



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DOUTORADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

EVA POLLYANNA PEIXE LARANJEIRA

**LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* PREVINE A DISFUNÇÃO VASCULAR
INDUZIDA POR DIABETES EM RATOS: ENVOLVIMENTO DAS VIAS RECEPTOR
MUSCARÍNICO E RECEPTOR DE INSULINA**

FORTALEZA - CEARÁ

2020

EVA POLLYANNA PEIXE LARANJEIRA

LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* PREVINE A DISFUNÇÃO VASCULAR
INDUZIDA POR DIABETES EM RATOS: ENVOLVIMENTO DAS VIAS RECEPTOR
MUSCARÍNICO E RECEPTOR DE INSULINA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Alana de Freitas Pires

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy

FORTALEZA - CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Laranjeira, Eva Pollyanna Peixe.

Lectina de *Canavalia brasiliensis* previne a disfunção vascular induzida por diabetes em ratos: envolvimento das vias receptor muscarínico e receptor de insulina [recurso eletrônico] / Eva Pollyanna Peixe Laranjeira. - 2020.
95 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Doutorado, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof.^a Pós-Dra. Alana de Freitas Pires .

1. Disfunção endotelial. 2. Óxido nítrico. 3. Lectina de *Canavalia brasiliensis*.. I. Título.



19ª ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE EVA POLLYANNA PEIXE LARANJEIRA, REALIZADA NO DIA 17 DE MARÇO DE 2020.

Aos dezessete dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, realizou-se a sessão de Defesa de Tese de Doutorado, da aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, **EVA POLLYANNA PEIXE LARANJEIRA**. Compunham a banca os professores Drs. Alana de Freitas Pires (orientadora do projeto), Cláudia Ferreira Santos, Pedro Marcos Gomes Soares, Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia e Kyria Santiago do Nascimento. A tese teve como título "**Lectina de *Canavalia brasiliensis* previne a disfunção vascular induzida por diabetes em ratos: envolvimento do receptor muscarínico e do receptor de insulina**". A defesa ocorreu das 14:30 às 18:05 horas. Inicialmente, a aluna apresentou o conteúdo de sua tese e posteriormente foi arguida pelos professores membros da banca examinadora. Em seguida, a banca reuniu-se em separado, a fim de avaliar a tese e o desempenho da candidata. A avaliação da tese foi considerada SATISFATORIA tendo sido atribuídas as seguintes notas: Prof^ª Dr^a Alana de Freitas Pires 8,5, Prof^ª Dr^a Cláudia Ferreira Santos 8,5, Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares 8,5, Prof^ª Dr^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia 8,5 e Prof^ª Dr^a Kyria Santiago do Nascimento 8,5. A Banca Examinadora considerou a aluna APROVADA. Eu, Prof^ª Dr^a Alana de Freitas Pires, que presidi esta sessão pública de defesa de tese de doutorado, assino a presente ata, juntamente com os demais membros da banca, e dou fé. Fortaleza, 17 de março de 2020.

Alana de Freitas Pires
Prof^ª Dr^a Alana de Freitas Pires
Orientadora / ESTÁCIO FIC

Cláudia Ferreira Santos
Prof^ª Dr^a Cláudia Ferreira Santos
UECE

Pedro Marcos Soares
Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
UFC

Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia
Prof^ª Dr^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia
USP

Kyria Santiago do Nascimento
Prof^ª Dr^a Kyria Santiago do Nascimento
UFC

A Deus que me concedeu essa conquista,
aos meus pais pelo eterno apoio e ao
meu espaço por acreditar que sempre
posso alcançar vãos mais altos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser dono de minha vida e só me dar graças.

À toda minha família, por ser meu porto seguro, especialmente a Ana Lígia Peixe Laranjeira (mãe) e Ronaldo José Laranjeira (pai), pois sem a luta e persistência deles dois, eu nada seria. Um eterno obrigado aos meus pais, essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos Pablo e Patrick por fazerem parte da minha educação.

À Ítalo Almeida Alves (espoço), por toda força e paciência que ele teve comigo, além de sempre fazer com que eu acredite que posso ser cada vez melhor do que sou hoje.

