



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO**

**ConA e ConBr PREVINEM AUMENTO DE  $[Ca^{2+}]_c$  E NECROSE DE CÉLULAS  
ACINARES PANCREÁTICAS E MELHORAM PANCREATITE AGUDA  
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

**FORTALEZA - CE**

**2019**

**SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO**

**ConA e ConBr PREVINEM AUMENTO DE  $[Ca^{2+}]_c$  E NECROSE DE CÉLULAS  
ACINARES PANCREÁTICAS E MELHORAM PANCREATITE AGUDA  
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

**FORTALEZA - CE**

**2019**

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)

---

- D1c DAMASCENO, SAMARA RODRIGUES BONFIM.  
ConA e ConBr PREVINEM AUMENTO DE  $[Ca^{2+}]_c$  E NECROSE DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS E MELHORAM PANCREATITE AGUDA ALCOÓLICA EXPERIMENTAL / SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO. – 2019.  
145 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. PEDRO MARCOS GOMES SOARES.
1. Pancreatite Aguda Alcoólica. 2. Cálcio Citosólico. 3. Morte Celular. 4. ConA. 5. ConBr. I. Título.  
CDD 615.1
-

**SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO**

**ConA e ConBr PREVINEM AUMENTO DE  $[Ca^{2+}]_c$  E NECROSE DE CÉLULAS  
ACINARES PANCREÁTICAS E MELHORAM PANCREATITE AGUDA  
ALCOÓLICA EXPERIMENTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

Aprovada em: 04-02-2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo**  
**Universidade Federal de Sergipe – UFS**

---

**Prof. Dr. Rondinelle Ribeiro Castro**  
**Universidade Estadual do Ceará – UECE**

---

**Profa. Dra. Alana de Freitas Pires**  
**Universidade Estadual do Ceará – UECE**

---

**Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza**  
**Universidade Federal do Ceará - UFC**

*Gracias a Deus!*

## DEDICATÓRIA

*A Deus, por me fazer lembrar dos dias em que orei por coisas que tenho hoje! Pela proteção, pelas pessoas especiais que colocou na minha vida, pela concretização desse sonho!*

*Aos meus pais, Joaquim e Helena, e à minha avózinha Lourdes, por serem meus maiores suportes e exemplos de dedicação e amor. Tudo o que sou, devo a vocês...*

*Ao meu namorado Renan Oliveira, pela amizade desde o tempo de ICs, pelos ensinamentos, apoio, companheirismo, confiança, respeito e imenso amor...*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todas as bênçãos e pessoas de luz que colocou no meu caminho, pela fé e resiliência que me deu para suportar os dias difíceis dessa jornada (que não foram poucos), pela força e coragem para seguir em frente e finalmente pela concretização desse importante ciclo da minha vida.

Aos meus pais, **Joaquim e Kelena**, pelo grande amor e exemplo que me deram desde sempre. Pelas dificuldades superadas e toda renúncia de luxo ou conforto para a minha formação. Por me fazerem acreditar que eu era capaz. Por se amarem tanto e me ensinarem o verdadeiro significado de amor. Pelo apoio incondicional em tudo que me propus. Pelo incentivo aos meus estudos, mesmo quando tive que sair da sua proteção aos 14 anos para estudar e nunca mais ter voltado. Pelo abraço apertado a cada visita. Pela simplicidade, humildade, honestidade, caráter e fé que sempre tiveram e me ensinaram a ter. Pela bênção de ser filha de vocês!

À minha avózinha, **Maria de Lourdes**, por ser um exemplo de amor e bondade, por ter contribuído para a minha formação. Pelos foguetes que você comprou quando passei no vestibular. Pelas conversas tão simples que sempre tivemos. Tenho um amor por ti que nem sei se cabe em mim...

À meu irmão, **Samuel Rodrigues**, pelo apoio, força e amor.

À meu namorado **Renan Oliveira**, por ser meu exemplo de dedicação à pesquisa e apoio científico, merecedor da minha admiração em tudo, meu porto seguro, pelo amor leve, simples e gigante que temos! Por me acompanhar nesses 10 anos de amizade e nunca soltar a minha mão, nem na bancada de laboratório, nem na vida... Te amo!

À minhas companheiras de morada, **Kerlice e Karol**, pela convivência harmoniosa, tranquila e pela amizade forte e verdadeira que construímos ao longo desses anos. Pelas conversas bobas no nosso sofá querido, pelas risadas e gargalhadas que

incomodavam os vizinhos, pelas gordices de final de mês, pelo companheirismo e confidências trocadas, pela compreensão e apoio nos momentos difíceis e por todos os momentos simples, importantes, tristes ou alegres compartilhados ao longo desses 6 anos. Vocês foram uma das melhores partes desse ciclo. Eu amo vocês!

À toda minha família e amigos pelo apoio e incentivo nessa jornada, em especial à minha prima Débora e amigas Miúda (Guinha), Paula, Eli, Vanessa, Nathália, Marielle, Valdelânica, Juana, Laura, Valdênia e Jessyka.

À **Prof. Dr. Gand Venes Rolim Medeiros**, pela orientação na minha iniciação científica, por me ensinar como segurar um camundongo, como escrever um paper e como fazer pesquisa com ética e qualidade.

À meu orientador, **Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares**, pela acolhida ao seu laboratório, pela oportunidade de trabalhar em uma nova linha de pesquisa, pela sua dedicação ao laboratório e por todos os ensinamentos.

À **Prof. Dr. David Cuddle**, pela oportunidade de realizar parte do meu Doutorado na Universidade de Liverpool, Inglaterra, e por todo o amadurecimento pessoal e profissional que me proporcionou.

À toda a equipe do Blue Block do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Liverpool, Inglaterra, **Prof. Dr. Alexey Tepikin, Svetlana, Mayrel, Helen, Francesca, Jane, Jack, Yulin, Toni, Tobi e Micha** que me acolheram e me fizeram sentir em casa durante os 6 meses de realização do Doutorado Sanduíche.

À **Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada** e a toda a equipe do **Biomolab**, pela colaboração e por terem cedido as lectinas, fundamentais para a concretização desse trabalho.

À **Profa. Dra. Ana Maria Assreuy**, pela colaboração e solicitude.

À **Prof. Dr. Marcellus Henrique L. P. de Souza**, pela disponibilidade e cortesia sempre que precisei.

À **Prof. Dr. Gustavo Rêgo Coelho**, à Coordenadora da Central de Transplantes do Ceará, **Dra. Eliana Régia** e a toda equipe de enfermagem da Comissão Intra-hospitalar de Doação de Órgãos e Tecidos para Transplante (**Cihdott**) do Hospital **GGF**, pela colaboração para a realização dos experimentos translacionais com células humanas.

À todos os integrantes do Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal (**Leffag**) pelo apoio, amizade e união compartilhados ao longo desses anos. Em especial ao **Tiago (Ti)**, **Álvaro (Alvim)**, **Marcos (Marquim)** e **Patrícia (Paty)** pelo apoio e parceria em tantos momentos, pelo auxílio para a concretização de alguns experimentos, pelos momentos divertidos compartilhados e pela amizade sincera que construímos.

À técnica de laboratório mais fofinha e competente, querida **Eliane**, quase uma mãe para todos nós.

Às leffagatas, **Fabírcia**, **Kaira** e **Ceci**, pela grandiosa amizade que construímos ao longo desses anos... Vocês foram o meu apoio quando a fraqueza me consumia, e me fortaleceram com cada palavra dita. Vocês foram o sorriso ao final de um dia cansativo. Vocês foram as minhas professoras em algumas lições de vida. Vocês foram as mãos que me ajudaram quando eu não conseguia mais sozinha. Vocês são bênçãos na minha vida. Muito obrigada por tudo!

À todos os ICo do Leffag, em especial à **Myleide**, **Sarah**, **Victor**, **João Victor**, **Renata** e **Lorena**, pelo compromisso, responsabilidade e auxílio ao meu trabalho sempre que precisei.

À *Prof. Dr. Pedro Magalhães*, coordenador da Pós-Graduação em Farmacologia, pela competência, ética, profissionalismo e empatia em todos os momentos.

Às secretárias da Pós-Graduação em Farmacologia, *Laura e Célia*, pela gentileza e competência com que sempre me receberam.

A todos os *Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará*, pelas aulas de altíssimo nível e qualidade e por fazerem parte do meu processo de aprendizado para obtenção do título de Doutora em farmacologia.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que sempre me trataram com muita gentileza e respeito, em especial ao *José Amadeus, Seu Adalto, Seu Moreira, Augusto, Cláudia, Jefferson, Teresinha, Seu Valdenir, Seu Reginaldo (em memória), Seu Rogério e Marcílio*.

À *Cnpq* pelo incentivo à pesquisa e suporte financeiro que tem me oferecido durante a Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado. E à *Capes*, pelo financiamento do meu Doutorado Sanduíche no Exterior.

À *Banca Examinadora da Minha Defesa de Tese*, por ter aceitado o convite para avaliar meu trabalho.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a concretização dessa importante etapa da minha vida.

Muito obrigada!

*“Um passarinho quando aprende a voar sabe  
mais sobre coragem que de voo.”*

*(Lucão)*

## RESUMO

### **ConA e ConBr previnem aumento de $[Ca^{2+}]_c$ e necrose de células acinares pancreáticas e melhoram pancreatite aguda alcoólica experimental**

Etanol/POA causa elevações de cálcio, colapso mitocondrial, necrose de células acinares pancreáticas e pancreatite aguda experimental, sendo um dos melhores modelos caracterizados para o estudo da pancreatite aguda alcoólica, a qual até o presente momento não dispõe de tratamento eficaz que tenha levado à sua cura. Nesse sentido as lectinas ConA e ConBr possuem atividades biológicas importantes de proteção celular e sistêmica em diversos modelos de doença, e dessa forma, apresentam-se como potencial alternativa terapêutica. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de ConA e ConBr na lesão pancreática causada por Etanol/POA “*in vitro*” e “*in vivo*”. Células acinares foram isoladas de pâncreas de camundongos Swiss machos e de humanos, incubadas com ConA ou ConBr (10  $\mu\text{g/mL}$ , 1h), seguido da incubação com Etanol/POA (100  $\mu\text{M}$ , 30 min). Para análise da participação dos canais de cálcio, foi utilizado tapsigargina (2  $\mu\text{M}$ , inibidor da bomba de  $Ca^{2+}$  do Retículo Endoplasmático-SERCA). Para avaliar o domínio lectínico, as lectinas foram incubadas por 1h, com  $\alpha$ -metil-manosídeo ( $\alpha$ -MM; 0,1M). ConA ou ConBr acopladas à fluoresceína foram usadas para avaliação de sua interação com a célula acinar. As análises foram realizadas utilizando fluoróforos e avaliadas em microscópio confocal ou fluorímetro. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e considerados estatísticos quando  $p < 0,05$ . Etanol/POA (24,9 $\pm$ 2,6%) causou significativa ( $P < 0,05$ ) necrose nas células acinares murinas, comparado ao controle (9,0  $\pm$  2,6%), mas foi prevenida por ConA (8,1 $\pm$ 1,3%) e ConBr (9,4 $\pm$ 0,8%). Esse efeito protetor foi abolido por  $\alpha$ -MM (ConA: 19,1 $\pm$ 3,5 e ConBr: 26,9 $\pm$ 6,4%). Em células acinares humanas ConA (64,21  $\pm$  7,82 %) e ConBr (61,70  $\pm$  4,70 %) também diminuíram a necrose causada por Etanol/POA (84,37  $\pm$  3,45 %). Etanol/POA (488,3 $\pm$ 25,07 AUC) aumentou os níveis de  $[Ca^{2+}]_c$ , comparado ao controle (203,3 $\pm$ 1,2 AUC), o qual foi diminuído por ConA (304,7 $\pm$ 12,79 AUC) e ConBr (262,6 $\pm$ 15,42 AUC). Na avaliação dos canais de  $Ca^{2+}$  operados por estoque (SOCs), a administração de 10 mM de  $Ca^{2+}$  em células pré-incubadas com TPG aumentou os níveis de  $[Ca^{2+}]_c$  (2090 $\pm$ 139,5 AUC), comparado ao controle (190,3 $\pm$ 2,8 AUC); sendo prevenido por ConA (1395 $\pm$ 104,6 AUC) e ConBr (1132 $\pm$ 131,2 AUC). Etanol/POA aumentou  $[Ca^{2+}]_c$  pela interação com receptores de inositol trifosfato ( $IP_3R$ ) (413,4 $\pm$ 28,30 vs Controle: 193,3 $\pm$ 2,8 AUC), ConA e ConBr preveniram esse efeito (220,8 $\pm$ 08,03 e 232,0 $\pm$ 20,52 AUC, respectivamente). Etanol/POA (1248 $\pm$ 105,2 AUC) promoveu aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , comparado ao controle (189,4 $\pm$ 3,7), o qual foi revertido por ConA e ConBr (444,8 $\pm$ 22,86 e 440,3 $\pm$ 67,82 AUC, respectivamente). Contudo, as lectinas não preveniram a entrada de cálcio em mitocôndrias isoladas, na análise de MPTP (Etanol/POA: 0,32 $\pm$ 0,06 vs ConA: 0,31 $\pm$ 0,05 e ConBr: 0,32 $\pm$ 0,06). ConA e ConBr (13,41 $\pm$ 1,1 e 13,25 $\pm$ 1,1, respectivamente) preveniram a liberação de amilase intra-acinar causada por Etanol/POA (18,7 $\pm$ 2,2). As imagens de ConA e ConBr acopladas à fluoresceína demonstraram que ConA é internalizada e promove apoptose, enquanto ConBr interage com a membrana da célula e não exerce esse efeito. Além disso, ambas proteínas diminuíram os processos histopatológicos, inflamatórios, bioquímicos e nociceptivos causados pela administração de Etanol/POA em camundongos. Estes dados em conjunto reforçam o papel dessas lectinas como potenciais moléculas para investigações de tratamento no curso da pancreatite aguda alcoólica.

**Palavras-chave:** Pancreatite Aguda Alcoólica. Cálcio Citosólico. Morte Celular. ConA. ConBr.

## ABSTRACT

### **ConA and ConBr prevent increased $[Ca^{2+}]_c$ and necrosis of pancreatic acinar cells and improve experimental acute alcoholic pancreatitis**

Ethanol/POA causes calcium elevations, mitochondrial collapse, necrosis of pancreatic acinar cells and acute experimental pancreatitis, It is one of the best models characterized for the study of acute alcoholic pancreatitis, which until now has no cure or effective treatment. In this sense, the ConA and ConBr lectins have important biological activities of cellular and systemic protection in several disease models, and, therefore, present themselves as a potential therapeutic alternative. The objective of this study was to evaluate the effect of ConA and ConBr on *in vitro* and *in vivo* pancreatic injury caused by Ethanol/POA. Acinar cells were isolated from pancreas of male Swiss mice and human, incubated with ConA or ConBr (10  $\mu$ g/ml, 1h), followed by incubation with Ethanol/POA (100  $\mu$ M, 30 min). In order to analyze the calcium channel participation, thapsigargin (2  $\mu$ M,  $Ca^{2+}$  pump of the Endoplasmic Reticulum-SERCA) was used. In order to evaluate the lectin domain, the lectins were incubated for 1 h with  $\alpha$ -methyl-mannoside ( $\alpha$ -MM; 0.1M). The analyzes were carried out using fluorophores and evaluated by confocal microscope or fluorimeter. ConA or ConBr coupled to fluorescein were used to evaluate their interaction with the acinar cell. Data expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean and considered statistical when  $p < 0.05$ . The necrosis caused by Ethanol/POA ( $24.9 \pm 2.6\%$ ) in murine acinar cells, compared to control ( $9.0 \pm 2.6\%$ ), was prevented ( $p < 0.05$ ) by ConA ( $8.1 \pm 1.3\%$ ) and ConBr ( $9.4 \pm 0.8\%$ ). This protective effect was abolished by  $\alpha$ -MM (ConA:  $19.1 \pm 3.5$  and ConBr:  $26.9 \pm 6.4\%$ ). In human acinar cells ConA ( $64.21 \pm 7.82\%$ ) and ConBr ( $61.70 \pm 4.70\%$ ) also prevented necrosis caused by Ethanol/POA ( $84.37 \pm 3.45\%$ ). The increase of  $[Ca^{2+}]_c$  caused by Ethanol/POA ( $488.3 \pm 25.07$ AUC), compared to control ( $203.3 \pm 1.2$  AUC), was prevented by ConA ( $304.7 \pm 12.79$  AUC) and ConBr ( $262.6 \pm 15.42$  AUC). In the evaluation of store-operated  $Ca^{2+}$  channels (SOCs), the increase of  $[Ca^{2+}]_c$  levels ( $2090 \pm 139.5$  AUC) promoted by administration of 10 mM  $Ca^{2+}$  in cells pre-incubated with TPG, compared to control ( $190, 3 \pm 2.8$  AUC), was decreased by ConA ( $1395 \pm 104.6$  AUC) and ConBr ( $1132 \pm 131.2$  AUC). The increase of  $[Ca^{2+}]_c$  caused by interaction of Ethanol/POA with inositol triphosphate ( $IP_3R$ ) receptors ( $413.4 \pm 28.30$  vs Control:  $193.3 \pm 2.8$  AUC) was decreased by ConA and ConBr ( $220.8 \pm 08.03$  e  $232.0 \pm 20.52$  AUC, respectively). The increase of  $[Ca^{2+}]_{mit}$  promoted by Ethanol/POA ( $1248 \pm 105.2$  AUC), compared to control ( $189.4 \pm 3.7$ ), was reversed by ConA and ConBr ( $444.8 \pm 22.86$  e  $440.3 \pm 67.82$  AUC, respectively). However, lectins did not prevent the entry of calcium into isolated mitochondria in MPTP analysis (POA:  $0.32 \pm 0.06$  vs ConA:  $0.31 \pm 0.05$  and ConBr:  $0.32 \pm 0.06$ ). In addition, the amylase release caused by Ethanol/POA ( $18.7 \pm 2.2$ ) was prevented by ConA and ConBr ( $13.41 \pm 1.1$  and  $13.25 \pm 1.1$ , respectively). ConA and ConBr images coupled to fluorescein demonstrated that ConA is internalized and promotes apoptosis, whereas ConBr interacts with the cell membrane and does not exert this effect. In addition, the histopathological, inflammatory, biochemical and nociceptive processes caused by the administration of Ethanol/POA in mice were decreased by both lectins. These data together reinforce the role of these proteins as potential molecules for investigations of treatment in the course of acute alcoholic pancreatitis.

**Keywords:** Acute Alcoholic Pancreatitis. Cytosolic Calcium. Cell Death. ConA. ConBr.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura e localização do pâncreas e ductos excretorios.....	22.
<b>Figura 2.</b> Sistema de comunicação das células acinares e ductos pancreáticos.....	24.
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático ilustrando os canais de cálcio da célula acinar pancreática..	29.
<b>Figura 4.</b> Vias de metabolização do etanol no pâncreas.....	34.
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de Dano Induzido por Etanol/POA.....	38.
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas obtidas do modelo estrutural do monômero da Concanavalina A.....	40.
<b>Figura 7.</b> Representações esquemáticas da ligação de íons e carboidrato a lectinas de leguminosas.....	41.
<b>Figura 8.</b> Representação da imagem da leguminosa <i>Canavalia ensiformis</i> e da estrutura da lectina ConA.....	46.
<b>Figura 9.</b> Equilíbrio químico entre as formas tetraméricas e diméricas da ConA em função do pH.....	46.
<b>Figura 10.</b> Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a localização das quatro subunidades.....	48.
<b>Figura 11.</b> Sequência de aminoácidos das lectinas ConA e ConBr.....	49.
<b>Figura 12.</b> Comparação (por superposição) das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros de ConA e ConBr.....	50.
<b>Figura 13.</b> Protocolo experimental de retirada de tecido pancreático humano.....	54.
<b>Figura 14.</b> Protocolo experimental de Isolamento Primário de Células Acinares.....	58.
<b>Figura 15.</b> Protocolo de análise do efeito de ConA e ConBr sobre a necrose e apoptose em células acinares estimuladas por Etanol/POA.....	59.
<b>Figura 16.</b> Protocolo de análise do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ causado por Etanol/POA.....	61.
<b>Figura 17.</b> Protocolo de avaliação do papel de ConA ou ConBr na prevenção da liberação de $Ca^{2+}$ causada por Etanol/POA: potencial interação com $IP_3R$ .....	62.
<b>Figura 18.</b> Protocolo de análise do papel de ConA e ConBr na prevenção da entrada de $Ca^{2+}$ externo: potencial interação com SOCs.....	63.
<b>Figura 19.</b> Protocolo de avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ causado por Etanol/POA.....	64.
<b>Figura 20.</b> Protocolo de avaliação do efeito de ConA e ConBr na regulação do Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas.....	66.

<b>Figura 21.</b> Protocolo de avaliação do papel de ConA e ConBr na liberação de amilase intracinar causada por Etanol/POA.....	67.
<b>Figura 22.</b> Protocolo de análise da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas.....	68.
<b>Figura 23.</b> Protocolo de delineamento da indução de pancreatite aguda alcoólica experimental.....	69.
<b>Figura 24.</b> Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas.....	73.
<b>Figura 25.</b> Confirmação do efeito antinecrótico de ConA e ConBr em análise overnight.....	74.
<b>Figura 26.</b> Avaliação da participação do domínio lectínico no efeito antinecrótico de ConA e ConBr.....	75.
<b>Figura 27.</b> Observação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas.....	76.
<b>Figura 28.</b> Ensaio de morte celular apoptótica em células acinares pancreáticas: efeito de ConA e ConBr.....	77.
<b>Figura 29.</b> Papel de ConA e ConBr na proteção contra o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA.....	77.
<b>Figura 29.1.</b> Imagens de microscopia confocal do papel de ConA e ConBr contra o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA.....	78.
<b>Figura 30.</b> Análise da capacidade de ConA e ConBr causarem aumento de $[Ca^{2+}]_c$ <i>per si</i> ....	79.
<b>Figura 31.</b> Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por armazenamento (SOCs) em células acinares pancreáticas – incubação prévia de TPG.....	80.
<b>Figura 32.</b> Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por armazenamento (SOCs) em células acinares pancreáticas – incubação prévia de Etanol/POA.....	80.
<b>Figura 33.</b> Capacidade de ConA e ConBr reverter o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ em células acinares pancreáticas.....	81.
<b>Figura 34.</b> Participação de ConA e ConBr no aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA em condições livres de cálcio: possível interação com $IP_3R$ .....	82.
<b>Figura 35.</b> Papel de ConA e ConBr na liberação de cálcio através do bloqueio da bomba SERCA promovido por tapsigargina.....	83.
<b>Figura 36.</b> Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[Ca^{2+}]_c$ causadas por concentração fisiológica de CCK (10 pM) .....	84.

<b>Figura 37.</b> Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[Ca^{2+}]_c$ causadas por concentração patológica de CCK (10 nM) .....	84.
<b>Figura 38.</b> Efeito de ConA e ConBr na prevenção do aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA.....	85.
<b>Figura 39.</b> Efeito de ConA e ConBr na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas.....	86.
<b>Figura 40.</b> Efeito de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA: envolvimento do domínio lectínico.....	87.
<b>Figura 41.</b> Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas humanas.....	88.
<b>Figura 42.</b> Papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA: avaliação histopatológica.....	89.
<b>Figura 43.</b> Fotomicrografias da avaliação histopatológica do papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA .....	90.
<b>Figura 44.</b> Papel de ConA e ConBr na avaliação de peso úmido pancreático em animais tratados com Etanol/POA.....	91.
<b>Figura 45.</b> Papel de ConA e ConBr na dosagem de mieloperoxidase em camundongos submetidos à pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA.....	92.
<b>Figura 46.</b> Efeito de ConA e ConBr na dosagem de amilase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	93.
<b>Figura 47.</b> Efeito de ConA e ConBr na dosagem de lipase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	94.
<b>Figura 48.</b> Efeito de ConA e ConBr na ativação de tripsina na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	95.
<b>Figura 49.</b> Análise da Participação de ConA e ConBr na avaliação das transaminases hepáticas (TGO e TGP) na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	96.
<b>Figura 50.</b> Avaliação do potencial antinociceptivo de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	97.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADH</b>	Álcool-desidrogenase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>	Bomba de Cálcio-ATPase
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CCK</b>	Colecistocinina
<b>CEPA</b>	Comitê de ética em pesquisa animal
<b>ConA</b>	Lectina Concanavalina A de <i>Canavalia ensiformis</i>
<b>ConBr</b>	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
<b>CONCEA</b>	Conselho nacional de controle da experimentação animal
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EEAG</b>	Etil éster de ácidos graxos
<b>EEAP</b>	Etil éster de ácido palmitoleico
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>g</b>	Grama
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroxietil)- 1- piperazinoetanossulfônico
<b>IP</b>	Iodeto de propídeo
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor de trifosfato de inositol
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Manganês
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NAD</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
<b>NADH</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida

<b>nm</b>	Nanômetros
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>PA</b>	Pancreatite aguda
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>POA</b>	Ácido Palmitoleico
<b>MPTP</b>	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RyR</b>	Receptor de rianodina
<b>T.A</b>	Temperatura ambiente
<b>TMRM</b>	Tetrametil rodamina metil éster
<b>u.m.a</b>	Unidade de massa atômica
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\alpha</math>-MM</b>	Alfa-metil-manosídeo
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar
<b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>	Concentração de cálcio
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>	Concentração de cálcio citosólico
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentração de cálcio intracelular
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub></b>	Concentração de cálcio mitocondrial
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub></b>	Concentração de cálcio do retículo endoplasmático
<b><math>\Delta\Psi_m</math></b>	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1. Anatomia e fisiologia do pâncreas	22
1.2. Canais de cálcio na célula acinar pancreática	25
1.3. Pancreatite aguda	29
1.4. Pancreatite aguda causada por álcool: a importância do metabolismo não-oxidativo	32
1.5. Mecanismos de dano induzido por Etanol/POA: a relação entre o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ , lesão mitocondrial, diminuição de ATP, necrose celular e inflamação na pancreatite aguda	34
1.6. Lectinas de leguminosas como alternativa terapêutica	38
1.7. Lectina das sementes de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	45
1.8. Lectina das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	48
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>51</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
3.1. Objetivo geral	52
3.2. Objetivos específicos	52
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>53</b>
4.1. Aspectos éticos envolvendo pesquisa animal	53
4.2. Animais	53
4.3. Aspectos éticos envolvendo pesquisa com células humanas	53
4.4. Retirada de amostra de tecido pancreático humano	54
4.5. Lectinas vegetais	55
4.6. Aparelhos e instrumentos laboratoriais	55
4.7. Fármacos, soluções e marcadores fluorescentes	56
4.7.1. Fármacos e reagentes	56
4.7.2. Soluções	56
4.7.3. Marcadores fluorescentes	56
4.8. Estudos <i>In Vitro</i>	57
4.8.1. Preparação celular e soluções	57
4.8.2. Isolamento de células acinares pancreáticas	57
4.8.3. Análise dos efeitos de ConA e ConBr sobre a necrose e apoptose em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA	58
4.8.4. Avaliação da participação do domínio lectínico nos efeitos de ConA e ConBr	59
4.8.5. Avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ causado por Etanol/POA	60
4.8.6. Análise da participação de ConA ou ConBr na Prevenção da Liberação de $Ca^{2+}$ causada por Etanol/POA: Potencial Interação com $IP_3R$	61
4.8.7. Análise da participação de ConA ou ConBr na prevenção da entrada de $Ca^{2+}$ externo: potencial interação com SOCs	62
4.8.8. Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[Ca^{2+}]_c$ causadas por concentrações fisiológicas e patológicas de CCK	63
4.8.9. Avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ causado por Etanol/POA	64
4.8.10. Avaliação de ConA e ConBr na regulação do Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas	64
4.8.11. Análise do papel de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar causada por Etanol/POA	66
4.8.12. Avaliação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas	67
4.9. Estudos <i>In Vivo</i>	68

4.9.1. Indução da pancreatite aguda alcoólica experimental .....	68
4.9.2. Avaliação de peso úmido pancreático .....	69
4.9.3. Análise histopatológica do pâncreas.....	69
4.9.4. Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) .....	70
4.9.5. Dosagens de amilase e lipase séricas.....	70
4.9.6. Atividade de tripsina pancreática .....	70
4.9.7. Dosagens de transaminases hepáticas.....	71
4.9.8. Avaliação de dor visceral .....	71
4.9.9. Análise estatística .....	71
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
<b>RESULTADOS EM CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS MURINAS .....</b>	<b>733</b>
5.1. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas .....	73
5.2. Confirmação do efeito antinecrótico de ConA e ConBr em análise overnight .....	74
5.3. Avaliação da participação do domínio lectínico no efeito antinecrótico de ConA e ConBr.....	74
5.4. Observação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas.....	75
5.5. Ensaio de morte celular apoptótica em células acinares pancreáticas: efeito de ConA e ConBr....	76
5.6. Papel de ConA e ConBr na proteção contra o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA.....	77
5.7. Análise da capacidade de ConA e ConBr causarem aumento de $[Ca^{2+}]_c$ <i>per si</i> .....	78
5.8. Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por Estoque (SOCs) em células acinares pancreáticas.....	79
5.9. Verificação da capacidade de ConA e ConBr reverter o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ em células acinares pancreáticas .....	81
5.10. Análise da participação de ConA e ConBr no aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA em condições livres de cálcio: possível interação com $IP_3R$ .....	81
5.11. Papel de ConA e ConBr na liberação de cálcio através do bloqueio da bomba SERCA promovido por tapsigargina.....	82
5.12. Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[Ca^{2+}]_c$ causadas por concentrações fisiológicas e patológicas de CCK.....	83
5.13. Avaliação do efeito de ConA e ConBr na prevenção do aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA.....	85
5.14. Análise do efeito de ConA e ConBr na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas .....	85
5.15. Efeito de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA: envolvimento do domínio lectínico .....	86
<b>RESULTADOS EM CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS HUMANAS.....</b>	<b>87</b>
5.16. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas humanas .....	87
<b>RESULTADOS IN VIVO .....</b>	<b>88</b>
5.17. Papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA: avaliação histopatológica.....	88
5.18. Papel de ConA e ConBr na avaliação de peso úmido pancreático em animais tratados com Etanol/POA.....	90
5.19. Papel de ConA e ConBr na dosagem de mieloperoxidase em camundongos submetidos à pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA.....	91

5.20. Efeito de ConA e ConBr na dosagem de amilase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos .....	92
5.21. Efeito de ConA e ConBr na dosagem de lipase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos .....	93
5.22. Efeito de ConA e ConBr na ativação de tripsina na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	94
5.23. Análise da participação de ConA e ConBr na avaliação das transaminases hepáticas (TGO e TGP) na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos .....	95
5.24. Avaliação do potencial antinociceptivo de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.....	96
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>8. MODELO HIPOTÉTICO .....</b>	<b>110</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>139</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>140</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>144</b>

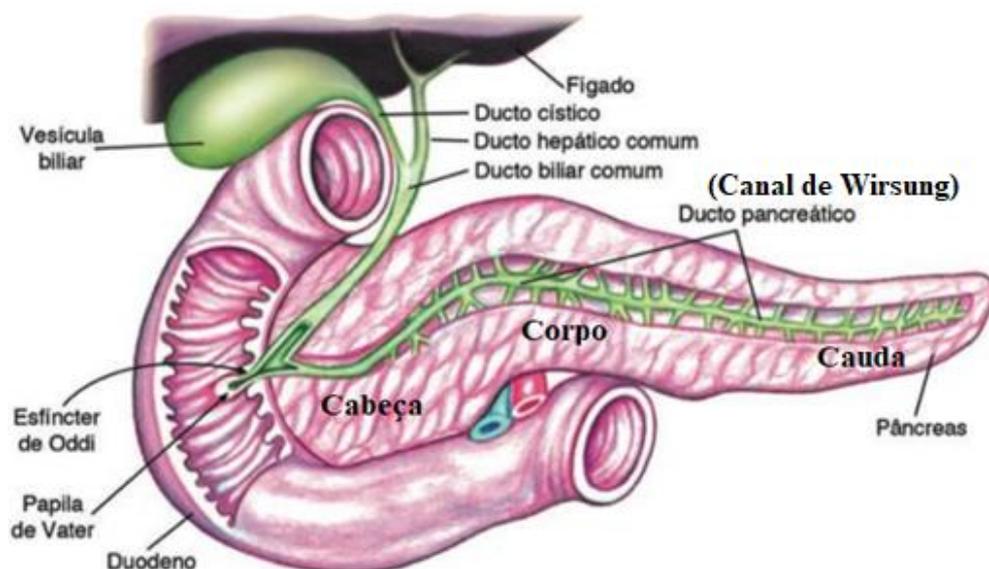
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Anatomia e fisiologia do pâncreas

O pâncreas é um órgão de localização retroperitoneal, dividido em cabeça, processo uncinado, corpo e cauda, posicionado obliquamente entre o arco duodenal e o baço, posteriormente ao estômago e cólon transversal, situado anteriormente à veia cava inferior, aorta, veia esplênica e glândula suprarrenal esquerda (Figura 1) (LONGNECKER, 2014; ORIÁ; BRITO, 2016).

A função endócrina do pâncreas corresponde a apenas 20% em média de sua atividade, enquanto que quase a totalidade do órgão, aproximadamente 80% estão envolvidos com sua função exócrina (THIRUVENGADAM et al., 2012; LEUNG, 2010). O conjunto de células que formam a porção endócrina do pâncreas denomina-se ilhotas de *Langerhans*, sendo estas distribuídas por toda a glândula, mas são relativamente concentradas na cauda do pâncreas, situadas no parênquima pancreático (WANG et al., 2012). Cerca de 75% a 80% são células beta (ou células  $\beta$ ), produtoras de insulina, 10% a 20% são células alfa (ou células  $\alpha$ ), produtoras de glucagon, cerca de 5% são células delta (ou células  $\delta$ ) que contêm somatostatina e há ainda as células F ou PP produtoras de polipeptídeo pancreático (HENRY et al., 2018; BRADLEY, 2012).

**Figura 1.** Estrutura e localização do pâncreas e ductos excretores.



O pâncreas exócrino corresponde à maior parte da massa pancreática, constituída por células, agrupadas em lóbulos (ácinos), os quais estão conectados aos ductos pancreáticos, formando uma espécie de rede, como mostrado na Figura 2. A estrutura do ácino consiste em aglomerados de células epiteliais secretoras com um lúmen no centro, denominado canalículo intercelular (CERANOWICZ et al., 2015). Nessa região se inicia o sistema ductal que se estende até o duodeno. As principais funções do pâncreas exócrino são: secreção de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), que tem o papel de neutralizar o pH ácido do conteúdo gástrico que flui para o interior do duodeno, além das funções de síntese, armazenamento e secreção de enzimas digestivas (MURPHY et al., 2017).

