em útero de ratas Wistar, conclui-se que a *S. platensis* possivelmente:

- diminui a produção de prostanoídes contráteis;
- diminui a geração do ânion superóxido;
- modula negativamente a NADPH oxidase;
- afeta a formação do NO.

Referências

ABRAHAMSOHN, P. A. **Histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

AKINLOYE, A. K.; OKE, B. O. Characterization of the Uterus and Mammary Glands of the Female African Giant Rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse) in Nigeria. **Int. J. Morphol.** 2010.

ALANAZI R.; ALOTAIBI M.; DJOUHRI L. In vitro effects of hydrogen peroxide on rat uterine contraction before and during pregnancy. **Croat Med J.** v. 59, n. 6, p. 327-334, 2018.

ALTENHOFER, S.; RADERMACHER, K. A.; KLEIKERS, P. W. M.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. W.; Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2015.

ANDREW S.; COCO, M. Primary Dysmenorrhea. **Am Fam Physician**, v. 60, n. 2, p, 489-96, 1999.

ANGULO, S. M. T.; LÓPEZ, M. S.; CASTRO, D. E.; VILLAVICENCIO, F.L; L., EMILIANO, J.R.; ORTÍZ, M. S. S. Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. **Acta Universitaria**, 2012.

ARAUJO, L.C.C.; BRITO, A.F.; SOUZA, I.L.L.; FERREIRA, P.B.; VASCONCELOS, L.H.C.; SILVA, A.S.; SILVA, B.A. Spirulina platensis Supplementation Coupled to Strength Exercise Improves Redox Balance and Reduces Intestinal Contractile Reactivity in Rat Ileum. **Marine Drugs**. v. 18, p. 89, 2020.

ARUSELSELVAN, P. FARD M.T., TAN, W.S., GOTHAI S., FAKURASI S., NORHAIZAN M.E., KUMAR, S.S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 2016

BARBOSA, K. B. F; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; De PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, 2010.

BATH P. M., COLEMAN, C.M., GORDON A.L., LIM W.S., WEBB A.J. Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections. **F1000Res**. 2021.

BARROS, B. C. Investigação do mecanismo de ação preventivo da Spirulina platensis nas alterações do acoplamento eletromecânico induzidas pelo treinamento de força em útero de ratas Wistar. **Repositório UFPB**. 2021.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. P. J. Processo inflamatório. **Jaboticabal, SPUNESP-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**. 2006.

BEDARD, K.; LARDY, B.; KRAUSE, K. H., NOX family NADPH oxidases: not just in mammals. **Biochimie**, v. 89, n. 9, p. 1107-1112, 2007.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **J. Am. Nutraceutical Assoc.**, v. 5, p. 27-48, 2002.

BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. In: Berridge, M.J. **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, pp. 1-130, 2012.

BERNARDI, M.; LAZZERI, L., PERELLI, F., REIS, F. M., PETRAGLIA, F. Dysmenorrhea and related disorder. **Faculty Rev. Italy**. n. 6. p. 1-7, 2017.

BISWAS, D., SOMKUWAR, B. G., BORAH, J. C. Modulação mediada por fitoquímicos de COX-3 e NFκB para o gerenciamento e tratamento da artrite. **Sci. Rep.** **13**, 2023.

BITTENCORUT, G. N., Contração uterina em ratas prenhes: Comparação entre as técnicas de biosusceptometria de corrente alternada e banho de órgãos isolados. **Repositório UNESP**, 2021.

BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: Is there a cyclooxygenase 3?. **Clin. Infect. Dis.** **31** (5), S202–S210. 2000.

BOTTING, R., AYOUB, S. S., COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids** **72**, 85–87, 2005.

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

BRITO, A. F.; SILVA, A. S.; OLIVEIRA, C. V. C.; SOUZA, A. A.; FERREIRA, P. B.; SOUZA, I. L. L.; ARAUJO, L. C. C.; G. S.; FÉLIX, G. S.; SAMPAIO, R. S.; TAVARES, R. L.; PEREIRA, R. A.; NETO, M. M.; SILVA, B. A. *Spirulina platensis* prevents oxidative stress and inflammation promoted by strength training in rats: dose-response relation study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. **Scand J Rheumatol.** 2004.

CAI, B.; ZHAO, X.; LUO, L.; WAN, P.; CHEN, H.; PAN, J. Structural characterization, and *in vitro* immunostimulatory and antitumor activity of an acid polysaccharide from *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 196, 46-53. 2022.

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

v. 10, n. 25, p. 155-167, 2019.

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

CAVALCANTE, K. K.; CALEGARI, G. C.; ORSATO, A.; PEREZA, C. C. Estresse Oxidativo e Nox: Doenças Relacionadas e Principais Classes de Inibidores Sintéticos e Naturais. *Revista Virtual de Química*. 2023.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; TRIRATANA, P.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNANG, B. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013.

CHANDRASEKHARANN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (21), 13926–13931. 2002.

CHANG, K.; XIAO, D.; HUANG, X.; LONGO, L. D.; ZHANG, L. Chronic hypoxia increases pressure-dependent myogenic tone of the uterine artery in pregnant sheep: role of ERK/PKC pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 296, p. H1840 –H1849, 2009.

