



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

KAIRA EMANUELLA SALES DA SILVA LEITE

**INVESTIGAÇÃO DA NOCICEPÇÃO VISCERAL E TRANSTORNOS DE HUMOR
ASSOCIADOS A PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EXPERIMENTAL:
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE**

FORTALEZA - CEARÁ

2019

KAIRA EMANUELLA SALES DA SILVA LEITE

INVESTIGAÇÃO DA NOCICEPÇÃO VISCERAL E TRANSTORNOS DE HUMOR
ASSOCIADOS A PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EXPERIMENTAL:
ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE

Tese apresentada ao Curso de doutorado em Ciências Fisiológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: fisiologia

Orientadora: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mariana Lima Vale

FORTALEZA - CEARÁ

2019

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

Silva-Leite, Kaira Emanuella Sales da.

Investigação da nocicepção visceral e transtornos de humor associados a pancreatite aguda alcoólica experimental: envolvimento do sistema canabinóide [recurso eletrônico] / Kaira Emanuella Sales da Silva-Leite. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 141 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2019.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientação: Prof. Ph.D. Pedro Marcos Gomes Soares.

Coorientação: Prof.^a Dra. Mariana Lima Vale.

1. Sistema canabinóide. 2. Nocicepção. 3. Pancreatite aguda. 4. Depressão. 5. Ansiedade. I. Título.

KAIRA EMANUELLA SALES DA SILVA LEITE

INVESTIGAÇÃO DA NOCICEPÇÃO VISCERAL E TRANSTORNOS
DE HUMOR ASSOCIADOS A PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA
EXPERIMENTAL: ENVOLVIMENTO DO SISTEMA CANABINÓIDE

Tese apresentada ao Programa de
pós-graduação em Ciências
Fisiológicas do Instituto Superior de
Ciências Biomédicas da
Universidade Estadual do Ceará
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Fisiológicas

Aprovada em: 31 de Janeiro de 2019

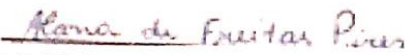
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC




Prof. Dr^a. Karoline Sabóia Aragão
Centro Universitário Estácio-FIC



Prof^a. Dr^a. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Prof. Dr^a. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará - UECE



Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí - UFPI

À Deus o criador de todas as coisas,
Àquele que inicialmente me deu a vida,
uma mãe que não mediu esforços para me
ajudar, me deu um esposo que
compreende todas as ausências para a
conclusão deste trabalho e aos amigos que
são os co-autores dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares por sua valiosa contribuição, dando-me suporte material e intelectual para que esse trabalho pudesse ser concluído.

À Profa. Dra. Mariana Vale por sua co-orientação e suporte.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (LEFFAG) que tornaram esses quase 5 anos, agradáveis, divertidos, estimulantes e inesquecíveis: Thiago Meneses, Humberto, Lucas Nicolau, Juan, Genilson Jr, Ronaldo Farias, Jonhatan, Priscila Fernanda, Suliana, Bárbara, Myleide, Sara Leyenne, Sarah Calixto, Victor, Athayde, Renata, Lorena, Paulo Roberto, Klayre, João Victor, Géssica, João e Vitória. Agradeço pela dádiva de partilhar meus dias com pessoas que se tornaram uma família, por toda a cumplicidade e conhecimento ofertados nesta caminhada.

Ao laboratório de Polissacarídeos Bioativos (LAPOBIO) no nome da professora Maria Gonçalves Pereira, por ter aberto as portas para meus primeiros passos como aluna de iniciação científica. Nesse espaço me fortaleci, vivi muitas alegrias e foi onde me encantei pela pesquisa.

Ao laboratório de Fisiologia Farmacológica da Inflamação (LAFFIN), local onde desenvolvi meu mestrado e aprendi muito do que sei hoje como pesquisadora. Aos alunos que dividiram comigo 2 anos de muito amor, de aprendizado, de alegrias, risos fáceis. São eles Gabriela Marques, Timna Varela, Juliana Madeira, Pedro Bringel, Lívia de Paula, Pollyana Peixe, Lívia Almeida, Luiz André Brizeno. À professora Alana Pires, exemplo de profissional e de ser humano. À professora Ana Maria Sampaio Assreuy, pelo acolhimento e ensinamentos.

Agradeço ao ex-aluno de iniciação científica Pedro Almir por todo seu apoio e sua amizade no tempo em que esteve conosco; à minha companheira dos “caminhos dolorosos na pancreatite aguda”, Deysen Kerlla, foi aquela que me acolheu logo que cheguei ao referido laboratório, seguindo os anos em que esteve conosco sempre me auxiliando em todos os aspectos que foram desde sua capacidade intelectual e técnica, e por estar me apoiando sempre que precisei enquanto pesquisadora e grande amiga. Esse trabalho também é seu, obrigada por toda sua dedicação.

Agradeço aos meus amigos, que além da valiosa amizade me deram suporte imensurável para que eu obtivesse os dados para a conclusão deste trabalho: Carlos Eduardo, Álvaro Xavier, Tiago Santos e Marcos Aurélio.

