



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

**EFEITOS GASTRO- E HEPATOPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS
SEMENTES DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA
2018

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

EFEITOS GASTRO- E HEPATOPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS
SEMENTES DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. Renan Oliveira Silva.

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N712c Nogueira, Francisca Cristiane.
Efeitos gastro- e hepatoprotetor de uma proteína isolada das sementes do noni (*Morinda citrifolia* L.) em camundongos / Francisca Cristiane Nogueira. – 2018.
62 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira.
Coorientação: Prof. Dr. Renan Oliveira Silva.
1. *Morinda citrifolia* L.. 2. Noni. 3. McLTPI. 4. Úlcera gástrica. 5. Atividade hepatoprotetora. I. Título.
CDD 572
-

FRANCISCA CRISTIANE NOGUEIRA

EFEITOS GASTRO- E HEPATOPROTETOR DE UMA PROTEÍNA ISOLADA DAS
SEMENTES DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica, do Centro de
Ciências da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 16 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires
Centro Universitário Estácio do Ceará (ESTÁCIO FIC)

Dedico com muito amor e gratidão à minha avó (*in memoriam*), aos meus pais e irmãs por todo o apoio e zelo na realização dos meus sonhos e a todos que torceram e me ajudaram no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Arleudo** e **Ziuná**, por todo o esforço, zelo, dedicação, por não medirem esforços em me apoiar de todas as formas na realização dos meus sonhos e pela compreensão nos meus momentos de ausência.

A minhas irmãs **Geilia Patrícia** e **Gerda Cristina** por toda a torcida, compreensão e pelo apoio emocional e fraterno de irmãs e minha sobrinha **Ana Laís** por me alegrar com seu sorriso e seu amor.

A minha vó **Rivalda** (*in memoriam*), meu primeiro e maior exemplo de Educadora, por todo o apoio, torcida e amor de vó que proporcionou durante sua vida terrena.

Ao meu Orientador **Hermógenes David**, por ter me acolhido tão bem junto à família do Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas - BioAP, pelo seu exemplo de Professor dedicado e empenhado na formação acadêmica, na pesquisa e por toda a orientação dada para minha melhor formação. Pelos momentos de descontração e cafés compartilhados. Desejo que momentos como esses continuem a ser vivenciados pelos próximos quatro anos.

Ao meu Co-orientador Dr. **Renan Oliveira**, pela paciência, apoio e dedicação à pesquisa com importantes orientações nos experimentos de bancada e, principalmente, na escrita do manuscrito desta dissertação. Espero que a sua paixão pela pesquisa engrandeça a sua vida profissional e pessoal diante de inúmeras conquistas, Dr. Renan!

Às minhas colegas de laboratório **Dyély Campos** e **Andréa Costa**, por todo apoio, orientação e por estarem sempre dispostas a me ajudarem nos experimentos com animais. Sou imensamente grata!

Ao meu namorado **Marcelo Cabral**, por todo amor, compreensão, apoio, cuidado em me acompanhar por diversas vezes nos fins de semana de experimentos. Por sempre acreditar na minha capacidade e pelas palavras de conforto nos momentos de dificuldades.

Ao meu amigo **Diêgo Chagas**, por todos os momentos de dificuldades e apreensão vividos juntos durante essa etapa das nossas vidas, que se tornaram mais tranquilos por ter alguém tão divertido e leve como você ao meu lado.

Aos meus amigos da família BioAP, pelos momentos de diversão e orientações a mim proporcionados, em especial: **Adson Ávila**, **Vilmara Farias**, **Adrienne Maia** e **Mighay Lovera**.

Aos meus colegas da turma do mestrado em Bioquímica por dividirmos inquietações, alegrias e conhecimentos em diversos momentos: **André Luiz**, **Rayssa Bret**, **Eilton Sousa** e **Rikaely Sousa**.

Aos professores Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares** e **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pela parceria e aos alunos do Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (LEFFAG) pela recepção e ótima acolhida no laboratório durante os experimentos, especialmente ao estudante de Doutorado **Álvaro Xavier** pela parceria.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (Nempi), pela confecção das lâminas histológicas a ao Técnico Júnior pela paciência.

A todos os colegas dos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela ajuda mútua e união diante das dificuldades. Expresso a minha gratidão ao estudante **Thiago Fernandes** e aos amigos do Labalgas: **Glauber Cruz, Willer Sousa e Luiz Eduardo** pela amizade e pelas diversas vezes em que me ajudaram sem hesitar.

Aos professores da banca examinadora, **Profa. Nylane Maria** e **Profa. Alana Pires**, pelo tempo dedicado a leitura do trabalho e pelas valiosas contribuições para enriquecimento do meu conhecimento.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e a todos os professores que participaram da minha formação. Sou infinitamente grata por não medirem esforços em repassar seus conhecimentos.

A **Universidade Federal do Ceará** e aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por todo o apoio em viabilizar as melhores condições de trabalho. A todos os **amigos e familiares**, que torcem pelo meu bem e pela concretização dos meus objetivos, muito obrigada!