CHAOUACHI, M.; GAUTIER, S.; CARNOT, Y.; BIDEAU, N.; GUILLEMOT, P.; MOISON, Y.; COLLIN, T.; VINCENT, S.; GROUSSARD, C. *Spirulina platensis* Provides a Small Advantage in Vertical Jump and Sprint Performance But Does Not Improve Elite Rugby Players' Body Composition. *J Diet. Suppl.* p. 1-16, 2020.

CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters*, Kew, v. 18,n.5,p. 603-608, 1996.

CHEN, Y.; CAO, Y.; XIE, Y.; ZHANG, X.; YANG, Q.; LI, X.; SUN, J.; QIU, P.; CAO, W.; WANG, S. Traditional Chinese Medicine for the treatment of primary dysmenorrhea: How do Yuanhu painkillers affectively treat dysmenorrhea? *Phytomedicine*. China, v. 20, p. 1095-1104, 2013.

CHEN, Y.; LI, Z.; ZHANG, H.; CHEN, H.; HAO, J.; LIU, H.; LI, X. Mitochondrial metabolism and targeted treatment strategies in ischemic-induced acute kidney injury. *Cell Death Discovery*, 10(1), 69, 2024.

CHEN, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LU, N.; ZHANG, L, SHI, L. Exercise intensity-dependent reverse and adverse remodeling of voltage-gated Ca²⁺ channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hipertension Research*. v.15, p. 1-10, 2015.

CHENG, G.; RITSICK, D.; LAMBETH, J. D. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (33), 34250-34255. 2004.

CHO, C. C.; HSIEH, W.Y.; TSAI, C.H.; CHEN, C.Y.; CHANG, H.F.; LIN, C.S. *In vitro* and *in vivo* experimental studies of PM_{2.5} on disease progression. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 7, p. 1380, 2018.

CHOCRY, M.; LELOUP, L.; The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. **Antioxidants & Redox Signaling**, 2020.

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

COELHO, L. C.; DIONÍSIO, A. P.; LIRA, S. M.; SANTOS, G. B. M.; ZOCOLO, G. J.; SILVA, G. S.; GUEDES, M. I. F. Características físico-químicas e efeito no estresse oxidativo da pitaia vermelha em camundongos swiss diabéticos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e899975035-e899975035, 2020.

CÔCO, H.; PERNOMIAN, L.; MARCHIA, K. C.; GOMES, M. S.; ANDRADE, C. R.; RAMALHO, L. N. Z.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, A. M. Consequence of hyperhomocysteinaemia on α_1 -adrenoceptor-mediated contraction in the rat corpus cavernosum: the role of reactive oxygen species. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, p. 63-75, 2016.

COMHAIR, S. A., ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 283 (2): L246-255. 2002.

COSTA, R. C. C. Pigmentos azul (ficocianina) e vermelho (r-ficoeritrina) da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): purificação e caracterização parcial. **Dissertação de mestrado. Repositório Universidade Federal do Ceará**. 2016.

COUTINHO, M. A.; Muzitano, M. F.; Costa, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, 1 (3), 241-256. 2009.

COLQUHOUN, A.; MIYAKE, J. A.; BENADIBA, M. Fatty acids, eicosanoids and cancer. **Nutritional Therapy and Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 105- 112, 2009

CRIBBS, L. L.; LEE, J. H.; YANG, J.; SATIN, J.; ZHANG, Y.; DAUD, A.; BARCLAY, J.; WILLIAMSON, M. P.; FOX, M.; REES, M.; PEREZ-REYES, E. Cloning and characterization of α_1H from human heart, a member of the T type Ca^{2+} channel gene family. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p. 103-109, 1998.

CUETO, L. D.; VELASCO, F. A.; GERTON, G. L. Methods to study the role of progranulin in preimplantation mouse embryo development. *In*: Bateman, A., Bennett, H., Cheung, S. (eds) Progranulin. **Methods in Molecular Biology**, 2018.

CUNHA, M. P.; MAGATÃO, M.; SILVA, D. F.; QUEIROGA, M. R.; SILVA, M. P.;

PALUDO, A. C. Efeito do ciclo menstrual no desempenho em exercício físico: Uma rápida revisão da literatura. **Periódico do Instituto Brasileiro de Pesquisa e Ensino em Fisiologia do Exercício**, 2021.

CUNHA, N. V. Envolvimento das prostaglandinas nos parâmetros cardiovasculares e inflamatórios em ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico. Universidade Estadual de Londrina, **Dissertação de mestrado**, 2024

DIAS, T. A. Estudo *in vitro* de ações biológicas da ficocianina livre e microencapsulada. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Passo Fundo. 2021.

DIKENSOY, E.; BALAT, O.; PENÇE, S.; BALAT, A.; ÇEKMEN, M.; YUREKLI, M. Malondialdehyde, nitric oxide and adrenomedullin levels in patients with primary dysmenorrhea. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 34, n. 6, p. 1049-1053, 2008.

DINIZ, A. F. A., de SOUZA, I. L. L., SANTOS F., E., CARVALH, M. T.L., BARROS, B. C., FERREIRA, P. B., SILVA B. A. Potential therapeutic role of dietary supplementation with spirulina platensis on the erectile function of obese rats fed a hypercaloric diet. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2020.