Aos meus queridos “filhos” ICs, Elane e João Lucas por toda a disponibilidade, esforço, competência e carinho.

Aos meus amigos que conquistei nesse tempo dentro do laboratório, que se estenderam para minha vida e que enchem meu coração de alegria com suas presenças: Tiago Santos, Marcos Aurélio, Samara Damasceno, Fabrícia Jácome, Álvaro Xavier. Como é bom saber que pude adicionar vocês ao meu ciclo de amizades. Vocês são um presente de Deus nessa caminhada.

À minha querida amiga e irmã Cecília Mendes, por sua preciosa amizade, um dos melhores presentes que Deus me deu neste tempo de doutorado. Obrigada por suas orações, seus conselhos valiosos, por ser exemplo de fé, e por dividir comigo desde as angústias, às alegrias dessa vida. “Melhor é serem dois do que um (...) Porque se um cair, o outro levanta o seu companheiro; mas ai do que estiver só; pois, caindo, não haverá outro que o levante” (Eclesiastes 4:9,10).

Ao meu querido esposo Janierson Leite, por sua paciência, amor, compreensão, cuidado e por seu apoio em todo esse tempo de pesquisa.

À minha mãe pelo apoio incondicional e por confiar em minha capacidade de concluir meus objetivos

À minha família que sempre está torcendo por minhas vitórias.

Aos amigos de toda uma vida: Renata Line, Rosiane Alves, Neliane Pereira, Jamila Camurça (*in memoriam*), Fábio Freitas, Valéria Pinheiro, Jeovana.

À Universidade Estadual do Ceará e Universidade Federal do Ceará pela estrutura
Ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF)

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos funcionários do Centro de Biomedicina: Jefferson, Claudia, Valdenir, Marcílio e aos funcionários da secretaria do PPGCF Ecila e Lindalva

Por fim, agradeço a Deus, a quem devo tudo, Senhor de todas as coisas, àquele que me deu motivos e pessoas para agradecer em todas essas linhas previamente descritas.

“Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; Eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa. Pois eu sou o Senhor, o seu Deus, que o segura pela mão direita e lhe diz: Não tema; eu o ajudarei.”

(Isaías 41:10;13)

RESUMO

A dor na pancreatite aguda (PA) é um sintoma presente em cerca de 90% dos pacientes, e seus mecanismos neurobiológicos não estão bem elucidados, influenciando na baixa especificidade terapêutica. Estudos descrevem transtornos de humor associados à dor visceral. Nesse contexto, o sistema canabinoide surge como um alvo na modulação da dor visceral, por se encontrar em regiões-chave do processamento nociceptivo. Objetivou-se caracterizar a hiperalgesia e transtornos de humor na PA e a participação do sistema canabinoide. A PA foi induzida por via intraperitoneal (i.p) em camundongos Swiss machos por etanol e ácido palmítico (POA) associado ao etanol (protocolo:103/16). Avaliou-se parâmetros inflamatórios (mieloperoxidase-MPO, fator de necrose tumoral alfa-TNF- α , interleucina 1 β - IL-1 β , histopatologia), α -amilase e lipase; e parâmetros de estresse oxidativo (glutathiona reduzida-GSH e malondialdeído-MDA). A hiperalgesia visceral (0, 4, 6 e 24 h) pelo teste de von Frey (TVF) e, para investigar sensibilização central, teste de imersão da cauda (TIC) e TVF na pata. Para descartar o efeito do etanol sobre a locomoção realizou-se o teste de rota-rod (1, 2 e 3 h). Foi investigada a associação entre hiperalgesia na PA e comportamentos de depressão e ansiedade pelos testes de campo aberto (TCA), labirinto em cruz elevado (LCE), de suspensão da cauda (TSC) e de nado forçado (NF). Foi analisada a ativação neuronal (marcação por imunofluorescência para C-FOS) no córtex pré-frontal (CPF) e corno dorsal da medula. Para avaliar a modulação canabinoide, os animais receberam por via endovenosa (e.v.), WIN 55,212-2 (agonista canabinoide inespecífico), ACEA (agonista canabinoide CB1), AM1241 (agonista canabinoide CB2), URB597 (inibidor de hidrolase de anandamida), 1 h após indução da PA. Para os antagonistas de CB1 (AM281) e de CB2 (AM630), as administrações foram feitas por via subcutânea (s.c) 30 min após os agonistas. Após os tratamentos realizou-se: TVF abdominal, TIC, TCA, TSC e NF. Após sacrifício (24 h) analisou-se a concentração plasmática da α -amilase, atividade de MPO e histopatologia pancreática e, na medula (T8-T12) quantificação de CB1 e CB2 por western blot. Análise estatística: teste de Bonferroni, Student e teste de Kruskal-Wallis (histopatologia) ($p < 0.05$). Os animais com PA (etanol/POA, 24 h) apresentaram aumento de parâmetros inflamatórios, estresse oxidativo, elevação de lipase e α -amilase; foi observada redução nos limiares nociceptivo (4, 6 e 24 h) no TVF abdominal e TIC (24 h). Os animais com PA apresentaram comportamento depressivo. No TCA apresentaram redução no número de cruzamentos e de *rearings* e no LCE apresentaram menor tempo nos braços abertos. Houve um aumento significativo de neurônios marcados para C-FOS tanto na medula quanto no CPF dos animais com PA. WIN 55,212-2, ACEA, AM1241 e UR597 aumentaram significativamente o limiar de hiperalgesia nos animais com PA, seguidos de reversão pelo co-tratamento com AM281 e AM630. Os agonistas canabinoídes atuaram de forma significativa na elevação do número de cruzamentos e de *rearings* no TCA (AM1241 e ACEA), na redução da concentração sérica de α -amilase (ACEA e AM1241), danos histopatológicos (AM1241 e URB597) e MPO pancreática (AM1241) dos animais com PA. Conclui-se que há hiperalgesia visceral e transtornos de humor na PA alcóolica experimental envolvendo ativação neuronal espinal e cortical e transtornos de humor. Além disso, sugere um envolvimento da via canabinoide na modulação da hiperalgesia visceral presente nesse modelo.