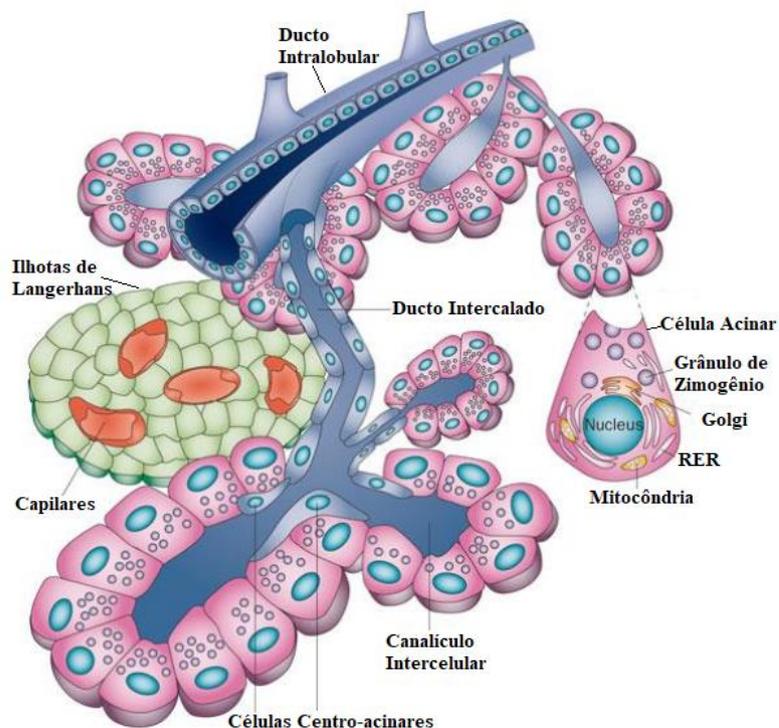
As células acinares, que podem ser esféricas, tubulares ou irregulares (HENRY et al., 2018) possuem duas porções distintas de membrana: a membrana basolateral, que é mais extensa e localizada na periferia acinar, e a membrana apical, que representa menos de 10% da área total da célula, estando voltada para o lúmen central. As células acinares pancreáticas são muito ricas em RNA, indicando intensa atividade de síntese proteica. A síntese das enzimas ocorre nos ribossomos do retículo endoplasmático, posteriormente transportadas em vesículas para o aparelho de Golgi e, então, separadas em diferentes grupos, segundo a sua função. As enzimas digestivas são armazenadas em grânulos de zimogênios contidos na região apical (DE SOUZA et al., 2018). Nas microvilosidades dessa região e no citoplasma subjacente à membrana plasmática apical residem filamentos de actina que estão envolvidos na exocitose do conteúdo dos grânulos (BHARMAL et al., 2017).

Na membrana basolateral existem receptores para hormônios e neurotransmissores que estimulam a secreção dessas enzimas (PANDOL, 2010). Dessa forma, uma vez desencadeados sistemas neuro-humorais como colecistocinina (CCK) (endócrino), acetilcolina e outros peptídeos incluindo secretina, polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV) e angiotensina II, além do sistema nervoso autônomo (NAWROT-PORABKA et al., 2015), os grânulos de zimogênio fundem-se com a membrana apical da célula e os ácinos liberam os conteúdos de seus grânulos secretórios nos ductos intralobulares, alcançando os ductos interlobulares, em seguida os extralobulares e finalmente os ductos pancreáticos acessório e principal. Na sua terminação, o ducto pancreático acopla-se ao colédoco para desembocar no duodeno por um óstio comum, o esfíncter de Oddi, para então ocorrer a ativação dessas enzimas por enteroquinases intestinais, contribuindo assim com o processo de digestão dos alimentos (BHARMAL et al., 2017).

As principais enzimas digestivas encontradas no suco pancreático são a tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases (enzimas proteolíticas), amilase pancreática, lipase pancreática, esterases e fosfolipases

(PENDHARKAR; ASRANI; MURPHY, 2017). As enzimas proteolíticas encontram-se sob a forma de pro-enzimas inativas ou zimogênios (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipolipeptidases). As mesmas células que secretam as enzimas proteolíticas no interior dos ácinos, secretam também outras substâncias, denominadas inibidores da tripsina, que são armazenados no citoplasma das células glandulares que circundam os grânulos de enzimas e previnem a ativação da tripsina tanto no interior das células secretoras quanto nos ductos pancreáticos (NAWROT-PORABKA et al., 2015). Contudo, na vigência de fatores que culminam em intensa lesão do pâncreas, grandes quantidades de secreção pancreática ativam-se dentro da glândula. Embora o pâncreas possua mecanismos capazes de prevenir a ativação intracelular de zimogênios e subsequente autodigestão, em condições de lesão pancreática, os mecanismos protetores são pouco eficientes; assim, as secreções pancreáticas tornam-se rapidamente ativas, podendo levar à autodigestão do pâncreas, predispondo à condição clínica grave de pancreatite aguda (PA) (LV; LIU; ZHAO; QIAN, 2018).

**Figura 2.** Sistema de comunicação das células acinares e ductos pancreáticos.



Estrutura celular do pâncreas. A parte exócrina do pâncreas secreta enzimas digestivas no duodeno, enquanto a parte endócrina fornece hormônios para a corrente sanguínea. A parte exócrina do pâncreas é composta de glândulas acinares que produzem e secretam enzimas digestivas e os ductos que tamponam o pH e transportam a mistura de enzimas para o intestino. Figura modificada de Logsdon et al., 2013.

## 1.2. Canais de cálcio na célula acinar pancreática

Diferentemente das células nervosas, endócrinas e musculares, as células do pâncreas exócrino não possuem canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem e os sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos,  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , que governam a secreção acinar pancreática são gerados principalmente pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, principalmente do retículo endoplasmático (RE) (STREB et al., 1983; PETERSEN, 1992; PETERSEN; TEPIKIN, 2008). No entanto, os depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  são, por definição, finitos. As bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase na membrana plasmática (PMCA) são ativadas para aumentar a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  sempre que a concentração de cálcio intracelular,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , aumenta e, portanto, as células acinares pancreáticas ficariam sem  $\text{Ca}^{2+}$  no RE se não houvesse um mecanismo compensatório de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir da solução externa (PETERSEN; TEPIKIN, 2008).

Este mecanismo de captação é conhecido como entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ativada pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) ou operado por estoque, e os canais CRAC na membrana plasmática têm sido bem caracterizados (PAREKH; PUTNEY, 2005). A natureza molecular desses canais (na célula acinar pancreática o canal Orai1 é o principal canal CRAC até agora conhecido) é agora também conhecida (FESKE et al., 2006) e a ligação entre a depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE e abertura dos canais CRAC tem sido estabelecida, na qual uma redução na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no RE ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) causa translocação de uma proteína sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$ , chamada STIM1, amplamente distribuída na membrana do RE ao chamado “puncta”, ponto próximo à membrana plasmática, onde pode interagir e abrir os canais Orai1 (LIOU et al., 2005; PARK et al., 2009; YUAN et al., 2009). Este mecanismo também atua nas células acinares pancreáticas, porque a liberação causada por estimulantes de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE resulta na translocação do STIM1 para o “puncta” próximo à membrana plasmática basolateral, especificamente em locais onde o RE é desprovido de ribossomos e onde a interação entre STIM1 e Orai1, dessa forma, ocorre (LUR et al., 2009).

A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre através da membrana basolateral (que cobre aproximadamente 95% da superfície celular acinar) para que os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do ER possam ser reabastecidos, após a depleção provocada por agonistas, de qualquer fonte pontual na base de uma célula acinar isolada (ASHBY; TEPIKIN, 2002; PETERSEN, 2005). A ampla distribuição de canais permite a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  em uma situação fisiológica sem qualquer concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  localmente, mas pode resultar em uma elevação global e sustentada de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , o que pode se tornar prejudicial à célula acinar. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque podem ser cruciais no desenvolvimento da pancreatite aguda, pois agentes como altas concentrações tóxicas de colecistocinina (CCK), metabólitos não oxidativos do etanol e ácidos

biliares provocam elevações prolongadas de  $[Ca^{2+}]_i$ , que são, em grande parte, dependentes da presença de  $Ca^{2+}$  externo (GERASIMENKO; TSUGORKA; GERASIMENKO, 2018). De fato, estudos têm mostrado que ocorre proteção contra ativação do tripsinogênio e vacuolização após a remoção do  $Ca^{2+}$  externo nessas situações (GERASIMENKO et al., 2013, CRIDDLE, 2015).

A captação endocítica de  $Ca^{2+}$  (GERASIMENKO et al., 1998) também pode ser importante e ocorre nas células acinares pancreáticas (SHERWOOD et al., 2007). Nesse caso, existem importantes depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  (ácido) fora do RE (MENTEYNE et al., 2006; GERASIMENKO et al., 2009; GERASIMENKO et al., 2011). A liberação de  $Ca^{2+}$  dos armazenamentos acídicos - localizados em grânulos de zimogênios (ZGs), endossomos e lisossomos - desempenha um papel crucial na ativação intracelular de tripsinogênio provocada pelo álcool e por etil ésteres de ácidos graxos em experimentos com células acinares pancreáticas permeabilizadas (GERASIMENKO et al., 2009; GERASIMENKO et al., 2011) e ativação tripsinogênica induzida por hiperestimulação ocorre em estruturas endocíticas e ácidas pós-exocitóticas (SHERWOOD et al., 2007). O bloqueio do canal CRAC previne a elevação tóxica sustentada de  $[Ca^{2+}]_i$ , que é induzida pela depleção grave de depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  ou por metabólitos tóxicos do etanol, como o ácido palmitoleico (POA) ou os etil ésteres de ácido palmitoleico (EEPOA), reconhecidos como importantes mediadores da pancreatite aguda.

Em contraste, tal bloqueio tem pouco efeito sobre o pico fisiológico (oscilatório) de  $Ca^{2+}$  evocado por acetilcolina (ACh) ou colecistocinina (CCK), neurotransmissor e hormônio, respectivamente, naturalmente presentes em animais e humanos, que provocam aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  em uma necessidade fisiológica para exocitose de vesículas, por exemplo, que nesse caso irá promover a liberação de zimogênios a partir das células acinares pancreáticas para efetividade da atividade digestiva, além disso, tem apenas efeitos pequenos ou nulos na entrada de  $Ca^{2+}$  nos hepatócitos, reforçando a importância destacada desses canais nas células acinares pancreáticas. É importante ressaltar que o bloqueador de CRAC também é eficaz contra a ativação de proteases intracelulares e a necrose induzida por EEPOA. Dessa maneira, tem sido sugerido que o bloqueio farmacológico da CRAC tem potencial para o tratamento efetivo da pancreatite aguda (GERASIMENKO et al., 2013).

O influxo líquido de  $Ca^{2+}$  pode ser induzido não apenas pela abertura de canais de  $Ca^{2+}$  na membrana plasmática, mas também pela inibição da extrusão de  $Ca^{2+}$ . Existem duas vias principais que exportam  $Ca^{2+}$ , nomeadamente, a bomba de  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática (também conhecida como bomba ATPase ativada por  $Ca^{2+}$  da membrana plasmática - PMCA) e o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (GUERINI et al., 2005). Na célula acinar pancreática, o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$

é de pouca importância quantitativa (ASHBY; TEPIKIN, 2002; PETERSEN, 2005), o que explica porque a sobrecarga de cálcio é particularmente perigosa nessas células. Em outros tipos de células que possuem ambos mecanismos de extrusão, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pode descartar o cálcio em uma taxa muito maior que a PMCA, mas é ativado somente em níveis mais elevados de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (GUERINI et al., 2005). Nos neurônios, a ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  previne a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  excitotóxico e a morte celular, enquanto a inativação desse transportador causa morte neuronal (BANO et al., 2005).

A extrusão de cálcio mediada pela PMCA dependente de ATP ocorre em baixos níveis durante o estado de repouso da célula, sob condições não estimuladas, e qualquer aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a partir do nível de repouso de aproximadamente 100 nM ativa rapidamente a bomba de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ . Durante estimulação tóxica por, por exemplo, ácidos biliares e metabólitos não oxidativos do etanol, há despolarização do potencial de membrana mitocondrial (CRIDDLE et al., 2004; VORONINA et al., 2004), com subsequente perda da produção de ATP, o que prejudica a extrusão de cálcio, aumentando a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Em contraste com a entrada de cálcio que acontece em toda a superfície basolateral, atingindo em torno de 95% de toda a área celular, a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  é polarizada, com a PMCA concentrada na pequena área da membrana apical (ASHBY; TEPIKIN, 2002; PETERSEN, 2005). Isto faz sentido fisiológico porque os principais locais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  estão localizados no puncta apical do RE (PETERSEN, 2005), mas também é de importância fisiopatológica. A PMCA é uma enzima estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaM) e a CaM transloca-se da base para o pólo apical na fase inicial de uma elevação de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provocada por agonistas. Esta concentração apical de CaM é de vida curta e durante uma elevação sustentada de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é seguido de translocação para o núcleo (CRASKE et al., 1999), o que possivelmente limita a taxa de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a estimulação prolongada. Além disso, como a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre em toda a superfície basolateral, enquanto as bombas de extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  estão concentradas na membrana apical, há também um desajuste espacial, que pode impedir o descarte efetivo de uma sobrecarga celular de  $\text{Ca}^{2+}$  (GERASIMENKO; PENG; TSUGORKA; GERASIMENKO, 2018; PETERSEN; SUTTON, 2006).

Na membrana do RE há dois tipos de canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , nomeadamente, os receptores de Inositol Trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e receptores de rianodina (CALI; BRINI; CARAFOLI, 2018). Ambos participam na resposta do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico apical à estimulação com baixas concentrações (fisiológicas) de ACh ou CCK (PETERSEN, 2005). Todos os agentes que induzem a necrose celular acinar (concentrações agonistas tóxicas de ácidos biliares, CCK ou metabólitos não oxidativos do etanol, por exemplo) liberam  $\text{Ca}^{2+}$  do RE. Em condições livres

de  $\text{Ca}^{2+}$  externamente à célula, a estimulação com, por exemplo, o ácido graxo ácido palmitoleico (POA) provoca uma elevação sustentada de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tão alta que esvazia o RE e mesmo com uma estimulação supramáxima de agonistas não causa liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  porque essa organela foi esvaziada pela sua ação. A liberação de cálcio causada pelo ácido biliar ácido taurolitocólico sulfatado (TLC-S) é bloqueada pela inibição de receptores de  $\text{IP}_3$  com cafeína (VORONINA et al., 2002; KIM et al., 2002; CRIDDLE et al., 2004). A hiperestimulação tóxica com CCK (ao contrário da estimulação fisiológica) ativa fosfolipase C, e dessa forma muitos dos diferentes agentes que causam mudanças celulares semelhante à pancreatite podem agir também pela liberação de cálcio do RE via ativação de receptores de  $\text{IP}_3$ . A cafeína pode ser útil como antagonista de  $\text{IP}_3\text{R}$  *in vivo* por ser extremamente permeável às membranas, o que também significa que seu efeito inibitório é rapidamente reversível (WAKUI et al., 1990; PETERSEN, 2005). De fato, o consumo de café tem sido associado com a redução do risco de pancreatite alcoólica (MORTON et al., 2004). Todos os subtipos de receptores de  $\text{IP}_3$  estão presentes nas células acinares pancreáticas (PETERSEN, 2005), mas os subtipos 2 e 3 tem se mostrado mais relevantes para sinalização e secreção de cálcio causada por diferentes agonistas.

É necessário haver absorção ativa de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do RE para compensar o extravasamento de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE para o citosol, em situação de repouso. Isto é demonstrado pela observação de que a tapsigargina, um inibidor específico da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE (ATPase ativada por  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarco (endo) plasmático - SERCA), induz a liberação líquida de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE (VORONINA et al., 2002; KIM et al., 2002; VORONINA et al., 2004). Dessa forma, a perda passiva de  $\text{Ca}^{2+}$  é compensada pela recaptação ativa de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo esta última dependente de ATP. Em geral, a perda não compensada de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE causa perturbações no manejo de proteínas com consequências potencialmente desastrosas (BURDAKOV et al., 2005). De fato, a tapsigargina causa ativação do tripsinogênio e vacuolização nas células acinares pancreáticas (RARATY et al., 2000). A taxa de recaptação mediada pela SERCA é determinada pela concentração de cálcio do retículo endoplasmático,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , de forma que uma diminuição de cálcio no lúmen do RE ativa as bombas de recaptação e um aumento causa inibição. Sob condições fisiológicas normais, a liberação de cálcio do RE causada por estimulantes é seguida pela recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$ , e a taxa de absorção diminui à medida que a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  aumenta até que a taxa de absorção seja igual à taxa de extravasamento em repouso. Tem sido sugerido que o sensor luminal de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE é muito provavelmente o complexo ERp57-calreticulina, que se liga de uma maneira dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  à SERCA e inibe sua atividade (BURDAKOV et al., 2005). Além disso, a bomba SERCA também é ativada por um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (LANG; EYLENSTEIN; SHUMILINA, 2012). Alterações patológicas

nesses mecanismos regulatórios podem ter implicações importantes para a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula acinar e levar à pancreatite aguda (CRIDDLE, 2015). A figura 03 ilustra os canais de cálcio da célula acinar mencionados nesse texto.

**Figura 03.** Diagrama esquemático ilustrando os canais de cálcio da célula acinar pancreática.

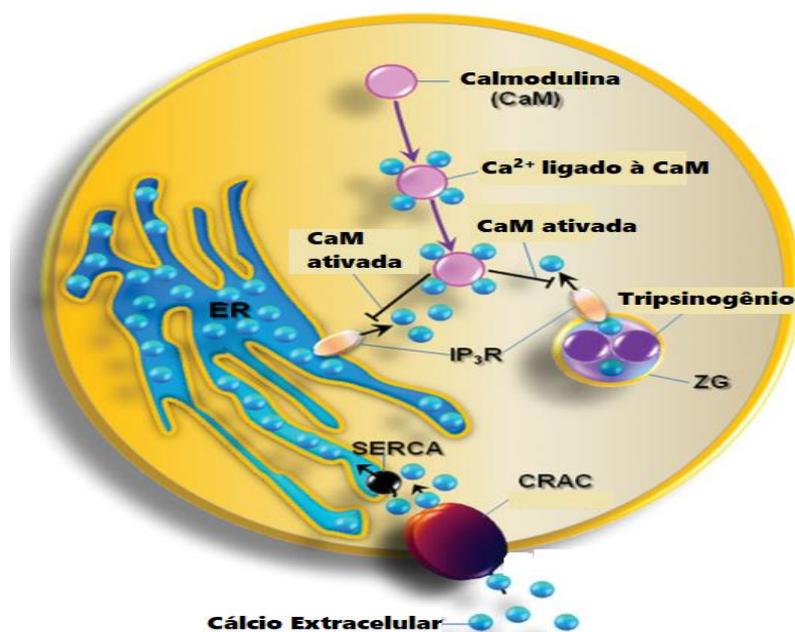


Diagrama esquemático ilustrando os canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) no retículo endoplasmático (ER) e grânulos de zimogênio (ZGs) e os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) na membrana plasmática (SERCA, bomba  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático). Figura adaptada de GERASIMENKO; GERASIMENKO; PETERSEN, 2014.

### 1.3. Pancreatite aguda

As doenças digestivas atingem cerca de 50 mil pessoas por ano no Reino Unido, com essa proporção acontecendo em taxas similares ao redor do mundo. Nesse contexto, 70% dos casos são de pancreatite aguda, causando grande morbidade e mortalidade. Nos EUA, a pancreatite aguda é a segunda causa de internação entre as doenças do trato gastrointestinal, sendo superada apenas pela colelitíase/colecistite (YADAV; LOWENFELS, 2013). No Brasil a incidência varia geograficamente; no entanto, essa condição clínica segue uma média de acometimento de 19 a cada 100.000 habitantes (DATASUS, 2017).

Fazendo uma análise retrospectiva de aproximadamente 12 anos atrás até os dias atuais, as doenças pancreáticas foram responsáveis por mais de 27.077 casos hospitalares no Brasil em 2006, com mais de 1.400 óbitos por ano, o que representou um custo financeiro de

R\$ 12 milhões naquele ano (DE CAMPOS et al., 2008; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS, 2006). No ano de 2010, ocorreram 22.872 mil internações por pancreatite e outras doenças do pâncreas, o que representa aproximadamente 2% do total de internações por doenças do aparelho digestivo ocorridas no referido ano (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Segundo informações mais recentes obtidas pelo banco de dados Datasus, Ministério da Saúde (2017), estes dados vêm crescendo, entre os meses de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2017 foram registradas 30.032 internações relacionadas às doenças pancreáticas, que resultaram em 1.551 óbitos no país, sendo a maior incidência na região sudeste. Esse quadro representa um custo de aproximadamente R\$ 26 milhões aos cofres públicos brasileiros neste período.

A pancreatite aguda (PA) apresenta um espectro clínico bastante amplo, caracterizada por intensa dor abdominal de início súbito, dor nas costas, náuseas, vômitos e febre alta, acompanhada por elevação sérica de enzimas pancreáticas (amilase e lipase), podendo variar de um quadro leve associado ao edema pancreático, até quadros graves com extensa necrose pancreática, sendo a evolução e o quadro clínico relacionados com a intensidade e extensão da lesão no pâncreas e à resposta inflamatória sistêmica (HAMADA et al., 2016; FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008).

A pancreatite aguda é, portanto, uma doença inflamatória do pâncreas exócrino que envolve uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Essa doença desenvolve-se rapidamente, podendo levar a complicações fatais como insuficiência pulmonar, renal e circulatória (HEGYI et al., 2011). Dependendo da gravidade e da duração, a pancreatite apresenta-se sob uma variedade de formas clínicas. Pode ser caracterizada como uma doença inflamatória moderada, autolimitada, com pouca necrose das células acinares; nesse caso, é classificada como pancreatite aguda edematosa. Em casos avançados, a pancreatite torna-se grave e algumas vezes fatal devido à maciça necrose acinar e hemorragia pancreática, sendo, nesse caso, denominada pancreatite aguda hemorrágica necrosante. A maioria dos casos, sob ponto de vista fisiopatológico, se apresenta como pancreatite edematosa (80-85%), contudo 15% a 20% pode se apresentar sob a forma necro-hemorrágica (PAPACHRISTOU; WHITCOMB, 2005; FROSSARD et al., 2008; PANDOL et al., 2007). A mortalidade na pancreatite necro-hemorrágica é em torno de 20% a 30%, dependendo da ocorrência de necrose infectada e de falência de órgãos (HAMADA et al., 2016). Além disso, vários episódios de pancreatite aguda podem levar a um quadro de pancreatite crônica, caracterizada por fortes dores abdominais e progressiva fibrose, conduzindo à insuficiência pancreática (FRULLONI et al., 2010).

Apesar dos estudos exaustivos, inúmeras lacunas persistem na fisiopatologia da pancreatite aguda (LONGO et al., 2011). Entre os vários fatores etiológicos da PA, o cálculo biliar e a ingestão de álcool constituem aqueles mais frequentes, sendo que os mecanismos exatos de como estes agentes iniciam a pancreatite ainda não são bem compreendidos. Outras causas menos frequentes incluem medicamentos, hipertrigliceridemia, defeitos genéticos, tumores, infecções virais, hipercalcemia e pós-colangiopancreatografia endoscópica retrógrada. Acredita-se que a exposição a algum destes fatores causais desencadeia uma cascata de eventos patológicos, resultando nas alterações locais e sistêmicas da pancreatite (LONGO et al., 2011; THIRUVENGADAM et al., 2012). Foram propostas como mecanismos fisiopatológicos a lesão da microcirculação, quimiotaxia de leucócitos, a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, ativação prematura de zimogênios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), aumento sustentado de  $Ca^{2+}$  no interior das células acinares e a translocação bacteriana para o pâncreas e circulação sistêmica (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2010; HUANG et al., 2014).

Em vista da dificuldade de compreensão dos mecanismos envolvidos em tal patologia, nenhuma terapêutica clínica específica demonstrou diminuição significativa na mortalidade da pancreatite aguda grave (PANDOL et al., 2007; LIU et al., 2006). O tratamento ainda consiste na terapia intensiva focada nos sintomas e nas complicações locais e sistêmicas como dor, infecção, necrose e disfunção múltipla de órgãos (GALLAGHER et al., 2004). Nas complicações locais estão indicados procedimentos cirúrgicos, endoscópicos ou radiológicos quando há necroses infectadas, abscessos ou pseudocistos (GALLAGHER et al., 2004).

Na tentativa de melhor explicar a fisiopatologia da doença, dados recentes têm atribuído maior importância aos eventos que aconteceriam no interior da célula pancreática (HUANG et al., 2014; BOOTH et al., 2011). Embora uma gama de estudos esteja focada em estudar tal fisiopatologia, os mecanismos através dos quais as diferentes causas levam à PA não são ainda conhecidos por completo, entretanto, a pancreatite aguda induzida por álcool (segunda causa mais comum dessa condição patológica) vem sendo alvo de investigações mais profundas, uma vez que tem sido demonstrado na literatura científica que os mecanismos subjacentes à lesão pancreática causada por álcool difere dos mecanismos danosos causados pelo mesmo agente em outros órgãos (WANG et al., 2009; YADAV; LOWENFELS, 2013) dessa forma, os pesquisadores estão cada vez mais perto de elucidar as lacunas ainda existentes sobre a fisiopatologia da pancreatite aguda alcoólica, e assim encontrar um tratamento mais eficaz.

#### 1.4. Pancreatite aguda causada por álcool: a importância do metabolismo não-oxidativo

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas tem sido relacionado com o aumento da incidência de pancreatite aguda nos últimos anos (DAHAN et al., 2016). Esta associação tem sido reconhecida por mais de 100 anos (FRIEDERICH, 1878) e permanece o questionamento até os dias atuais de como o abuso do álcool predispõe o pâncreas para uma condição patológica. Nos países em desenvolvimento, aproximadamente 35% dos casos de pancreatite aguda (WANG et al., 2009) e aproximadamente 70% dos casos de pancreatite crônica (DAHAN et al., 2016) estão associados à ingestão abusiva do etanol.

O álcool é metabolizado no nosso organismo por duas vias funcionais, a oxidativa e não-oxidativa. A via oxidativa é mais proeminente no processo de metabolização alcoólica que acontece no fígado, a qual acontece em duas etapas. As principais enzimas envolvidas nesse processo, a álcool desidrogenase (ADH), a enzima do citocromo P450 2E1 (CYP 2E1) do sistema microsomal de oxidação do etanol e a catalase podem todas converter o álcool a acetaldeído, gerando nesse processo também espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHALBUEVA et al., 2013). Na segunda etapa deste processo, o acetaldeído, o qual é um composto altamente reativo, é convertido pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) em acetato. Porém, a expressão de ADH e CYP 2E1 no pâncreas é muito menor que no fígado. Conseqüentemente, o metabolismo oxidativo do etanol pelo pâncreas também acontece em uma proporção bastante menor que no fígado (HABER et al., 1988; NORTON et al., 1998). Dessa forma, o acetaldeído contribui para a doença induzida pelo álcool no fígado, mas não pode ser responsável por danos em órgãos como o pâncreas, coração ou cérebro, onde o metabolismo oxidativo é mínimo ou ausente; nem pode explicar os variados padrões de danos em órgãos encontrados em alcoólatras crônicos (CLEMENS et al., 2016).

Em contrapartida, o metabolismo não oxidativo do etanol é realizado por um grupo diversificado de enzimas conhecidas como etil ésteres de ácidos graxos sintetases (LAPOSATA, 1998). O metabolismo do etanol por estas enzimas combina ácidos graxos livres com etanol, gerando os metabólitos finais, os etil ésteres de ácidos graxos (EEAGs) (Figura 04). No pâncreas a atividade da enzima etil éster de ácido graxo sintetase é bastante alta. Dessa forma, o metabolismo pancreático do etanol pela via não-oxidativa é maior que pela via oxidativa (LAPOSATA, 1986). Pelo fato da atividade de ADH e CYP 2E1 ser relativamente baixa no pâncreas, o metabolismo do etanol por EEAG sintetases e a produção proeminente de EEAGs tem um papel importante nas disfunções pancreáticas associadas ao álcool e no desenvolvimento de pancreatite alcoólica.

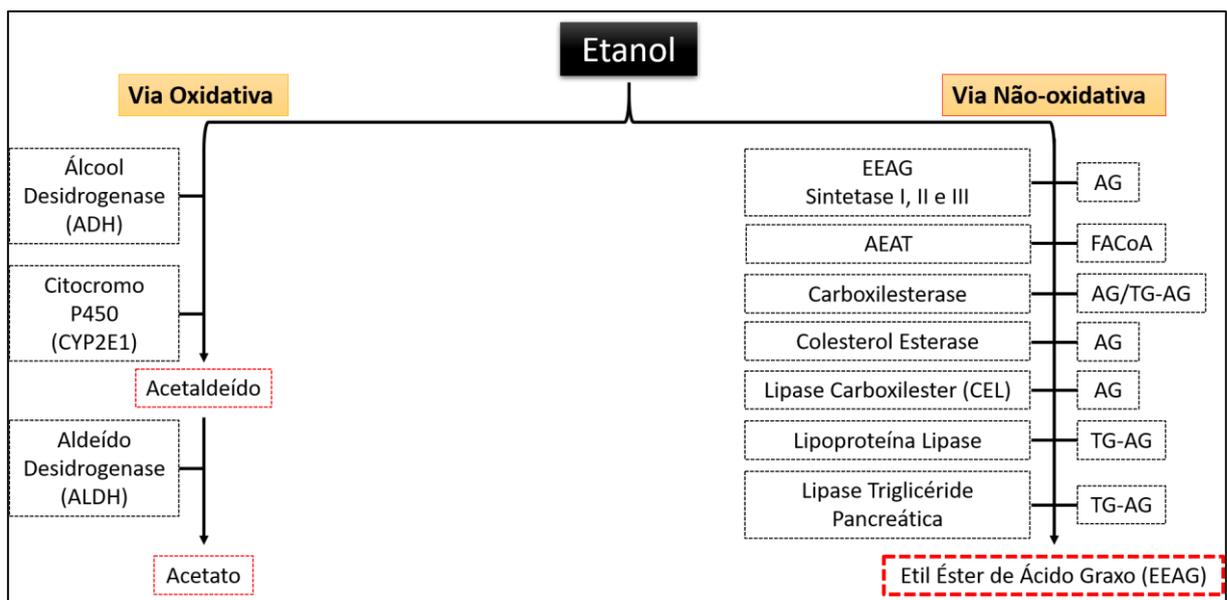
Estudos mostram que essas duas rotas de metabolização do etanol estão relacionadas, pois trabalhos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que o impedimento da oxidação por inibidores de ADH, citocromo P450 e catalase resulta em um aumento no metabolismo não-oxidativo do etanol e leva a uma produção aumentada de EEAGs no fígado e pâncreas (CLEMENS et al., 2016). Nesse sentido, há trabalhos interessantes que mostram que ao contrário dos EEAGs, o acetaldeído não apresenta-se em concentrações significativas no coração, cérebro e especialmente no pâncreas, sendo somente detectado quantidades ínfimas na circulação, logo após a ingestão de etanol (LAPOSATA, 1998; LAPOSATA, 1986). Dessa forma, estes dados reforçam ainda mais os achados da literatura, sugerindo que as consequências patológicas do uso abusivo do etanol no pâncreas não são devido ao seu metabolismo oxidativo, mas sim aos produtos da sua rota de metabolização não-oxidativa, como os EEAGs ou os próprios ácidos graxos, após processo de hidrólise final dessa rota.

Esses achados justificam o fato do álcool isolado não ser um modelo confiável de indução de pancreatite aguda experimental, pois a via metabólica comum compartilhada por ácidos graxos e álcool, através do processo não-oxidativo, tem demonstrado ser mais prejudicial ao pâncreas exócrino que a via de metabolização que não tem a participação de gorduras no processo (CRIDDLE, 2015). Essa associação tem relevância fundamentada em dados epidemiológicos de estudos populacionais que demonstraram que dietas com alto teor de gordura podem ter estreita relação com o desenvolvimento de pancreatite alcoólica aguda e crônica (DUFOUR; ADAMSON, 2003), enquanto a hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para ambos (WANG et al., 2009; YADAV; LOWENFELS, 2013).

Diante do conhecimento acerca da importância da rota não-oxidativa, onde a presença concomitante de gorduras e álcool no processo de metabolização são fatores cruciais para o desenvolvimento de pancreatite aguda, o professor David Criddle e colaboradores (2004), o qual é importante colaborador do nosso grupo de pesquisa no Brasil, na tentativa de desenvolver um melhor modelo experimental *in vitro* que representasse a nível celular o que acontece na clínica de pacientes com pancreatite aguda, desenvolveu um modelo de lesão da célula acinar pancreática induzida por etanol associado a um ácido graxo, o ácido palmitoleico (POA). Através desse trabalho, foi demonstrado, de forma pioneira, que os metabólitos de ácidos graxos não oxidativos ou os próprios ácidos graxos, mais que o etanol *per si*, são responsáveis pela elevação acentuada de cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$ , o qual medeia a toxicidade na célula acinar pancreática e que esses compostos agem primariamente pela liberação de cálcio do retículo endoplasmático, através de receptores de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>R) (Criddle et al., 2006).

Nessa mesma perspectiva, o professor Dr. David Criddle (HUANG et al., 2014) também sugeriu um modelo experimental *in vivo* baseado no metabolismo não oxidativo do etanol, envolvendo duas injeções intraperitoneais simples de etanol na presença de ácido Palmítoleico (Etanol/POA) em camundongos, os quais causaram inflamação e dano pancreático grave, característicos de pancreatite aguda, tais como, mudanças histopatológicas, como necrose, inflamação e edema tecidual, bem como aumento na concentração de marcadores bioquímicos, incluindo tripsina pancreática, amilase sérica e dosagem de mieloperoxidase, além do aumento da citocina pró-inflamatória interleucina-6. Estes modelos têm se mostrado bastante promissores e têm sido utilizados extensivamente por pesquisadores ao redor do mundo como uma forma eficaz de mimetização da pancreatite aguda alcoólica que acomete os seres humanos.

**Figura 04.** Vias de metabolização do etanol no pâncreas.



EEAG: Etil éster de ácido graxo. AG: ácido graxo. AEAT: etanol acil transferase. TG: triglicérido. Figura adaptada de BEST; LAPOSATA, 2003.