DINIZ, A. F. A., OLIVEIRA, B. F.C., FRANCELINO, D. M. C., SILVA, J. M. A., BARROS, B. C., ARRUDA, R. R. A., MELCHIADES, M.K.N., SILVA, B. A. 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**, 2024.

DUMAY, J.; MORANÇAIS, M.; MUNIER, M.; LE GUILLARD, C.; FLEURENCE, J. Chapter Eleven - Phycoerythrins: Valuable Proteinic Pigments in Red Seaweeds. *In: Sea Plants*. V. 71 p. 321–343, 2014.

EL-SHEEKH, M. M.; HAMAD, S. M.; GOMAA, M. Protective effects of Spirulina on the liver function and hyperlipidemia of rats and human. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 77-86, 2014.

FALCIROLI, R. R.; SOUZA DE, T. B. **O uso da bandagem elástica funcional para o alívio da dismenorreia primária**. Bragança Paulista. p. 12-22. set, 2015.

FERREIRA, A. R. T. Dismenorreia primária: Opções terapêuticas. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. **Dissertação de Mestrado**. 2024.

FERREIRA, P. B.; DINIZ, A. F. A.; LACERDA JÚNIOR, F. F.; SILVA, M. D. C. C.; CARDOSO, G. A.; SILVA, A. S., DA SILVA, B. A. Supplementation with Spirulina platensis Prevents Uterine Diseases Related to Muscle Reactivity and Oxidative Stress in Rats Undergoing Strength Training. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3763, 2021.

FISCHER, D. P.; GRIFFITHS, A. L.; LUI, S.; SABAR, U. J.; FARRAR, D.;

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

GARFIELD R. E., MANER W. L. Physiology and electrical activity of uterine contractions. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 2007; 18: 289-95.

GDARA, N. B.; BELGACEM, A.; KHEMIRI, I.; MANNAI, S.; BITRI, L. Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 196-202, 2018.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 1, p. 85-98, 2012.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN-JUNIOR, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG A.W. Princípios de Farmacologia. 3. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2018.

GRANGER, D. N.; KVIETYS, P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. **Redox Biology**, v. 6, p. 524–551. 2015.

GRUBER C. W.; O'BRIEN M. Uterotonic plants and their bioactive constituents. **Planta Med.** 2011.

GUIL-GUERRERO, J. L. Stearidonic acid (18: 4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 12, p. 1226-1236, 2007.

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

GUIMARÃOES, I.; PÓVOA A. M. Primary Dysmenorrhea: Assessment and Treatment. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2020.

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

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

GUO, H.; WALZ, W.B. The interplay of autophagy and oxidative stress in the kidney: What do we know? **Nephron**, 147(10), 627–642. 2923. 2023.

GUYTON, A. C. M. D.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 11^o edição, **Elsevier**, 2006.

HABIB, A. review on culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fish. **Aquaculture Circular No.** 2008.

HALBE H. W. **Tratado de Ginecologia**.3ª ed. São Paulo: Roca; 2000.

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

HAWCROFT, G. The omega-3 polyunsaturated fatty acid eicosapentaenoic acid inhibits mouse MC-26 colorectal cancer cell liver metastasis via inhibition of PGE2-dependent cell motility. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 5, p. 1724-1737, 2012.

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

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

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, 82, S206-S212. 2006.

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.

HUA, Y. Q.; DUAN, J. A.; ZHU, Q.; WANG, Q. J. Study on method of oxytocin induced in vitro dysmenorrhea model in mouse. **Chinese Pharmacological Bulletin.** v. 24, p. 489–493, 2008.

IACOVIDES S.; AVIDON I.; BAKER F. C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. **Hum Reprod Update**, v.21, n.6, p.762-778, 2015.

ITANI, R. SOUBRA, L. KAROUT, S. RAHME, D. KAROUT L. KHOJAH, H.M.J. Primary Dysmenorrhea: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Updates. v. 43, **Korean Journal of Family Medicine.** 2022.

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

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

and **Chemical Toxicology**, v. 59, p. 199-206, 2013.

KAPOOR, R.; HUANG, Y. S. Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 531-534, 2006.

KAWAMURA, A.; OYAMA, K.; KOJIMA, K.; KACHI, H.; ABE, T.; AMANO, K.; AOYAMA, T. Dietary supplementation of gamma-linolenic acid improves skin parameters in subjects with dry skin and mild atopic dermatitis. **Journal of Oleo Science**, v. 60, n. 12, p. 597-607,

KHO, K. A.; SHIELDS, J. K. Diagnosis and management of primary dysmenorrhea. **JAMA**. v. 323, p. 268–269, 2020.

KIM, J-M.; AU, S.; KI, S.; XU, B.; WANG, T. Role of potassium channels in female reproductive system. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 0, p. 1-12, 2020.

KIMURA, K.; ITO, M.; AAMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. B.; FENG, J. Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). **Science**, Vol. 273, pp. 248-254, 1996.

KUMAR S., PANDEY A.K., Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**. 2015.

KUMMER, C. L., COELHO, T. C. R. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 52, 498-512. 2002.

LACERDA-JÚNIOR, 2022, F. F; **Padronização do modelo de dismenorreia primária e a prevenção das alterações induzidas no sistema reprodutor feminino de ratas Wistar tratadas com *Spirulina platensis***. 2022. 175p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2022.

