



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

KECIANY ALVES DE OLIVEIRA

**EFEITO DO EXTRATO PROTEICO DE *Calotropis procera* E SUA FRAÇÃO
PII-IAA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE HEPÁTICA E NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL HEPÁTICA E MUSCULAR *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

**FORTALEZA – CEARÁ
2018**

KECIANY ALVES DE OLIVEIRA

EFEITO DO EXTRATO PROTEICO DE *Calotropis procera* E SUA FRAÇÃO
PII-IAA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE HEPÁTICA E NA FUNÇÃO
MITOCONDRIAL HEPÁTICA E MUSCULAR *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará - UECE como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos

FORTALEZA – CEARÁ
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Keciary Alves de .

EFEITO DO EXTRATO PROTEICO DE *Calotropis procera* E SUA FRAÇÃO PII-IAA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE HEPÁTICA E NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL HEPÁTICA E MUSCULAR IN VIVO E IN VITRO. [recurso eletrônico] / Keciary Alves de Oliveira. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 129 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, 2018.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientação: Prof. Ph.D. Ariclécio Cunha de Oliveira.

Coorientação: Prof. Ph.D. Márcio Viana Ramos.

1. *Calotropis procera*. 2. Função mitocondrial. 3. Glicemia. 4. Látex. 5. Produção hepática de glicose. I. Título.

KECIANY ALVES DE OLIVEIRA

EFEITO DO EXTRATO PROTEICO DE *Calotropis procera* E SUA FRAÇÃO PII-IAA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE HEPÁTICA E NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL HEPÁTICA E MUSCULAR *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Conceito obtido:

Orientador: Prof^o. Dr^o. Ariclécio Cunha de Oliveira.

Co-Orientador: Prof. Dr^o. Marcio Viana Ramos

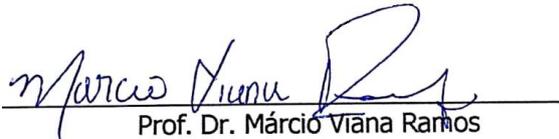
Aprovada em: 06 de dezembro de 2018.


Prof. Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira

Universidade Estadual do Ceará – UECE


Profª Drª Cláudia Ferreira Santos

Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP


Prof. Dr. Adriano César Carneiro Loureiro
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Às duas pessoas mais importantes e guerreiras da minha vida: Raimundo Nonato de Oliveira (pai) e Rita Alves de Oliveira (mãe).

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. **Ariclécio Cunha de Oliveira**, pela paciência ao me ensinar, sentando comigo por repetidas vezes, as técnicas do laboratório para a realização dos experimentos. Obrigada pela confiança e pela oportunidade dos estágios nos laboratórios de renome, colaborações essa por seu mérito, e que foram essenciais para o sucesso do trabalho. Também gostaria de agradecer pelas lições valiosas ensinadas, como **hierarquia** quando diz “Faça assim que é melhor!”, **antecipação** “Espera ver o que a banca vai dizer”, **paciência** “Envie o trabalho para o meu e-mail que assim que puder eu vejo”, **responsabilidade** “Porque você não apareceu ontem?”, **economia** “Quando chegar o dinheiro a gente compra, veja se não tem em outro laboratório”, **redação** “O artigo ficou bom, mas a discussão precisa de uma revisada. Envie para o seu email os comentários”, **didática** “Você pode dar aula no meu lugar na próxima semana?”, **investimentos** “Essa revista só aceita OpenAccess, vamos procurar outra!”, **dedicação** “O que é que você faz da meia-noite às seis?”, **disponibilidade** “Veja na minha agenda um horário para a gente conversar.”, **suspense** “Tenho uma notícia boa e uma ruim, qual você quer primeiro?” e **compartilhar** “Vamos colocar os nomes do meus colaboradores no seu artigo também!”.

Ao meu co-orientador, Prof. **Márcio Viana Ramos**, sempre disponível para conversar e por sua boa vontade em discutir os resultados da tese comigo. Obrigada pelo incentivo à leitura, ao me auxiliar na escrita dos artigos científicos e pela orientação na escolha das revistas científicas. Também quero parabenizá-lo pelo exemplo de profissional, que com perseverança e dedicação conquistou reconhecimento nacional na pesquisa de proteases vegetais.