### 1.5. Mecanismos de dano induzido por Etanol/POA: A relação entre o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ , lesão mitocondrial, diminuição de ATP, necrose celular e inflamação na pancreatite aguda

Os mecanismos propostos para a pancreatite aguda causada por álcool dispostos na literatura científica relatam que através do processo de metabolização não oxidativa, o etanol na presença de ácidos graxos (AG) sofre ação de enzimas presentes no citosol da célula acinar pancreática, como as do complexo Etil Ésteres de Ácidos Graxos Sintetases ou a Lipase

carboxilester, levando à formação dos metabólitos finais dessa rota, os etil ésteres de ácidos graxos (EEAGs). Uma vez localizados no citosol, certa quantidade de EEAGs direcionam-se e acumulam-se na mitocôndria, sofrendo hidrólise pelas enzimas Etil Ésteres de Ácidos Graxos Hidrolases, sendo transformados novamente em ácidos graxos. Dessa maneira, a hidrólise mitocondrial de EEAGs para AGs tem sido associada a uma importante rota de toxicidade nas células acinares pancreáticas (CRIDDLE et al., 2004).

Nesse sentido, ambos etil éster de ácido palmitoleico (EEPOA), um tipo de etil éster de ácido graxo, e seu produto hidrolítico ácido Palmitoleico (POA), um tipo de ácido graxo, quando localizados no citosol da célula acinar pancreática, têm uma ação inicial através da interação com receptores de inositol trifosfato (IP3) do retículo endoplasmático (IP3R), promovendo uma liberação de cálcio sustentada, causando dessa forma, depleção dos estoques de cálcio do retículo endoplasmático (RE) (CRIDDLE et al., 2006). O esvaziamento deste sistema de armazenamento provoca a ativação dos canais de cálcio operados por armazenamento, mediada pela comunicação entre a proteína STIM-1 do RE com a ORAI-1 localizada nos canais de cálcio operados por armazenamento da membrana plasmática, permitindo a entrada de uma quantidade ainda maior de cálcio para dentro da célula acinar (WEN et al., 2015).

A sobrecarga de cálcio citosólico,  $[Ca^{2+}]_c$ , no interior dessas células é refletida em um consequente aumento exacerbado na concentração de cálcio mitocondrial,  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , uma vez que a mitocôndria apresenta-se, dentre outras funções, como uma organela de armazenamento de cálcio, o qual em condições basais impulsiona a bioenergética celular normal (HALESTRAP et al., 2015), porém em condições patológicas a resposta mitocondrial difere.

Dessa forma, durante a condição de estímulo das células acinares por Etanol/POA, a função mitocondrial é prejudicada de duas maneiras independentes, mas acontecendo ao mesmo tempo durante o processo, uma dessas formas é a intensa sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  que leva à abertura do Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP), um canal não-específico que se forma na membrana mitocondrial interna, permitindo a passagem de partículas com menos de 1500 daltons (Da), causando perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), essencial para a produção de ATP (GIORGIO et al., 2013). Já a outra forma de acometimento lesivo da mitocôndria é a capacidade do ácido palmitoleico (POA) exercer dano direto local, *per si*, após hidrólise mitocondrial, o qual já foi demonstrado na literatura científica causar desacoplamento da fosforilação oxidativa por toxicidade direta e estudos têm sido direcionados sobre sua capacidade de abertura do MPTP (MUKHERJEE et al., 2016).

Ambos os processos causadores de disfunção dessa organela levam a um colapso mitocondrial e consequente diminuição da produção de ATP, o qual é necessário, dentre outras ações, para o funcionamento correto das bombas de extrusão de cálcio contido no citosol, tanto a bomba do retículo endoplasmático (bomba Cálcio-ATPase do retículo sarco/endoplasmático - SERCA), quanto da membrana plasmática (bomba Cálcio-ATPase da membrana plasmática - PMCA), além de ser essencial para a ativação dos processos de morte celular controlada (apoptose, por exemplo) envolvendo caspases, as quais são ativamente dependentes de ATP (GRYSHCHENKO et al., 2018). Assim, o impedimento da extrusão de  $Ca^{2+}$  pelas bombas dependentes de ATP exacerbam ainda mais a sobrecarga de cálcio dentro da célula acinar, uma vez que a presença de Etanol/POA promove um aumento global, sustentado e tóxico na concentração de  $[Ca^{2+}]_c$  através da liberação de cálcio do RE, bem como pela entrada de cálcio externo pelos canais operados por armazenamento, e com as bombas de extrusão de cálcio defeituosas pela carência de ATP, esse cálcio entra na célula acinar de forma intensa, mas a célula não possui mais a capacidade de expulsá-lo para recuperar a homeostase, perpetuando esse processo em um ciclo vicioso, culminando em necrose da célula acinar, a qual tem consequências inflamatórias para o tecido pancreático, uma vez que nesse processo de morte há ruptura da membrana plasmática, com liberação de conteúdo intracelular, como citocinas inflamatórias e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (CRIDDLE, 2015).

Além disso, a célula acinar é ainda mais impulsionada para a morte necrótica em consequência da ativação prematura de zimogênios de forma patológica, que também acontece como consequência do aumento sustentado e tóxico de  $Ca^{2+}$  causado por Etanol/POA (GERASIMENKO et al., 2009). Assim, a conversão, ainda dentro do pâncreas (uma vez que sua ativação correta fisiologicamente acontece apenas no lúmen intestinal), de tripsinogênio em tripsina, enzima desencadeadora da ativação de todas as demais proteínas contidas no pâncreas sob forma inativada, leva ao tão bem conhecido fato da pancreatite aguda, a autodigestão do parênquima pancreático, responsável pelo agravamento do processo inflamatório desta condição clínica (GAISER et al., 2011).

Estudos realizados em modelos experimentais com animais têm mostrado que as células acinares pancreáticas, particularmente durante os estágios iniciais da pancreatite aguda, produzem, liberam e respondem a citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  (GUKOVSKAYA et al., 1997). Trabalhos recentes envolvendo células acinares pancreáticas de pacientes com pancreatite aguda e recorrente têm revelado a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, tais como TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-18, bem como a quimiocina MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos - 1 ou CCL2) (GU et al., 2013; HABTEZION, 2015),

sugerindo que as respostas inflamatórias iniciais e as sinalizações que recrutam leucócitos se originam nas células acinares pancreáticas lesionadas, as quais quando entram em morte celular necrótica, após intenso dano, sofrem extravasamento de conteúdo intracelular, com liberação dessas citocinas, iniciando o processo de cascata inflamatória característico.

Os neutrófilos apresentam um papel importante na fase inicial da pancreatite aguda, pois parecem ser as primeiras células do sistema imune que reconhecem a sinalização do complexo de citocinas após necrose das células acinares, sendo então recrutados para o sítio da lesão, contribuindo assim para a ativação de tripsinogênio (GUKOVSKAYA et al., 2002; ABDULLA et al., 2011) e progressão para pancreatite aguda grave. Oiva e colaboradores (2013) demonstraram a presença de leucócitos circulantes em pacientes com pancreatite aguda grave com disfunção múltiplas de órgãos, nos quais foi encontrada intensa sinalização e aumento nas propriedades de transmigração neutrofílica, sugerindo que os neutrófilos contribuem não somente para os eventos pancreáticos locais precoces, mas também para complicações sistêmicas e danos em órgãos à distância, como nos pulmões, um dos principais órgãos que sofrem com o dano remoto da pancreatite aguda (Figura 05).

Em suma, toda essa cascata de eventos que começa no interior das células acinares sob estímulo de precipitantes lesivos como o Etanol/POA, provocando aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , disfunção mitocondrial, diminuição da produção de ATP, ativação patológica de zimogênios e necrose da célula acinar levam a um processo inflamatório intenso e às vezes irreversível, quando na extrema situação de envolvimento e disfunção de múltiplos órgãos, iniciado pelo recrutamento de células imunes como os neutrófilos (GRYSHCHENKO et al., 2018). Dessa forma, por conta de eventos tão complexos envolvendo essa condição clínica, muitas vezes o prognóstico de pacientes com pancreatite aguda grave é fatal, levando ao óbito de 20 a 30% dos pacientes com essa condição.

Diante disso, a partir destes conhecimentos prévios acerca da fisiopatologia da pancreatite aguda alcoólica, pesquisadores ao redor do mundo estão, incansavelmente, em busca de um tratamento que seja capaz de intervir em partes do processo iniciador de lesão da célula acinar, para assim prevenir toda a cascata inflamatória consequente desse colapso celular inicial, na tentativa de minimizar os danos que essa condição clínica provoca e dessa forma diminuir a mortalidade de pacientes com pancreatite aguda, uma vez que os tratamentos disponíveis atualmente são apenas cirúrgico-intervencionistas e/ou paliativos.

**Figura 05.** Mecanismos de Dano Induzido por Etanol/POA.

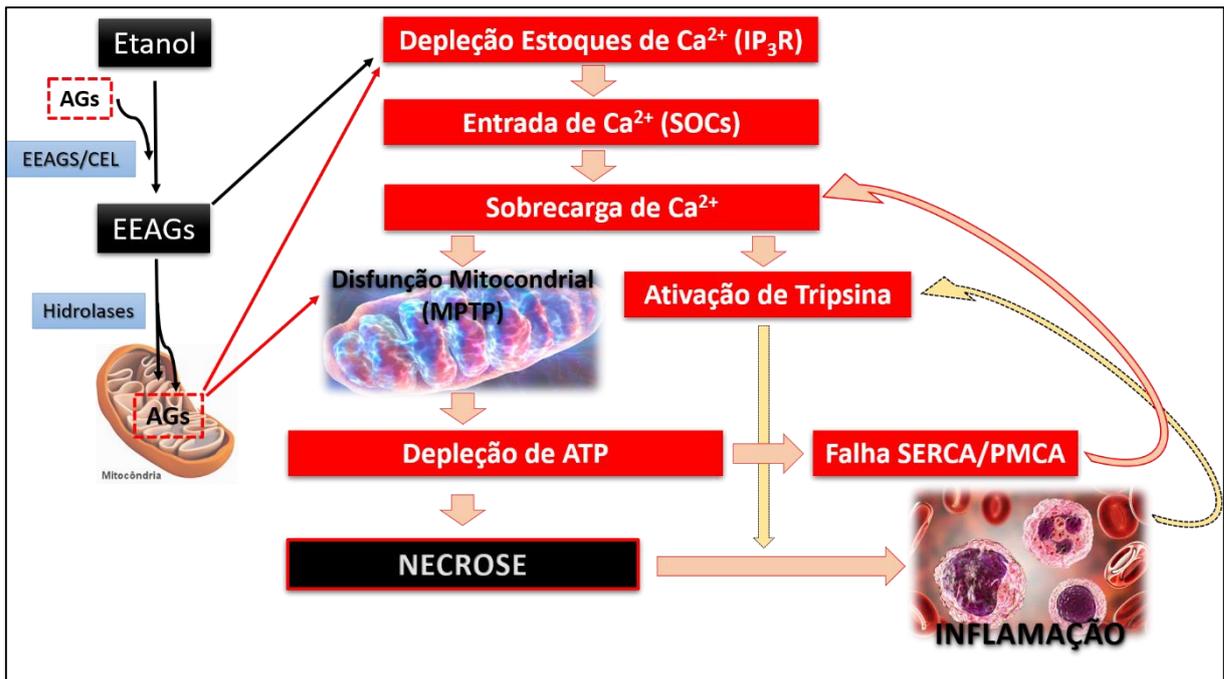


Figura adaptada de CRIDDLE, 2015.

### 1.6. Lectinas de leguminosas como alternativa terapêutica

O uso de produtos naturais como alternativa terapêutica tanto popular como clinicamente tem sido usado por décadas no Brasil, devido à grande disponibilidade e variedade, principalmente de produtos do Reino *Plantae* (GHOSH; PLAYFORD, 2003). Entretanto, estas moléculas têm poucos estudos esclarecedores sobre seu potencial biológico e químico, aumentando a necessidade de um maior aprofundamento do estudo para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dessas substâncias biologicamente ativas.

Dentro desse contexto, as lectinas representam um grupo seletivo dentro dos produtos naturais existentes, que apresentam atividades biológicas importantes de proteção celular e sistêmica em diversos modelos de doença. Isso é devido, em grande parte, à sua capacidade de reconhecimento de carboidratos (SATO; KATO, 2018). E como estes glicídios agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas, o potencial das lectinas de reconhecimento das informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células pode contribuir para as diversas atividades biológicas dessas moléculas (ZIATABAR et al., 2018).

Dessa forma, as lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam propriedades em comum de se unir a carboidratos com alta especificidade, através de um domínio não catalítico (PEUMANS; VANDAME, 1995). Elas são largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas, algas e microorganismos. Podem reconhecer mono-, oligo- ou polissacarídeos, bem como glicoconjugados e, dessa forma, reconhecer glicoproteínas ou glicolipídios, por exemplo, na superfície das células (SHARON; LIS, 1995). Cada molécula de lectina contém geralmente dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, denominado domínio de reconhecimento de carboidratos ou domínio lectínico. Assim, suas interações na superfície de membranas que expressam múltiplos carboidratos (como eritrócitos) resultam na ligação cruzada das células e sua subsequente precipitação (UNITT; HORNIGOLD, 2011). Além do sítio ligante para o carboidrato específico, algumas lectinas também possuem um segundo tipo de sítio ligante que se interage com ligantes não glicídicos, como por exemplo, bases nitrogenadas (SINGH et al., 1999).

Entre as lectinas mais estudadas estão as lectinas de plantas, principalmente as da família Leguminosae, as quais representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A expressão “lectinas de leguminosas” refere-se a um grupo particular de lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente nessa família. As lectinas desse grupo normalmente possuem cerca de 220 a 250 resíduos de aminoácidos (cerca de 30 kDa) por monômero e são extremamente semelhantes quanto aos aspectos estruturais, apresentando o mesmo tipo de enovelamento em relação a seus monômeros (RICHARDSON, 1984).

O monômero de lectinas de leguminosas é composto por 3 folhas- $\beta$  de fitas antiparalelas, interligadas por voltas e alças (*loops*), formando uma estrutura na forma achatada. As duas maiores folhas- $\beta$  formam o que se chama “sanduíche”, no qual a folha maior composta por 6 fitas antiparalelas é geralmente denominada de folha- $\beta$  posterior e a outra composta por 7 fitas também antiparalelas é denominada de folha- $\beta$  frontal. Esta conformação em “sanduíche” se apresenta um pouco mais aberta em uma das extremidades, onde se encaixa a terceira e menor folha- $\beta$ , com 5 fitas  $\beta$  antiparalelas, perpendicular à folha posterior e compartilhando fitas- $\beta$  retorcidas com a folha- $\beta$  posterior (LORIS et al., 1998; BRINDA et al., 2004) Esta orientação antiparalela das fitas beta e a mudança entre uma face e outra, forma uma estrutura estável, explicando, pelo menos parcialmente, a extrema resistência de lectinas de leguminosas à ação de muitas enzimas (RICHARDSON, 1984) (Figura 06).

**Figura 06.** Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas obtida do modelo estrutural do monômero da Concanavalina A.

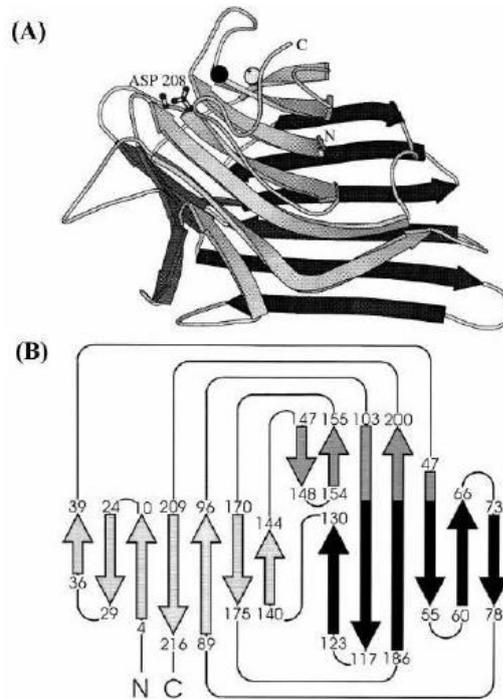


Imagem tridimensional em diagrama de Ribbon (A) com destaque para o resíduo cis-aspartato, Asp208, mostrado em diagrama bola-bastão e os íons cálcio e manganês estão representados em preto e cinza. (A) Diagrama de topologia para enovelamento. As cores são as mesmas da imagem B e representam a estrutura com 6 fitas antiparalelas das costas em preto, 7 fitas em cinza claro e 5 fitas em cinza escuro. Representação extraída e modificada a partir de LORIS et al. (1998).

A atividade ligante das lectinas de leguminosas depende da presença simultânea do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de um íon metálico de transição, geralmente manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ), coordenados próximos ao sítio de ligação ao carboidrato. Dentre os ligantes que podem coordenar esses metais, podem ser citados as cadeias laterais de ácido aspártico, inclusive aquele pertencente à tríade envolvida diretamente na ligação ao carboidrato (LORIS et al., 2004) (Figura 07).

As lectinas vegetais embora possam ser encontradas em diversas partes da planta, tais como folhas (COELHO; SILVA, 2000), cascas (INA et al., 2005), raízes (WANG; NG, 2006) e flores (SUSEELAN et al., 2002), são geralmente encontradas em maior quantidade em órgãos de estocagem, como por exemplo, em sementes (LATHA et al., 2006), sendo que a concentração presente pode variar amplamente de uma espécie para outra (RUDIGER; GABIUS, 2001). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem que se encontram em sementes, na grande maioria, mas também em tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta, dominam os estudos em lectinologia.

**Figura 07.** Representações esquemáticas da ligação de íons e carboidrato a lectinas de leguminosas.

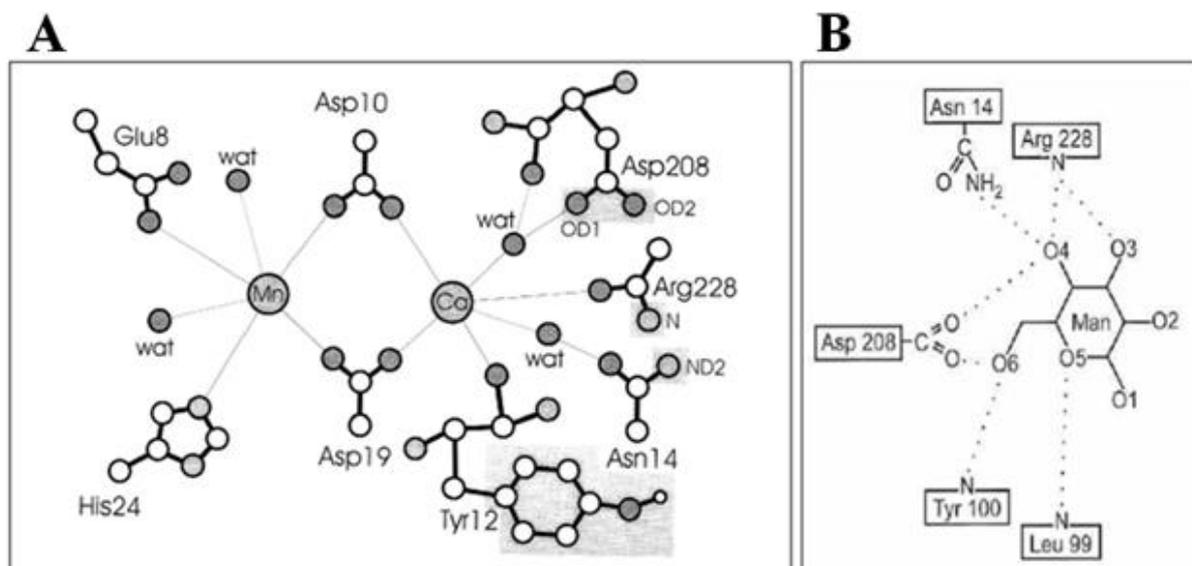


Imagem mostrando o sítio de ligação duplo da ConA (A). Os átomos de carbono estão em branco, nitrogênio em cinza claro e oxigênio em cinza escuro. Os dois íons estão indicados em cinza no centro da figura. Grupos funcionais essenciais para ligação de carboidratos estão destacados por uma caixa em cinza claro. Moléculas de água estão indicadas com wat. A figura B representa os resíduos do sítio de ligação a monossacarídeos da ConA ligados à manose (Man). Fonte: LORIS et al. (1998).

A maioria das lectinas costuma desempenhar funções no próprio vegetal que a produz como, por exemplo, servir de fator de reconhecimento, participar do estoque de nitrogênio, ter função de defesa, como ainda interagir com glicoconjugados de outros organismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). O fato das lectinas de plantas serem capazes de se ligar a glicoconjugados presentes de outros organismos, que não são comumente encontrados ou que estão totalmente ausentes nos vegetais, é um forte indício de que elas possuem função de proteção nas plantas que as produzem. Um exemplo a ser citado é o caso das lectinas ligantes de quitina, que são capazes de interagir com este carboidrato que é tipicamente encontrado na parede celular de fungos e no exoesqueleto de invertebrados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Diante de tantas características interessantes e peculiares dessas proteínas, não é difícil imaginar o leque de propriedades biológicas que elas podem desempenhar de forma útil e benéfica aos seres humanos. Nesse contexto, um grande número de lectinas têm sido isoladas com atividades antibacteriana (ex.: lectina isolada de *Sparassis latifolia*, protetora contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) (CHANDRASEKARAN et al., 2016), antifúngica (como a lectina PgTeL, ligante de quitina, protetora contra *Candida*

*albicans* e *Candida krusei*) (DA SILVA et al., 2018) ou antiviral (como as lectinas *Oscillatoria agardhii* agglutinin (OAA), Griffithsin (GRFT), Scytovirin (SVN), *Microcystis viridis* lectin (MVL), e Actinohivin (AH) com propriedades anti-HIV) (KOHARUDIN; GRONENBORN, 2014; BRINCHMANN; PATEL; IVERSEN, 2018). Estas proteínas podem interferir diretamente com o crescimento, a multiplicação e a propagação dos agentes microbianos por diferentes mecanismos, como aglutinação e imobilização dos microorganismos. Lectinas de plantas frequentemente estão presentes em potenciais sítios de invasão microbiana e sua ligação a estruturas fúngicas leva à inibição do crescimento e germinação de fungos, emergindo como candidatos antimicrobianos para terapia de novas drogas (BREITENBACH et al.; 2018).

Recentemente, um interesse aumentado no potencial de lectinas de plantas como agentes terapêuticos para o câncer tem se tornado evidente, como exemplo dessas moléculas temos as lectinas indutoras de apoptose que abrangem as galectinas, as lectinas do tipo C, as anexinas, a lectina *Polygonatum odoratum*, a lectina do visco, a Concanavalina A, a lectina *Dicentrarchus labrax* de ligação à fucose, a lectina de *Strongylocentrotus purpuratus*, e a lectina *Polygonatum odoratum*, e quanto às lectinas indutoras de autofagia incluem as anexinas, a Concanavalina A e a lectina *Polygonatum odoratum* (YAU et al., 2015). Lectinas podem ser usadas para estudar padrões de distribuição metastática, os perfis de expressão de glicoconjugados de células tumorais e de seus efeitos biológicos em vários tumores (LAGARDA-DIAZ et al., 2017). Já é bem conhecido na literatura que os carboidratos presentes na membrana das células são importantes para o reconhecimento celular, comunicação e adesão. No câncer, essas interações são essenciais para a progressão do tumor e metástase, já que nas células tumorais, a glicosilação geralmente é alterada em comparação às células normais e essas alterações podem ser detectadas pelas lectinas (LOPEZ; FRANCONETTI; FERNANDEZ-BOLANOS, 2018). Nesse sentido, Litynska e colaboradores (2001) comparou o padrão de ligação de lectinas em diferentes linhagens de células de melanoma humano usando a lectina PHA-L e outras lectinas que não são de leguminosas, tais como as lectinas de *Galanthus nivalis*, *S. nigra*, MAL, aglutinina de *Datura stramonium* e aglutinina do gérmen de trigo (WGA).

Os carboidratos da superfície celular são alvos chave para lectinas, no câncer, uma via geral envolve reconhecimento de receptores de carboidrato desencadeando a ativação de enzimas (PANDA et al., 2014). Entretanto, a ligação das lectinas aos glicanos na membrana celular pode não ser suficiente para induzir apoptose. Kim e colaboradores (2010), mostraram que a morte celular requer a endocitose da lectina Galectina-3, a qual desencadeia sinalização para apoptose. ConA, a primeira lectina de leguminosa a ser resolvida e cristalizada, tem a

capacidade de controlar o crescimento tumoral de hepatoma, a qual é mediada primariamente pela sua ligação a resíduos de manose de glicoproteínas de membrana celular, com subsequente internalização e acúmulo na mitocôndria; a autofagia é então ativada, levando a uma degradação lisossomal da mitocôndria afetada e ultimamente, morte celular (CHANG et al., 2007). No geral, esses achados de pesquisa com câncer têm revelado os mecanismos responsáveis pela ação anti-tumoral de diferentes lectinas de plantas.

Dessa forma, as lectinas de plantas têm mostrado atividade anti-tumoral *in vivo* e *in vitro*, como as lectinas concanavalin A e *Sophora flavescens* (SHI et al., 2014) e a lectina isolada da leguminosa *Musa acuminata* (SRINIVAS, SHIVAMADHU, JAYARAMA, 2018). Lectinas com potencial para inibir o crescimento tumoral, tais como as lectinas tipo-I do visco e PHA estão atualmente em diferentes fases de triagens clínicas para o tratamento da câncer pancreático e hepático, respectivamente (STAUDER; KREUSER, 2002; BLOMME et al., 2009; TRÖGER et al., 2013). Lectinas de leguminosas podem modificar a expressão de interleucinas e algumas proteíno-quinases e dessa maneira modular o sistema imune (DWYER; JOHNSON, 1981). Além disso, nos cânceres, lectinas, tais como ConA, lectinas do visco, a lectina PCL e a lectina de *S. flavescens* podem alterar a via de sinalização envolvida na expressão de membros das famílias de caspases, relacionados à autofagia e expressão de Bcl-2, bem como p53, ERK, Ras-Raf e BNIP3, e dessa forma induzir tanto apoptose como autofagia (JIANG et al., 2015).

Recentemente, foram descritas lectinas presentes naturalmente no pâncreas que são relacionadas com efeitos protetores contra a pancreatite aguda. A família de genes de regeneração (Reg), pertence à superfamília de lectinas dependentes de  $Ca^{2+}$  (Tipo C), tendo sido primariamente isolada de uma biblioteca de DNA complementar (DNAC) de tecidos com colite ulcerativa (YU et al., 2016). Poucos estudos têm sido feitos sobre a especificidade do domínio de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas, o que tem sido demonstrado até agora é que as proteínas da família Reg parecem ligar-se com mais afinidade à manana e heparina (HO et al., 2010; CASH; WHITHAM; HOOPER, 2006). O fato de não haver demonstração da presença dos açúcares manana e heparina nas células acinares pancreáticas nos trabalhos realizados até o presente momento (JONAS; PUTZKE, 1992; WILLEMER et al., 1990) nos leva a inferir que os efeitos benéficos relacionados com essas proteínas durante episódios de pancreatite aguda são independentes do seu domínio lectínico.

Reg-4 tem um padrão de expressão tecidual altamente restrito, é predominantemente expressa em tecidos do trato gastrintestinal, incluindo cólon, intestino delgado, estômago e pâncreas. Atualmente tem sido fortemente sugerido que os genes da família Reg estão

intimamente associados com a pancreatite, inferindo a noção de que proteínas da família Reg, particularmente Reg-3 $\alpha$  e Reg-4 poderiam servir como moléculas protetoras contra esta afecção (HU et al., 2011).

Yu e colaboradores (2016) demonstraram que a administração da lectina Reg-3 $\alpha$  recombinante (rReg-3 $\alpha$ ) reduziu significativamente o dano pancreático causado pela injeção de L-arginina, evidenciado através de análises histopatológicas e ensaios de amilase, lipase e proteína C reativa (PCR). Corroborando com esses achados, Hu e colaboradores (2011) evidenciaram que Reg-4 é acentuadamente supra-regulada nas células acinares residuais, ao redor das ilhotas e no epitélio metaplástico de regeneração durante a pancreatite aguda induzida por L-arginina. Nesse mesmo trabalho, demonstraram ainda que a lectina Reg-4 protege contra a necrose de células acinares na pancreatite experimental. Nesse trabalho foi também mostrado que a versão recombinante dessa lectina, rReg-4, protegeu contra a necrose de células acinares estimuladas por L-arginina e ceruleína tanto *in vivo* quanto *in vitro*, envolvendo como mecanismo de ação a supra-regulação de Bcl-xL e Bcl-2, as quais são correlacionadas inversalmente com a necrose em células acinares pancreáticas isoladas.

Diante dessas informações, sendo as lectinas de leguminosas também caracterizadas por um domínio de reconhecimento de carboidratos dependente de Ca<sup>2+</sup>, assim como as da família Reg localizadas no pâncreas, e sendo também dotadas de propriedades biológicas diversas nos mais variados tipos de células e tecidos, resolvemos investigar o papel de duas lectinas de leguminosas, ConA e ConBr, na pancreatite aguda experimental, bem como nas alterações celulares induzidas por Etanol/POA.

### **1.7. Lectina das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA)**

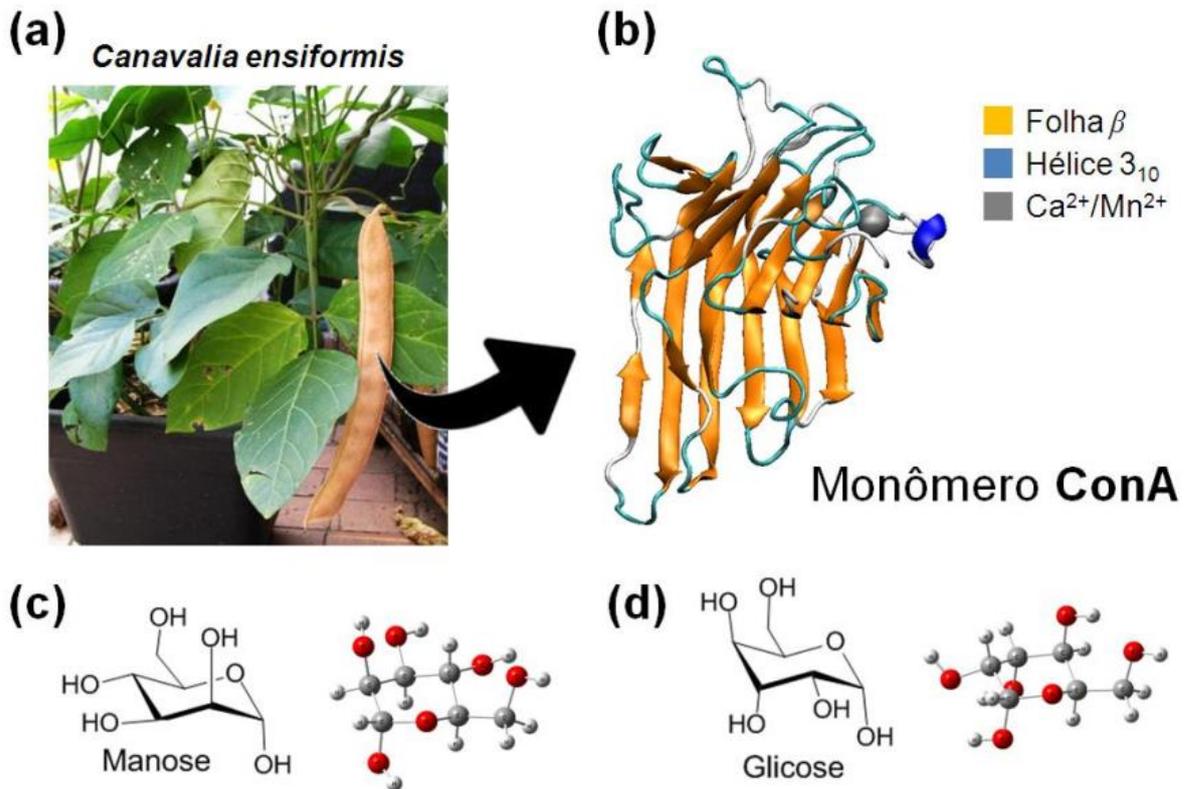
A *Canavalia ensiformis* (L.) DC, conhecida como feijão de porco ou “jack bean” em inglês, é uma planta arbustiva, que pertence à família Fabaceae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae. A leguminosa *C. ensiformis* é de origem centro-americana, bastante cultivada em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. É encontrada em estado silvestre nas Antilhas e nas zonas africanas e asiáticas. É uma leguminosa anual ou bianual, herbácea, rústica, rasteira, apresentando um crescimento ereto e determinado de início lento podendo atingir 1,2 m de altura e é amplamente cultivada nos países tropicais como cobertura verde (BALLIANA et al., 2017).

A lectina Concanavalina A (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis*, foi a primeira lectina a ser isolada, em 1916, sequenciada e teve sua estrutura tridimensional e

sequenciamento de carboidratos determinada por cristalografia de raio-x (HARDMAN, 1972; HARDMAN, 1982). ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica (LI et al., 2011) e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos, que formam duas folhas  $\beta$  antiparalelas, compostos por 6 e 7 fileiras paralelas de sequências de aminoácidos estendidas em cada uma delas, respectivamente. A formação dos dímeros é dada pelo emparelhamento adjacente e antiparalelo dos monômeros, como mostrado na figura 8. Muitos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais fizeram desta proteína a lectina de planta melhor caracterizada e uma das mais estudadas (GOLDSTEIN et al., 2012).

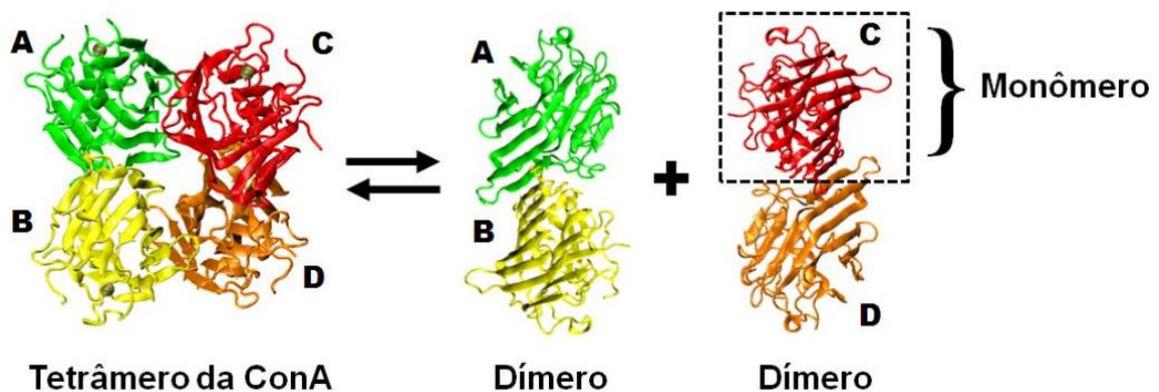
Estruturalmente a ConA apresenta estrutura multimérica composta de monômeros de 25,5 KDa, em meio fisiológico possui estrutura quaternária tetramérica, com peso molecular de aproximadamente 110 KDa, além de exibir a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al., 1999), sendo descrita muitas vezes como dímero de dímeros, cuja dissociação reversível é dada pela mudança de pH, de modo que suas subunidades sofrem apenas uma pequena perturbação estrutural, mantendo igual afinidade pelos açúcares em ambas as formas dimérica (pH < 5,5) ou tetramérica (pH > 5,5), como pode ser representado na figura 9. A subtribo Diocleinae, da qual faz parte a ConA, de uma forma geral representa metaloproteínas que requerem íons divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) para exibir atividade biológica completa (SANZ-APARICIO et al., 1997). Cada subunidade também contém sítios de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , os quais são necessários para a estabilidade dessa classe de proteínas vegetais (Figura 7), e uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, assim como fito-hormônios (CAVADA et al., 2001).