LAMBETH, J. D.; NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. **Nature Reviews Immunology**, 2004.

LEE, J. H.; GOMORA, J. C.; CRIBBS, L. L.; PEREZ-REYES, E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block alpha1H. **Biophysical Journal**, v. 77, p. 3034–3042, 1999.

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

LEMOS, A. S. O.; CAMPOS, L. M.; CRUZ, O. A.; NETTO, L. L.; GOLIATT, P. V. Z. C.; FABRI, R. L. Avaliação da atividade anti-inflamatória in silico dos

flavonoides de *Lantana camara* L. frente à enzima ciclooxygenase-2. **BIOFARM-Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 4, p. 930-949, 2021.

LEMOS, P. V. F.; OPRETZKA, L. C. F.; ALMEIDA, L. S.; CARDOSO, L. G.; SILVA, J. B. A.; SOUZA, C. O.; VILLAREAL, C. F.; DRUZIAN, J. I. Preparation and characterization of C-phycoerythrin coated with STMP/STPP cross-linked starches from different botanical sources. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 739-750, 2020.

LIMA, R. P. N. D., Avaliação do impacto do canabidiol sob o estresse oxidativo na lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão em ratos Wistar adultos, **Trabalho de Conclusão de Curso**, 2024.

LIN, Y. Y.; JEAN, Y. H.; LIN, S. C.; FENG, C. W.; KUO, H. M.; LAI, Y. C.; WEN, Z. H. Etoricoxib prevents progression of osteolysis in repeated intra-articular monosodium urate-induced gouty arthritis in rats. **Journal of Advanced Research**, 109-120. 2020.

LIWA, A. C.; BARTON, E.N.; COLE, W.C.; NWOKOCHA, C.R. Bioactive plant molecules, sources and mechanism of action in the treatment of cardiovascular disease. In: **Pharmacognosy. Academic Press**, 2017.

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

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, 224, 164–175. 2014.

MALEK, M.; NEMATBAKHS, M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. **Journal of Renal Injury Prevention**, v. 4, n. 2, p. 20, 2015.

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

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

MAUL H.; MANER W.L.; SAADE G.R.; GARFIELD R.E. The physiology of uterine contractions. **Clinics in Perinatology**. 2003.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MENGLE-GAW, L. J., SCHWARTZ, B. D. Cyclooxygenase-2 inhibitors: promise or peril? **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 5, p. 275-286, 2002.

MITCHELL, B. F.; FANG, X.; WONG, S. Oxytocin: a paracrine hormone in the regulation of parturition? **Reviews of Reproduction**. v. 3, p. 113–122, 1998.

MODZELEWSKA, B.; JÓŻWIK, M.; JÓŻWIK, M.; TYLICKA, M.; KLESZCZEWSKI, T. The effects of extended nitric oxide release on responses of the human non pregnant myometrium to endothelin-1 or vasopressin. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 5, p. 892-898, 2019.

MOHAMMADA-GOURAJIA, E.; SOLEIMANIAN-ZADA, S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 102, p. 230-236, 2019.

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

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 1475-1489, 2011

MORROW, C.; NAUMBURG, E. H. Dysmenorrhea. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 1, p. 19-32, 2019.

MOURA, P. R.; VIDAL, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

MYERS, K. M.; ELAD D. Biomechanics of the human uterus. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**. 2017.

NASIRIAN, F.; DADKHAH, M.; MORADI-KOR, N.; OBEIDAVI, Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.11, p. 375, 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOVAK, T. E.; BABCOCK T.A.; JHO, D.H.; HELTON, W.S.; ESPAT, N.J. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, n. 1, p. L84-L89, 2003

O'DONOVAN, D. J.; FERNANDES, C. J. Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, n. 1-2, p. 352-358, 2000.

OKAWA, T.; VEDERNIKOV, Y. P.; SAADE, G. R.; LONGO, M.; OLSON, G. L.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Roles of potassium channels and nitric oxide in modulation of uterine contractions in rat pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 181, n. 3, p. 649-655, 1999.

OLIVEIRA, M. D. F. R.; MASCARENHAS, D. C.; MORAIS, A. C. S.; SUAIDEN, A. S. PRESCRIÇÃO FARMACÊUTICA DE AINES NA DISMENORREIA PRIMÁRIA. **Diálogos Interdisciplinares**, 15 (01), 250-255. 2024

PAGANO, C.; SAVARASE, B.; COPPOLA, L.; NAVARRA, G.; AVILIA, G.; LAEZZA, C.; BIFULCO, M. Cannabinoids in the modulation of oxidative signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023.

PHANEUF S.; FINNER N. E.; VARNEY M.; MACKENZIE I. Z.; WATSON F. P.; LOPEZ-BERNAL, A. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in human myometrial cells: involvement of pertussin-sensitive and -insensitive G proteins. **Journal of Endocrinology**. v. 136, p. 497–509, 1993.

PARAMANYA, A.; B. S.; SHAHIDA, A. S.; PAYAL, P.; SURUCHI, J.; JOHRA,

K.; JACKSON, R. G. S. A.; AHMAD, A. Spirulina: Ethnic Food and Potential Health Applications. **Ethnic Knowledge and Perspectives of Medicinal Plants**, Volume 2. 2023.