Ao Prof. **Leonardo dos Reis Silveira**, por permitir a realização do estágio no seu laboratório e sempre disponível para conversar, aconselhar e me ajudar. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação.

Ao Prof. **Rodrigo Soares Fortunato**, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por proporcionar meu

estágio no seu laboratório e aprender técnicas que foram essenciais no meu crescimento como pesquisadora.

À Profa **Maria Diana Gomes Moreira** por sempre me motivar a continuar na pesquisa, acreditar no meu potencial e por implantar a técnica de dosagem de citocinas no laboratório.

Ao Prof. **Adriano César Loureiro**, à Profa **Vânia Marilande Ceccato** e toda a equipe do LABIEX pela colaboração para a realização dos experimentos. Essa parceria foi muito importante para a compreensão da relevância do trabalho em equipe para o sucesso de um trabalho.

À **Profa. Andreлина Noronha Coelho de Souza**, por ter sempre acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos esses anos de trabalho, por ter me orientar da melhor forma nas decisões na minha caminhada como pesquisadora e por me estimular a batalhar para conquistar o mérito e reconhecimento das minhas conquistas. Serei eternamente grata por todo o seu apoio.

Aos pesquisadores que desde a minha iniciação científica me instigaram a continuar na carreira acadêmica e na minha formação como docente, **Prof. Francisco Walber Ferreira da Silva, Profa. Claudia Ferreira dos Santos, Prof. José Henrique Leal Cardoso, Profa Aline Alice Cavalcante de Albuquerque, Profa Lucília Maria Abreu Lessa, Profa Ana Maria Sampaio Assreuy, Profa Alana de Freitas Pires, Prof. Lúcio Diniz, Profa Viviane Portela e Profa. Luciana Catunda.**

Ao **Pedro Militão** e a todos os funcionários do Instituto Superior de Ciências Biomédicas que, com seus trabalhos cotidianos, tornaram possível a produção do presente trabalho.

Aos meus queridos amigos da pesquisa para a vida, **Edgleyson, Edivânia, Renata, Paula, Regina, Rutyleia** pelo companheirismo, pelo ombro amigo, pela cumplicidade, pela troca de conhecimento, pela partilha das angústias dos experimentos frustrantes e dos resultados perfeitos.

Aos alunos de iniciação científica do LAFEM, **Neu, Larissa e Danton**, vocês são perfeitos, e aos colegas do laboratório **Mariana e Saulo**, que me auxiliaram na revisão do inglês durante todo o trabalho.

Aos alunos do laboratório de Pâncreas Endócrino e Metabolismo da UNICAMP, **Hygor, Tanes, André, Dimi, Bianca, Thiago Reis, Thiago Rentz, Israel, Gabi, Cris, Jean, Sandra, Maressa**, e toda a equipe do OCRC, que me receberam muito bem em Campinas, sempre atenciosos, com boa vontade em me ajudar e pela agradável convivência no laboratório. Sou realmente grata a vocês, me ensinaram muito sobre um campo da ciência que eu pouco conhecia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu doutorado.

Por fim a minha amada família. Em especial, ao meu pai **Nonato** e minha mãe **Ritinha**, que nunca mediram esforços para realizar meus sonhos e vontades. Tudo o que pedi vocês sempre fizeram o possível e o impossível para tornar real. Ao meu irmão **Wesley**, que sempre me auxiliou na formatação dos slides da apresentação da tese, incentivou à leitura, apoiou minha carreira acadêmica e estimulou o meu aperfeiçoamento no inglês.

“Há um limite na mente de cada um que é perigoso ultrapassar. Uma vez que se cruza esta linha, é impossível voltar atrás”.

