



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

PATRÍCIA DA SILVA PANTOJA

**EFEITO PROTETOR DA CASCA DE *Ximenia americana* NA PANCREATITE
AGUDA: ENVOLVIMENTO NA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR**

FORTALEZA-CEARÁ

2019

PATRÍCIA DA SILVA PANTOJA

EFEITO PROTETOR DA CASCA DE *Ximenia americana* NA PANCREATITE AGUDA:
ENVOLVIMENTO NA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

Co-orientador: Prof. Dr. David Neil Criddle

FORTALEZA – CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Pantoja, Patricia da Silva.

Efeito protetor da casca de *Ximenia americana* na pancreatite aguda: envolvimento sinalização de cálcio intracelular [recurso eletrônico] / Patricia da Silva Pantoja. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¼ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 85 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fortaleza, 2019.

Área de concentração: Ciências Biológicas.

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

Coorientação: Prof. Ph.D. David Neil Criddle.

1. Pancreatite. 2. Carboidratos. 3. *Ximenia americana*. 4. Cálcio. 5. Inflamação. I. Título.

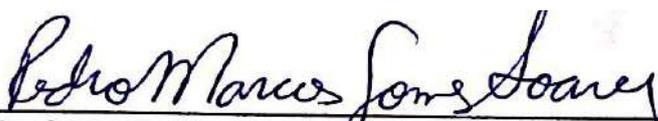
PATRÍCIA DA SILVA PANTOJA

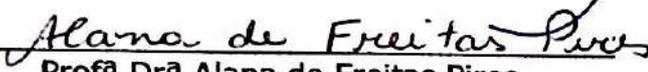
EFEITO PROTETOR DA CASCA DE *Ximenia americana* NA PANCREATITE AGUDA:
ENVOLVIMENTO NA SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO INTRACELULAR

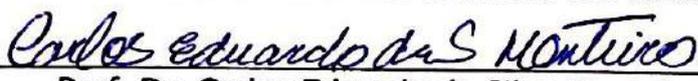
Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto Superior de Ciências Biomédicas, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração: Ciências Biológicas

Aprovada em: 28 / 02 / 2019

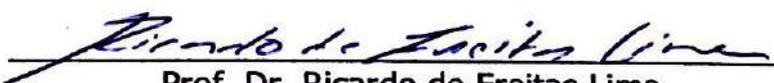
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares / UFC
orientador


Profª Dra Alana de Freitas Pires
CENTRO UNIVERSITÁRIO ESTÁCIO DO CEARÁ


Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro
UFC


Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza
UFC


Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima
UFC

À DEUS, meu senhor e salvador. O único capaz de fazer esse trabalho possível e, por meio dEle, posso dedicar à minha família, meus irmãos (Natanael e Priscila) e meus pais (Amazonito e Aurinete) por todo suporte nesses anos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, onde coloquei toda minha esperança e ele se inclinou para mim e ouviu o meu grito de socorro. Ele me tirou de um poço de destruição, de um atoleiro de lama; pôs os meus pés sobre uma rocha e firmou-me num local seguro.

Pôs um novo cântico na minha boca, um hino de louvor ao nosso Deus. Muitos verão isso e temerão, e confiarão no Senhor. Não oculto no coração a tua justiça; falo da tua fidelidade e da tua salvação. Não escondo da grande assembleia a tua fidelidade e a tua verdade. Mas regozijem-se e alegrem-se em ti todos os que te buscam; digam sempre aqueles que amam a tua salvação: "Grande é o Senhor! " Salmos 40!