PEIXOTO, E. B.; PESSOA, B. S.; BISKWAS, S. K.; FARIA, J. B. L. Antioxidant SOD mimetic prevents NADPH oxidase-induced oxidative stress and renal damage in the early stage of experimental diabetes and hypertension. **American Journal of Nephrology**, v. 29, p. 309-318, 2009.

PAWLINA, W. **Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology** (7th ed.). Wolters Kluwer. 2021.

QIN, N.; CODD, E.; Flores, C.; ZHAN, S. P. Human cyclooxygenase-3 enzyme and uses thereof. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. **U.S. Patent**. No. 10/783297 (2004).

RADI, R., Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2018.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-Dependent Effect of Flavonoids in Rat Uterine Smooth Muscle Contraction Elicited by CaCl₂. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos da contração do músculo liso vascular. **075 Measuring blood pressure: the importance of understanding variation**, v. 12, n. 2, p. 89-92, 2005

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

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; BAI, Y.; SANDERSON, M. J. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca²⁺ oscillations. **Journal of General Physiology**, v. 135 n. 3, p. 247-259, 2010.

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

POZNYAK, A. V.; GRECKO, A. V.; OREKHOVA, V. A.; KHOTINA, V.; IVANOVA, E.A.; OREKHOV, A.N. NADPH Oxidases e seu papel na aterosclerose. **Biomedicinas**. 2020

PROCTOR, M.; FARQUHAR, C. Diagnosis and management of dysmenorrhoea.

British Medical Journal, v. 332, n. 7550, p. 1134-1138, 2006.

REBOLEIRA, J.; FREITAS, R.; PINTEUS, S. F. G.; SILVA, J. *Spirulina In: Nonvitamin and nonmineral nutritional supplements. Academic Press*, 2019.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY; M. **Biochemistry of smooth contraction**, San Diego: Academic Press, p. 227-239, 1996.

RIBEIRO, W. L. **Avaliação comparativa da seletividade de antiinflamatórios por isoformas da ciclooxygenase por meio de docking molecular**. Tese de Doutorado - Centro Universitário FAMETRO, Fortaleza- CE. 2020.

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

RODRIGUES, J. C; AVILA, M. A.; REIS, F. J. J; DEGANI A. M.; ARRUDA, G. T.; DRIUSSO, P. Como se parece a minha dor ? Caracterizando a dor relacionada à dismenorreia utilizando o mapa corporal da dor. **BrJP**; São Paulo, 2023.

ROY, J.; GALANO, J. M.; DURAND, T.; LE GUENNEC, J. Y.; LEE, J. C.; Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 2017.

ROMAY, C. H.; GONZÁLES, R.; LEDÓN, N.; REMIREZ, D. RIMBAU, V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.

ROWE, E. F; COREY, E; ARCHER, J. S. Primary Dysmenorrhea. **Obstetrics &Gynecology**, Indiana, v.136, n.5, p.1047-1058, nov.,2020.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of Cphycocyanin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36–41, 1998.

RYAN, S. A. The Treatment of Dysmenorrhea. v. 64, **Pediatric Clinics of North America**. W.B. Saunders; p. 331–42. 2017.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANTOS, L. B; BARBOSA, I. R.; DANTAS, T. H. M; ARAUJO, C. M; DANTAS, J. H; FERREIRA, C. W. S; CÂMARA, S. M. A; DANTAS, D. Prevalence of primary dysmenorrhea and associated factors in adult women. **Rev Assoc Med Bras;** v.68, n.1, p.31-36, nov 2021.

SANTOS, N. J; FARIA, G, S; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, R. J; SANTOS, J. F. M.;GONÇALVES, L. S; SANTOS, B. R; RIBEIRO, A. A. S Intervenção fisioterapêutica em mulheres com dismenorreia primária: Revisão integrative de

literatura. **Rev REASE.**; São Paulo, 2023.

SERBAN, M. C.; SAHEBKAR A.; DRAGAN, S.; HOGEA, G.S.; URSONIU, S.; ANDRICA, F.; BANACH, M. A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 842-851, 2016.

SHIH, C. M.; CHENG, C. S.; KUO, T. C. Antiinflammatory and antihyperalgesic activity os C-phycoocyanin. **Anesth. Analg.**, v. 108, p. 1303-1310, 2009.

SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R.; TAGHAVI, M. Efficacy of *Spirulina platensis* on immune functions in cancer mice with systemic candidiasis. **Journal of Mycology Research**, v. 1, n. 1, p. 7-13, 2014

SIBIYA, T.; GHAZI, T.; CHUTURGOON, A. The potential of *Spirulina platensis* to ameliorate the adverse effects of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Nutrients**, v. 14, n. 15, p. 3076, 2022.

SIEHLER S. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. **Br J Pharmacol**. 2009.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122–126. 2018.

SILVA, A. A. Avaliação dos efeitos dos compostos fenólicos: Ácido caféico e rutina sobre a contração do músculo liso de aorta, útero e íleo de ratos Wistar. 2018. **Tese de Doutorado**. Dissertação (Mestrado).-Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri. CRATO.