**Figura 08.** Representação da imagem da leguminosa *Canavalia ensiformis* e da estrutura da lectina ConA.



A imagem mostra (a) Folhas e vagem com sementes da *Canavalia ensiformis*, da qual é extraída a lectina ConA. A estrutura do monômero da ConA (b), PDB 3CNA (HARDMAN; AINSWORTH, 1972), e dos carboidratos manose (c) e glicose (d).

**Figura 09.** Equilíbrio químico entre as formas tetraméricas e diméricas da ConA em função do pH.



Em  $\text{pH} > 5.5$ , o tetrâmero é a estrutura quaternária mais abundante, enquanto que, em pH mais ácido ( $< 5.5$ ), a estrutura dimérica é predominante. Ambas as formas apresentam a mesma afinidade por manose e glicose.

Através da sua capacidade de ligação específica a resíduos de manose e glicose em diferentes tipos de células, ConA pode modular vários eventos, como neuroplasticidade (LIN; LEVITAN, 1991; SCHERER; UDIN, 1994; EVERTS et al., 1999), limiar de resposta em receptores ionotrópicos de glutamato (THALHAMMER; EVERTS; HOLLMANN, 2002; BOEHM; HUCK, 1998) apresentar efeitos inibitórios no transporte de 5-HT (5-hidroxitriptamina, ou serotonina) antagonizado por  $\alpha$ -metil-D-manose (IKEGAMI et al., 1991), inibição pré-sináptica em neurônios (BOEHM; HUCK, 1998), dessensibilização no transporte de dopamina (HUANG et al., 2003), atividade imunomodulatória (SOUZA et al., 2013; REIS et al., 2008), propriedade antinociceptiva (PINTO et al., 2013) além de ter atividade na modulação da morte celular (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) com comprovação de mecanismos de ação na promoção de apoptose (RUHUL AMIN et al., 2007; LIU et al., 2009; RUHUL AMIN et al., 2010) e autofagia em diversos tipos de células (BIBHAS et al., 2014; ZHENG et al., 2014; LAI et al., 2015).

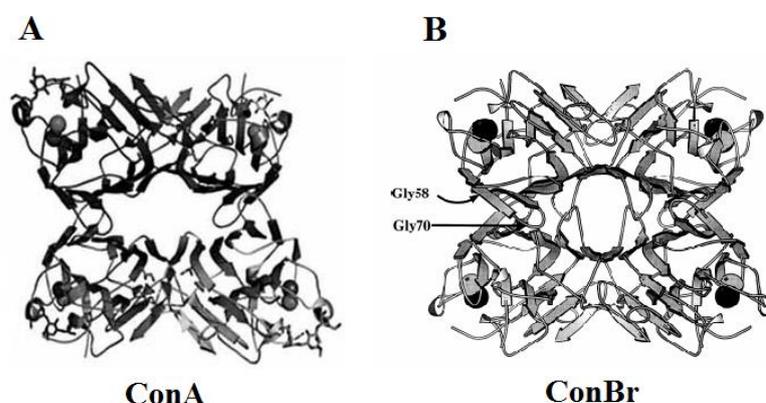
A partir do isolamento de ConA, várias lectinas com propriedades físicas similares tem sido purificadas e parcialmente caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como as lectinas de *Canavalia bonariensis*, CABO (DAM et al., 1998), *Cratylia floribunda*, CFL (MOREIRA et al., 1991), *Dioclea guianensis*, DGuiL (VASCONCELOS et al., 1991), *Dioclea violacea*, DVioL (MOREIRA et al., 1996) e uma dentre elas tem recebido especial atenção ao longo dos anos, a lectina isolada de *Canavalia brasiliensis*, ConBr (MOREIRA; CAVADA, 1984), a qual tem sua estrutura totalmente purificada e caracterizada e tem apresentado uma gama de atividades biológicas tanto em trabalhos comparativos aos efeitos de ConA (BARAUNA et al., 2006; RUSSI et al., 2012; FAHEINA-MARTINS et al., 2012), quanto utilizada sozinha (RIEGER et al., 2013; JACQUES et al., 2013; SILVA et al., 2014; RIEGER et al., 2017), mostrando ser uma molécula bastante versátil nos mais variados perfis de ações em modelos de doença. Tendo em vista a possibilidade de avaliação em conjunto dessas duas lectinas tão similares estruturalmente, tivemos como uma das propostas para esse trabalho a investigação do seu papel no modelo de pancreatite aguda induzida experimentalmente por Etanol/POA, no sentido de analisar comparativamente os perfis de resposta de ambas as moléculas.

### 1.8. Lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. é uma trepadeira pertencente à família Fabaceae, que podem atingir de 0,5 a 5 m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. As raízes são amarelas, folhas alternadas, trifolioladas, com as flores apresentando coloração roxa e as pétalas reunidas em inflorescências do tipo paniculada, com escapo floral de coloração verde-arrochada. Trata-se de uma planta nativa do novo mundo, com distribuição geográfica natural ampla, sendo encontrada no México, Caribe, Paraguai, Argentina e também no nordeste e sul do Brasil (SAUER, 1964).

A lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, ConBr, compartilha muitas semelhanças com a lectina ConA, ambas pertencentes à família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae. ConBr tem sua estrutura cristalográfica definida, apresentando 99% da sequência de aminoácidos idêntica à da ConA e a mesma especificidade por glicose/manose (SANZ-APARICIO et al., 1997). A estrutura cristalográfica de ConBr é representada abaixo (Figura 10) e mostra os resíduos de aminoácidos que variam em relação à ConA. Apenas quatro resíduos de aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos das lectinas (Figuras 11), essas substituições de aminoácidos fora do sítio de união de carboidratos podem ser responsáveis pela diferença na afinidade de ligação aos açúcares ou de atividades biológicas das lectinas Diocleinae (SANZ-APARICIO et al., 1997; GRANGEIRO et al., 1997).

**Figura 10.** Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a localização das quatro subunidades.



As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr (figura B) são substituídas por Asp e Ala em ConA (figura A), respectivamente. As esferas cinza e preta representam os íons de transição,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , respectivamente (Adaptado de SANZ-APARICIO et al., 1997; LI et al., 2010).

**Figura 11.** Sequência de aminoácidos das lectinas ConA (NAISHMITH; FIELD, 1996) e ConBr (GRANGEIRO et al., 1997).

```

      1                               45
ConA  ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNG
ConBr  ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNG

      46                               90
ConA  KVGTAHIIYNSVDKRLSAVVSYPNADSATVSYDVLDLNVLPWVR
ConBr  KVGTAHIIYNSV*GKRLSAVVSYPNGSATVSYDVLDLNVLPWVR
                               *

      91                               135
ConA  VGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNSTHETNALHFMFNQFSK
ConBr  VGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNSTHETNALHFMFNQFSK

      136                               180
ConA  DQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
ConBr  DQKDLILQGDATTGTE*GNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
                               *

      181                               225
ConA  IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGS
ConBr  IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGS

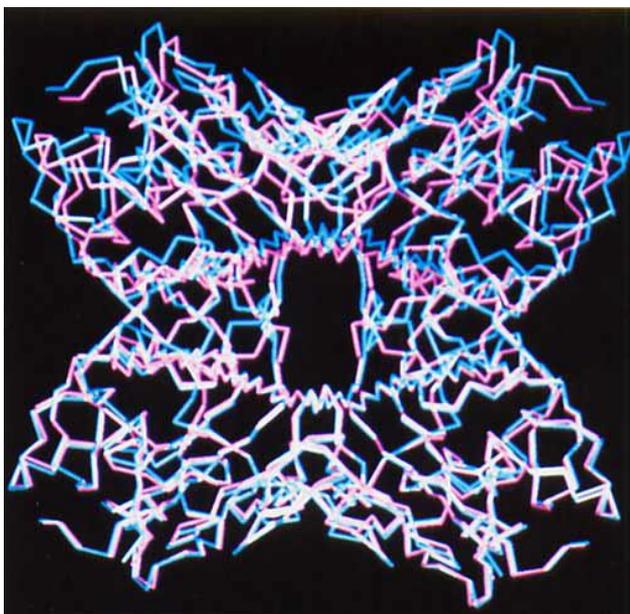
      226           237
ConA  TGRLLGLFPDAN
ConBr  TGRLLGLFPDAN

```

O asterisco (\*) indica as diferenças nas sequências de aminoácidos das lectinas. Fonte: Adaptado de BARBOSA et al. (2001).

A comparação, por superposição, das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros de ConA e ConBr são ilustradas na figura 12. Apesar da similaridade estrutural, as lectinas ConA e ConBr podem apresentar diferentes efeitos biológicos relacionados, por exemplo, a propagação de macrófagos peritoneais em camundongos (RODRIGUEZ et al., 1992), produção de NO (ANDRADE et al., 1999) e estimulação de linfócitos humanos in vitro (BARRALNETTO et al., 1992), além de efeitos biológicos diferentes relacionados à melhora da depressão em camundongos, onde ConBr, mas não ConA, teve efeito antidepressor no teste de nado forçado, modelo experimental de depressão (BARAUNA et al., 2006), com envolvimento do sistema monoaminérgico como mecanismo de ação. Em outro estudo, realizado por Russi e colaboradores (2012), ConBr, administrada via intracerebroventricular, apresentou atividade neuroprotetora nas convulsões induzidas por ácido quinolínico, além de proteger contra a necrose de células do hipocampo causada por este agente, tais efeitos não foram observados com a administração de ConA (RUSSI et al., 2012).

**Figura 12.** Comparação (por superposição) das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros de ConA (magenta) e ConBr (azul e branco).



Fonte: Adaptado de GRANGEIRO et al. (1997).

Em contrapartida, existem trabalhos que mostram uma similaridade na atividade das lectinas ConA e ConBr, como nos efeitos antiproliferativos em células tumorais de carcinoma mamário MCF-7, onde ambas apresentam o mesmo padrão de citotoxicidade e genotoxicidade (FAHEINA-MARTINS et al., 2011). Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa (FAHEINA-MARTINS et al., 2012), ConA e ConBr também exerceram efeitos semelhantes de atividade antiproliferativa em linhagens de células leucêmicas MOLT-4 e HL-60, os resultados encontrados mostraram que ambas as lectinas inibem a proliferação das células tumorais através da promoção de apoptose e melhora da estabilidade mitocondrial. Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que ConA e ConBr apresentam efeito antinecrótico em células acinares pancreáticas estimuladas experimentalmente por ácido biliar, sugerindo como um dos mecanismos envolvidos dessas lectinas a proteção contra a despolarização mitocondrial causada por este agente lesivo (DAMASCENO, 2015).

Dessa forma, diante da necessidade de tratamentos mais eficazes para a pancreatite aguda alcoólica e tendo em vista que as lectinas ConA e ConBr são moléculas versáteis com ampla atividade na modulação dos processos de morte celular, com envolvimento mitocondrial, além de já apresentarem atividade biológica em outros modelos experimentais de lesão celular pancreática, resolvemos investigar o papel dessas proteínas na pancreatite aguda alcoólica experimental induzida por Etanol/POA, nos aspectos *in vitro* e *in vivo*.

## 2. JUSTIFICATIVA

A pancreatite aguda é uma condição clínica que acomete uma parte significativa da população mundial e quando não tratada pode levar a quadros graves com extensa necrose pancreática e falência múltipla de órgãos, direcionando ao óbito cerca de 20 a 30% dos pacientes acometidos. Na última análise feita pelo DATASUS, no Brasil, apenas entre os meses de fevereiro de 2016 a fevereiro de 2017 foram registradas 30.032 internações relacionadas às doenças pancreáticas, que resultaram em 1.551 óbitos, representando um custo de aproximadamente R\$ 26 milhões aos cofres públicos brasileiros neste período.

O álcool é identificado como a segunda principal causa de pancreatite ao redor do mundo, diante disso, intensas investigações têm sido voltadas para compreender melhor o processo patológico que ocorre no pâncreas após a ingestão de etanol. Nesse sentido, o modelo experimental de pancreatite aguda induzida por Etanol/POA, o qual segue pelo caminho da via não-oxidativa de metabolização pancreática, tem esclarecido aos poucos o processo fisiopatológico subjacente a essa lesão, demonstrando que o processo inflamatório acontece em consequência de uma série de fatores que ocorrem dentro da célula acinar pancreática, como aumento de cálcio citosólico, lesão mitocondrial e necrose celular. Por conta da complexidade de eventos envolvendo esta condição patológica, muitos dos quais ainda desconhecidos, atualmente ainda não há cura ou tratamento eficazes para a pancreatite aguda alcoólica.

As lectinas de leguminosas ConA e ConBr são moléculas biologicamente ativas extensamente usadas em diversos modelos experimentais, sendo utilizadas atualmente, inclusive, em triagens clínicas. Suas propriedades são amplas que vão desde atividades sistêmicas com propriedades anti-nociceptivas a modulações nos perfis de morte celular nos mais variados tipos de células e tecidos. Além disso, um trabalho realizado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que essas lectinas possuem atividade protetora contra disfunção mitocondrial e necrose de células acinares pancreáticas estimuladas por ácido biliar. Dessa forma, diante da necessidade de busca por moléculas que possam ser objetos de tratamento mais eficazes para a pancreatite aguda alcoólica, resolvemos investigar o papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda induzida experimentalmente por Etanol/POA, tanto em abordagens *in vitro*, quanto *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de ConA e ConBr na lesão pancreática causada por Etanol/POA “*in vitro*”, investigando seu potencial modulador de cálcio citosólico e morte celular e “*in vivo*”, através da análise de parâmetros inflamatórios, bioquímicos e nociceptivos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de ConA e ConBr na necrose de células acinares pancreáticas murinas e humanas causada por Etanol/POA, bem como seu efeito na apoptose de células murinas, sob as mesmas condições.
- Estudar os papéis de ConA e ConBr na modulação de  $[Ca^{2+}]_c$  em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA.
- Investigar a interação de ConA e ConBr com os canais de  $Ca^{2+}$  reguladores da célula acinar pancreática, tais como Canal de entrada de cálcio operado por estoque (SOCs) e receptor de liberação de cálcio do retículo endoplasmático dependente de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ).
- Verificar o papel de ConA e ConBr na modulação de  $[Ca^{2+}]_c$  em células acinares pancreáticas estimuladas com CCK em concentração fisiológica e patológica.
- Avaliar os efeitos de ConA e ConBr na modulação de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA.
- Analisar a participação de ConA e ConBr na regulação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) em células acinares pancreáticas estimuladas por concentrações tóxicas de  $Ca^{2+}$ .
- Verificar a interação e localização de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas em condições fisiológicas e patológicas.
- Investigar o papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos, através de:
  - Avaliação Histopatológica;
  - Análise do Peso Úmido Pancreático;
  - Dosagens de Amilase, Lipase, Tripsina, TGO e TGP;
  - Dosagem de Mieloperoxidase (MPO);
  - Análise do Limiar Nociceptivo.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Aspectos éticos envolvendo pesquisa animal**

Todos os procedimentos envolvendo animais estavam de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e o referido projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 25/2016 (Anexo I).

### **4.2. Animais**

Foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss ou CD-1, com idade variando entre 8 a 12 semanas de idade, pesando em média 25g. Os animais da linhagem Swiss foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e os da linhagem CD-1 foram provenientes do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Liverpool, Inglaterra. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno, medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura, permanecendo em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, mantidos em estante com variação térmica de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com exaustão de ar e respeitando o ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso à comida e água. A técnica de deslocamento cervical foi utilizada para eutanásia dos animais.

### **4.3. Aspectos éticos envolvendo pesquisa com células humanas**

A avaliação experimental envolvendo células acinares pancreáticas humanas foi realizada em parceria com a Central de Transplantes do Estado do Ceará, conforme projeto previamente aprovado pela Plataforma Brasil, credenciado pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP)/ Ministério da Saúde (MS), aprovado sob número de parecer 1.764.066/16 (Anexo II). Foram seguidas as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos no Brasil, da resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do CONEP/MS. Os tecidos pancreáticos foram retirados de doadores não-vivos, já doadores de outros órgãos para transplante. Durante a abordagem da família do potencial doador para autorização da liberação dos órgãos para transplante, a família foi abordada para a possibilidade de doação do tecido pancreático para a

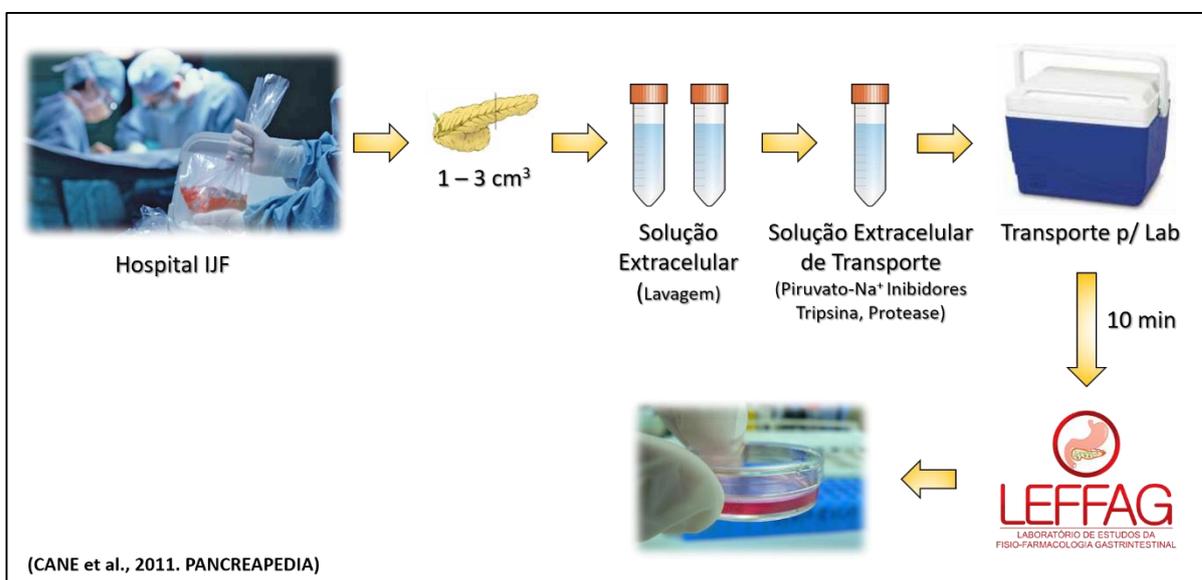
realização da nossa pesquisa, através de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), (Anexo III).

#### 4.4. Retirada de amostra de tecido pancreático humano

Trata-se de uma pesquisa *in vitro*, utilizando-se tecido pancreático de doador cadáver obtido no momento da captação de órgãos para transplante, obedecendo-se os rigores das leis específicas.

**Tecido pancreático humano** – Segmentos de 1-3 cm<sup>3</sup> de tecidos pancreáticos foram retirados de doador cadáver de múltiplos órgãos, após o consentimento da família e liberação através de termo próprio. Seguindo o protocolo descrito por CANE e colaboradores (2011), o pedaço de pâncreas foi imediatamente colocado em solução de transferência em dois tubos de 50 ml com solução extracelular gelada (solução extracelular (mM): 140 NaCl, 4,7 KCl, 1,13 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 D-glicose e 10 HEPES - ajustada para pH 7,35 com NaOH) para remover detritos e produtos sanguíneos. Após a lavagem, a amostra foi adicionada a um tubo contendo aproximadamente 50 mL de solução extracelular, mantida em gelo, contendo inibidor de tripsina, inibidores de protease, e piruvato de sódio, para então ser imediatamente transportada nesta solução em gelo para o laboratório. Fundamentalmente, o tempo de retirada da amostra para o início do isolamento de células foi o mais curto possível (aproximadamente 10 minutos) para assegurar preparações celulares de boa qualidade. Este protocolo é ilustrado na figura 13.

**Figura 13.** Protocolo experimental de retirada de tecido pancreático humano.



#### 4.5. Lectinas vegetais

As lectinas utilizadas foram extraídas das sementes das plantas leguminosas *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Jack bean) (ConA) e *Canavalia brasiliensis* MART (ConBr), ambas apresentam especificidade de ligação a resíduos de D-glicose e D-manose. ConA e ConBr foram isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex- G50 (MOREIRA; CAVADA,1984) no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após a purificação, as lectinas foram dialisadas em água destilada e em seguida liofilizadas. Ambas foram dissolvidas em solução de NaCl 0,9% (salina), imediatamente antes de sua utilização. ConA e ConBr conjugadas ao marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram preparadas e cedidas pelo mesmo laboratório citado.

#### 4.6. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- ✓ Agitador Vortex – Cetomart MV
- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Centrífuga Refrigerada Eppendorf 5804R
- ✓ Contador Automático de Células – Colter
- ✓ Freezer -80°C, Thermo Scientific
- ✓ Material Cirúrgico
- ✓ Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Confocal FluoView™ 1000 – Olympus
- ✓ Microscópio Confocal LSM-510 – Zeiss
- ✓ Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- ✓ Microtubos Eppendorf
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Provetas Volumétricas 50 mL
- ✓ Tubos de Falcon 15 e 50 mL

#### 4.7. Fármacos, soluções e marcadores fluorescentes

Entre parênteses, estão identificadas as empresas comerciais de fornecimento de cada produto utilizado.

##### 4.7.1. Fármacos e reagentes

- ✓ Ácido Palmitoleico – POA (Sigma)
- ✓ Etanol Absoluto (Sigma)
- ✓  $\alpha$ -Metil-Manosídeo (Sigma)

##### 4.7.2. Soluções

- ✓ Água Destilada
- ✓ Álcool 70% (Dinâmica)
- ✓ Dimetil Sulfóxido – DMSO (Molecular Probes)
- ✓ Solução Salina Estéril – NaCl 0,9% (Isofarma)
- ✓ NaCl – 140 mmol/l (Vetec)
- ✓ KCl – 4,7 mmol/l (Dinâmica)
- ✓ MgCl<sub>2</sub> – 1,13 mmol/l (Vetec)
- ✓ CaCl<sub>2</sub> – 1 mmol/l (Vetec)
- ✓ D-glucose – 10 mmol/l (Vetec)
- ✓ HEPES (4 (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanosulfônico ácido) – 10 mmol/l (Sigma)
- ✓ NaOH (Dinâmica)
- ✓ Colagenase Purificada CLSPA (Worthington Biochemical Corporation)
- ✓ Colagenase Tipo II (Sigma)

##### 4.7.3. Marcadores fluorescentes

- ✓ Iodeto de Propídeo (Sigma)
- ✓ Hoechst 33342 (Invitrogen)
- ✓ Tetrametil Rodamina Metil Ester – TMRM (Molecular Probes)
- ✓ Fluo-4, AM (Molecular Probes)
- ✓ Rhod-2, AM (Molecular Probes)

- ✓ Caspases 3, 7 Cell Event® (Molecular Probes)
- ✓ Mg-Green (Molecular Probes)

## **4.8. Estudos *In Vitro***

### **4.8.1. Preparação celular e soluções**

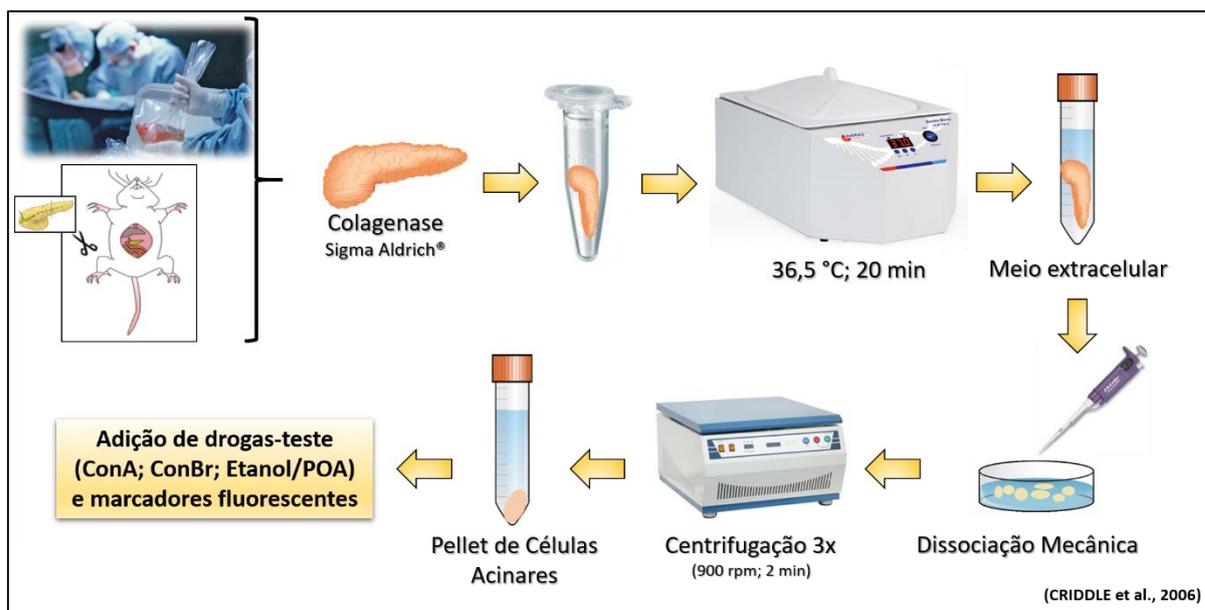
As células acinares pancreáticas foram isoladas com collagenase tipo II (Sigma Aldrich®) do pâncreas de camundongos Swiss ou CD-1 (8-12 semanas de idade). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (23-25° C) e as células foram utilizadas dentro de 4 horas após o isolamento. A solução extracelular continha (em mmol/l): 140 NaCl; 4,7 KCl; 1,13 MgCl<sub>2</sub>; 1 CaCl<sub>2</sub>; 10 D-glucose; e 10 HEPES (4 (2-hidroxi)etil)-1-piperazinoetanosulfônico ácido), ajustados para pH 7,35 ± 1,0. O cálcio (CaCl<sub>2</sub>) foi omitido desta solução em algumas análises.

### **4.8.2. Isolamento de células acinares pancreáticas**

Após eutanásia dos animais, o pâncreas foi removido, sendo posteriormente lavado com meio extracelular contendo Ca<sup>2+</sup>, a fim de eliminar resquícios de sangue ou qualquer sujeira contida no tecido. Para a digestão enzimática, foi injetado em cada pâncreas 1 ml de collagenase tipo II (0.15 mg/ml, Sigma), com posterior incubação em banho-maria a 36,5°C durante 20 minutos (CRIDDLE et al., 2006). Após a retirada do banho-maria foram acrescentados 5 ml de meio extracelular, e realizada a digestão mecânica com pipetagens do tecido, com o objetivo de gerar forças de cisalhamento através da passagem do pâncreas pelo orifício das ponteiras, promovendo, dessa forma, a desintegração do tecido. A cada ciclo de 5 a 6 pipetagens, esperava-se a precipitação dos pedaços maiores de tecido e coletava-se o sobrenadante. Em seguida, ao restante de tecido que ficava no fundo do tubo de polipropileno (falcon) acrescentavam-se mais 5 ml de meio extracelular, e continuavam-se os movimentos com a pipeta para desintegração do tecido. Esse processo era repetido 3 vezes para cada órgão, a fim de serem coletados, ao final, 15 ml de sobrenadante, sendo posteriormente centrifugado a uma velocidade de 900 rpm, durante 2 minutos (min). Após a centrifugação, descartava-se o sobrenadante e as células eram ressuspensas em 5 ml de meio extracelular e dava-se seguimento à segunda centrifugação com a mesma rotação e tempo da anterior. Ao final desta última, foi realizado novamente o descarte do sobrenadante e o pellet de células foi

ressuspendido em 2 ou 3 ml de meio extracelular. Em seguida, procedeu-se a distribuição deste meio contendo as células, colocando-se 1 ml em microtubos Eppendorfs âmbar e então realizados os tratamentos adequados e incubados sob agitação com tempo determinado de acordo com cada protocolo. Este protocolo é ilustrado na figura 14.

**Figura 14.** Protocolo experimental de Isolamento Primário de Células Acinares.

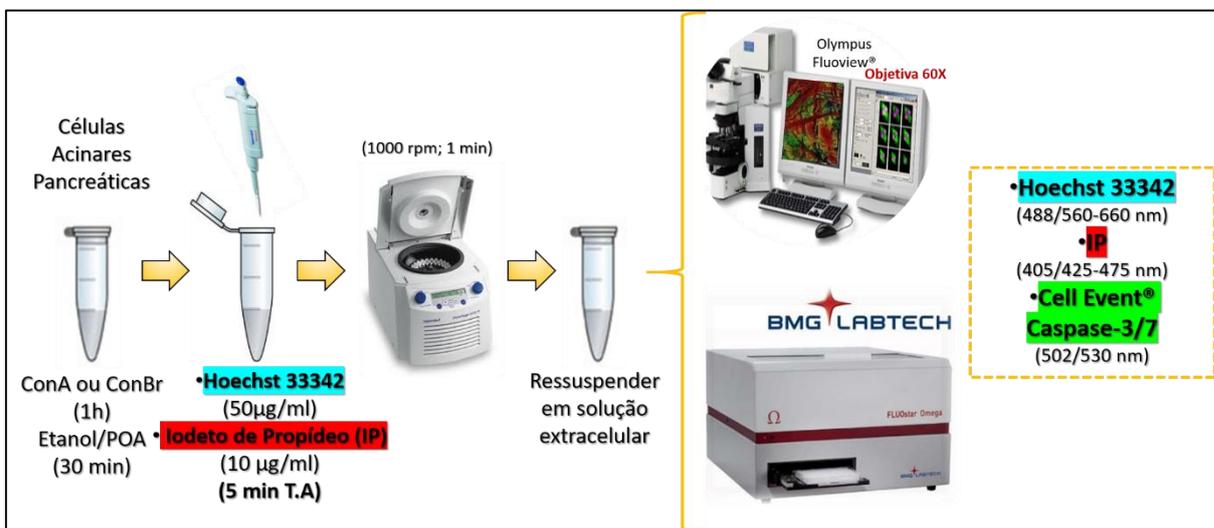


#### 4.8.3. Análise dos efeitos de ConA e ConBr sobre a necrose e apoptose em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA

Para avaliar os efeitos de ConA ou ConBr (3, 10, 30 µg/ml) sobre a lesão celular induzida por etanol na presença de ácido palmítico (Etanol/POA; 100 µM), as células isoladas foram previamente tratadas e incubadas com ConA ou ConBr durante 1h, seguido da administração de Etanol/POA durante 30 minutos. No grupo controle negativo para lesão celular foi administrado apenas salina; no grupo controle positivo foi avaliado o potencial necrosante de Etanol/POA durante 30 min, sem pré-tratamento com as lectinas. Em outro grupo, também utilizado como controle, foi administrado ConA e ConBr às células, com incubação durante 1h, sem a administração posterior de Etanol/POA, com a finalidade de observar a possibilidade dessas lectinas causarem alguma lesão às células acinares pancreáticas. Após a finalização dos tratamentos, as células foram incubadas por 5 minutos com o marcador nuclear Hoechst 33342 (50 µg/ml) e com iodeto de propídeo (IP; 10 µg/ml) (utilizado para detectar a ruptura da membrana plasmática, característica de necrose) (CRIDDLE et al., 2006). Ao final

deste processo, as células foram centrifugadas (1000 rpm, 1 min), lavadas e ressuspensas em solução extracelular para posterior visualização no microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus. A fluorescência de Hoechst 33342 (excitação/emissão: 488/560-660 nm) e IP (excitação/emissão: 405/425-475) foram obtidas utilizando a objetiva de 40x. De cada grupo foram feitas 15 imagens de campos de visualização diferentes, com repetição de pelo menos 3 experimentos independentes. O percentual de necrose é dado a partir da correlação do número de células totais presentes no campo de visualização, marcadas com hoechst, com o número de células em necrose, marcadas com iodeto de propídeo. Na tentativa de visualizar o potencial das lectinas protegerem as células acinares pancreáticas da necrose causada por Etanol/POA por um período de tempo mais prolongado, foi realizado o mesmo procedimento de tratamento e incubação com marcadores fluorescentes descritos acima em um fluorímetro (FLUOstar OPTIMA – BMG LABTECH), overnight, durante 14h, seguindo esse mesmo protocolo foi mensurado o potencial apoptótico de ConA e ConBr, utilizando o kit Cell Event® Caspase-3/7 Green, conforme instruções do fabricante. Este protocolo é ilustrado na figura 15.

**Figura 15.** Protocolo de análise do efeito de ConA e ConBr sobre a necrose e apoptose em células acinares estimuladas por Etanol/POA.



#### 4.8.4. Avaliação da participação do domínio lectínico nos efeitos de ConA e ConBr

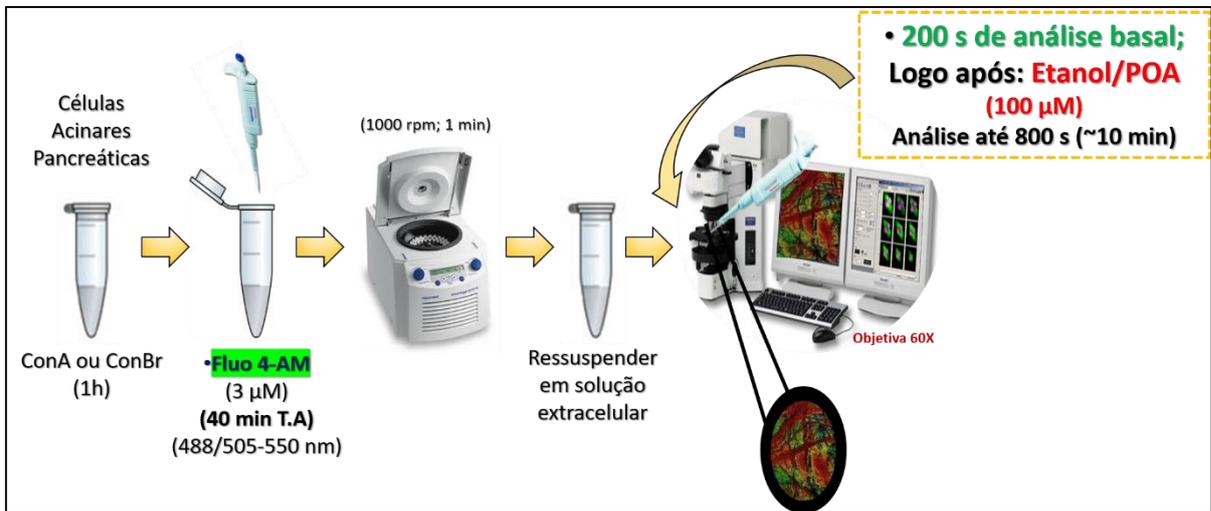
Neste protocolo experimental, ConA ou ConBr (10 µg/ml) foram previamente incubadas durante 1h a 37°C, em banho-maria, com seu açúcar ligante  $\alpha$ -metil-manosídeo ( $\alpha$ -MM), na concentração de 0,1 M. Esse procedimento garante a ocupação do domínio lectínico pelo seu açúcar conjugado (ASSREUY et al., 2009). Ao final desse processo, as lectinas ligadas

ao  $\alpha$ -MM foram administradas nas células e incubadas durante 1h, seguida da administração e incubação durante 30 minutos com Etanol/POA. Com o intuito de eliminar o viés da possibilidade do açúcar  $\alpha$ -MM estar causando alguma alteração celular, um grupo de células recebeu administração de  $\alpha$ -MM, sem ligação com as lectinas, durante 1h. A tabela 2 descreve a divisão e tratamento dos grupos experimentais deste protocolo. Após a finalização dos tratamentos, todos os grupos foram incubados com o marcador nuclear Hoechst 33342 e com iodeto de propídeo durante 5 min, seguido do processo de lavagem e visualização em microscópio confocal, conforme descrito na metodologia anterior.