Aos meus pais que me bancaram esses anos todos e suportaram os períodos difíceis;

Aos meus irmãos que não me deixariam desistir nunca mesmo que quisesse;

Aos pastores e irmãos em Cristo que estiveram orando todo esse tempo por mim, muitas foram as provações;

Aos professores Pedro Soares e David Criddle que nesse tempo se tornaram mais que orientadores, amigos;

À Fabrícia que não doou somente as mãos para os experimentos, ela doou seus ouvidos e seu coração quando só existia silêncio;

A todos que foram parte do LEFFAG durante esses 5 anos e puderam contribuir com esse trabalho e essa formação;

Aos professores que estiveram construindo esse trabalho direta ou indiretamente;

Ao LAFFIN e LAPOBIO que estiveram presentes em sugestões para que o trabalho se tornasse melhor e foram suporte com o produto chave dessa pesquisa;

Às bancas de qualificação e defesa por suas sugestões em melhorarem o trabalho;

Às universidades UFC e UECE que foram suporte com o corpo docente e laboratórios possíveis de desenvolver a pesquisa;

Ao programa de pós-graduação desde as secretárias até a coordenação que foram suporte nesses 5 anos de pesquisa e orientação;

À CAPES e FUNCAP com as bolsas de pesquisas que foram suporte para dedicação exclusiva à pesquisa.

Aos que nesse tempo passaram por minha vida, e foram muitos, cada um em um momento diferente (Ic's, pós-graduandos, pós-doc's, professores, amigos da igreja e do dia a dia), todos deixaram sua marca, ensinaram algo e levaram algo de mim. Obrigada por todas as lições, toda paciência e que o Senhor os retribua em dobro.

“As únicas pessoas que alcançam êxito são as que querem tanto o conhecimento que insistem em busca-lo, mesmo em condições pouco favoráveis.

(C. S. Lewis)”

RESUMO

Pancreatite aguda é definida como um processo inflamatório agudo do pâncreas que envolve frequentemente tecidos peripancreáticos e sistemas de órgãos remotos. Está entre as causas de mortes por doenças do sistema digestivo com crescimento em torno de 75% entre 2010 e 2018 comparado aos últimos 40 anos. Estados Unidos e Reino Unido apresentam maiores índices. 5% dessas mortes ocorrem por pancreatite, 3% em homens e 2% em mulheres. Os polissacarídeos da casca de *X. americana* tem sido descrito como anti-inflamatórios tanto na pancreatite como na gastrite em modelos experimentais com camundongos. Contudo o mecanismo não tem sido contemplado na literatura. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo investigar o efeito protetor dos polissacarídeos da casca de *X. americana* (PLTd-xa) na pancreatite aguda e o envolvimento da fração (FII) e arabinose na sinalização de cálcio intracelular. A coleta da espécie vegetal ocorreu no município de Quixadá, o pó seco da casca (5g) foi despigmentado com metanol, filtrado e o material residual utilizado na extração dos polissacarídeos (NaOH 0,1 M; 3x) e desproteinado com ácido tricloro acético (TCA). A FII foi obtida a partir do acompanhamento do conteúdo de carboidrato pelo método de ácido fenol-sulfúrico. Para indução da pancreatite foi utilizado 2 modelos. Modelo cirúrgico com uso de Na-TC 3%, infusão retrógrada de ducto biliar, tratamento na 1 e 13h após a indução com PLTd-xa (3,10, 30 mg/kg e.v) e/ou sham/salina. Segundo modelo com injeção consecutivas de POA (intervalo 1h), tratados 1 e 13h (30 mg/kg, e.v) ou salina. Após 24h, animais foram sacrificados e retirado sangue para análises de amilase e pâncreas para análises parâmetros inflamatórios por método histopatológico e coloração H.E, com parâmetros de necrose, edema, infiltrado neutrofilico e escores totais, atividade de mieloperoxidase (MPO) e tripsina. Mecanismo avaliado em isolamento de células acinares pelo uso de colagenase específica e dissociação mecânica. O tratamento com arabinose ou FII ocorreu 1h antes das análises e o uso de marcadores para cálcio citosólico (FLUO-4), despolarização mitocondrial (TMRM-AM), ATP intracelular (Mg-green-AM) foram adicionados 30 minutos antes das análises. Agentes lesivos (TLC-s, POA, Ach, CCK) adicionados no curso do tempo (200ms) ou 30 min antes da análise de morte celular por necrose. O docking molecular utilizou bioinformática. Os dados expressos como Média \pm SEM (n=6-10), por ANOVA e teste de Bonferroni ou Dunns ($p < 0,05$). Os protocolos obedeceram aos princípios éticos e legais estabelecidos pela lei: 11.794/08 com parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC n: 13/2016. Como resultados, obtemos reversão significativa nos parâmetros histológicos para os dois modelos, assim como em análises bioquímicas de amilase, MPO e tripsina. Em células acinares, preveniu necrose, o