SILVA, D. C. Eletroestimulação no tratamento de mulheres com dismenorria primária: uma revisão integrativa. Trabalho de conclusão de curso. **Repositório UFPB**. 2022.

SILVA, M. C. C; FURTADO, J. H. L; PALMEIRA, I. S; OLIVEIRA, G. B; CRUZ, A. T; Influência da dismenorréia na vida de universitárias. **Cadernos UniFOA Volta Redonda**, 2023.

SILVA, N. S. B; PEREIRA, N. R. M; INÁCIO, A. S; SILVA, R. A; SILVA, E. M. O; SILVA, F. P. Impacto da dismenorréia em adolescentes escolares. **REAS/EJCH**, 2020.

SHI, L.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; LIU, Y.; LU, N.; ZHAO, T.; ZHANG, L. Chronic exercise normalizes changes in Ca_v 1.2 and K_{Ca} 1.1 channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 1846-1858, 2015.

SYMONDS I.; ARULKUMARAN S., **Obstetrícia e ginecologia essenciais**. 3ª edição Churchill Livingstone; Edimburgo: 1998. pp. 26–31.

SOLOFF, M. S. Uterine receptors for oxytocin: effects of oestrogen Biochemical and Biophysical. **Research Communications**. v. 65, p. 205–212, 1975.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83 n. 4, pp. 1325-1358, 2003.

SONG, Z., YAN, C., ZHAN, Y., WANG, Q., ZHANG, Y., JIANG, T. Melatonin attenuates lung ischemia-reperfusion injury through SIRT3 signaling-dependent mitophagy in type 2 diabetic rats. **Experimental Lung Research**, 2023.

SOUSA, N. Análise das propriedades da malva-do-reina e hortelã- pimenta contra a dismenorreia primária. **Multidebates**, v. 6, n. 3, p. 10-16, 2022.

SOUZA, I. L. L. Suplementação alimentar com *Spirulina platensis* previne o desenvolvimento da disfunção erétil em ratos Wistar alimentados com dieta hipercalórica. **Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SUH, Y. A.; ARNOLD, R. S.; LASSEGUE, B.; SHI, J.; XU, X.; SORESCU, D.; LAMBETH, J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. **Nature**, 1999.

SUN, L.; LIU, L.; ZONG, S.; WANG, Z.; ZHOU, J.; XU, Z.; DING, G.; XIAO, W.; KOU, J. Traditional Chinese medicine Guizhi Fuling capsule used for therapy of dysmenorrhea via attenuating uterus contraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 273–279, 2016.

SUENAGA, H.; KAMATA, K. Lysophosphatidylcholine activates extracellular signal-regulated protein kinase and potentiates vascular contractile responses in rat aorta. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 4, p. 348-358, 2003.

SUZANA, J. M. G. A influência das dismenorreia primária na vida de universitária do sertão paraibano. **Repositório Institucional da Unifip**, 2024.

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

TAKEYA, R.; UENO, N.; KAMI, K.; TAURA, M.; KOHJIMA, M.; IZAKI, T.; SUMIMOTO, H. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

TASCA, S.; CAMPOS, C.; LACERDA, D.; ORTIZ, V. D.; TURCK, P.; BIANCHI, S. E.; ARAÚJO, A. S. D. R. Pterostilbeno Reduz o Estresse Oxidativo no Pulmão e no Ventrículo Direito Induzido por Infarto do Miocárdio Experimental. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 118(2), 435-445. 2022.

TASSET-CUEVAS, I.; FERNANDÉZ-BEDMAR, Z.; LOZANO-BANEA, M.D.; CAMPOS-SANCHÉZ, J.; HARO-BAILÓN, A.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORANGA, A. Protective effect of borage seed oil and gamma linolenic acid on DNA: in vivo and in vitro studies. **PloSone**, v. 8, n. 2, p. e56986, 2013.

TAYLOR, J. P.; HUBERT, M. T. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 48, p. 102159, 2021.

TAWHEEL; G. M. A.; MOHSEN, G. A. M.; ANTONISAMY, P.; AROKIYARAJ, S.; KIM, H. J.; KIM, S. J.; PARK, H. K.; KIM, O.Y.; *Spirulina* consumption effectively reduces anti-inflammatory and pain related infectious diseases. **J Infect Public Health.**; Arabia Saudita, 2019.

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

TRETTER, V.; HOCHREITER, B.; ZACH, M. L.; KRENN, K.; KLEIN, K. U. Understanding cellular redox homeostasis: A challenge for precision medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

TSO, P.; CALDWELL, J.; LEE, D.; BOIVIN, G.P.; DEMICHELE, S.J. Comparison of growth, serum biochemistries and n-6 fatty acid metabolism in rats fed diets supplemented with high-gamma-linolenic acid safflower oil or borage oil for 90 days. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 1911- 1919, 2012.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_c$ smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 315 – 329, 1989.

VELLOSA, J. C. R.; BIAVATTI, M.; FRANÇÓIA, P. C. O.; de MELO, B. J.; de ALMEIDA, A. C.; BUENO, G. E. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, 2021.

VERAS, A. C. M. F. Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento fitoterápico- Funchicórea®, pó - Ensaio Farmacológico de Estabilidade para Controle de Qualidade Biológico. **Dissertação de mestrado.**; João Pessoa, 2022.