Palavras-chave: Sistema canabinoide. Nocicepção. Pancreatite aguda. Depressão. Ansiedade.

ABSTRACT

Acute pancreatitis (AP) pain is a symptom present in about 90% of patients, and its neurobiological mechanisms are not well elucidated, influencing the low therapeutic specificity. Studies describe mood disorders associated with visceral pain. In this context, the cannabinoid system appears as a target in the modulation of visceral pain, because it is found in key regions in nociceptive processing. The objective of this study was to characterize hyperalgesia and mood disorders in AP and the participation of the cannabinoid system. AP was induced intraperitoneally (i.p) in male Swiss mice by ethanol and palmitoleic acid (POA) associated with ethanol (protocol:103/16). Inflammatory parameters (myeloperoxidase-MPO, tumor necrosis factor alpha-TNF- α , interleukin 1 β -IL-1 β histopathology), α -amylase and lipase were evaluated; and oxidative stress parameters (reduced glutathione-GSH and malonildialdehyde-MDA). The visceral hyperalgesia (0, 4, 6 and 24 h) by the von Frey test (VFT) and, to investigate central sensitization, tail immersion test (TIT) and VFT in the paw. To eliminate the effect of ethanol on locomotion, the rota-rod test (1, 2 and 3 h) was performed. We investigated the association between hyperalgesia in AP and depression and anxiety behaviors by open field (OFT), elevated plus maze (EPM), tail suspension (TST) and forced swimming (FST) tests. Neuronal activation (immunofluorescence labeling for C-FOS) in the prefrontal cortex (PFC) and dorsal horn of the spinal cord was analyzed. To evaluate the cannabinoid modulation, the animals received intravenous (i.v.), WIN 55,212-2 (non-specific cannabinoid agonist), ACEA (cannabinoid agonist CB1), AM1241 (cannabinoid agonist CB2), URB597 (anandamide hydrolase inhibitor), 1 h after induction of AP. For CB1 (AM281) and CB2 (AM630) antagonists, administrations were done subcutaneously (s.c.) 30 min after the agonists. After the treatments, abdominal VFT, TIT, OFT, TST and FST were performed. After sacrifice (24 h) the plasma concentration of α -amylase, MPO activity and pancreatic histopathology were analyzed and quantification of CB1 and CB2 by western blot in the spinal medulla (T8-T12). Statistical analysis: Bonferroni test, Student's test and Kruskal-Wallis test (histopathology) ($p < 0.05$). The animals with AP (ethanol/POA, 24 h) presented increased inflammatory parameters (MPO, histopathology, IL-1 β), oxidative stress (reduction of GSH and increase of MDA), elevation of lipase and α -amylase; reduction in nociceptive thresholds (4, 6 and 24 h) in abdominal VFT and TIT (24 h) was observed. Animals with AP presented depressive behavior with increased immobility time in TST and FST. In the OFT, there was a reduction in the number of crosses and rearings, and the EPM presented shorter time in the open arms. There was a significant increase in C-FOS-labeled neurons in both the medulla and PFC of animals with AP. WIN 55,212-2, ACEA, AM1241 and UR597 significantly increased the hyperalgesia threshold in animals with AP, followed by reversal by co-treatment with AM281 and AM630. Cannabinoid agonists significantly increased the number of crosses and rearings in OFT (AM1241 and ACEA), reduction of serum α -amylase concentration (ACEA and AM1241), histopathological damage (AM1241 and URB597), and pancreatic MPO AM1241) of animals with AP. We conclude that there is visceral hyperalgesia and mood disorders in experimental alcoholic AP involving spinal and cortical neuronal activation and mood disorders. In addition, it suggests an involvement of the cannabinoid pathway in the modulation of visceral hyperalgesia present in this model.

Keywords: Cannabinoid system. Nociception. Acute pancreatitis. Depression. Anxiety.