cálcio citosólico, despolarização mitocondrial e ATP intracelular. O docking molecular mostrou a interação da arabinose com o canal ORAI1. Concluiu-se que os PLTd-xa protegeu necrose em dois modelos de PA reduzindo cálcio intracelular e proteção na produção de ATP mitocondrial. Além disso, FII e arabinose protegeu a sinalização de cálcio sugerindo uma possível interação com o canal ORAI1 mostrando-se como possível potencial tratamento.

Palavras-chave: Pancreatite. Polissacarídeo. *X. americana*.

ABSTRACT

Acute pancreatitis is defined as an acute inflammatory process of the pancreas that often involves peripancreatic tissues and systems of remote organs. Diseases of the digestive system growth around 75% between 2010 and 2018 compared to the last 40 years. The United States and the United Kingdom have higher rates. 5% of these deaths occur due to pancreatitis, 3% in men and 2% in women. Polysaccharides from *X. americana* bark have been described as anti-inflammatory in pancreatitis and gastritis for experimental models. However, the mechanism has not been contemplated in the literature. The objective of this work was to investigate the protective effect of polysaccharides from *X. americana* bark (PLTd-xa) on acute pancreatitis and the involvement of the fraction (FII) and arabinose on intracellular calcium signaling. The dry powder of the bark (5g) was depigmented with methanol, filtered and the residual material used to extract the polysaccharides (0.1 M NaOH, 3x). Trichloroacetic acid (TCA) used to deproteinized. The FII was obtained from the monitoring of the carbohydrate content by the phenol-sulfuric acid method. Two models were used for induction of pancreatitis. Surgical model with 3% Na-TC, retrograde bile duct infusion, treatment at 1 and 13h after induction with PLTd-xa (3.10, 30 mg / kg e.v) or sham or saline. Second model with consecutive POA injection (interval 1h), treated 1 and 13h (30 mg / kg, e.v) or saline. After 24h, animals were sacrificed and blood was collected for analysis of amylase and pancreas for analysis of inflammatory parameters by histopathological method and H.E staining, with parameters of necrosis, edema, neutrophilic infiltration and total scores, myeloperoxidase activity (MPO) and trypsin. Mechanism was evaluated in acinar cells isolation by the use of specific collagenase and mechanical dissociation. Treatment with arabinose or FII occurred 1 h before the analyzes and the use of markers for cytosolic calcium (FLUO-4), mitochondrial depolarization (TMRM-AM), intracellular ATP (Mg-green-AM) were added 30 minutes prior to analysis. Damaging agents (TLC-s, POA, Ach, CCK) added time course (200ms) or 30 min prior to necrotic cell death analysis. Molecular docking used bioinformatics. The data was expressed as mean \pm SEM (n = 6-8), by ANOVA and Bonferroni or Dunn's test ($p < 0.05$). The protocols complied with the ethical and legal principles established by law: 11.794 / 08 with approval of the Ethics Committee UFC Animal (No: 13/2016). As results, we obtain significant reversion in histological parameters for both models, as well as in biochemical analyzes of amylase, MPO and trypsin. In acinar cells, it prevented necrosis, cytosolic calcium, mitochondrial depolarization and intracellular ATP. Molecular docking showed the interaction of arabinose with the ORAI1 channel. It was concluded that PLTd-xa protected necrosis in two AP models

by reducing intracellular calcium and protection in mitochondrial ATP production. In addition, FII and arabinose protected calcium signaling suggesting a possible interaction with the ORAI1 channel showing as potential for treatment.

Keywords: Pancreatitis. Polysaccharides. *X. Americana*.