#### **4.8.5. Avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ causado por Etanol/POA**

Para a realização dessa análise, ConA ou ConBr (10  $\mu$ g/mL) foram incubadas, durante 1h, em temperatura ambiente (t.a.) às células acinares pancreáticas isoladas, na presença do marcador fluorescente de  $Ca^{2+}$  citosólico, Fluo 4-AM (3  $\mu$ M; excitação: 488 nm, emissão: 505–550 nm), em seguida centrifugadas (1000 rpm, 1 min) e analisadas no microscópio confocal ZEISS LSM510 (Jena GmbH, Germany). ). Após uma análise inicial basal de 200 segundos, para registrar o perfil de concentração de cálcio citosólico basal de cada célula sem estímulo, Etanol/POA (100  $\mu$ M) foi aplicado às células, sendo mensurada a fluorescência relativa de cada célula durante 10 minutos. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência basal (razão F/F0). Para verificar se ConA ou ConBr promoviam aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  “per si”, foi analisado a fluorescência basal de cada célula (durante 200s) e em seguida, administrado ConA ou ConBr (colocadas no tempo de 200s, mantendo o registro até 400s), colocando-se posteriormente Etanol/POA (colocado no tempo de 400s, mantendo o registro até 800s) após o tempo de observação das células na presença das lectinas. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência basal (razão F/F0). Protocolo ilustrado na figura 16.

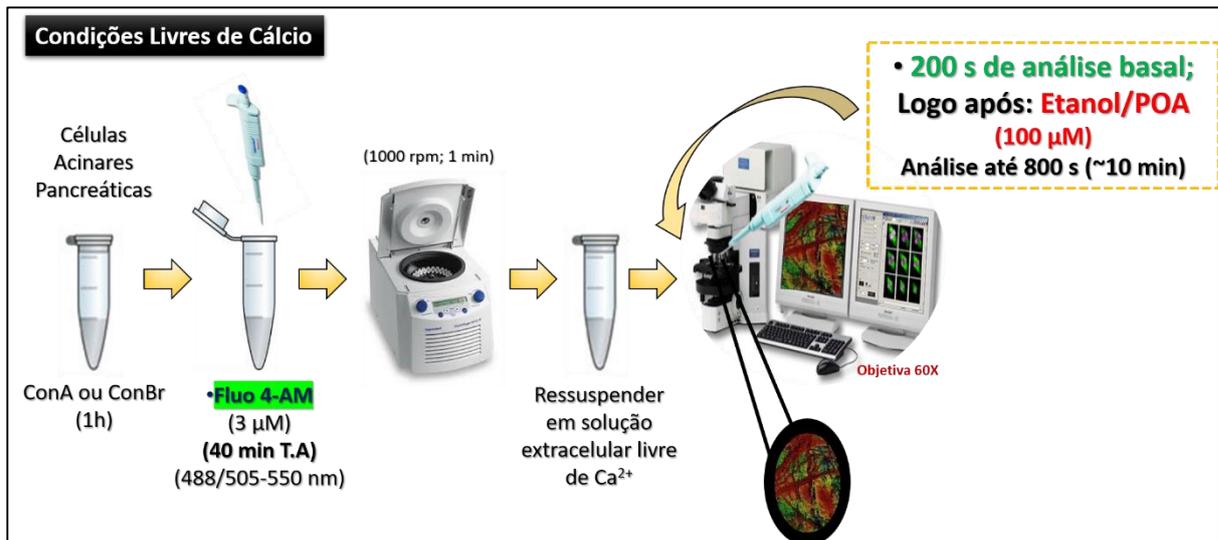
**Figura 16.** Protocolo de análise do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado por Etanol/POA.



#### 4.8.6. Análise da participação de ConA ou ConBr na Prevenção da Liberação de $Ca^{2+}$ causada por Etanol/POA: Potencial Interação com IP<sub>3</sub>R

Para a investigação da capacidade de ConA e ConBr (10 µg/mL) diminuírem a liberação de  $[Ca^{2+}]_c$  causada pela interação de Etanol/POA com receptores de IP<sub>3</sub> do RE, ConA e ConBr foram incubadas durante 1h, (t.a.) com as células acinares pancreáticas, seguida da incubação com o marcador fluorescente de  $[Ca^{2+}]_c$ , Fluo 4-AM (3 µM; excitação/emissão: 488/505-550 nm) por 40 min, em temperatura ambiente. Após centrifugação (1000 rpm, 1 min), as células foram ressuspensas em solução extracelular isenta de cálcio, e levadas para análise em microscópio confocal, com uma análise inicial de 200 segundos, para registrar o perfil de concentração de cálcio citosólico basal de cada célula sem estímulo, após esse tempo, foi administrado Etanol/POA em uma concentração tóxica (100 µM) e registrado a fluorescência relativa até 800 segundos (aproximadamente 10 minutos de análise), como pode ser observado na figura 17. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência basal (razão F/F<sub>0</sub>).

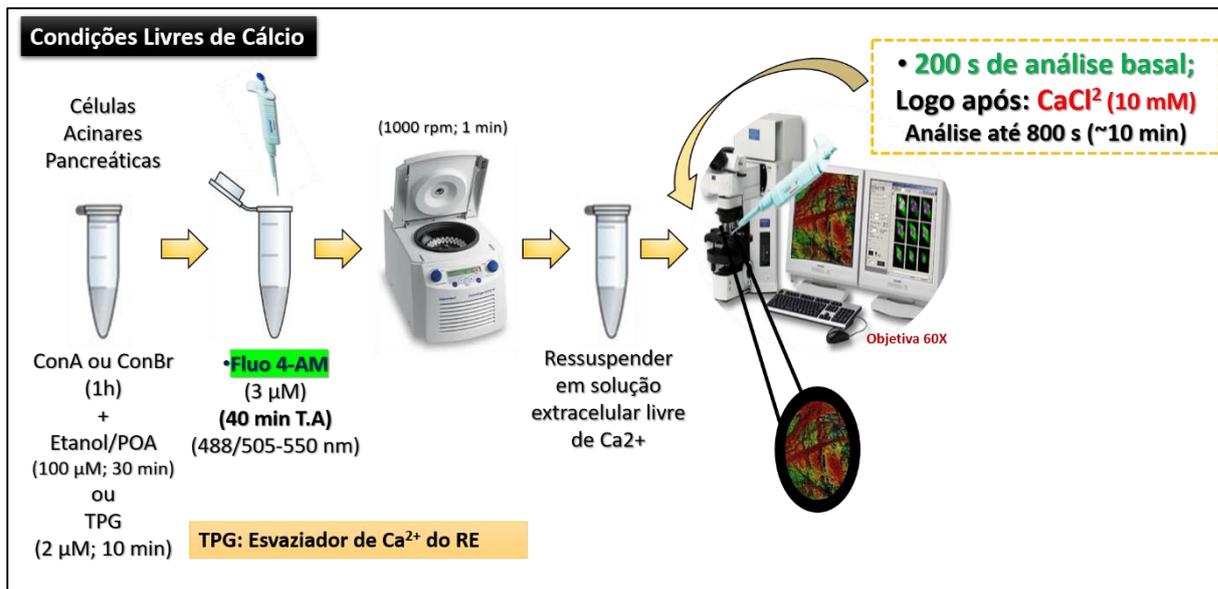
**Figura 17.** Protocolo de avaliação do papel de ConA ou ConBr na prevenção da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  causada por Etanol/POA: potencial interação com  $\text{IP}_3\text{R}$ .



#### 4.8.7. Análise da participação de ConA ou ConBr na prevenção da entrada de $\text{Ca}^{2+}$ externo: potencial interação com SOCs.

Para essa investigação, sob condições livres de cálcio na solução de manutenção celular, ConA e ConBr (10 µg/mL, 1h, t.a.) foram incubadas previamente com Etanol/POA (100 µM, 30 min) ou tapsigargina (2µM, 10 min), um inibidor não-competitivo da bomba  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  do retículo sarco/endoplasmático (SERCA), o qual atua como um liberador de cálcio independente de  $\text{IP}_3$ . Tapsigargina foi usada em condições com meio extracelular isentas de  $\text{Ca}^{2+}$ , com o intuito de esvaziar os estoques de cálcio do retículo endoplasmático e permitir a entrada de cálcio operada por estoque (SOCE) a partir da reintrodução de  $\text{Ca}^{2+}$  (10 mM) no meio externo. Logo após, procedeu-se a incubação com o marcador fluorescente de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , Fluo 4-AM (3 µM; excitação/emissão: 488/505-550 nm) por 40 min (t.a.). Após centrifugação (1000 rpm, 1 min), as células foram ressuspensas em solução extracelular isenta de cálcio, e levadas para análise em microscópio confocal, com uma análise inicial de 200 segundos, para registrar o perfil de concentração de cálcio citosólico basal de cada célula sem estímulo, após esse tempo, foi administrado cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em uma concentração tóxica (10 mM) e registrado a fluorescência relativa até 800 segundos (aproximadamente 10 minutos de análise), como pode ser observado na figura 18. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência basal (razão  $F/F_0$ ).

**Figura 18.** Protocolo de análise do papel de ConA e ConBr na prevenção da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo: potencial interação com SOCs.



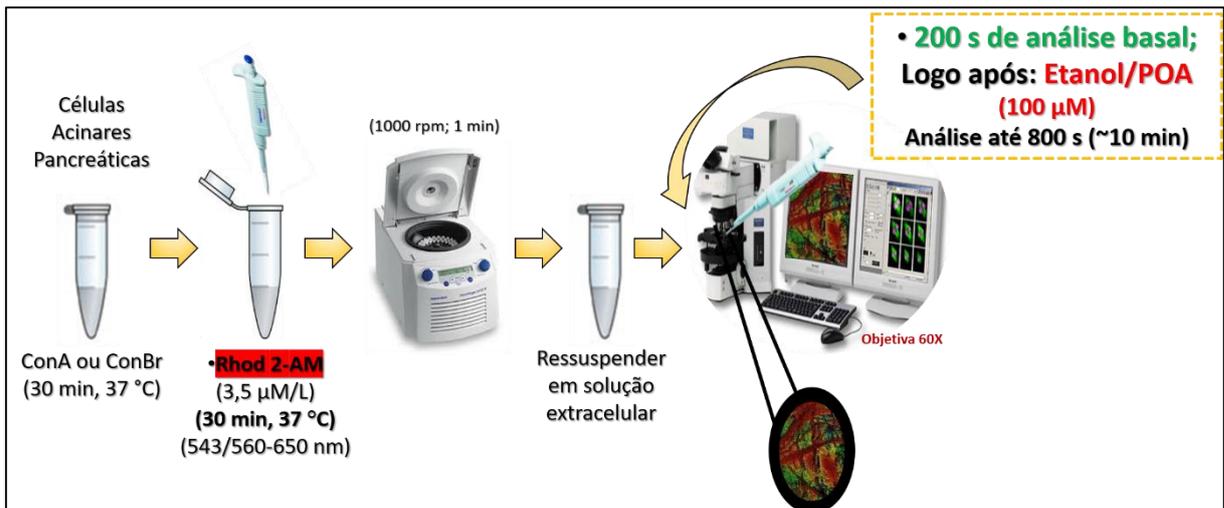
#### 4.8.8. Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ causadas por concentrações fisiológicas e patológicas de CCK

Na intenção de avaliar a capacidade de ConA e ConBr interferirem na alteração de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  causada por um agente endógeno, além do agente precipitante exógeno Etanol/POA, utilizamos o hormônio colecistocinina (CCK), em concentrações fisiológicas e patológicas. Para essa proposta, ConA ou ConBr (10 µg/mL) foram incubadas, durante 1h, em temperatura ambiente (t.a.) às células acinares pancreáticas isoladas, na presença do marcador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, Fluo 4-AM (3 µM; excitação: 488 nm, emissão: 505–550 nm), em seguida centrifugadas (1000 rpm, 1 min) e analisadas no microscópio confocal ZEISS LSM510 (Jena GmbH, Germany). Após uma análise inicial de 200 segundos, para registrar o perfil de concentração de cálcio citosólico basal de cada célula sem estímulo, CCK em concentração fisiológica (10 pM) e patológica (10 nM) foi aplicado às células, sendo mensurada a fluorescência relativa de cada célula durante aproximadamente 10 minutos. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência (F) basal (razão F/F<sub>0</sub>).

#### 4.8.9. Avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ causado por Etanol/POA

Para a realização dessa análise, ConA ou ConBr (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foram incubadas, durante 30 min a 37  $^{\circ}\text{C}$ , às células acinares pancreáticas isoladas, na presença do marcador fluorescente de  $Ca^{2+}$  mitocondrial ( $[Ca^{2+}]_{mit}$ ), Rhod 2-AM (3,5  $\mu\text{M/L}$ ; excitação: 543 nm; emissão: 560-650 nm), em seguida analisadas no microscópio confocal ZEISS LSM510 (Jena GmbH, Germany). Após uma análise inicial de 200 segundos, para registrar o perfil de concentração de cálcio mitocondrial basal de cada célula sem estímulo, Etanol/POA (100  $\mu\text{M}$ ) foi aplicado às células, sendo registrada a fluorescência relativa até 800 segundos (aproximadamente 10 minutos de análise), como pode ser observado na figura 19. As medidas foram expressas como mudanças a partir da fluorescência basal (razão F/F<sub>0</sub>).

**Figura 19.** Protocolo de avaliação do efeito de ConA e ConBr sobre o aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  causado por Etanol/POA.



#### 4.8.10. Avaliação de ConA e ConBr na regulação do Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas

##### Técnica de isolamento de mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas essencialmente de acordo com o método modificado de Johnson e Lardy por Lapidus e Sokolove (JOHNSON; LARDY, 1967; LAPIDUS; SOKOLOVE, 1993). As amostras de fígado de camundongos foram rapidamente cortadas e

aparadas para remover o excesso de tecidos em um tampão contendo 210 mM de manitol, 70 mM de sacarose, 5 mM de HEPES, 1 M de KOH e 1 mM de EGTA, com pH ajustado para 7,4.

As amostras de fígado foram pesadas, picadas e suspensas no mesmo tampão para produzir um homogenato a 10%. A suspensão foi imediatamente homogeneizada em gelo usando um homogeneizador de vidro. O homogenato foi centrifugado numa centrífuga refrigerada de alta velocidade (SM-18B, Surgifield medical, Inglaterra) e as fracções mitocondriais obtidas foram lavadas com um tampão de lavagem contendo 210 mM de manitol, 70 mM de sacarose, 5 mM de HEPES-KOH e 0,5% de BSA, com pH 7,4.

Os sedimentos mitocondriais foram suspensos em tampão de intumescimento (210 mM de manitol, 70 mM de sacarose e 5 mM de HEPES-KOH, pH 7,4) e imediatamente dispensados em tubos Eppendorf de 2 ml. As mitocôndrias isoladas foram usadas dentro de 3 horas de isolamento.

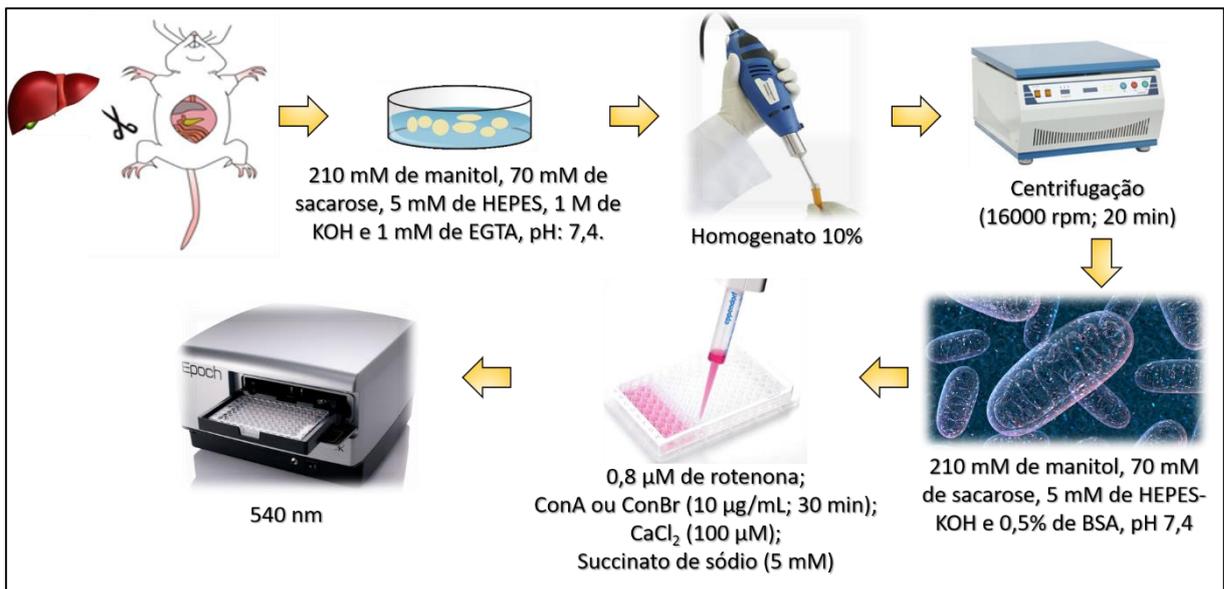
#### **Determinação de proteína mitocondrial**

A dosagem de proteína mitocondrial foi realizada de acordo com o método descrito por Lowry et al (LOWRY et al., 1951) utilizando albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

#### **Ensaio de intumescimento mitocondrial – avaliação do Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (MPTP)**

As mitocôndrias isoladas (0,4 mg de proteína/mL) foram pré-incubadas em uma placa de 96 poços, na presença de 0,8  $\mu$ M de rotenona em um tampão de inchaço contendo 210 mM de manitol, 70 mM de sucrose, 5 mM de Hepes-KOH, (pH 7,4). ConA ou ConBr foram previamente incubadas, 30 min, antes da adição de 100  $\mu$ M de  $\text{CaCl}_2$  (agente lesivo, desencadeante da abertura do MPTP). A permeabilidade mitocondrial (abertura de MPTP) foi quantificada como mudanças na absorbância a 540 nm, na presença de 5 mM de succinato de sódio, em espectrofotômetro de leitura em placa. O  $\text{CaCl}_2$  foi omitido nos ensaios para avaliação de grupos controles, sem agente desencadeante. Protocolo ilustrado na figura 20.

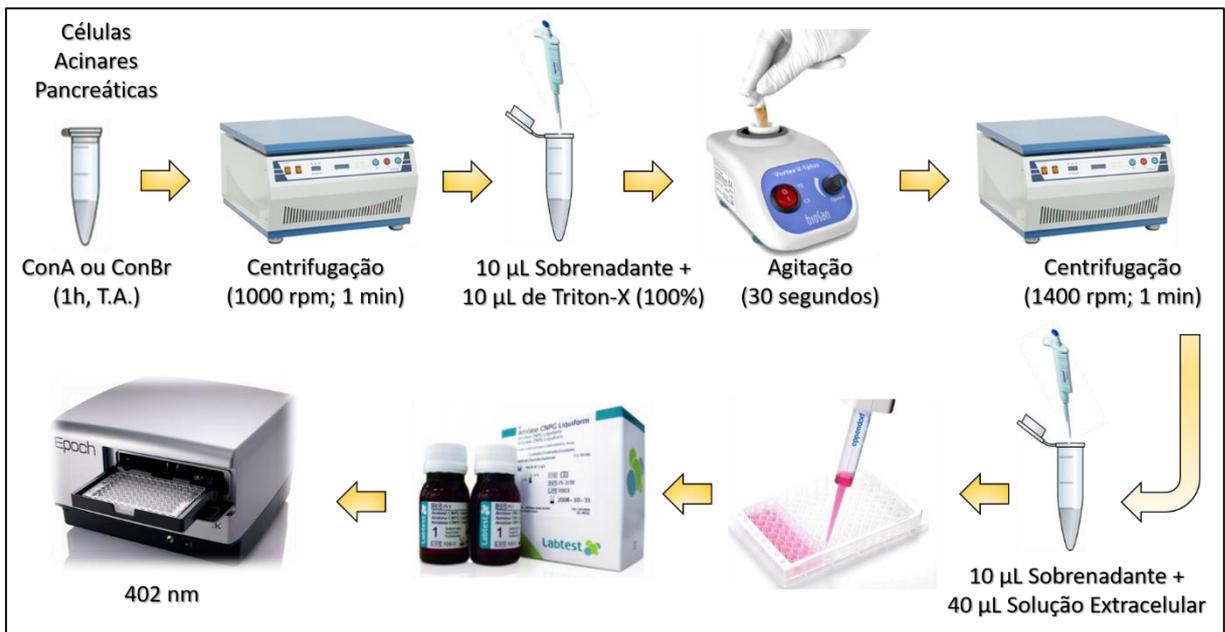
**Figura 20.** Protocolo de avaliação do efeito de ConA e ConBr na regulação do Poro de Transição de Permeabilidade Mitochondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas.



#### 4.8.11. Análise do papel de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar causada por Etanol/POA

As células acinares pancreáticas foram isoladas e divididas em tubos eppendorfs para dar seguimento aos tratamentos, nos quais foram administrados previamente ConA ou ConBr durante 1 h, seguidos da administração de Etanol/POA durante 30 minutos. Para controle algumas células foram tratadas apenas com salina ou Etanol/POA. Após a incubação, as células foram centrifugadas (1000 rpm, 1 minuto), em seguida, foi coletado 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, reservado em outro eppendorf para adição de 10  $\mu\text{L}$  de Triton-X (100%). Essa mistura foi homogeneizada, agitada em vortex, durante 30 segundos, e centrifugada (1400 rpm, 1 minuto), após esse processo, foi coletado 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e adicionado ao mesmo, 40  $\mu\text{L}$  de meio extracelular para dar início ao plaqueamento, utilizando o kit colorimétrico de Amilase CNPG Liquiform (Labtest®, Brasil), seguindo instruções do fabricante. Protocolo ilustrado na figura 21.

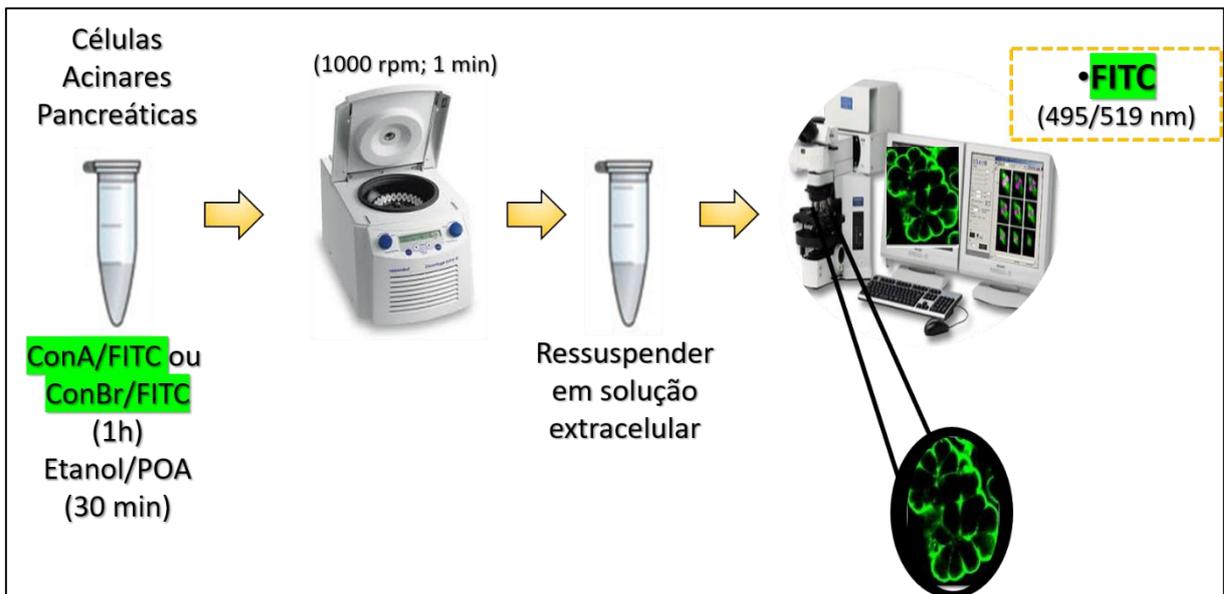
**Figura 21.** Protocolo de avaliação do papel de ConA e ConBr na liberação de amilase intracelular causada por Etanol/POA.



#### 4.8.12. Avaliação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas

ConA e ConBr (10 µg/mL) conjugadas ao marcador fluorescente Isotiocianato de fluoresceína (FITC), foram incubadas, durante 1h, com as células acinares pancreáticas em condições basais (na ausência de Etanol/POA) e em condições patológicas (na presença de Etanol/POA, 100 µM). Após esse processo, as células foram analisadas em microscópio confocal Olympus FluoView – 1000, sob excitação: 450-490 nm e emissão: 515-565 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes para obter um total final de aproximadamente 40 células analisadas, utilizando objetiva de imersão, de aumento 60 X. Protocolo ilustrado na figura 22.

**Figura 22.** Protocolo de análise da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas.

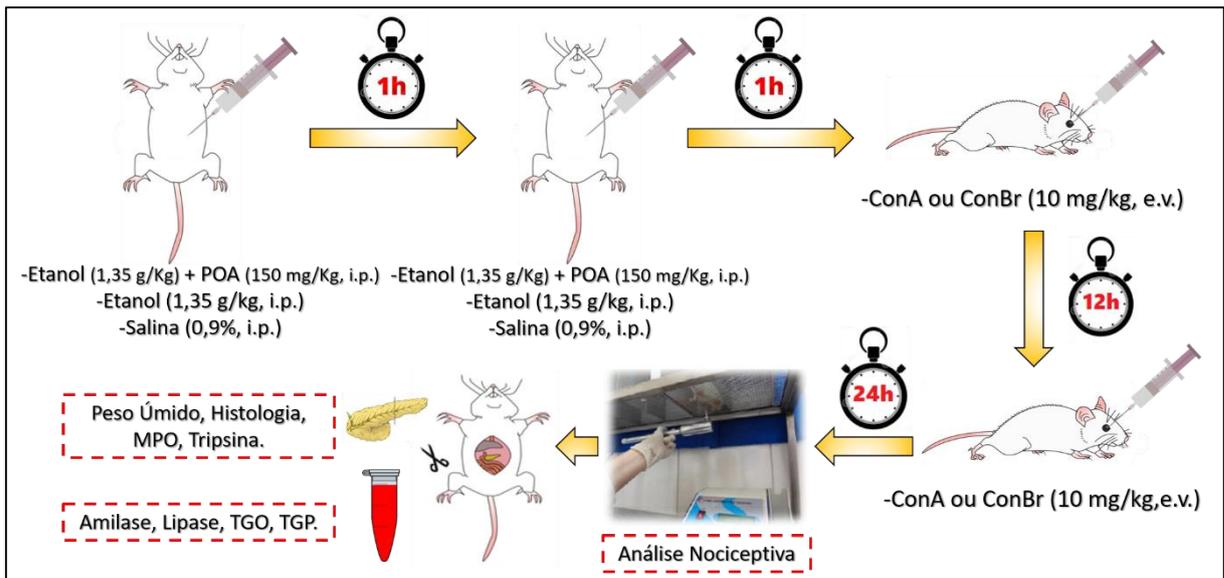


#### 4.9. Estudos *In Vivo*

##### 4.9.1. Indução da pancreatite aguda alcoólica experimental

A pancreatite aguda experimental foi induzida através da administração de ácido palmitoléico (POA) (150 mg/Kg) combinado ao etanol (1,35 g/Kg), (relatado sob a expressão Etanol/POA no decorrer deste trabalho) ambos obtidos na Sigma Aldrich, EUA, na proporção 4:6, por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes com um intervalo de 1h. Os controles receberam etanol (1,35 g/Kg, i.p.) ou salina (0,9%, i.p.) (Huang et al., 2014). Após 1h e 12h da indução, procedeu-se o tratamento com ConA (10 mg/kg) e ConBr (10 mg/kg), de forma endovenosa (e.v.) e 24h após a indução, tempo considerado o pico da inflamação, foi realizada avaliação de dor visceral, através do teste de nocicepção Von-frey, em seguida, os grupos de animais foram eutanasiados, sendo retirados os pâncreas para análise de peso úmido, avaliação histopatológica, análise da atividade de mieloperoxidase (MPO) e tripsina e plasma, para a mensuração dos níveis séricos de amilase, lipase e transaminases hepáticas (transaminase glutâmico-oxalacética; TGO e transaminase glutâmico-pirúvica, TGP). O delineamento desse experimento é ilustrado na figura 23.

**Figura 23.** Protocolo de delineamento da indução de pancreatite aguda alcoólica experimental.



#### 4.9.2. Avaliação de peso úmido pancreático

Esta avaliação correlacionou a porcentagem de peso úmido pancreático ao peso corporal (SEO et al., 2008). Essa proporção (grama de peso pancreático / peso corporal g x 1.000) foi utilizada para avaliar o grau de edema pancreático.

#### 4.9.3. Análise histopatológica do pâncreas

O pâncreas foi embebido em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5  $\mu$ m por meio de um micrótomo e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE). As alterações morfológicas características de pancreatite avaliadas foram edema, infiltração inflamatória e necrose. O grau de edema foi determinado utilizando uma escala de 0 a 3 (0= ausente, 1 = edema interlobular, 2= edema interlobular e moderado edema intralobular, e 3 = edema interlobular e severo edema intralobular). A presença de infiltrado inflamatório também foi analisada, obedecendo a uma grade de 0 a 3 (0= ausente 1= infiltração perivascular escassa, 2= moderada infiltração perivascular e escassa infiltração difusa, e 3 = abundante infiltração difusa). A necrose do parênquima foi analisada pela atribuição de escores de 0 a 3 (0= ausente, 1= menos do que 15% de células pancreáticas envolvidas, 2= de 15 a 35% das células pancreáticas envolvidas, e 3= mais do que 35% de células envolvidas) (Wildi et al., 2007).

#### **4.9.4. Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO)**

Amostras de pâncreas foram coletadas, pesadas e maceradas em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Aldrich, EUA), pH 6,0, na proporção de 500 µL de solução para 50 mg de tecido. Posteriormente, o macerado foi centrifugado (5000 rpm, 7 min, 4°C). Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços em duplicata. Em cada poço, adicionaram-se 200 µL de solução contendo O-dianisidina (Sigma Aldrich, EUA), 5 mg diluída em 3 mL tampão fosfato. A essa solução foram ainda adicionados 15 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Aldrich, EUA) a 1%. Determinou-se a absorbância em leitor de absorbância (BMG Labtech, Espanha) no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada leitura no tempo zero e 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C (BRADLEY et al., 1982).

#### **4.9.5. Dosagens de amilase e lipase séricas**

A determinação da amilase e lipase séricas foram feitas através de testes colorimétricos (InterKit® e Bioclin®, Brasil, respectivamente), onde foram seguidas as instruções do fabricante.

#### **4.9.6. Atividade de tripsina pancreática**

Os pâncreas obtidos dos animais Swiss foram homogeneizados, em gelo, por um homogeneizador motorizado em tampão de homogeneização de tecidos pH 6,5, contendo 5 mM de MOPS, 250 mM de sacarose e 1 mM de sulfato de magnésio. Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 1500 g por 5 min, e 10 µl de cada sobrenadante foram adicionados a uma microplaca, contendo o substrato peptídico Boc-Gln-Ala-Arg-MCA (Peptídeo, Osaka, Japão) dissolvido em 190 µl de tampão de ensaio pH 8,0 : 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,1 mg / ml de albumina de soro bovino. A atividade de tripsina foi medida por ensaio fluorimétrico utilizando um Fluorímetro BMG FLUOstar OPTIMA (Milton Keynes, UK). As amostras foram excitadas a 380 nm e a emissão coletada a 440 nm (NATHAN et al., 2005; KAWABATA et al., 1988). Uma curva padrão foi gerada usando tripsina humana purificada. A atividade da tripsina foi expressa como pmol / mg de proteína.

#### 4.9.7. Dosagens de transaminases hepáticas

A determinação da TGO e TGP séricas foram feitas através de testes bioquímicos colorimétricos (Labtest®, Brasil), onde foram seguidas as instruções do fabricante.

#### 4.9.8. Avaliação de dor visceral

A hiperalgesia visceral foi mensurada através da avaliação da resposta a um estímulo mecânico abdominal através de um analgesímetro digital (Insight Equipamentos Científicos, Brasil), que é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável 0,5 mm<sup>2</sup> que estimula diretamente o abdômen do animal (WINSTON *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2013). Para início do experimento, os animais tiveram sua região abdominal depilada e as áreas determinadas para estimulação receberam marcação com uma linha que atravessa o esterno até uma região a meio caminho entre as pernas dianteiras e traseiras. Aos animais foram postos nas cabines de observação 15 min antes da realização do teste para a aclimatação. O experimentador, cego à divisão dos grupos e tratamentos, aplicou a ponteira em ângulo reto na região demarcada do abdômen do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque resposta de retirada. Foram consideradas respostas de retirada: retração do abdômen, lambida ou contração abdominal imediatamente após a aplicação da ponteira e salto (LAIRD *et al.*, 2001). O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica fica registrada no aparelho. Foram realizadas três aplicações distintas para cada animal, no tempo 0h (antes da indução de pancreatite, tempo basal) e no tempo 24h após a indução da pancreatite. Foi calculada a média das três aplicações, determinando-se o limiar nociceptivo (força, em g). Quanto menor o limiar nociceptivo, mais sensibilidade é observada.