VERMOT, A.; PETIT-HARTLEIN, I.; SMITH, S.M.E.; FIESCHI, F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. **Antioxidants**. 2021

VIEIRA, N. F.; BARBOSA, T. P.; CÁRNIO, E. C. Desempeño del óxido nítrico en la sepsis: una revisión de alcance. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 37, p.

eAPE00512, 2024.

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

VLACHOU, E.; OWENS, D.A.; LAVDANITI, M.; KALEMIKERAKIS, J.; EVAGELOU, E.; MARGARI, N.; FASOI, G.; EVANGELIDOU, E.; GOVINA, O.; TSARTSALIS, A. Prevalence, Wellbeing, and Symptoms of Dysmenorrhea among University Nursing Students in Greece. **Diseases**, Atenas, 2019.

WOODRUM, D.A.; ROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Mol. Cell. Endocrinol**, 2001.

WRAY, S.; ARROWSMITH, S. **Uterine smooth muscle**. In: Hill and Olson, editor. *Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. London: Elsevier; p. 1207- 1216, 2012

WRAY, S.; ARROWSMITH, S. Uterine Excitability and Ion Channels and Their Changes with Gestation and Hormonal Environment. **Annu Rev Physiol**. v. 83, p. 331-357, 2021, Epub 2020.

WIJERATNE, D.; FIANDER, A.; Gynaecological disease in the developing world: a silent pandemic. **The Obstetrician & Gynaecologist**.; 2018.

WILLIAMS, M. E.; FELDMAN, D. H.; MCCUE, A. F.; BRENNER, R.; VELICELEBI, G.; ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 71-84, 1992.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. Cox-1, Cox-2 e Cox-3 e o futuro tratamento da doença inflamatória crônica. **Elsevier**. 2000.

ZHANG, X.; SUN, J.; WANG, Y.; LI, W. Factors contributing to haze and fog in China. **Chin. Sci. Bull**, v. 58, n. 1178, p. 972013-150, 2013.

ZAHRADNIK, H. P.; HANJALIC-BECK, A.; GROTH, K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea: A review. **Contraception**. v. 81, p. 185–196, 2010.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

ZATTI, P. H.; FERLITO, J. V.; DOS SANTOS, C. B. Estudo do papel do estresse oxidativo e dos antioxidantes na infecção por SARS-CoV-2: uma revisão

sistemática. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e52711831346-e52711831346, 2022.

ZHOU, Q. L.; BAI, Y. Z.; GAO, J.; DUAN, Y.; LYU, Y. C.; GUAN, L. F.; ELKIN, K.; XIE, Y. L.; JIAO, Z.; WANG, H.Y. Human serum-derived extracellular vesicles protect A549 from PM_{2.5}-induced cell apoptosis. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 34, n. 1, p. 40-49, 2021.

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

9 Anexos

Anexo 1 – Certificado de análise da *Spirulina platensis*

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Espirulina 60%	Data de Análise:	27-10-2017
Lote Interno:	17J11-B004-025041	Lote Fabricante:	SP17132
Data de Fabricação:	19-06-2017	Data de Validade:	18-06-2020
Origem:	China	Procedência:	Hong Kong
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	025041

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	-	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações:	Parte Utilizada:	Toda a planta	Nome Científico: Spirulina platensis

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição *	Po fino verde, com leve odor de algas	Conforme		Fabricante
Sabor	Leve de algas	Conforme		Fabricante
Perda por Dessecação *	<= 8,0% (2g/ 105°C/ Peso constante)	4,44	%	Fabricante
Proteína	>= 60	65,3	%	Fabricante
Cinzas totais *	<= 8,0	6,83	%	Fabricante
Total Carotenoides *	>= 0,3	0,30	g/100g	Fabricante
Arsênio *	<= 1,0	0,081	ppm	Fabricante
Chumbo *	<= 2,0	Não detectado	ppm	Fabricante
Cádmio *	<= 0,1	0,012	ppm	Fabricante
Mercurio	<= 0,1	Conforme	ppm	Fabricante
Granulometria	100 passa malha 80	Conforme	%	Fabricante
Densidade Aparente *	+ ou - 0,5	0,47	g/mL	Fabricante
Testes Microbiológicos				
Contagem total de bactérias *	<= 100000	< 1000	UFC/g	Fabricante
Fungos e Leveduras *	<= 300	< 10	UFC/g	Fabricante
Salmonella *	Negativo	Negativo		Fabricante
Echerchia coli *	Negativo	Negativo		Fabricante
Coliformes	<= 10	< 10	UFC/g	Fabricante
Staphylococcus *	Negativo	Negativo		Fabricante



2

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Espirulina 60%	Data de Análise:	27-10-2017
Lote Interno:	17J11-B004-025041	Lote Fabricante:	SP17132
Data de Fabricação:	19-06-2017	Data de Validade:	18-06-2020
Origem:	China	Procedência:	Hong Kong
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	025041

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	-	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações:	Parte Utilizada:	Toda a planta	Nome Científico: Spirulina platensis

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)
Reprovado ()

Responsável Técnico
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: Nº 7355