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio de infraestrutura e fomento das instituições citadas abaixo, a quem agradeço imensamente.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – por fornecer as condições necessárias para a capacitação em Bioquímica, nos níveis de ensino e pesquisa realizada.

Laboratório de Aplicação Biotecnológica de Algas e Plantas (Bioap) – do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a coordenação dos professores Dr. Hermógenes David de Oliveira e Dra. Márjory Lima Holanda Araújo;

Laboratório de Estudos da Fisiologia Farmacológica Gastrointestinal (Leffag), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e Departamento de Medicina Clínica, sob a coordenação dos professores Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e Dr. Pedro Marcos Gomes Soares;

Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (Nempi), do Departamento de Morfologia, sob a coordenação da Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO (CNPq)** – por meio de fomento à pesquisa.

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
(CAPES)** – por meio de concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

O trato digestório é exposto a diversos fatores agressores exógenos capazes de ocasionar lesões e disfunções em vários órgãos. Por essa razão, diversas moléculas têm sido investigadas quanto ao seu potencial farmacológico para o tratamento desses distúrbios. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos gastroprotetor e hepatoprotetor de uma proteína termoestável isolada a partir de sementes de *Morinda citrifolia* L. A proteína em estudo, denominada *McLTP*₁, foi isolada a partir da farinha delipidada de sementes de *M. citrifolia* L. segundo protocolo já descrito, e utilizada para tratamento por via oral de camundongos induzidos a lesões hepáticas e gástricas (projeto aprovado pelo CEUA-UFC – Protocolo nº 109/2016). *McLTP*₁ foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) e em todas as doses testadas (4, 8 e 16 mg/kg) as lesões gástricas induzidas por etanol após 1h, com valor máximo de inibição de 84% na dose de 8 mg/kg nos tratamentos profilático e terapêutico. Essa inibição não diferiu significativamente dos efeitos observados para o controle positivo N-acetilcisteína (300 mg/kg). O efeito gastroprotetor de *McLTP*₁ parece estar relacionado à ativação da via do óxido nítrico (NO), uma vez que o pré-tratamento dos animais com L-NAME (20 mg/kg, i.p.) antes do tratamento com *McLTP*₁, foi capaz de reverter parcialmente os efeitos observados, enquanto *McLTP*₁ mostrou-se resistente ao tratamento com indometacina e vermelho de rutênio, indicando a não participação de prostaglandinas e canais TRPV₁. *McLTP*₁ foi capaz de reduzir a secreção gástrica em modelo de ligadura pilórica. Assim como, reduzir significativamente os níveis de malondialdeído (de $70,7 \pm 12,5$ para $39,8 \pm 11,6$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ do MDA) e de aumentar significativamente os níveis de glutathiona reduzida (GSH) mostrando que essa proteína é capaz de inibir o estresse oxidativo que precede as lesões experimentais induzidas por etanol. Nos ensaios de lesão hepática induzida por paracetamol, *McLTP*₁ (8mg/kg v.o.) foi capaz de reduzir significativamente as alterações histopatológicas induzidas pelo paracetamol, diminuindo os níveis de AST e ALT em amostras de soro dos camundongos. Tal como observado no modelo de úlcera induzida por etanol, o tratamento dos animais com *McLTP*₁ foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA (de $139,1 \pm 23,6$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ para $81,6 \pm 7,0$), e de aumentar os níveis de GSH (de $158,9 \pm 26,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ para $319,2 \pm 21,8$) ($p < 0,05$). *McLTP*₁ foi capaz de proteger a mucosa gástrica de lesão por etanol via mecanismos antioxidantes e com envolvimento do NO e de redução da secreção gástrica. Assim como foi capaz de proteger o fígado de lesão hepática por paracetamol via mecanismos de defesa oxidativa. Sendo a primeira abordagem experimental envolvendo a investigação de efeitos gastro e hepatoprotetores de proteínas transferidoras de lipídeos.

Palavras-chave: *Morinda citrifolia* L. Noni. McLTP₁. Úlcera gástrica. Atividade hepatoprotetora.