#### 4.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (Erro Padrão da Média) e média  $\pm$  E.P.M para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal. A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, baseando-se na continuidade das

variáveis em análise, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ , sendo o n mínimo de 8 e máximo de 12. Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o Software GraphPad Prism®, versão 5.0.

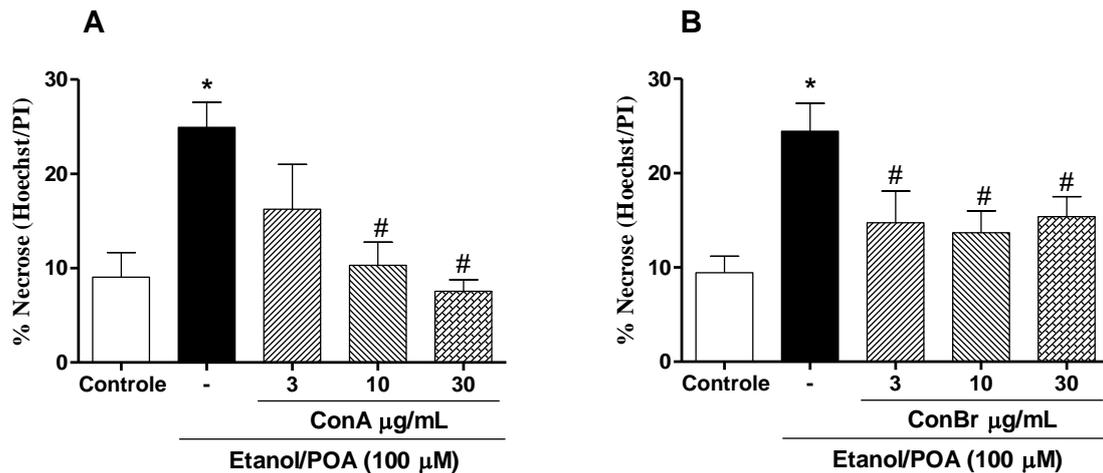
## 5. RESULTADOS

### RESULTADOS EM CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS MURINAS

#### 5.1. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas

Etanol/POA causou necrose significativa às células ( $25,38 \pm 1,76$  %), comparado ao grupo controle ( $9,16 \pm 1,28$  %), (66% de aumento de necrose). Na análise da curva dose-resposta, ConA ( $3\mu\text{g/mL}$ :  $16,27 \pm 4,74$  %;  $10\mu\text{g/mL}$ :  $10,30 \pm 2,47$  %;  $30\mu\text{g/mL}$ :  $7,56 \pm 1,21$  %) e ConBr ( $3\mu\text{g/mL}$ :  $14,74 \pm 3,36$  %;  $10\mu\text{g/mL}$ :  $13,70 \pm 2,31$  %;  $30\mu\text{g/mL}$ :  $15,40 \pm 2,12$  %) protegeram ( $p < 0,05$ ) as células acinares pancreáticas contra a necrose induzida por Etanol/POA em praticamente todas as doses avaliadas, não havendo prevenção apenas com a dose de  $3\mu\text{g/mL}$  de ConA. A dose de  $10\mu\text{g/mL}$  foi escolhida para as análises subsequentes, por ser a dose de menor concentração com melhor efeito em ambas as lectinas (Porcentagem de inibição de necrose vs Etanol/POA: ConA: 59% e ConBr: 46,02%) (Figura 24).

**Figura 24.** Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas.

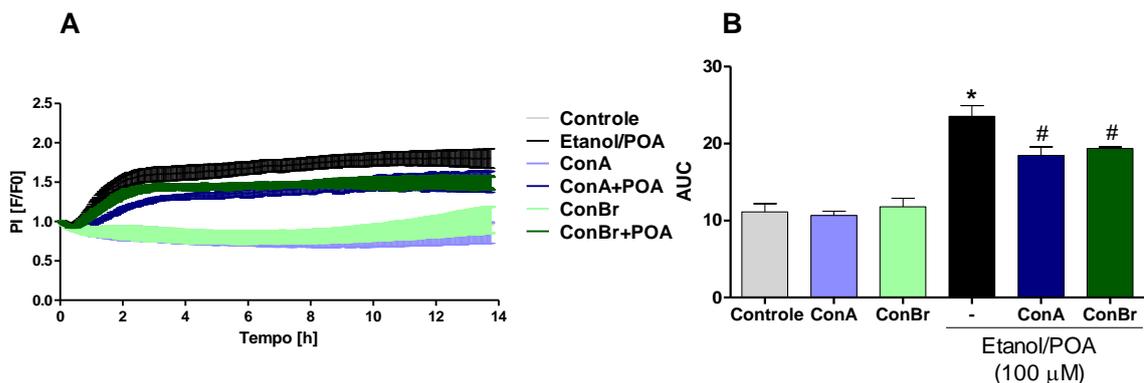


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de células obtidas em microscópio confocal FluoView<sup>TM</sup> 1000 – Olympus, de 3 experimentos independentes. A porcentagem (%) de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (PI) nas análises de ConA(A) e ConBr (B). \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

## 5.2. Confirmação do efeito antinecrótico de ConA e ConBr em análise *overnight*

Os resultados de área sob a curva da análise de confirmação do efeito antinecrótico de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas estimuladas por ácido palmítico, durante 14 horas de análise *overnight*, mostraram que Etanol/POA ( $25,53 \pm 1,40$  AUC) causou necrose significativa às células acinares pancreáticas, quando comparado com o grupo controle ( $11,14 \pm 1,03$  AUC) (56,36% de aumento de necrose). O tratamento com as lectinas preveniu, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a necrose causada por Etanol/POA (ConA:  $18,45 \pm 1,12$  %, com 27,73% de inibição de necrose e ConBr:  $19,37 \pm 0,18$ , com 24,12% de inibição de necrose). A administração de ConA ou ConBr na ausência do agente lesivo não causou qualquer dano às células acinares pancreáticas ( $10,66 \pm 0,56$  e  $11,78 \pm 1,10$  AUC, respectivamente), apresentando resultados semelhantes ao grupo controle (Figura 25).

**Figura 25.** Confirmação do efeito antinecrótico de ConA e ConBr em análise *overnight*.



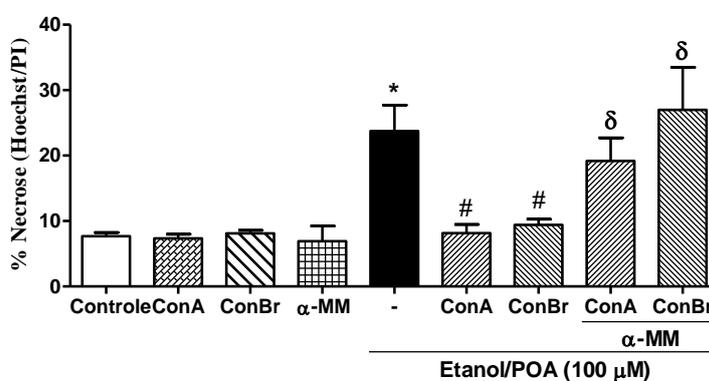
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de iodeto de propídeo (PI) (A) obtido em fluorímetro, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

## 5.3. Avaliação da participação do domínio lectínico no efeito antinecrótico de ConA e ConBr

Nesta análise experimental, os grupos de células tratadas com as lectinas pré-incubadas com seu açúcar ligante, alfa-metil manosídeo ( $\alpha$ -MM), apresentaram reversão significativa do potencial anti-necrótico anteriormente observado, (ConA/ $\alpha$ -MM:  $19,19 \pm 3,54$  % vs ConA:  $8,15 \pm 1,32$  %) e (ConBr/ $\alpha$ -MM:  $26,99 \pm 6,47$  % vs ConBr:  $9,43 \pm 0,86$  %). Etanol/POA ( $23,74 \pm 3,99$  %), como esperado, causou necrose significativa às células acinares pancreáticas,

comparado ao controle ( $7,67 \pm 0,57$  %). A administração de  $\alpha$ -MM sozinho, não causou morte celular ( $6,92 \pm 2,33$  %), comparado com o grupo controle, da mesma forma que ConA e ConBr ( $7,34 \pm 0,62$ % e  $8,11 \pm 0,45$  %; respectivamente), quando administradas na ausência de Etanol/POA, as quais mostraram resultados semelhantes ao grupo controle, demonstrando que as lectinas estudadas não causam qualquer dano às células acinares, quando administradas na ausência do agente lesivo (Figura 26).

**Figura 26.** Avaliação da participação do domínio lectínico no efeito antinecrótico de ConA e ConBr

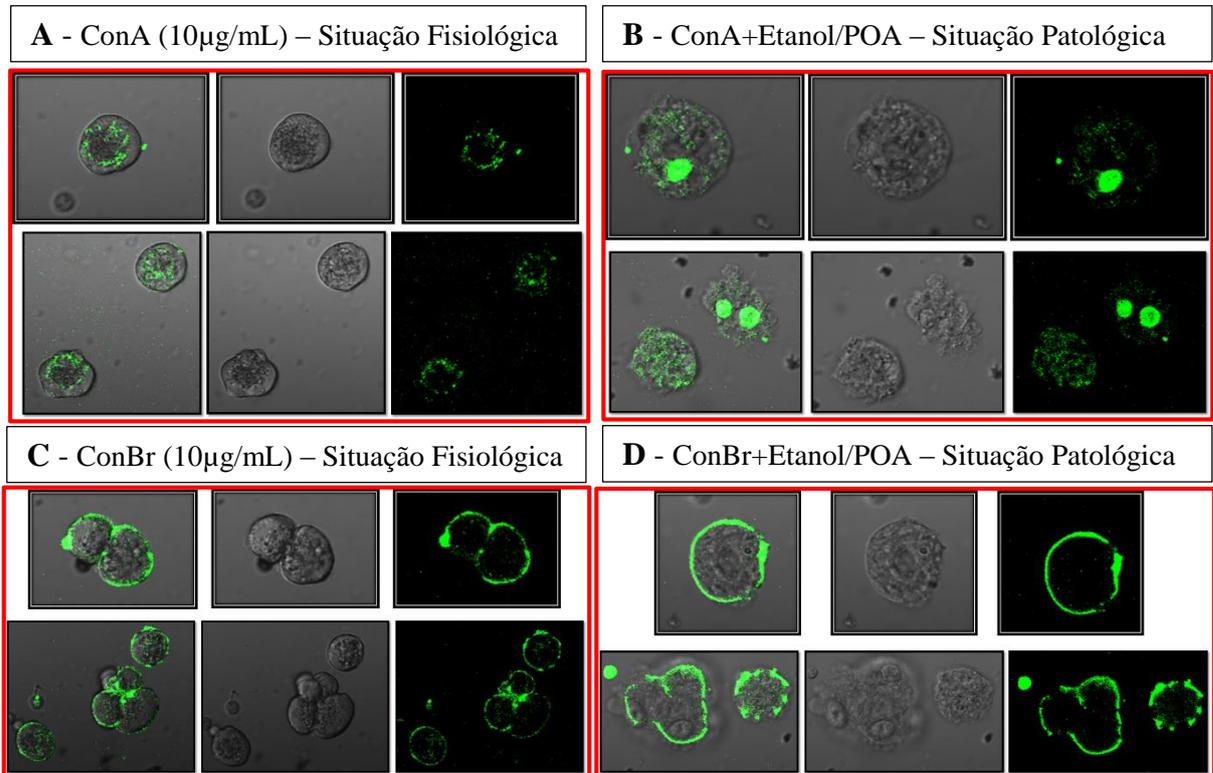


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de células obtidas em microscópio confocal FluoView<sup>TM</sup> 1000 – Olympus, de 3 experimentos independentes. A porcentagem (%) de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (PI). \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA;  $\delta p < 0,05$  vs grupos ConA+Etanol/POA e ConBr+Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

#### 5.4. Observação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas

Como pode ser observado na figura 27, ConA em situações basais, apresenta-se internalizada no citoplasma celular, porém quando em uma situação de lesão celular, após administração de Etanol/POA, parece haver uma mudança de localização de ConA do citoplasma para o núcleo da célula acinar. ConBr apresenta localização predominante na membrana plasmática da célula acinar tanto em condições basais quanto patológicas, sob estímulo lesivo do Etanol/POA.

**Figura 27.** Observação da interação de ConA e ConBr fluoresceinadas com as células acinares pancreáticas.

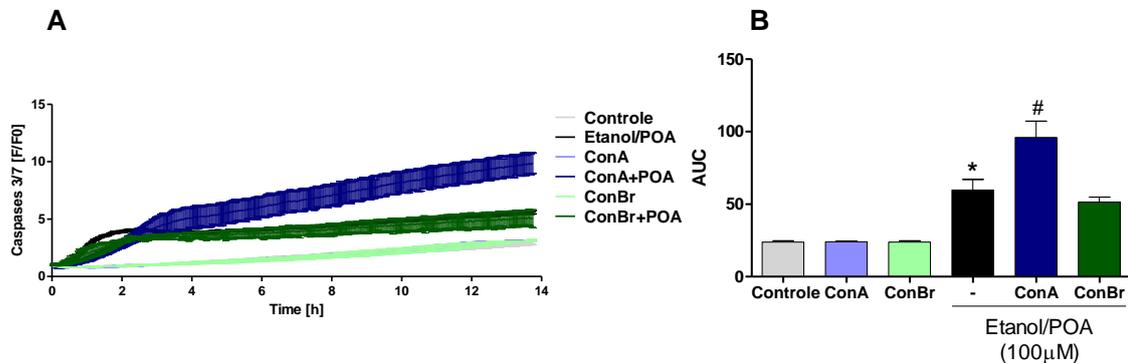


Imagens mostrando as lectinas fluoresceinadas interagindo com a célula acinar pancreática sob situações fisiológicas (A e C), na ausência de qualquer agente lesivo, e sob condições patológicas (B, D), quando houve pré-tratamento (1h) com as lectinas, seguido da administração (30 min) com Etanol/POA. Imagens obtidas em microscópio confocal Olympus Fluoview 1000 (excitação: 450-490; emissão: 515-565 nm).

### 5.5. Ensaio de morte celular apoptótica em células acinares pancreáticas: efeito de ConA e ConBr

Nessa análise experimental, apenas ConA ( $96,04 \pm 11,23$  AUC) foi capaz de promover apoptose ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo Etanol/POA ( $59,76 \pm 7,29$  AUC). ConBr ( $51,42 \pm 3,54$  AUC) não alterou o perfil de morte celular apoptótica, em relação ao Etanol/POA (Figura 28). ConA e ConBr ( $24,06 \pm 0,53$  e  $23,79 \pm 0,98$  AUC, respectivamente), administradas na ausência do agente lesivo, não promoveram qualquer alteração nos perfis de viabilidade celular, mantendo seus valores em níveis basais, semelhantes ao controle ( $23,83 \pm 0,93$  AUC).

**Figura 28.** Ensaio de morte celular apoptótica em células acinares pancreáticas: efeito de ConA e ConBr.

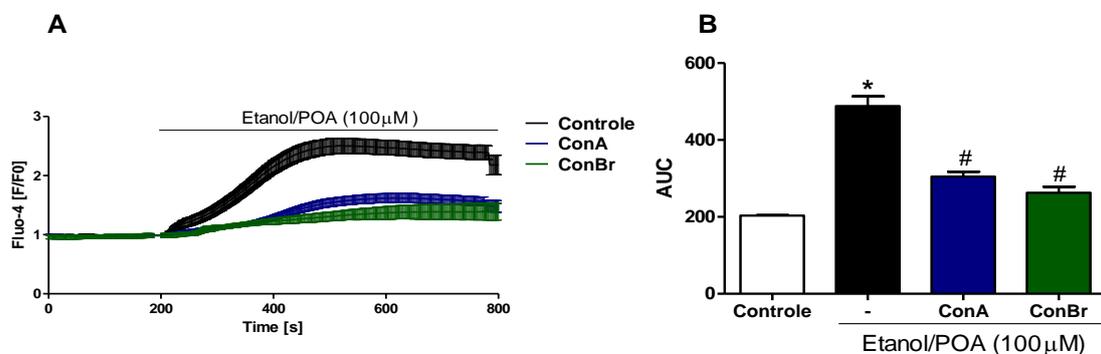


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Caspases 3/7 (A) obtido em fluorímetro, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.6. Papel de ConA e ConBr na proteção contra o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA

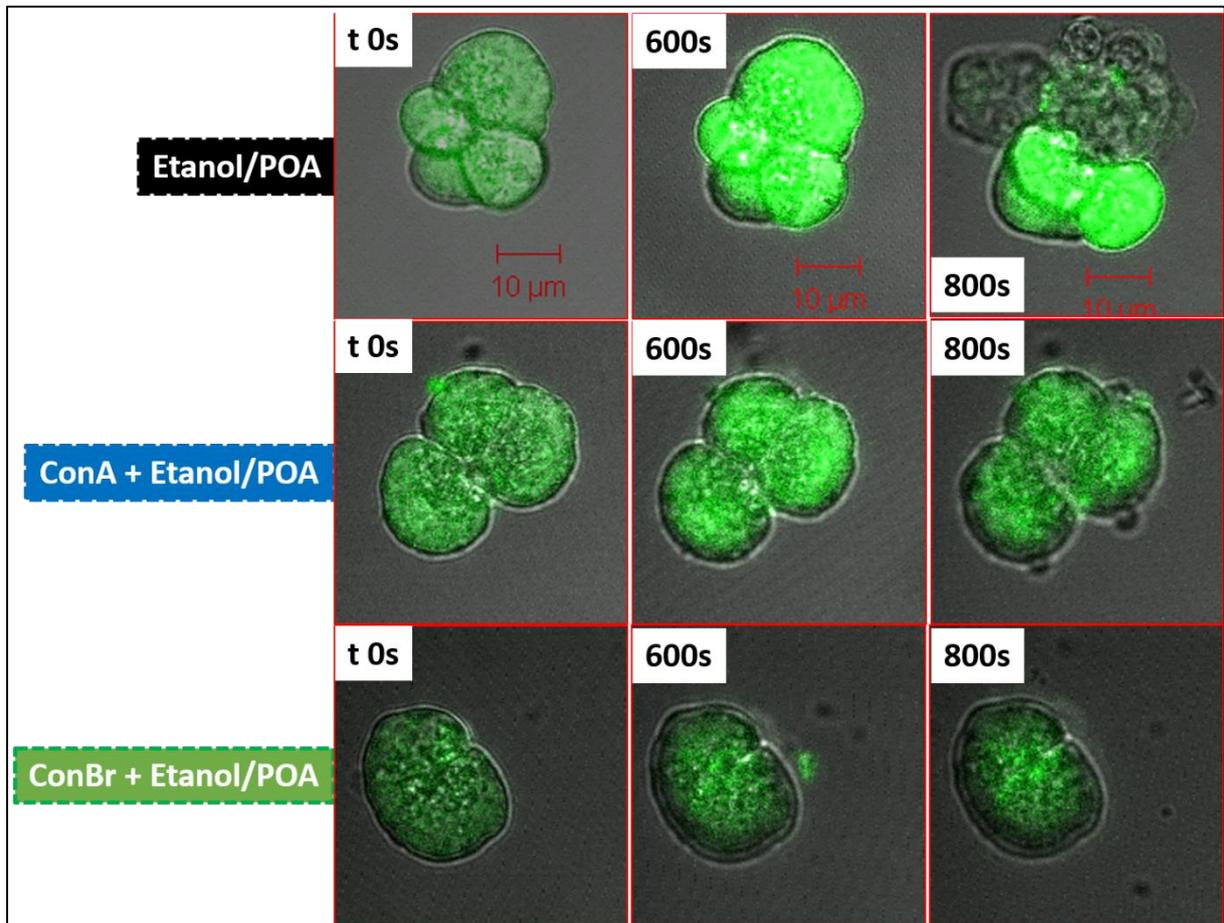
ConA e ConBr quando pré-administradas e incubadas durante 1h às células acinares foram capazes de prevenir o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  ( $304,70 \pm 12,79$  e  $262,60 \pm 15,42$  AUC, respectivamente) promovido por Etanol/POA ( $488,30 \pm 25,07$  AUC). O grupo controle, como esperado, manteve o  $[Ca^{2+}]_c$  em níveis basais ( $203,30 \pm 1,21$  AUC). Resultados mostrados no gráfico de linha e de coluna da Figura 29 e na representação de imagens da figura 29.1.

**Figura 29.** Papel de ConA e ConBr contra o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido por Etanol/POA.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEISS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**Figura 29.1.** Imagens de microscopia confocal do papel de ConA e ConBr contra o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido por Etanol/POA.



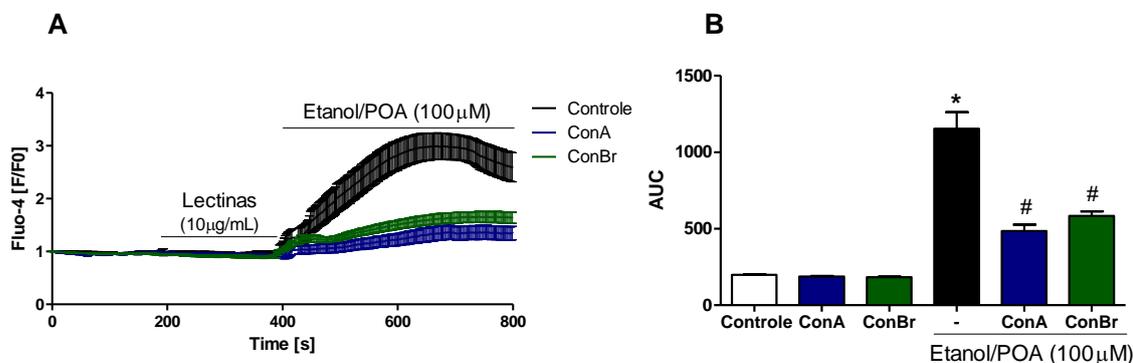
Imagens obtidas de microscópio confocal Zeiss LSM-510, aumento de 600x. Análise da fluorescência relativa de células acinares pancreáticas incubadas com Fluo 4-AM. Análise de tempo basal (t 0s), após 600 segundos (t 600s) de análise e ao final da análise com 800 segundos (t 800s) de grupos de células sob estímulo de Etanol/POA e tratamento com ConA e ConBr.

### 5.7. Análise da capacidade de ConA e ConBr causarem aumento de $[Ca^{2+}]_c$ *per se*

Na tentativa de observar se ConA ou ConBr estariam alterando os padrões de  $[Ca^{2+}]_c$  basal da célula acinar, seguiu-se o protocolo de administração dessas lectinas na ausência do agente lesivo Etanol/POA. Os resultados mostraram que não houve alteração nos padrões de concentração de cálcio, após a administração de nenhuma das lectinas (ConA:  $188,40 \pm 2,95$  ConBr:  $183,50 \pm 3,66$  AUC), comparado ao grupo controle ( $199,20 \pm 199,2$  AUC). Resultados dessa mesma análise mostraram que ambas as lectinas (ConA:  $485,60 \pm 40,66$  e ConBr:  $584,40 \pm 30,31$  AUC), mesmo quando administradas imediatamente antes de Etanol/POA ( $1154 \pm 107,20$  AUC), ou seja, sem a incubação prévia durante 1h realizada no experimento

anteriormente descrito acima, preveniram significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado por este agente lesivo (Figura 30).

**Figura 30.** Análise da capacidade de ConA e ConBr causarem aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  *per se*.



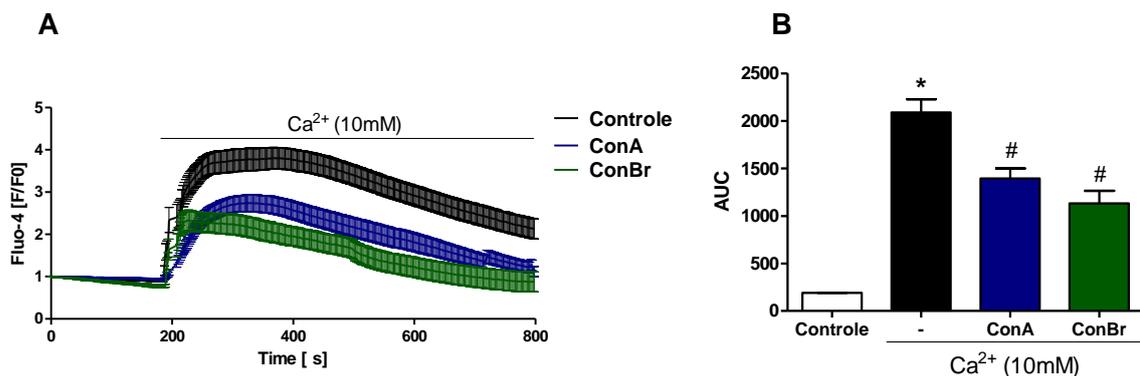
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEISS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.8. Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por estoque (SOCs) em células acinares pancreáticas

A partir do resultado anterior, onde as lectinas demonstraram prevenir o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido por Etanol/POA, partimos para uma investigação no intuito de descobrir por qual mecanismo essas moléculas estariam promovendo esse efeito protetor. Para tanto, como uma forma de investigação da participação dos canais de cálcio operados por estoque, as células foram colocadas em condições de solução de manutenção extracelular sem cálcio, sendo previamente incubadas com tapsigargina, um esvaziador de cálcio do retículo endoplasmático, nessas condições a administração de cálcio (10 mM) causou aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  ( $2090,0 \pm 139,5$  AUC), comparado ao controle ( $190,3 \pm 2,8$  AUC). O pré-tratamento de ConA ou ConBr preveniram de forma significativa esse efeito ( $1395,0 \pm 104,6$  e  $1132,0 \pm 131,2$  AUC, respectivamente), sugerindo que essas moléculas podem estar prevenindo o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  por estarem impedindo o cálcio externo de entrar na célula acinar através dos canais de cálcio operados por armazenamento (Figura 31). Para confirmar esse efeito, em outra análise experimental, as células foram pré-incubadas com as lectinas (1h), e em seguida com Etanol/POA (30 min), o qual age nos receptores de  $IP_3$  do retículo endoplasmático, liberando cálcio de forma sustentada e ativando a entrada de cálcio operada por armazenamento. Nessa

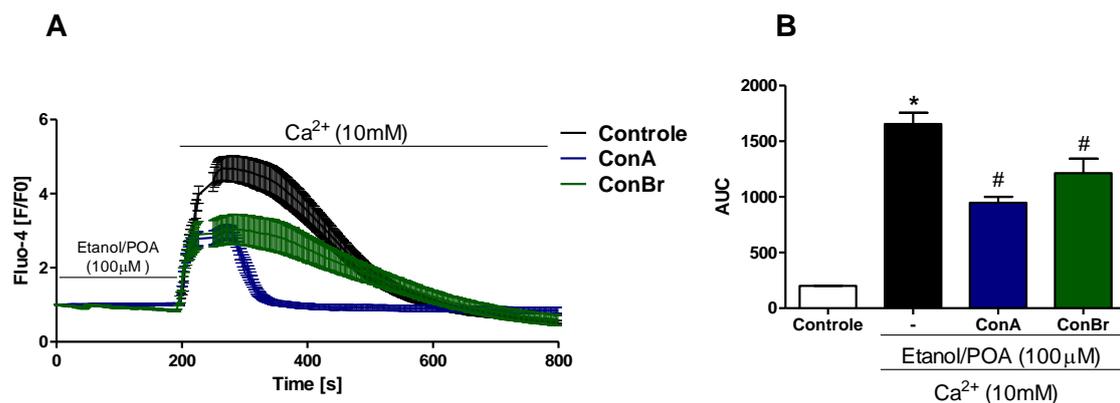
situação, quando o cálcio (10 mM) foi administrado ao grupo Etanol/POA, a  $[Ca^{2+}]_c$  aumentou significativamente ( $1656,0 \pm 99,9$  AUC;  $p < 0,05$ ), comparado ao controle ( $200,7 \pm 1,6$  AUC). ConA e ConBr, como pode ser observado na figura 32, também foram capazes de prevenir esse efeito ( $947,7 \pm 53,2$  e  $1215,0 \pm 129,4$  AUC, respectivamente).

**Figura 31.** Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por estoque (SOCs) em células acinares pancreáticas – incubação prévia de TPG.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEIS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**Figura 32.** Análise da participação de ConA e ConBr nos canais de cálcio operados por estoque (SOCs) em células acinares pancreáticas – incubação prévia de Etanol/POA.

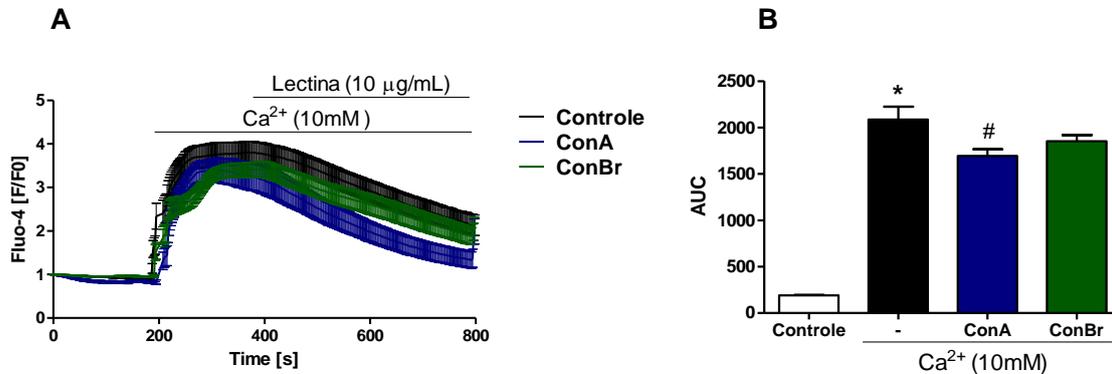


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEIS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.9. Verificação da capacidade de ConA e ConBr reverter o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ em células acinares pancreáticas

A partir da demonstração de proteção das lectinas contra o aumento de cálcio citosólico promovido por Etanol/POA observado nos resultados anteriores, como forma preventiva, uma vez que nessas análises as lectinas eram previamente incubadas antes da administração do agente lesivo; surgiu o questionamento se ConA e ConBr também seriam capazes de reverter esse aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , após já ter iniciado a entrada de cálcio operada por armazenamento. Os resultados dessa análise mostraram que apenas ConA ( $1693,0 \pm 72,43$  AUC) foi capaz de reverter, de forma significativa, o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado pela administração de cálcio (10 mM) ao meio extracelular ( $2086,0 \pm 139,0$  AUC). A administração de ConBr não reverteu esse efeito ( $1850,0 \pm 66,7$  AUC) (Figura 33). O grupo controle, como esperado, manteve os valores de  $[Ca^{2+}]_c$  dentro de níveis basais ( $190,3 \pm 2,8$  AUC).

**Figura 33.** Capacidade de ConA e ConBr reverter o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  em células acinares pancreáticas.



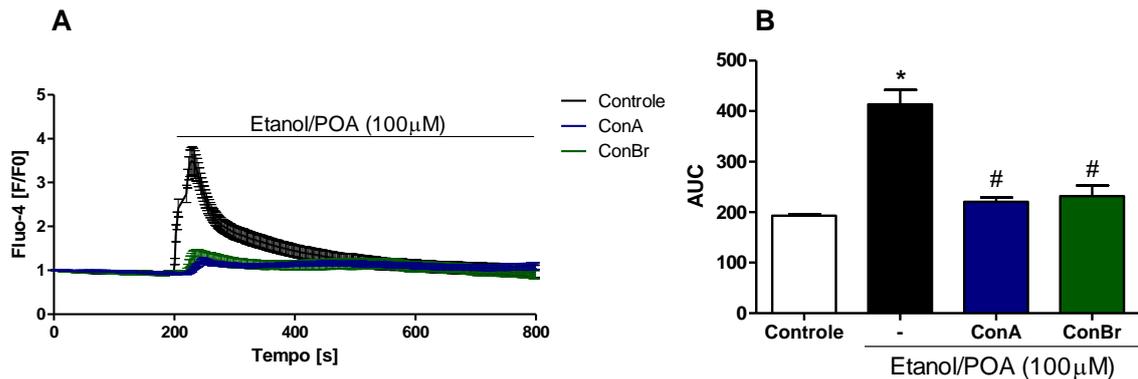
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEISS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.10. Análise da participação de ConA e ConBr no aumento de $[Ca^{2+}]_c$ promovido por Etanol/POA em condições livres de cálcio: possível interação com IP<sub>3</sub>R

Nessa análise experimental, a administração de Etanol/POA em condição de ausência de cálcio no meio extracelular promoveu, nas células acinares, aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  ( $413,4 \pm$

28,3 AUC), comparado ao controle ( $193,3 \pm 2,8$  AUC). ConA e ConBr preveniram de forma significativa esse efeito ( $220,8 \pm 08,0$  e  $232,0 \pm 20,5$  AUC, respectivamente) (Figura 34).

**Figura 34.** Participação de ConA e ConBr no aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido por Etanol/POA em condições livres de cálcio: possível interação com  $IP_3R$ .

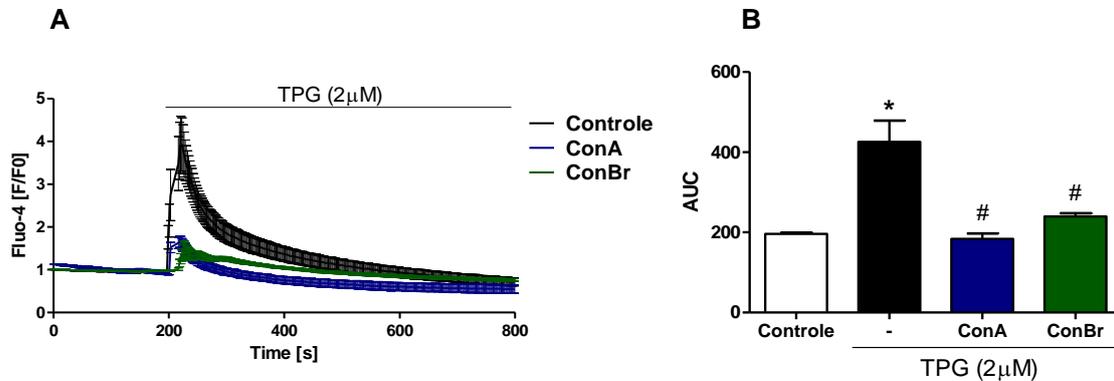


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEISS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.11. Papel de ConA e ConBr na liberação de cálcio através do bloqueio da bomba SERCA promovido por tapsigargina

Como pode ser observado na figura 35, a administração de tapsigargina (TPG) promoveu aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  ( $426,0 \pm 52,77$  AUC), comparado ao controle ( $196,5 \pm 2,72$  AUC). O pré-tratamento de ConA ( $183,70 \pm 14,27$  AUC) e ConBr ( $239,50 \pm 7,99$  AUC) preveniu significativamente o pico de aumento de cálcio.