(Fiódor Dostoiévski)

RESUMO

Proteínas fitomoduladoras do látex de *Calotropis procera* (Lp) apresentam propriedades farmacológicas, como antioxidante e anti-inflamatória. No entanto, não há estudos sobre seu mecanismo no metabolismo da glicose, embora o látex seja usado na medicina popular para o tratamento de diabetes. Neste estudo, Lp e a fração proteica PII-IAA foram avaliadas na homeostase glicêmica hepática e muscular *in vivo* e *in vitro*. O tratamento dos animais ocorreu na dose intravenosa única (5 mg/kg) de Lp ou PII-IAA. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e os fígados foram retirados para dosagem do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e análise da proteína quinase ativada por AMP fosforilada (p-AMPK) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) por *western blot* e RT-PCR, respectivamente. Testes de tolerância à insulina, glicose, glucagon e piruvato, calorimetria indireta, dosagem da glicemia e insulina sérica também foram realizados. Células HepG2 e C2C12 foram tratadas com PII-IAA (100 μ g/ml), por 3 horas, para a determinação da função mitocondrial por avaliação do consumo de oxigênio, consumo de lactato e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ICAT), atividade do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), densidade mitocondrial, expressão proteica dos complexos mitocondriais (OXPHOS) e p-AMPK, e mRNA da proteína desacopladora 2 (UCP2). O tratamento com Lp ou PII-IAA reduziram a glicemia, sem alterar a secreção de insulina. Lp melhorou a sensibilidade à insulina. Lp e PII-IAA inibiram a gliconeogênese e melhoraram a tolerância à glicose e o metabolismo oxidativo. Lp inibiu mRNA PEPCK, aumentou a expressão de p-AMPK. Em HepG2, PII-IAA aumentou o consumo de oxigênio, reduziu a concentração de lactato, aumentou a expressão de OXPHOS, aumentou a atividade de PPAR, reduziu a produção de ERO e aumentou a densidade mitocondrial. Em C2C12, PII-IAA aumentou o consumo de oxigênio, a densidade mitocondrial, sem alterar a sinalização à insulina. Assim, Lp e PII-IAA são ferramentas promissoras como alternativa terapêutica para a prevenção e/ou tratamento de diabetes tipo 2.

Palavras-chave: *Calotropis procera*. Função mitocondrial. Glicemia. Látex. Produção hepática de glicose.

ABSTRACT

Phytomodulatory proteins of *Calotropis latex* (Lp) have pharmacological, antioxidant and anti-inflammatory properties. However, there are no studies about its mechanism on glucose metabolism, although latex is used in folk medicine for the treatment of diabetes. In this study, Lp and its PII-IAA proteic fraction were evaluated in hepatic and muscular glycemic homeostasis in vivo and in vitro. The animals were treated with a single Lp or PII-IA intravenous dose (5 mg / kg). After treatment, the animals were euthanized and livers were removed for alpha tumor necrosis factor (TNF- α) dosing and protein kinase analysis by phosphorylated AMP (p-AMPK) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) by western blot and RT-PCR, respectively. Tolerance tests for insulin, glucose, glucagon and pyruvate, indirect calorimetry, and blood glucose and serum insulin measurement were performed. HepG2 and C2C12 cells were treated with PII-IAA (100 μ g / ml) for 3 hours in order to determine mitochondrial function by evaluation of oxygen and lactate consumption and intermediates of the tricarboxylic acid cycle (ICAT), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), oxygen crowd protein (ERO), mitochondrial protein (OXPHOS) and p-AMPK, and uncoupling protein 2 (UCP2) mRNA. Treatment with PII-IAA was able to reduce glycemia without altering insulin secretion. Lp improved insulin sensitivity. Lp and PII-IAA inhibited gluconeogenesis and improved glucose tolerance and oxidative metabolism. Lp inhibited PEPCK mRNA and increased p-AMPK expression. In HepG2, PII-IAA increased oxygen consumption, reduced lactate concentration, increased OXPHOS expression, increased PPAR activity, reduced ROS production and increased mitochondrial density. In C2C12, PII-IAA increased oxygen consumption and mitochondrial density, without altering insulin signaling. Thus, Lp and PII-IAA are promising tools as a therapeutic alternative for the prevention and / or treatment of type 2 diabetes.

Keywords: *Calotropis procera*. Mitochondrial function. Glycaemia. Latex. Hepatic glucose production.