ABSTRACT

The digestive tract is exposed to several exogenous aggressive factors capable of causing lesions and dysfunctions in several organs. For this reason, several molecules have been investigated for their pharmacological potential for the treatment of these disorders. This study aimed to evaluate the gastroprotective and hepatoprotective effects of a thermostable protein isolated from *Morinda citrifolia* L seeds. The protein, denominated *McLTP*₁, was isolated from *M. citrifolia* L. seeds according to protocol already described, and used for oral treatment of mice induced to hepatic and gastric lesions (project approved by CEUA-UFC - Protocol n° 109/2016). *McLTP*₁ was able to significantly reduce ($p < 0.05$) and at all doses tested (4, 8 and 16 mg / kg) the gastric lesions induced by ethanol after 1h, with a maximum inhibition value of 84% at 8 mg / kg in prophylactic and therapeutic treatments. This inhibition did not differ significantly from the effects observed for the N-acetylcysteine positive control (300 mg / kg). The gastroprotective effect of *McLTP*₁ appears to be related to activation of the nitric oxide (NO) pathway, since pre-treatment of animals with L-NAME (20 mg / kg, ip) prior to treatment with *McLTP*₁ was able to reverse partially observed effects, while *McLTP*₁ was resistant to treatment with indomethacin and ruthenium red, indicating the non-participation of prostaglandins and TRPV₁ channels. *McLTP*₁ was able to reduce gastric secretion in pyloric ligation model. As well as significantly reducing the levels of malondialdehyde (from 70.7 ± 12.5 to 39.8 ± 11.6 $\mu\text{g} / \text{mg}$ of MDA) and significantly increasing the levels of reduced glutathione (GSH) showing that this protein is capable to inhibit the oxidative stress that precedes the ethanol-induced experimental lesions. In paracetamol-induced hepatic injury assays, *McLTP*₁ (8mg / kg v.o.) was able to significantly reduce the histopathological changes induced by paracetamol, decreasing the levels of AST and ALT in serum samples from mice. As observed in the ethanol-induced ulcer model, treatment of the animals with *McLTP*₁ was able to significantly reduce MDA levels (from 139.1 ± 23.6 $\mu\text{g} / \text{mg}$ to 81.6 ± 7.0), and from increase GSH levels (from 158.9 ± 26.38 $\mu\text{g} / \text{mg}$ to 319.2 ± 21.8) ($p < 0.05$). *McLTP*₁ was able to protect the gastric mucosa from injury by ethanol via antioxidant mechanisms and with NO involvement and reduction of gastric secretion. As well as it was able to protect the liver from liver damage by paracetamol via oxidative defense mechanisms. This is the first experimental approach involving the investigation of gastro and hepatoprotective effects of lipid transfer proteins.

Key words: *Morinda citrifolia* L. Noni. *McLTP*₁. Gastric ulcer. Hepatoprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação das enzimas antioxidantes na lesão causada pelo etanol.....	19
Figura 2 - Mucosa gástrica e seus mecanismos de defesa.....	22
Figura 3 - <i>Morinda citrifolia</i> L. visão geral.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencias efeitos adversos associados ao uso prolongado dos IBPs.....	18
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminostransferase
ANOVA	Análise de variância
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GPX	Glutathiona peroxidase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
IBPs	Inibidores de bomba de prótons
L-NAME	N (ω) -nitro-L-arginina metil éster
LTPs	Proteínas transferidoras de lipídeos
MDA	Malondialdeído
NAC	N-acetilcisteína
NAPQUI	N-acetil- <i>p</i> -benzoquinona
NO	Óxido nítrico
PG	Prostaglandinas
TCA	Ácido tricloroacético
TRPV ₁	Receptor Vaniloide de potencial transiente tipo 1

SUMÁRIO

1	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Úlcera gástrica – aspectos gerais e fisiopatologia das lesões causadas por etanol	16
2.2	Mecanismos fisiológicos de proteção da mucosa gástrica.....	20
2.3	Lesões hepáticas causadas por paracetamol.....	23
2.4	<i>Morinda citrifolia</i> L.....	25
3	INTRODUCTION.....	39
4	MATERIALS AND METHODS.....	40
4.1	Drugs and reagents.....	40
4.2	Purification of <i>McLP</i> ₁	40
4.3	Animals	41
4.4	Ethanol-induced gastric lesion in mice	41
4.4.1	<i>Histopathological evaluation</i>	41
4.4.2	<i>Measurement of malondialdehyde (MDA) and Glutathione (GSH) levels on the gastric tissue</i>	42
4.4.3	<i>Role of nitric oxide, prostaglandin and TRPV₁ receptor in the gastroprotective effect of <i>McLTP</i>₁</i>	42
4.5	Effect of <i>McLTP</i> ₁ on gastric secretion.....	42
4.6	Acetaminophen-induced hepatotoxicity.....	43
4.6.1	<i>Biochemical parameters of serum</i>	43
4.7	Statistical analysis.....	43
5	RESULTS.....	43
5.1	Gastroprotective effect of <i>McLTP</i> ₁	43
5.1.1	<i>Effect of <i>McLTP</i>₁ on ethanol-induced gastric damage</i>	44
5.1.2	<i>Effect of <i>McLTP</i>₁ on MDA and GSH levels in the ethanol-induced gastric damage</i>	44
5.1.3	<i>Pharmacologic mechanisms of <i>McLTP</i>₁ on ethanol-induced gastric damage</i>	45
5.1.4	<i>Effect of <i>McLTP</i>₁ on the gastric acid secretion</i>	45

5.2	Hepatoprotective effect of McLTP₁ against acetaminophen-induced hepatotoxicity	45
5.2.1	<i>Hepatic histopathological evaluation of protective effect of McLTP₁</i>	45
5.2.2	<i>Assessment of biochemical parameters</i>	45
6	DISCUSSION	46
7	CONCLUSION	50
8	CONFLICT OF INTEREST	50
9	ACKNOWLEDGMENTS	50
	FIGURE CAPTIONS	55
	ANEXOS-FIGURES	62