**Figura 35.** Papel de ConA e ConBr na liberação de cálcio através do bloqueio da bomba SERCA promovido por tapsigargina.

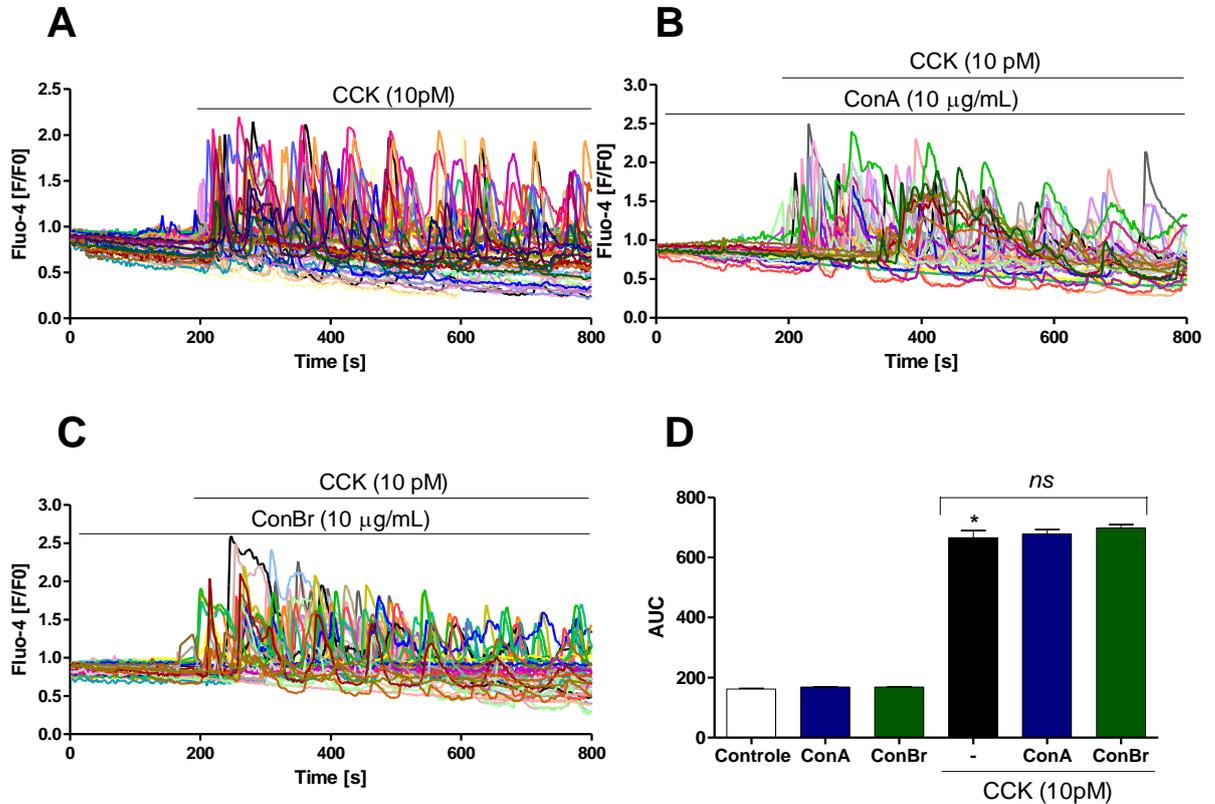


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F<sub>0</sub>) de Fluo-4AM (A) obtido em microscópio confocal ZEIS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.12. Efeito de ConA e ConBr nas alterações de $[Ca^{2+}]_c$ causadas por concentrações fisiológicas e patológicas de CCK

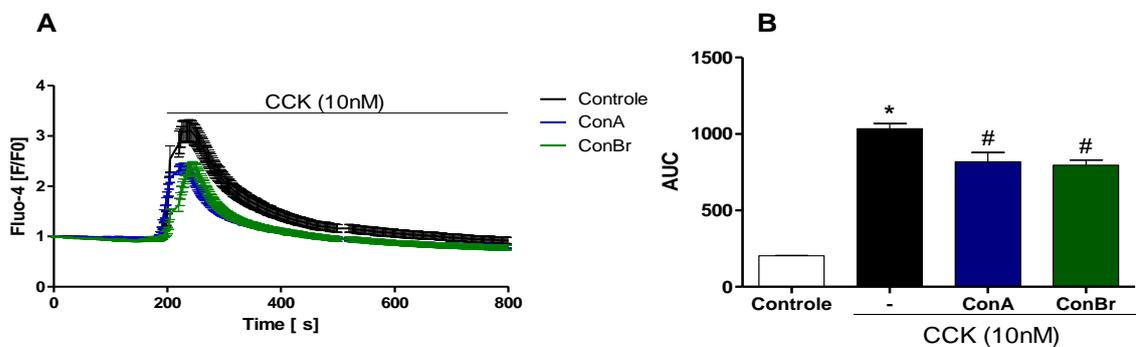
Com o intuito de avaliar se as lectinas poderiam interferir nos padrões de concentração fisiológica de cálcio nas células acinares, foi utilizado colecistocinina (CCK), um hormônio encontrado naturalmente na tecido pancreático, o qual em concentrações fisiológicas causa aumento de cálcio oscilatório necessário para a exocitose dos grânulos de zimogênios para atuarem no processo de digestão dos alimentos. Em contrapartida, em concentrações patológicas esse mesmo agente causa aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  de forma sustentada e lesão de células acinares pancreáticas. ConA e ConBr ( $678,20 \pm 15,78$  e  $698,50 \pm 11,30$  AUC, respectivamente) não alteraram o padrão de aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado por CCK em concentração fisiológica (10 pM) ( $665,80 \pm 23,55$  AUC), além disso, as lectinas administradas na ausência de estímulo CCK mantiveram os valores de  $[Ca^{2+}]_c$  semelhantes ao controle (ConA:  $168,40 \pm 1,45$ ; ConBr:  $168,01 \pm 1,96$ ; Controle:  $162,10 \pm 2,53$ ) como pode ser observado na figura 36. Contudo, ambas as lectinas (ConA:  $817,70 \pm 61,45$  e ConBr:  $796,20 \pm 33,61$  AUC) protegeram as células acinares contra o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  sustentado e tóxico causado pela administração de concentração patológica de CCK (10 nM) (CCK:  $1035 \pm 33,93$  AUC vs Controle:  $203,50 \pm 2,01$ ) (Figura 37).

**Figura 36.** Efeito de ConA e ConBr nas alterações de  $[Ca^{2+}]_c$  causadas por concentração fisiológica de CCK (10 pM).



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (D) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A-Controle+CCK; B-ConA+CCK; C-ConBr+CCK) obtido em microscópio confocal ZEISS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; ns: não significativo vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**Figura 37.** Efeito de ConA e ConBr nas alterações de  $[Ca^{2+}]_c$  causadas por concentração patológica de CCK (10 nM)



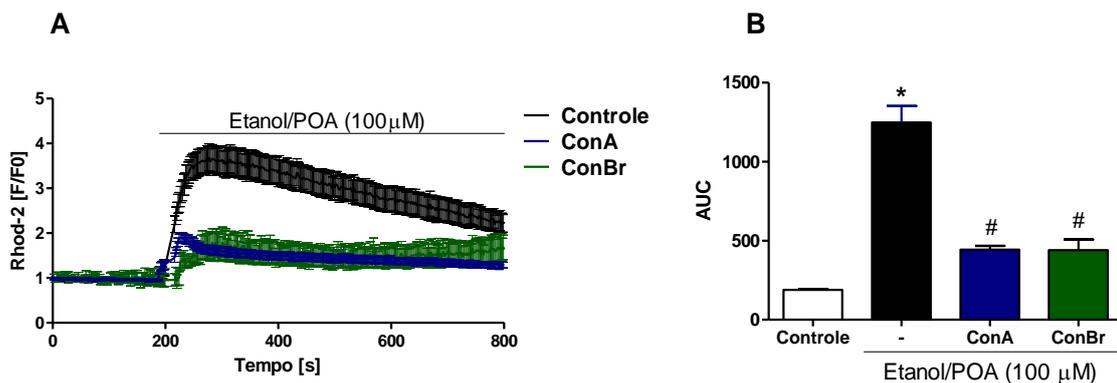
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Fluo-4AM (A) obtido em

microscópio confocal ZEIS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo CCK. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.13. Avaliação do efeito de ConA e ConBr na prevenção do aumento de $[Ca^{2+}]_{mit}$ em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA

ConA ( $444,80 \pm 22,86$  AUC) e ConBr ( $440,30 \pm 67,82$  AUC) preveniram, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), o aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  causado por Etanol/POA ( $1248 \pm 105,20$  AUC), como pode ser observado na figura 38. O grupo controle, como esperado, manteve os valores de concentração de cálcio mitocondrial em níveis basais ( $189,40 \pm 3,79$  AUC).

**Figura 38.** Efeito de ConA e ConBr na prevenção do aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA.



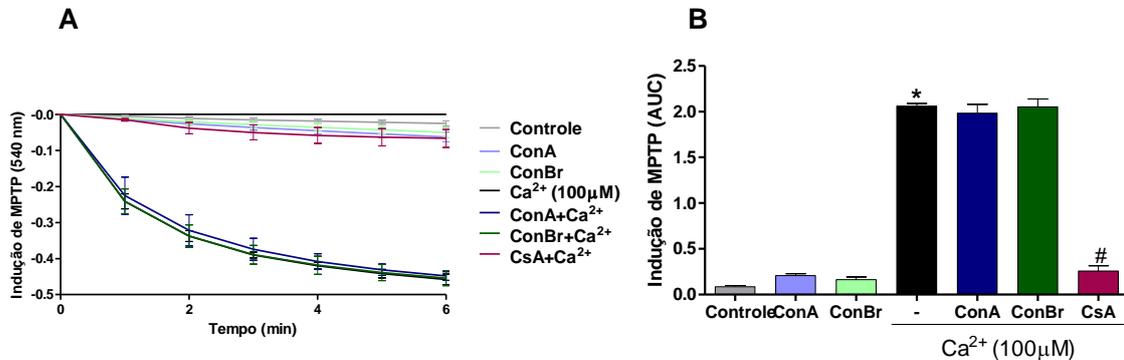
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado de fluorescência relativa (F/F0) de Rhod-2AM (A) obtido em microscópio confocal ZEIS-LSM 510, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.14. Análise do efeito de ConA e ConBr na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas

Como pode ser observado na figura 39, a administração de cálcio ( $100 \mu M$ ) em mitocôndrias isoladas causou a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial ( $2,06 \pm 0,02$  AUC), comparado ao grupo controle ( $0,08 \pm 0,01$  AUC). As lectinas não foram capazes de prevenir esse efeito (ConA:  $1,98 \pm 0,09$  e ConBr:  $2,05 \pm 0,08$  AUC), porém quando administradas na ausência de cálcio não demonstraram qualquer ação no poro, apresentando resultados semelhantes ao controle (ConA:  $0,20 \pm 0,02$  e ConBr:  $0,16 \pm 0,02$  AUC).

Ciclosporina A ( $0,25 \pm 0,05$  AUC), utilizada como controle nessa análise experimental, conseguiu prevenir a abertura do MPTP causada por cálcio.

**Figura 39.** Efeito de ConA e ConBr na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) em mitocôndrias isoladas.

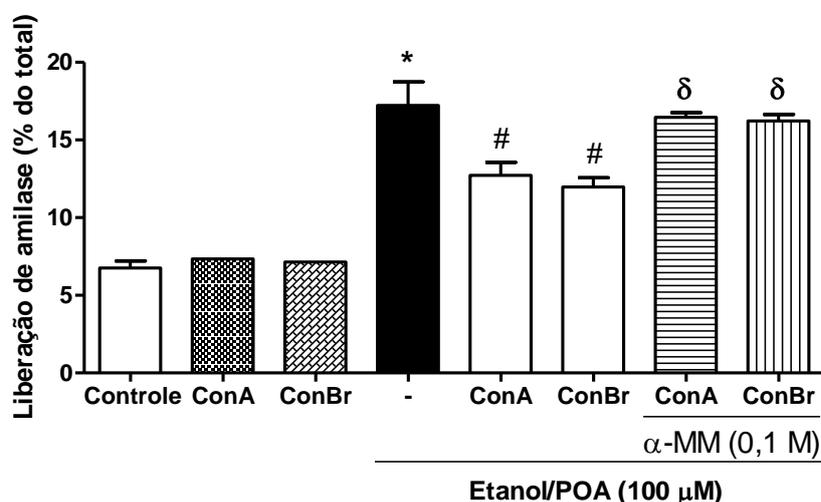


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da área sob a curva (AUC) (B) do resultado da absorbância (540nm) (A) obtido em leitor de microplaca, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Ca<sup>2+</sup> (100 μM). One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.15. Efeito de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA: envolvimento do domínio lectínico

A administração de Etanol/POA ( $17,22 \pm 1,52$  %) causou aumento da liberação de amilase nas células acinares pancreáticas isoladas, quando comparado ao grupo controle ( $6,75 \pm 0,44$  %), sendo esse efeito prevenido pelo pré-tratamento com ConA ( $12,73 \pm 0,83$  %) e ConBr ( $11,98 \pm 0,60$  %). Quando o domínio lectínico de ConA e ConBr foram bloqueados pela incubação prévia com seu açúcar ligante alfa-metil-manosídeo ( $\alpha$ -MM), o efeito protetor de ambas as lectinas contra o aumento da liberação de amilase causada por Etanol/POA foi revertido (ConA:  $16,46 \pm 0,30$  e ConBr:  $16,23 \pm 0,41$  %). A administração de ConA e ConBr ( $7,33 \pm 0,99$  e  $7,13 \pm 0,70$  %, respectivamente) na ausência do agente lesivo não causou qualquer mudança nos padrões de liberação de amilase intra-acinar, quando comparado ao grupo controle (Figura 40).

**Figura 40.** Efeito de ConA e ConBr na liberação de amilase intra-acinar em células acinares pancreáticas estimuladas por Etanol/POA: envolvimento do domínio lectínico.



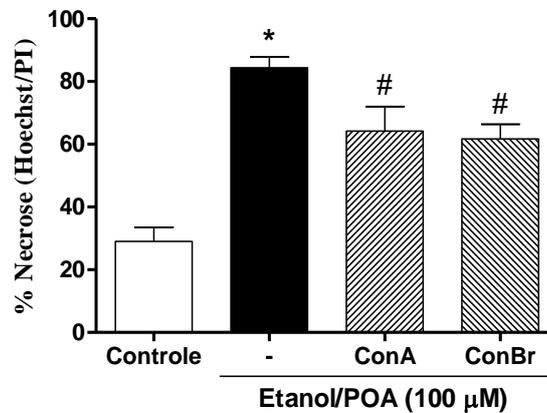
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da porcentagem de liberação de amilase de células acinares pancreáticas, de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA;  $\delta p < 0,05$  vs grupos ConA+Etanol/POA e ConBr+Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

## **RESULTADOS EM CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS HUMANAS**

### **5.16. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas humanas**

Com o intuito de verificar se achados encontrados em células murinas eram reproduzidos em células humanas, resolvemos iniciar essa análise translacional. Os resultados encontrados mostraram que ConA ( $64,21 \pm 7,82$  %, apresentando porcentagem de inibição de 23,89%, comparado ao Etanol/POA) e ConBr ( $61,70 \pm 4,70$  %, apresentando porcentagem de inibição de 26,86%, comparado ao Etanol/POA) também são capazes de prevenir a necrose de células acinares pancreáticas humanas sob estímulo lesivo de Etanol/POA ( $84,37 \pm 3,45$  %), o qual causa um aumento na porcentagem de necrose de 65,59% em relação ao controle. Valores de controle: ( $29,03 \pm 4,47$  %) (Figura 41).

**Figura 41.** Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por Etanol/POA em células acinares pancreáticas humanas.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da contagem de células obtidas em microscópio confocal FluoView<sup>TM</sup> 1000 – Olympus, de 3 experimentos independentes. A porcentagem (%) de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (PI). \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

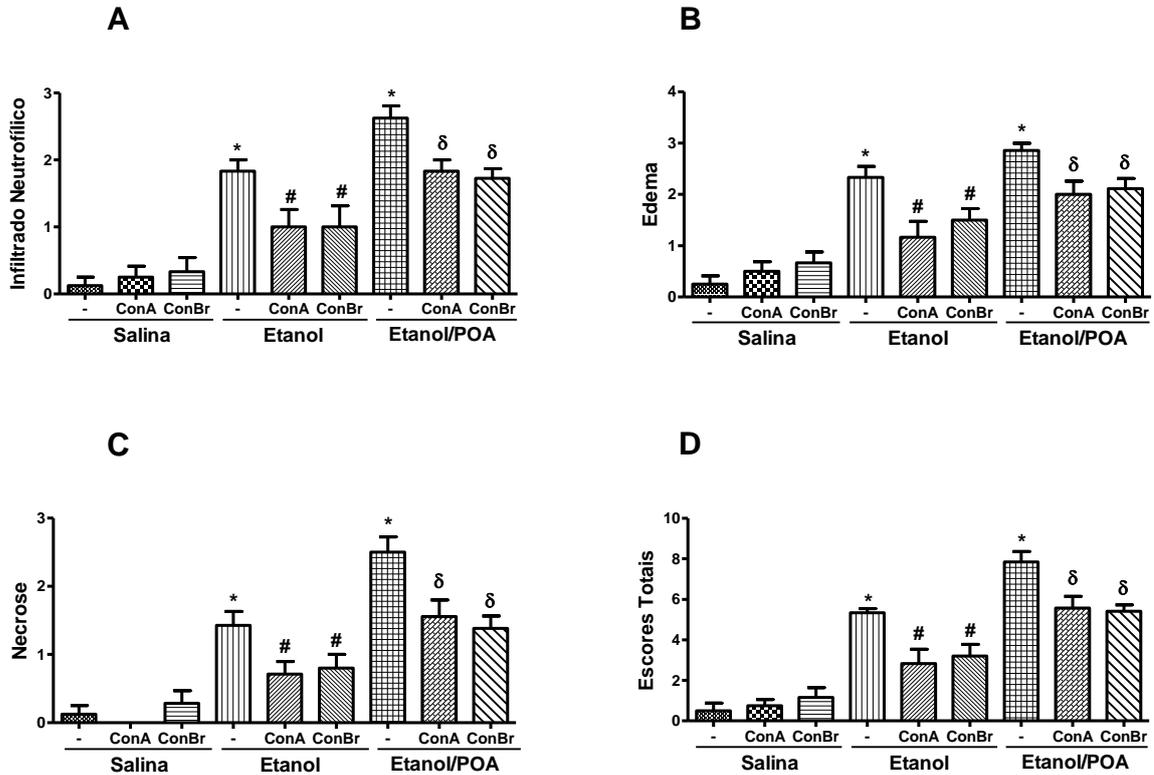
## RESULTADOS IN VIVO

### 5.17. Papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA: avaliação histopatológica

As lectinas avaliadas no presente estudo preveniram, ( $p < 0,05$ ), todas as alterações histopatológicas causadas por Etanol/POA: infiltrado neutrofílico (ConA:  $1,83 \pm 0,16$ ; ConBr:  $1,72 \pm 0,14$  vs Etanol/POA:  $2,62 \pm 0,18$ ), edema (ConA:  $2,00 \pm 0,25$ ; ConBr:  $2,11 \pm 0,20$  vs Etanol/POA:  $2,85 \pm 0,14$ ), necrose (ConA:  $1,55 \pm 0,24$ ; ConBr:  $1,38 \pm 0,18$  vs Etanol/POA:  $2,500 \pm 0,22$ ) e escores totais (ConA:  $5,57 \pm 0,57$ ; ConBr:  $5,41 \pm 0,31$  vs Etanol/POA:  $7,85 \pm 0,50$ ), bem como causadas por Etanol: infiltrado neutrofílico (ConA:  $1,00 \pm 0,25$ ; ConBr:  $1,00 \pm 0,31$  vs Etanol:  $1,83 \pm 0,16$ ), edema (ConA:  $1,16 \pm 0,30$ ; ConBr:  $1,50 \pm 0,22$  vs Etanol:  $2,33 \pm 0,21$ ), necrose (ConA:  $0,71 \pm 0,18$ ; ConBr:  $0,80 \pm 0,20$  vs Etanol:  $1,42 \pm 0,20$ ) e escores totais (ConA:  $2,83 \pm 0,70$ ; ConBr:  $3,20 \pm 0,58$  vs Etanol:  $5,33 \pm 0,21$ ). ConA e ConBr, na ausência de qualquer estímulo lesivo mantiveram todos os parâmetros em níveis semelhantes ao basal: infiltrado neutrofílico (ConA:  $0,25 \pm 0,16$ ; ConBr:  $0,33 \pm 0,21$ ; Controle:  $0,12 \pm 0,12$ ), edema (ConA:  $0,50 \pm 0,18$ ; ConBr:  $0,66 \pm 0,21$ ; Controle:  $0,25 \pm 0,16$ ), necrose (ConA:  $00,0 \pm 00,0$ ;

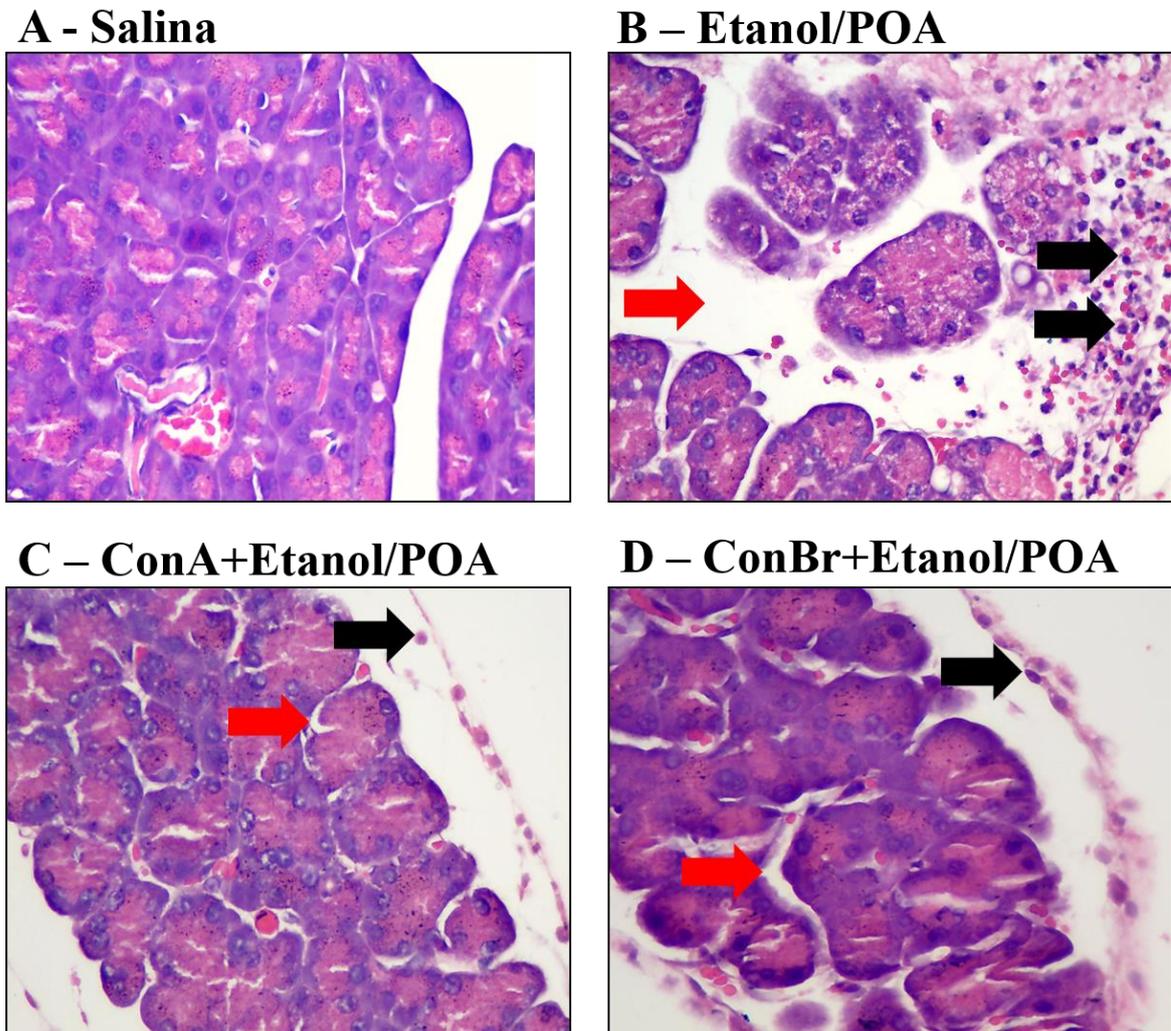
ConBr:  $0,28 \pm 0,18$ ; Controle:  $0,12 \pm 0,12$ ) e escores totais (ConA:  $0,75 \pm 0,31$ ; ConBr:  $1,16 \pm 0,47$ ; Controle:  $0,50 \pm 0,37$ ), como pode ser observado nas figuras 42 e 43.

**Figura 42.** Papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA: avaliação histopatológica.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0,05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**Figura 43.** Fotomicrografias da avaliação histopatológica do papel de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA.

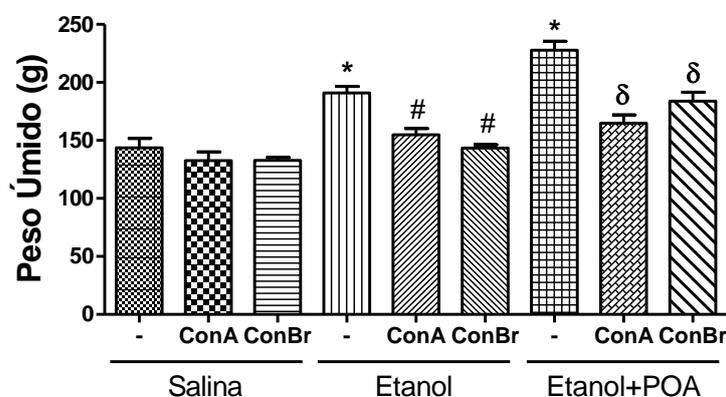


Fotomicrografias da análise histopatológica (aumento de 400 X). A: representando o grupo salina. B: representando o grupo Etanol/POA. C: representando o grupo ConA+POA. D: representando o grupo ConBr+POA. Setas pretas: indicando presença de infiltrado neutrofílico. Setas vermelhas: indicando edema.

### 5.18. Papel de ConA e ConBr na avaliação de peso úmido pancreático em animais tratados com Etanol/POA

ConA e ConBr ( $164,90 \pm 7,17$  e  $183,90 \pm 7,70$  g, respectivamente) preveniram significativamente o aumento do peso úmido pancreático, comparado ao grupo Etanol/POA ( $227,80 \pm 7,64$  g) bem como etanol (ConA:  $154,90 \pm 5,41$ ; ConBr:  $143,30 \pm 2,94$  vs Etanol:  $191,0 \pm 5,50$  g). Não havendo diferença estatística entre os grupos que receberam apenas salina (Figura 44).

**Figura 44.** Papel de ConA e ConBr na avaliação de peso úmido pancreático em animais tratados com Etanol/POA.

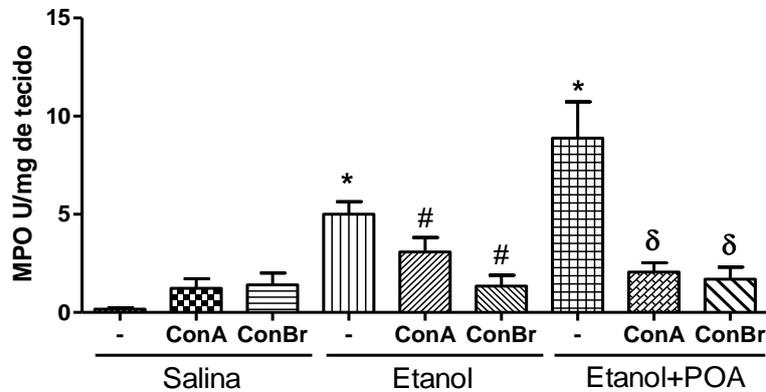


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0,05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.19. Papel de ConA e ConBr na dosagem de mieloperoxidase em camundongos submetidos à pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA

Nesta avaliação do potencial anti-inflamatório das lectinas, ambas (ConA:  $2,05 \pm 0,47$  e ConBr:  $1,69 \pm 0,60$  U/mg de tecido) foram capazes de reverter o aumento de MPO promovido por Etanol/POA ( $8,87 \pm 1,84$  U/mg de tecido). Efeito também observado nos grupos de animais que receberam apenas álcool, na ausência de Etanol/POA (ConA:  $3,07 \pm 0,73$ ; ConBr:  $1,34 \pm 0,54$  vs Álcool:  $5,0 \pm 0,64$  U/mg de tecido). A administração de ConA e ConBr ( $1,22 \pm 0,49$  e  $1,41 \pm 0,59$  U/mg de tecido, respectivamente) na ausência de qualquer agente lesivo, não promoveu qualquer alteração nos valores de MPO, mantendo em níveis basais, semelhantes ao grupo controle ( $0,16 \pm 0,07$  U/mg de tecido) (Figura 45).

**Figura 45.** Papel de ConA e ConBr na dosagem de mieloperoxidase (MPO) em camundongos submetidos à pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA.

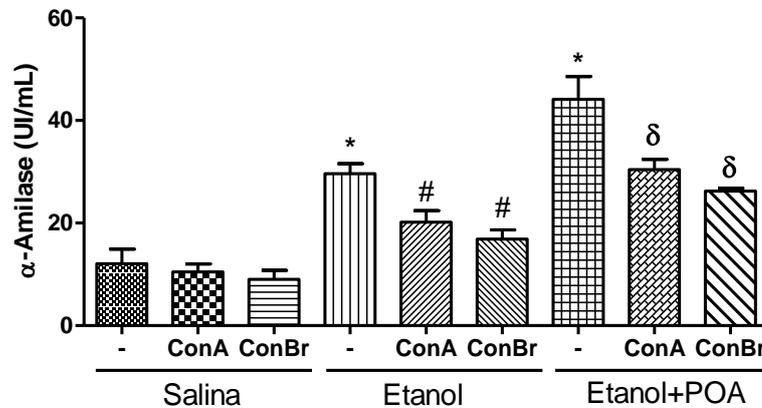


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0.05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.20. Efeito de ConA e ConBr na dosagem de amilase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos

Os animais sob administração de Etanol/POA ( $44,15 \pm 4,43$  UI/mL) apresentaram aumento significativo dos valores de amilase, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas salina ( $12,05 \pm 2,85$  UI/mL), sendo este efeito significativamente revertido pelo pós-tratamento com ConA ( $30,45 \pm 1,96$  UI/mL) e ConBr ( $26,23 \pm 0,55$  UI/mL). O grupo de animais que recebeu apenas álcool ( $29,60 \pm 1,98$  UI/mL) também apresentou valores de amilase aumentados, em relação ao controle; sendo este efeito também revertido ( $p < 0,05$ ) pelas lectinas (ConA:  $21,32 \pm 2,22$  e ConBr:  $16,86 \pm 1,83$  UI/mL). Os animais tratados com as lectinas (ConA:  $10,47 \pm 1,56$  e ConBr:  $9,03 \pm 1,75$  UI/mL), sem a administração prévia de Etanol/POA ou álcool, apresentaram valores de amilase em níveis basais, semelhantes ao controle (Figura 46).

**Figura 46.** Efeito de ConA e ConBr na dosagem de amilase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.

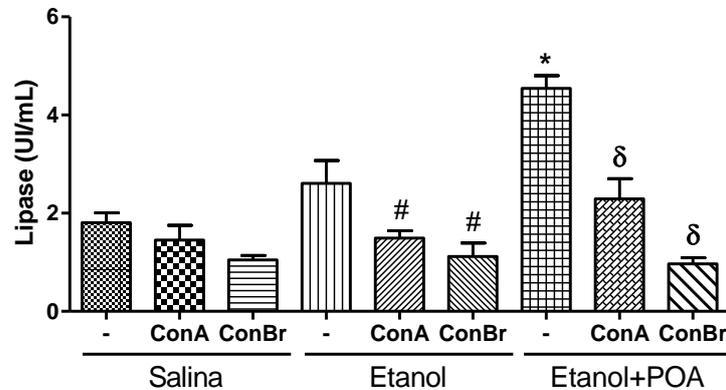


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0,05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.21. Efeito de ConA e ConBr na dosagem de lipase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos

Como pode ser observado na figura 47, Etanol/POA ( $4,54 \pm 0,26$  UI/mL) ( $p < 0,05$ ), mas não Etanol ( $2,60 \pm 0,46$  UI/mL) aumentou significativamente os níveis de lipase, comparados ao grupo controle ( $1,80 \pm 0,20$  UI/mL). ConA e ConBr foram capazes de diminuir as dosagens de lipase, em comparação ao grupo Etanol/POA (ConA:  $2,29 \pm 0,41$  e ConBr:  $0,96 \pm 0,12$  vs Etanol/POA:  $4,54 \pm 0,26$  UI/mL) e álcool (ConA:  $1,49 \pm 0,15$  e ConBr:  $1,11 \pm 0,27$  vs Álcool:  $2,60 \pm 0,46$  UI/mL). As lectinas administradas na ausência de qualquer agente agressor (ConA:  $1,45 \pm 0,29$  e ConBr:  $1,04 \pm 0,08$  UI/mL) apresentaram valores de lipase semelhantes aos encontrados no grupo controle ( $1,80 \pm 0,20$  UI/mL).

**Figura 47.** Efeito de ConA e ConBr na dosagem de lipase na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.

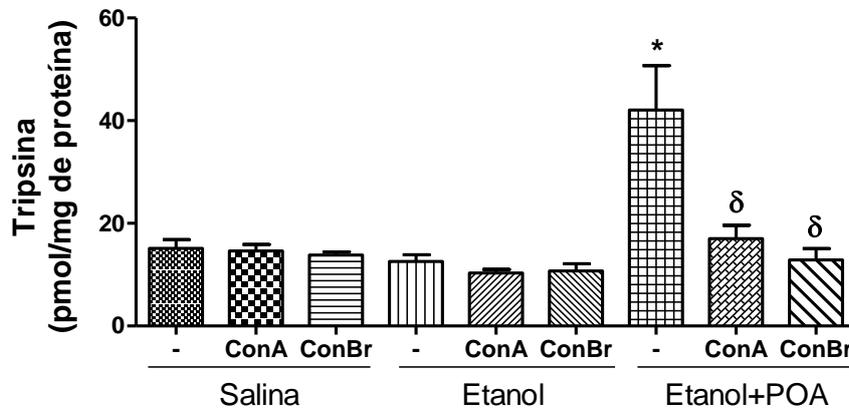


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0,05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.22. Efeito de ConA e ConBr na ativação de tripsina na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos

De forma semelhante ao resultado anterior, no resultado de avaliação da ativação de tripsina pancreática, a administração de Etanol/POA ( $42,08 \pm 8,65$  pmol/mg de proteína) ( $p < 0,05$ ), mas não Etanol ( $12,56 \pm 1,29$  pmol/mg de proteína) aumentou significativamente os níveis de tripsina, comparados ao grupo controle ( $15,13 \pm 1,68$  pmol/mg de proteína). ConA e ConBr foram capazes de diminuir as dosagens dessas dosagens, em comparação ao grupo Etanol/POA (ConA:  $17,03 \pm 2,61$  e ConBr:  $12,89 \pm 2,16$  pmol/mg de proteína) As lectinas administradas na ausência de qualquer agente agressor (ConA:  $14,63 \pm 1,27$  e ConBr:  $13,81 \pm 0,60$  pmol/mg de proteína) apresentaram valores semelhantes ao grupo controle (Figura 48).