À minha orientadora Profa. Dra. Alana de Freitas Pires por simplesmente tudo. Nossa jornada iniciou no Mestrado, eu imatura na pesquisa científica e ela ansiosa por sua primeira orientação na pós-graduação. Foram 7 anos de muita construção profissional e pessoal. Alana, muito obrigada por sua dedicação, paciência, sabedoria e sensibilidade que sempre teve por mim. Espero algum dia chegar a professora que vc é.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Maria Assereuy pelas suas contribuições científicas, sempre fazendo com que olhássemos o trabalho de maneira diferente e assim melhorando-o.

Aos professores Dra. Maria Gonçalves Pereira, Dra Edna Maria Camelo Chaves e Dr Gislei Frota Aragão pela contribuição científica que tem adicionado ao laboratório.

Ao professor Dr Benildo Sousa Cavada pela disponibilidade do material para a realização dos experimentos e todo BioMol pelo auxílio nos experimentos.

À professora Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia por disponibilizar o Lab. de Farmacologia Cardiovascular e do Trato Urinário para realização de estágio, aprendendo novos protocolos e vivências. Agradeço também aos seus alunos Camila (tutora), Júlio, Sara, Emiliana, Josi e me auxiliando nos experimentos. Aos queridos amigos Timna, Júlio e Dudu por toda a hospitalidade.

Aos professores que compõe a banca Prof. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (USP), Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (UFC), Prof. Dra. Claudia Ferreira Santos (UECE), Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (UFC), Prof. Dr.

Paulo Goberlanio de Barros Silva (UniChristus) e Profa. Karoline Saboia Aragão (Estácio – FIC).

A todos os amigos do LAFFIN, pela união que faz do nosso grupo uma família. Por conseguirem transformar os dias duros e estressantes da pós-graduação em momentos de boa convivência, troca de conhecimento e experiências, apoio e boas gargalhadas. Muito obrigada aos meus amigos Juliana Madeira, Pedro Bringel, Gabriela Marques-Domingos, Kaira Emanuella Sales, Timna Varela, Livia Almeida, Lucas Faustino, Cléo Queiroz e Beatriz Adfafre.

Ao meu lindo grupo da Contratilidade composto pelos Mestres Débora Helen, Róbio Cravo e Livia Almeida e ICs Mariana, Alice, Elaine e Atirson pela ajuda no cuidado com os animais, na construção de protocolo experimental e na elaboração de produção científica.

Às secretárias Ecila e Lindalva e à coordenação do mestrado pela boa vontade e organização em servir os alunos.

Ao Cleidson, Aquino e Romana pelos serviços gerais prestados.

À todos os funcionários do Instituto Superior de Ciências Biomédicas.

À Coordenação de Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo durante todo o doutorado.

À UECE, pela oportunidade de graduação, especialização, mestrado e, finalmente, a última etapa, doutorado.

À todos, minha eterna gratidão!

RESUMO

A diabetes leva a alterações morfológicas e funcionais da vasculatura, como a redução do relaxamento dependente do endotélio e perda da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). A lectina de *Canavalia brasilienses* (ConBr) pode modular estas alterações, pois além de fosforilar o receptor de insulina, possui efeito relaxante em artérias isoladas de ratos normoglicêmicos e diabéticos. Objetivou-se avaliar o efeito da ConBr sobre aspectos morfológicos e funcionais de artérias com disfunção endotelial induzida por diabetes. Ratos Wistar (250-300 g; CEUA UECE N° 12.776.260-4), foram induzidos a diabetes com streptozotocina (65 mg/kg, i.p.). Após 8 semanas de tratamento com a ConBr (1 mg/kg/dia; i.v.), o sangue foi coletado para dosagem de IL-1 β , e as aortas removidas para a análise de responsividade vascular em câmara para órgãos isolados, de alterações morfológicas e deposição de colágeno por microscopia (HE e Picrosirius), e de expressão de eNOS por imunohistoquímica. Artérias aorta e mesentérica isoladas animais diabéticos sem tratamento foram montadas em banhos para órgãos e incubadas com L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M), atropina (1 μ M), LY294002 (10 μ M), TEA (5 mM), indometacina (10 μ M) ou Tyrode 0Ca²⁺ e pre-contraídas com fenilefrina antes da adição da ConBr (1-100 μ g/ml) isolada ou associada a α -CH₃ (0.1 μ M). Após 8 semanas de diabetes, os níveis de IL-1 β plasmáticos estavam aumentados e a disfunção vascular confirmada redução da contração à fenilefrina e do relaxamento à acetilcolina, aumento do raio do lúmen da aorta, espessamento da camada muscular, deposição de colágeno e diminuição da expressão de eNOS. O tratamento com a lectina atenuou todos estes parâmetros, exceto o relaxamento dependente de endotélio. A adição de ConBr sobre aortas isoladas de animais diabéticos induziu relaxamento (58%) semelhante em animais normoglicêmicos e diabéticos, porém menor em artérias mesentéricas de ratos diabéticos (44% vs. normoglicêmico 55%). Em animais normoglicêmicos, o relaxamento da ConBr foi reduzido em ambas artérias na presença de L-NAME, ODQ, 0Ca²⁺, atropina e α -CH₃. Em animais diabéticos, o efeito da ConBr foi alterado por L-NAME e ODQ somente em aorta, mas por TEA, 0Ca²⁺ e LY294002 em artéria aorta e mesentérica. Além disso, o encaixe molecular sugeriu interação de ConBr e receptores de insulina. O tratamento i.v. com ConBr