Responsável Técnico Substituto
Olívia Neiva Mesquita Mendes
CRF-GO: Nº 5227

Responsável Técnico
Ana Lígia Boer Barbosa
CRF-SP: 72.656

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

Fim do Documento

Fonte: Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA, 2017

Anexo 2 - Cópia do comprovante de aquisição do pó de Spirulina platensis

PREFEITURA MUNICIPAL DE JOÃO PESSOA		SECRETARIA DE RECEITA MUNICIPAL		NOTA FISCAL DE SERVIÇOS ELETRÔNICA - NFS-e		NÚMERO
						1002781
						CÓDIGO DE VERIFICAÇÃO
						2T5BRCLG3
DADOS BÁSICOS						
DATA DA EMISSÃO	COMPETÊNCIA	ISS A RETER	Nº DO RPS	Nº DA NFS-e SUBSTITUIDORA	Nº DA NFS-e SUBSTITUÍDA	
25/10/2017	19/10/2017	Não	24436		1002780	
PRESTADOR DOS SERVIÇOS						
	NOME / NOME EMPRESARIAL		NOME DE FANTASIA		CPF / CNPJ	
	VTO COMERCIO FARMACEUTICO LTDA				04.211.357/0001-70	
	INSCRIÇÃO MUNICIPAL	EXIGIBILIDADE TRIBUTÁRIA	Nº DO PROCESSO	OPTANTE PELO SIMPLES NACIONAL	OPTANTE PELO SIMEI	
	833126	Exigível		Não	Não	
LOGRADOURO					NÚMERO	
AV DOM PEDRO II					00667	
COMPLEMENTO			BAIRRO			
LOJAS / 101 A 106			CENTRO			
MUNICÍPIO			ESTADO	PAÍS		
João Pessoa			PB	BRASIL		
CEP	TELEFONE	E-MAIL				
58013-420	(83) 3244-3488	administrativorovalp@gmail.com				
TOMADOR DOS SERVIÇOS						
NOME / NOME EMPRESARIAL		CPF / CNPJ		INSCRIÇÃO MUNICIPAL		
PAULA BENVINDO FERREIRA		006.039.433-14				
LOGRADOURO					NÚMERO	
RUA BANCARIOS JOSE ALEXANDRE DE FARIAS					71	
COMPLEMENTO			BAIRRO			
AP 904			MIRAMAR			
MUNICÍPIO			ESTADO	PAÍS		
João Pessoa			PB	BRASIL		
CEP	TELEFONE	E-MAIL				
58022-010	(83) 9121-9028					
SERVIÇOS PRESTADOS						
ITEM DA LISTA DE SERVIÇOS						
4.07 - Serviços farmacêuticos.						
DESCRIÇÃO DETALHADA						
405894 00014055884-0 FORMULA 700.00G Outras C/ SPIRULINA 700.00G						
1 350						
Trib aprox N=R\$47,08 E=R\$63,00 M=R\$0,00						
Fonte: BPT (PB) Versão 17.1.A						
OBRA VINCULADA - CONSTRUÇÃO CIVIL						
LOCAL DA PRESTAÇÃO DOS SERVIÇOS						
MUNICÍPIO			ESTADO	PAÍS		
João Pessoa			PB	BRASIL		
VALORES						
VALORES BÁSICOS						
VALOR DOS SERVIÇOS	DESCONTO INCONDICIONADO	DESCONTO CONDICIONADO		DEDUÇÃO LEGAL		
R\$ 350,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00		R\$ 0,00		
RETENÇÕES DE TRIBUTOS FEDERAIS						
PIS	COFINS	INSS	IR	CSLL		
R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00		
VALORES COMPLEMENTARES						
OUTRAS RETENÇÕES	BASE DE CÁLCULO	ALÍQUOTA	ISS	VALOR LÍQUIDO		
R\$ 0,00	R\$ 350,00	5,00 %	R\$ 17,50	R\$ 350,00		
LÍBRO DA ADMINISTRAÇÃO TRIBUTÁRIA						
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES						

Fonte: Laboratório de Controle de Qualidade VTO COMÉRCIO FARMACÊUTICO LTDA, 2017.

Anexo 3 - Cópia da certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB)



Universidade Federal da Paraíba
**Comissão de Ética no
 Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do mecanismo de ação da *Spirulina platensis* na hipercontratibilidade induzida por ocitocina em útero de ratas Wistar com dismenorrea primária", protocolada sob o CEUA nº 4080310124 (ID 002107), sob a responsabilidade de **Luiz Henrique César Vasconcelos e equipe; Bagnólia Araujo Costa; Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 07/03/2024.

We certify that the proposal "Investigation of the mechanism of action of *Spirulina platensis* on oxytocin-induced hypercontractility in uterus of Wistar rats with primary dysmenorrhea", utilizing 150 Heterogenic rats (150 females), protocol number CEUA 4080310124 (ID 002107), under the responsibility of **Luiz Henrique César Vasconcelos and team; Bagnólia Araujo Costa; Matheus Kelvin do Nascimento Melchiades** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 03/07/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2024 a 09/2024 Área: Fisiologia E Patologia

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Ratos heterogênicos sexo: Fêmeas idade: 90 a 120 dias Quantidade: 150

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar Peso: 150 a 250 g

João Pessoa, 08 de março 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