melhorou a morfologia e a função da parede vascular da aorta, via redução de IL-1 β e aumento de eNOS. Portanto, a ConBr induz relaxamento de artérias aorta e mesentérica de ratos normo- e hiperglicêmicos, envolvendo receptores muscarínicos/Ca²⁺_e/NOS/CG e receptores de insulina/IP3k/Akt/canais de K⁺, respectivamente.

Palavra-chave: Disfunção endotelial; Óxido nítrico; Lectina de *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

Diabetes leads to morphological and functional changes in the vasculature, such as reduction of endothelium-dependent relaxation and loss of nitric oxide (NO) bioavailability. *Canavalia brasilienses* lectin (ConBr) could modulate these alterations since it phosphorylates the insulin receptor and present relaxant effect on isolated arteries from normoglycemic and diabetic rats. This study aimed to evaluate ConBr effect in morphological and functional aspects of arteries with endothelial dysfunction induced by diabetes. Diabetes was induced in Wistar rats (250-300 g; CEUA/UECE Nº. 12.776.260-4) with streptozotocin (65 mg/kg, i.p.). After 8 weeks of ConBr treatment (1 mg/kg/day; i.v.), blood was collected for IL-1 β measurement, and aortas were removed for analysis of vascular responsiveness in a chamber of isolated organs, morphological changes and collagen deposition by microscopy (HE and Picrosirius), and eNOS expression by immunohistochemistry. Isolated aortic and mesenteric arteries of non-diabetic animals were mounted in organ baths and incubated with L-NAME (100 μ M), ODQ (10 μ M), atropine (1 μ M), LY294002 (10 μ M), TEA (5 mM), indomethacin (10 μ M) or Tyrode 0Ca²⁺ and pre-contracted with phenylephrine before addition of ConBr (1-100 μ g/ml) alone or associated to α -CH₃ (0.1 μ M). IL-1 β plasma levels were increased and vascular dysfunction was confirmed by the following: reduction of phenylephrine-induced contraction and of the acetylcholine-induced relaxation, the increased lumen radius of aorta, thickening of the muscle layer, collagen deposition and decreased expression of eNOS. The treatment with lectin attenuated all these parameters, except for endothelium-dependent relaxation. The addition of ConBr on isolated aortas of diabetic animals induced similar relaxation (58%) in normoglycemic and diabetic, but less in mesenteric arteries of diabetic rats (44% vs. normoglycemic 55%). In normoglycemic animals, relaxation of ConBr was reduced in both arteries in presence of L-NAME, ODQ, 0Ca²⁺, atropine or α -CH₃. In diabetic animals, ConBr-induced relaxation was altered by L-NAME and ODQ only in aorta, but not by TEA, 0Ca²⁺ or LY294002 in both aorta and mesenteric arteries. In addition, the molecular docking suggested interaction of ConBr and insulin receptors. The i.v. treatment with ConBr improved morphology and functional alterations of vascular wall of the aorta of, diabetic rats via

reduction of serum IL-1 β and increasing of eNOS. ConBr induces relaxation of aorta and mesenteric arteries of normo- and hyperglycemic rats, involving muscarinic/Ca²⁺_e/NOS/CG receptors and insulin/IP3k/Akt /K⁺ channels, respectively.

Keyword: Endothelial dysfunction; Nitric oxide; *Canavalia brasiliensis* lectin.