**Figura 48.** Efeito de ConA e ConBr na ativação de tripsina na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.

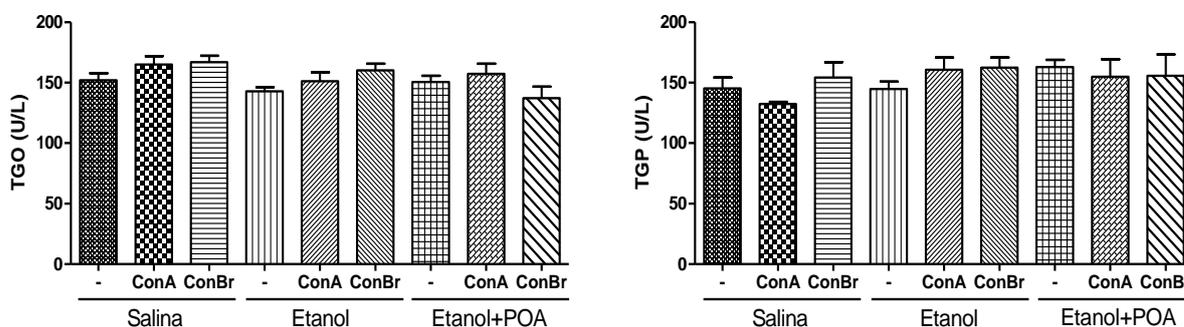


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0,05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.23. Análise da participação de ConA e ConBr na avaliação das transaminases hepáticas (TGO e TGP) na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos

Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 49), nem na avaliação de TGO (ConA:  $157,3 \pm 8,3$ ; ConBr:  $137,2 \pm 9,5$  vs Etanol/POA:  $150,6 \pm 5,1$  U/L); (ConA:  $151,3 \pm 7,2$ ; ConBr:  $160,2 \pm 5,5$  vs Álcool:  $143,0 \pm 3,2$  U/L), (ConA:  $165,2 \pm 6,7$ ; ConBr:  $167,0 \pm 5,2$ ; Controle:  $152,2 \pm 5,63$  U/L) nem de TGP (ConA:  $155,0 \pm 14,44$ ; ConBr:  $155,8 \pm 17,7$  vs Etanol/POA:  $162,9 \pm 6,0$  U/L); (ConA:  $160,7 \pm 10,0$ ; ConBr:  $162,5 \pm 8,3$  vs Álcool:  $144,7 \pm 6,3$  U/L) e (ConA:  $132,3 \pm 1,8$ ; ConBr:  $154,3 \pm 12,7$ ; Controle:  $145,3 \pm 9,0$  U/L).

**Figura 49.** Análise da participação de ConA e ConBr na avaliação das transaminases hepáticas (TGO e TGP) na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.

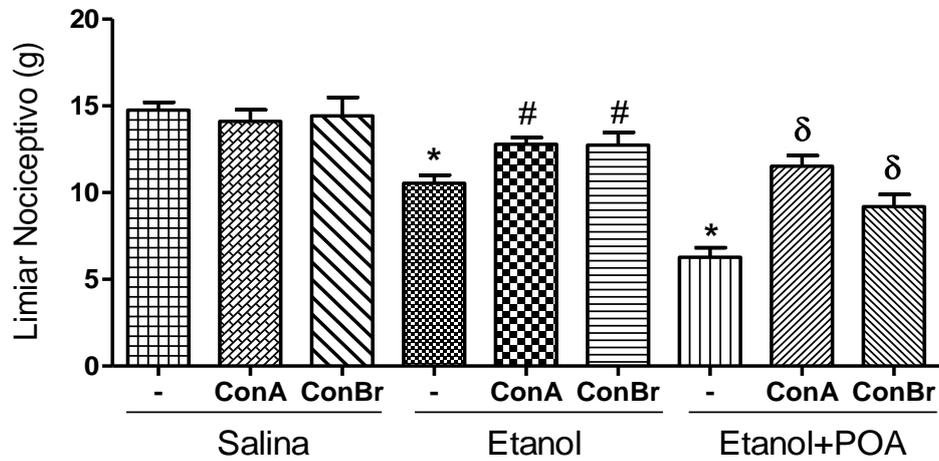


Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \*p < 0,05 vs grupo controle; #p < 0,05 vs grupo Etanol;  $\delta$ p < 0,05 vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

#### 5.24. Avaliação do potencial antinociceptivo de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos

Além de apresentarem potencial anti-inflamatório observado nos resultados anteriores, ConA e ConBr também tiveram efeito antinociceptivo, ao aumentarem o limiar nociceptivo nos animais tratados com ambas moléculas, em comparação ao grupo Etanol (ConA:  $12,72 \pm 0,46$ ; ConBr:  $11,96 \pm 0,92$  vs Etanol:  $10,02 \pm 0,36$  grama de força, g) e Etanol/POA (ConA:  $11,52 \pm 0,62$ ; ConBr:  $9,19 \pm 0,69$  vs Etanol/POA:  $6,27 \pm 0,54$  grama de força, g). Corroborando com todos os resultados anteriores, quando as lectinas foram administradas em animais que receberam apenas salina, ou seja, na ausência de qualquer agente lesivo como álcool ou ácido palmítico; ConA e ConBr ( $14,11 \pm 0,66$  e  $14,43 \pm 1,06$  grama de força, g, respectivamente) apresentaram valores semelhantes ao grupo controle ( $14,76 \pm 0,44$  grama de força, g), mostrando não causar nenhum efeito lesivo ou sugestivo de dor aos animais (Figura 50).

**Figura 50.** Avaliação do potencial antinociceptivo de ConA e ConBr na pancreatite aguda experimental induzida por Etanol/POA em camundongos.



Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de um “n” experimental de no mínimo 8 animais. \* $p < 0,05$  vs grupo controle; # $p < 0,05$  vs grupo Etanol;  $\delta p < 0.05$  vs grupos Etanol/POA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que ConA e ConBr previnem o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  decorrente da administração de Etanol/POA em células acinares pancreáticas isoladas de camundongos, impedindo dessa maneira o aumento de cálcio mitocondrial e a necrose celular, com esta última análise também sendo observada na análise translacional em células acinares pancreáticas humanas, na qual as lectinas também foram capazes de prevenir o processo de morte celular necrótica causada pelo mesmo agente. Além disso foi evidenciado que estas moléculas protegem as células acinares contra o agente endógeno CCK apenas em situações patológicas, não alterando o perfil fisiológico dessas células. Ambas as proteínas apresentaram respostas semelhantes em praticamente todas as análises realizadas, diferindo apenas no seu padrão de localização na célula acinar, na qual ConA demonstra estar localizada no citosol, e ConBr ligada predominantemente à membrana da célula acinar, sendo essa capacidade de internalização a possível razão pela qual ConA promove apoptose na célula acinar estimulada por Etanol/POA, enquanto ConBr não exerce esse efeito. Resultados importantes também foram encontrados na pancreatite aguda alcoólica experimental em camundongos, na qual ambas as proteínas reverteram os danos histopatológicos, inflamatórios, bioquímicos e nociceptivos causados pela administração de Etanol/POA.

Estudos tem mostrado que a necrose da célula acinar pancreática é o evento chave para o desencadeamento de toda a sequência de processos inflamatórios que acontecem na pancreatite aguda (CRIDDLE et al., 2004; CRIDDLE et al., 2015), dessa forma, a comunidade científica tem buscado estratégias para evitar esse acontecimento. No presente trabalho, foi demonstrado que ConA e ConBr previnem a necrose de células acinares causada por Etanol/POA, demonstrando permanência desse efeito protetor em uma análise de duração de até 14h após sua administração, sugerindo a capacidade dessas lectinas de leguminosas atuarem como moléculas protetoras contra os danos celulares da pancreatite alcoólica.

A atividade biológica de muitas lectinas tem sido relacionada à sua capacidade de interação com carboidratos presentes na superfície das membranas de células alvo (YAGI; KATO, 2017; ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). No presente trabalho, foi mostrado que o bloqueio do domínio lectínico de ConA e ConBr aboliu o efeito protetor antinecrótico anteriormente observado, sugerindo que a atividade biológica dessas proteínas é, pelo menos em parte, dependente da sua interação com resíduos de açúcar presentes na célula acinar.

Investigações de mais de 20 anos atrás demonstraram que a membrana da célula acinar pancreática contém resíduos de açúcar, tais como N-acetil-glicosamina, N-acetil-

galactosamina, galactose, fucose, glicose e manose (JONAS; PUTZKE, 1992). Além disso, um estudo realizado por Willemer e colaboradores (1990) demonstrou a ligação de algumas lectinas aos sistemas de membrana de organelas internas da célula acinar pancreática, com o objetivo de investigação de quais seriam os açúcares presentes. Os resultados desse estudo mostraram uma forte interação de ConA com as seguintes estruturas celulares: retículo endoplasmático rugoso, aparelho de golgi, vacúolos condensados (conteúdo e membrana), grânulos de zimogênio (conteúdo e membrana), lisossomos (conteúdo e membrana), lúmen acinar, núcleo, bem como nas superfícies apical, lateral, basal e perinuclear da membrana plasmática (WILLEMER et al., 1990).

Dessa forma, diante do fato de ConA e ConBr compartilharem a especificidade pelos mesmos açúcares (glicose e manose) e sendo estes presentes em diversos locais da célula acinar, pode-se inferir que essas lectinas, de alguma forma, interagem dentro ou fora da célula através da sua propriedade ligante a estes carboidratos, promovendo, assim, proteção celular. A partir desse resultado sugestivo, resolvemos analisar o perfil de localização dessas lectinas junto à célula acinar. Os resultados encontrados mostraram que quando administradas em situação fisiológica, na ausência de qualquer agente lesivo, ConA é internalizada na célula, localizando-se no citosol; enquanto ConBr encontra-se predominantemente na membrana da célula acinar, contudo na presença do agente estressor Etanol/POA, ConA muda sua localização, a qual é direcionada para o núcleo, enquanto ConBr não altera seu perfil, permanecendo a nível de membrana.

A lectina Concanavalina A (ConA) tem recebido destaque em inúmeros trabalhos na literatura científica por sua capacidade de internalização celular e promoção de apoptose em diversos tipos de células (SHI et al., 2014; SHI et al., 2013; LI et al., 2011; LI et al., 2010). ConA é capaz de penetrar no núcleo de células lesionadas e promover apoptose, através de interação direta com o gene supressor de tumor p53 (AMIN et al., 2010). No presente trabalho, ConA foi capaz de promover apoptose nas células acinares pancreáticas, sob estímulo lesivo por Etanol/POA, mas não em células saudáveis. Esse dado corrobora com os achados que mostram que esta lectina não causa qualquer ação nas células, a menos que elas estejam danificadas, com envolvimento da ativação de genes de sobrevivência celular (AMIN et al., 2007), o que se mostra como mais uma vantagem protetora dessa proteína, uma vez que clinicamente não seria interessante utilizar uma molécula indutora de apoptose em células viáveis metabolicamente, quando o alvo seriam apenas aquelas danificadas.

Na pancreatite aguda, a morte das células acinares por apoptose cursa com um melhor prognóstico que a morte por necrose, uma vez que não há ativação da cascata inflamatória

(CRIDDLE et al., 2006), reforçando ainda mais o papel benéfico de ConA nessa condição clínica. No entanto, apesar dessas diferenças iniciais de ConA e ConBr quanto à localização celular e capacidade de promoção de apoptose, estas moléculas compartilharam muitas atividades biológicas no decorrer deste trabalho.

Os mecanismos pelos quais o uso abusivo do etanol leva à necrose de células acinares pancreáticas e consequente inflamação nos quadros de pancreatite aguda estão sendo melhor elucidados com o passar dos anos, e atualmente sabe-se que o evento iniciante de toda essa cascata é o aumento sustentado, global e tóxico de  $Ca^{2+}$  na célula acinar (GRYSHCHENKO et al., 2018). Durante a avaliação deste estudo, foi demonstrado que ConA e ConBr diminuem o aumento de cálcio citosólico em células acinares pancreáticas causado por Etanol/POA, não apresentando aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  *per se*. Estudos têm mostrado que a necrose de células acinares é significativamente diminuída quando o aumento de cálcio é prevenido na pancreatite aguda (WEN et al., 2015). Diante desse fato, a propriedade das lectinas na modulação da concentração de cálcio em células estimuladas por metabólitos tóxicos do etanol sugere que possivelmente é através desse mecanismo que elas exercem suas atividades antinecróticas.

Os metabólitos da via não-oxidativa do etanol, ao entrarem na célula acinar, interagem com receptores de inositol trifosfato ( $IP_3R$ ) do retículo endoplasmático (RE), promovendo aumento exacerbado da liberação de  $Ca^{2+}$  e esvaziamento dessa organela, o que propicia a entrada de uma quantidade ainda maior de cálcio a partir do meio externo, através da ativação de canais de  $Ca^{2+}$  operados por estoque (SOCs) (CRIDDLE et al., 2006). A partir dessa informação, este estudo foi delineado no sentido de descobrir qual seria o envolvimento de ConA e ConBr nesse processo.

Para tanto as análises seguintes foram realizadas em meio de manutenção celular isento de cálcio, nessas circunstâncias, os resultados mostraram que ambas as lectinas preveniram o pico de aumento de cálcio promovido por Etanol/POA, o qual exerce esse efeito devido à liberação inicial de cálcio do RE; sugerindo, que ConA e ConBr, de alguma forma, estão impedindo a comunicação dos metabólitos não-oxidativos do etanol com os receptores de  $IP_3$  do retículo endoplasmático e dessa forma prevenindo o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ . Estes achados convergem com a literatura científica que tem mostrado que a inibição farmacológica de  $IP_3R$  com cafeína previne o aumento sustentado de cálcio causado por metabólitos alcoólicos tóxicos nas células acinares, bem como a pancreatite experimental (HUANG et al., 2015).

Dando seguimento a esta investigação, as análises posteriores mostraram que Etanol/POA esvaziou os estoques de cálcio do RE, levando à ativação dos canais SOCs, possibilitando a entrada de altas concentrações de cálcio dentro da célula. ConA e ConBr

também foram eficazes contra esse efeito, sugerindo eventual participação dessas proteínas como moléculas potencialmente protetoras no processo de ativação dos canais de cálcio operados por estoque em situação de estresse celular. Na tentativa de analisar com mais acurácia a potencialidade de ConA e ConBr atuarem nos canais SOCs, foi utilizado nesse trabalho um esvaziador de  $\text{Ca}^{2+}$  independente de  $\text{IP}_3$ , a tapsigargina (TPG), um inibidor não competitivo da bomba do Retículo Sarco/Endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$  (SERCA) que geralmente é utilizada em análises de células mantidas em meio isento de cálcio, forçando o esvaziamento dos sistemas de armazenamentos de  $\text{Ca}^{2+}$  e permitindo a entrada de cálcio operada por armazenamento pela reintrodução de cálcio externo (SEHGAL et al., 2017).

Ambas as lectinas utilizadas no presente trabalho foram capazes de prevenir a entrada de cálcio por SOCs inclusive nas preparações celulares utilizando tapsigargina, reforçando sua potencialidade na prevenção da necrose de células acinares através do impedimento de entradas substanciais de cálcio nessas células, possivelmente via interação com SOCs. ConA, mas não ConBr, foi ainda capaz de reverter a entrada de cálcio por SOCs mesmo após o evento já ter sido iniciado, mostrando mais uma diferença entre estas lectinas tão semelhantes estruturalmente. Talvez, o fato de ConA ter a capacidade de internalização na célula acinar, ao contrário de ConBr, possa justificar essa diferença de resposta.

Wen e colaboradores (2015) sugeriram aplicações translacionais de inibição da entrada de cálcio operada por armazenamento como uma possibilidade de tratamento para a pancreatite aguda clínica, uma vez que a inibição farmacológica de ORAI-1, o principal canal de cálcio operado por armazenamento da célula acinar, preveniu a lesão associada ao excesso de cálcio citosólico de células acinares pancreáticas humanas e pancreatite aguda em 3 modelos experimentais, inclusive de Etanol/POA utilizado nesse estudo. Rieger e colaboradores (2017), publicaram recentemente resultados interessantes com a lectina ConBr, mostrando sua eficácia na proteção contra morte celular, despolarização mitocondrial e espécies reativas de oxigênio (EROs), através da sua capacidade de modulação nos canais de cálcio operados por voltagem do tipo L em culturas de hipocampo expostas à lesão por isquemia. Apesar de não haver canais de cálcio operados por voltagem na célula acinar pancreática (STREB et al., 1983; PETERSEN, 1992; PETERSEN; TEPIKIN, 2008), a análise em conjunto dessas informações sugere a capacidade dessas lectinas interagirem diretamente nos canais SOCs da célula acinar e, dessa forma, prevenirem o aumento de cálcio citosólico em quantidades tóxicas, evitando assim a morte por necrose dessas células.

A bomba SERCA tem um importante papel no controle da recaptação de cálcio para o retículo endoplasmático, uma falha nesse sistema culmina em aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  sustentado e

lesão da célula acinar (CRIDDLE, 2015). A administração de taspigargina, em uma situação de ausência de cálcio no meio de manutenção celular, causa inicialmente um pico rápido de aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ , uma vez que ela propicia o esvaziamento do RE (WEN et al., 2015). ConA e ConBr também preveniram a liberação de cálcio do RE causada por TPG, sugerindo uma rota adicional ao efeito protetor de modulação de  $[Ca^{2+}]_c$  mediado por essas lectinas.

Durante a realização desse trabalho, foi questionado se ConA e ConBr poderiam interferir nas alterações de  $[Ca^{2+}]_c$  sob estímulos endógenos, uma vez que o precipitante tóxico que utilizamos, Etanol/POA, é totalmente exógeno ao sistema fisiológico pancreático. Para esta finalidade, utilizamos colecistocinina (CCK), um hormônio peptídico do sistema gastrointestinal e do cérebro, o qual é sintetizado pelas células I na mucosa do intestino delgado e secretado a partir do primeiro segmento do intestino delgado (OWYANG, 1999; MIYASAKA; FUNAKOSHI, 1998). Em células acinares pancreáticas, CCK ativa receptores ligados à fosfolipase C, levando a um aumento na concentração de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) no citosol. O  $IP_3$ , por sua vez, libera  $Ca^{2+}$  de sistemas de armazenamento citoplasmático, principalmente do RE, o que leva a um aumento na concentração de cálcio livre citosólico ( $[Ca^{2+}]_c$ ) (STREB et al., 1983). Um aumento oscilatório fisiológico na  $[Ca^{2+}]_c$  é um importante sinal precoce e necessário pelo qual os secretagogos fisiológicos induzem a liberação de enzimas digestivas das células acinares pancreáticas (GONZÁLEZ et al., 2008). Contudo, embora a CCK seja um importante regulador fisiológico da secreção pelo pâncreas exócrino, uma superestimulação pode causar danos ao pâncreas que podem levar à disfunção da glândula e até à ativação de vias de sinalização de morte (GUKOVSKAYA et al., 2002; SALUJA et al., 1999).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que ConA e ConBr não promovem qualquer alteração no aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido pela concentração fisiológica de CCK (10 pM), o que é um dado extremamente favorável para o nosso trabalho, uma vez que os picos oscilatórios de cálcio promovidos pelo estimulante endógeno CCK são necessários para as funções fisiológicas de secreção de zimogênios da célula acinar pancreática. Em contrapartida, ambas as lectinas protegeram as células acinares do aumento sustentado e tóxico de  $[Ca^{2+}]_c$  promovido pela concentração patológica de CCK (10 nM). Este achado nos leva a inferir que essas moléculas são potencialmente protetoras contra precipitantes lesivos que promovem aumento tóxico da concentração de cálcio citosólico, e que ambas as proteínas não alteram os padrões de funcionamento fisiológico das células.

Além da importância do aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  para as células acinares pancreáticas, o aumento de cálcio mitocondrial ( $[Ca^{2+}]_{mit}$ ) também é um importante evento causador da

pancreatite aguda, pelo fato de a mitocôndria ser uma importante organela de armazenamento de cálcio. Em condições de aumento sustentado e tóxico de cálcio citosólico causado por precipitantes como os metabólitos da via não-oxidativa do etanol, a mitocôndria é intensamente afetada, acumulando grandes quantidades de cálcio (MUKHERJEE et al., 2016). O aumento exacerbado de cálcio mitocondrial,  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , é o fator determinante para o desacoplamento da fosforilação oxidativa, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) e colapso da mitocôndria, com consequente diminuição de ATP e necrose da célula acinar (GRYSHCHENKO et al., 2018; MUKHERJEE et al., 2016). ConA e ConBr preveniram o aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  causado por Etanol/POA, um achado importante que abre o caminho para a investigação seguinte, a qual objetivou avaliar se estas lectinas estariam prevenindo o aumento de cálcio mitocondrial por interação direta com essa organela ou como uma consequência da prevenção do aumento de  $[Ca^{2+}]_c$ .

A transição de permeabilidade mitocondrial é caracterizada pela abertura de um poro proteico não seletivo na membrana mitocondrial interna, o qual é induzido por  $Ca^{2+}$  e sensível à ciclosporina A (SHALBUEVA et al., 2013). A abertura do MPTP é fisiológica no modo de baixa condutância, liberando espécies reativas de oxigênio (EROs) e cálcio para combinar o metabolismo com a carga de trabalho, mas patológico em modo de alta condutância comprometendo a produção de ATP e induzindo morte celular (HALESTRAP; RICHARDSON, 2015). Existe uma intrínseca associação entre a abertura do MPTP e a lesão da célula acinar pancreática, estudos recentes têm sugerido que a inibição da abertura desse poro mitocondrial previne a pancreatite aguda (ARMSTRONG et al., 2018; MUKHERJEE et al., 2016; LERCH; HALANGK; MAYERLE, 2013). Os dados encontrados no presente trabalho mostraram que as lectinas estudadas não tiveram nenhum papel direto na prevenção da abertura do MPTP em mitocôndrias isoladas estimuladas por cálcio, o que fortemente sugere que a diminuição de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  promovida por ConA e ConBr em células acinares sob estímulo lesivo de Etanol/POA é, na verdade, um efeito indireto como consequência do efeito protetor dessas lectinas contra o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado pelo mesmo agente.

A ativação prematura de zimogênios no interior das células acinares tem sido, durante muitos anos, associada como um dos principais eventos agravadores da pancreatite aguda (SINGH; GARG, 2016). Existe um embasamento forte na literatura científica que mostra que a ativação inadequada dessas pró-enzimas é dependente da sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_c$  na célula acinar pancreática (LERCH; GORELICK, 2000; CLEMENS et al., 2014). Nesse contexto, ConA e ConBr preveniram a ativação e liberação de amilase em células acinares pancreáticas isoladas estimuladas por metabólitos da via não-oxidativa do etanol, tendo esse efeito abolido

com o bloqueio do seu domínio lectínico. Analisando esses dados de uma forma integrada, podemos inferir que a capacidade dessas lectinas de prevenirem o aumento de cálcio no interior das células acinares, contribui para a homeostase dessas células ao evitar o aumento de cálcio mitocondrial, ativação prematura de zimogênios e necrose celular.

Ao longo dos anos, vem surgindo cada vez mais a necessidade de correlação entre a pesquisa básica e clínica, na tentativa de maior sucesso na aplicação prática dos produtos desenvolvidos, apresentando dessa forma, um melhor retorno para a sociedade (HOMMEL et al., 2015; MILAT; LI, 2017). Em vista disso, objetivou-se nesse trabalho avaliar a possibilidade dos resultados encontrados em células murinas (de camundongos) serem reproduzíveis também em células humanas. Dessa forma, foi demonstrado que ConA e ConBr mantiveram o seu efeito protetor contra a necrose causada por Etanol/POA em células acinares pancreáticas humanas. Esse dado importante coloca essas moléculas em uma posição de destaque, uma vez que a pesquisa translacional tem sido cada vez mais necessária com o avançar da ciência e tecnologia. Além disso, no campo das pesquisas envolvendo a busca de tratamento para a pancreatite aguda, a grande maioria das publicações relevantes dessa área faz uso da pesquisa translacional para reforçar a importância dos seus achados (WEN et al., 2015; RUMBUS et al., 2018; JIN et al., 2018).

Diante do fato de que muitas pesquisas importantes ficam estagnadas na área básica, por conta da dificuldade de extrapolação para a clínica ou pelo simples fato dos resultados encontrados em modelos animais não reproduzirem em modelos humanos, esse resultado abre um leque de possibilidades de investigações futuras dessas moléculas como alternativa para o tratamento clínico da pancreatite aguda. Nesse contexto, algumas lectinas de leguminosas já estão em fase de triagens clínicas para afecções pancreáticas, como é o caso da lectina do visco (ou lectinas Mistletoe), a qual está sendo utilizada em pesquisa clínica para o tratamento do câncer de pâncreas (TRÖGER et al., 2013; ESTRADA-MARTÍNEZ et al., 2017). Em um estudo de fase III realizado com pacientes com câncer de pâncreas avançado localizado ou câncer pancreático metastático, os quais estavam recebendo somente cuidados paliativos, sem tratamento quimioterápico no momento do estudo, foram evidenciados resultados favoráveis, com uma clara melhora na qualidade de vida e aumento na sobrevivência dos pacientes que receberam tratamento subcutâneo com as lectinas do visco, comparado aos pacientes controle sem tratamento (TRÖGER et al., 2013; ROSTOCK et al., 2005; STAUDER; KREUSER, 2002).

Com o avançar das pesquisas focadas na tentativa de melhor compreensão da pancreatite aguda, sabe-se atualmente que a necrose da célula acinar pancreática é o evento

principal que caracteriza o ápice da lesão celular e o início da ativação da cascata inflamatória e todas as consequências desastrosas da pancreatite aguda, tais como edema pancreático, necrose tecidual, aumento do infiltrado neutrofílico, alterações nas dosagens das enzimas pancreáticas, além da intensa dor característica dessa condição clínica (GARBER et al., 2018). Nesse sentido, uma vez que foi demonstrado nesse trabalho que ConA e ConBr são capazes de melhorar aspectos celulares importantes como diminuição de  $[Ca^{2+}]_c$ ,  $[Ca^{2+}]_{mit}$  e consequente necrose causada por Etanol/POA, sendo essa atividade antinecrótica interessante observada também em células humanas, resolvemos investigar se essas moléculas seriam também capazes de proteger contra a pancreatite aguda induzida pelo mesmo agente em um modelo animal.

A pancreatite aguda alcoólica apresenta uma série de complicações histopatológicas, inflamatórias e bioquímicas, que quando evoluídas para a condição mais grave, culmina em necrose pancreática, sepse e disfunção múltipla de órgãos, levando ao óbito de 20 a 30% dos pacientes acometidos (PETROV et al., 2010). Os resultados do presente estudo mostraram que ConA e ConBr reverteram o processo de lesão histopatológica na pancreatite aguda induzida experimentalmente por Etanol/POA, com diminuição do infiltrado neutrofílico, necrose e edema; sendo este último resultado reforçado através da diminuição do peso úmido pancreático, evidenciando a redução de edema tecidual com o tratamento de ConA e ConBr.

A liberação de marcadores inflamatórios a partir de célula acinar pode mediar o recrutamento e ativação de células inflamatórias circulantes, tais como células mononucleares e neutrófilos polimorfonucleares do sangue periférico (NOEL et al., 2014; MONTECUCCO et al., 2014). Contudo, a ativação excessiva de leucócitos desencadeia respostas inflamatórias locais e sistêmicas intensas, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade na pancreatite aguda grave (GUO et al., 2014). Estudos recentes têm sugerido um papel central dos neutrófilos para a evolução da pancreatite aguda grave (YANG; MENG; XU, 2015). Nos estágios precoces da pancreatite aguda, o dano celular pancreático causado pela sinalização inflamatória asséptica induzida por ativação anormal de tripsinogênio recruta neutrófilos para o pâncreas. Os neutrófilos ativados liberam altas concentrações de oxidantes e agentes citotóxicos, que pioram ainda mais o dano local aos tecidos pancreáticos. À medida que a inflamação continua, inicia-se a cascata de transmigração de neutrófilos através das células endoteliais (LANKISCH et al., 2015). Baseado num segundo recrutamento de neutrófilos, pode-se progredir rapidamente e agravar-se a partir da inflamação local pancreática para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, causando lesão de órgãos remotos, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e/ou complicações graves por respostas inflamatórias intensas

(YANG; MENG; XU, 2015). Além disso, evidências experimentais recentes têm sugerido fortemente que os neutrófilos também exercem um papel ativo na orquestração do progresso da pancreatite, através da regulação da ativação da tripsina regulada por neutrófilos e liberação de NETs (da expressão em inglês “Neutrophil Extracellular Traps”, uma nova descoberta do sistema imune de armadilhas liberadas a partir de neutrófilos) (WANG et al., 2017).

No presente estudo, ConA e ConBr reverteram a níveis basais a dosagem de mieloperoxidase, uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, amplamente utilizada como um marcador indireto da presença neutrofílica em tecidos; estes achados vão ao encontro com a redução do infiltrado neutrofílico, propiciado por ConA e ConBr, encontrado nas análises histopatológicas. Estas lectinas já têm sido descritas na literatura como moléculas com atividade anti-inflamatória em diversos modelos de doença (SILVA et al., 2016; ASSREUY et al., 1997; BATISTA et al., 2017), o que reforça a capacidade dessas proteínas atuarem modulando a inflamação pronunciada da pancreatite aguda, prevenindo assim as suas complicações subsequentes.

A ativação prematura de enzimas pancreáticas intracelulares é uma etapa inicial importante durante a patogênese da pancreatite aguda (HU; LI; ZANG, 2018). A conversão patológica de tripsinogênio inativo para tripsina tem sido considerada durante muitos anos como um dos mecanismos primários na iniciação da pancreatite aguda, além disso tem sido demonstrado que a expressão de tripsina nas células acinares é suficiente para induzir morte celular e inflamação no tecido pancreático (SINGH; GARG, 2016; GAISER et al., 2011). Na pancreatite alcoólica experimental desenvolvida nesse estudo, ConA e ConBr reduziram as taxas de tripsina pancreática para valores basais, inferindo que essas proteínas apresentam propriedades benéficas importantes sobre os eventos desencadeadores da cascata inflamatória da pancreatite aguda.

A partir da ativação de tripsina, outras enzimas pancreáticas são conseqüentemente ativadas prematuramente, tais como a amilase e lipase, as quais são parte importante do critério diagnóstico para pancreatite aguda, na qual a elevação sérica de amilase e lipase cerca de 3 vezes o valor de referência normal é parte do diagnóstico confirmatório para esta condição, juntamente com a presença de dor epigástrica severa e exames de imagem confirmatórios, como tomografia computadorizada e ressonância magnética (ROMPIANESI et al., 2017).

Assim como na clínica, o modelo experimental de pancreatite alcoólica desenvolvido nessa pesquisa apresentou níveis elevados de amilase e lipase em cerca de 3 vezes o valor normal, sendo diminuído também pelo tratamento de ConA e ConBr, reforçando mais uma vez o papel dessas lectinas na modulação de marcadores inflamatórios e bioquímicos da pancreatite

aguda. Um achado interessante nas análises bioquímicas aqui apresentadas foi o fato do etanol sozinho, na ausência de POA não ter promovido alteração nas dosagens de lipase, nem tripsina, corroborando com as informações da literatura que mostram que a administração de álcool, na ausência de gorduras, não é suficiente para promover dano pancreático reproduzível, e por esse motivo não é um modelo experimental seguro de indução de pancreatite aguda (CRIDDLE, 2015), o que reforça a importância do modelo Etanol/POA utilizado nesse trabalho.

A pancreatite aguda classicamente cursa com intensa dor, sintoma esse que tem forte influência na evolução clínica da PA, sendo responsável por procura de cerca de 90% dos pacientes ao atendimento médico (FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram pela primeira vez que após a indução da PA por Etanol/POA há queda do limiar nociceptivo dos animais visto sobre o método padrão de avaliação de comportamentos atrelados à nocicepção, o teste de Von Frey abdominal, bem como por meio de aumento de expressão de c-FOS na medula espinhal (GIRÃO, 2017).

O tratamento da dor na PA representa um grande desafio clínico e influencia a evolução clínica da patologia (MAYERLE; HLOUSCHEK; LERCH, 2005; TOULI et al., 2003), pois o seu mecanismo ainda não é completamente conhecido. Contudo, acredita-se que seja do tipo nociceptiva, neuropática e inflamatória (BARRETO E SACCONI, 2012). Os mecanismos da dor inflamatória têm sido extensivamente examinados no tecido pancreático. De modo que já foi demonstrado que agentes pró-inflamatórios nocivos ativam uma subpopulação de neurônios aferentes primários da medula espinhal, os quais liberam Substância P e CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene de Calcitonina) por projeções periféricas em tecidos inflamados, e centralmente, no corno dorsal da medula espinhal. Na periferia, a SP e o CGRP causam inflamação neurogênica, caracterizada por extravasamento de proteínas plasmáticas, infiltração de granulócitos e hiperemia (BARRETO E SACCONI, 2012; LARSSON, 1979; SEIFERT et al., 1985).

ConA e ConBr têm sido descritas como detentoras de capacidade antinociceptiva em diversos estudos (PIRES et al., 2014; PINTO et al., 2013; PIRES et al., 2013). No presente trabalho, ambas as lectinas diminuíram, de forma bastante acentuada, o processo nociceptivo de camundongos sob administração de Etanol/POA, evidenciando a capacidade dessas moléculas de modular o processo inflamatório, atenuando-o e melhorando inclusive aspectos sequenciais como a dor, possivelmente inflamatória.

Além de todos esses achados, uma característica interessante encontrada em todos os resultados tanto no modelo celular quanto animal, é que quando ConA e ConBr são administradas em condições basais, na ausência do agente lesivo Etanol/POA, ambas lectinas

não causam qualquer alteração no padrão fisiológico. Esse resultado é importante do ponto de vista clínico, uma vez que não seria interessante que a administração de moléculas focadas em melhorar aspectos patológicos, sejam eles celulares ou clínicos, causasse também alteração nos padrões fisiológicos. Um trabalho publicado por Amin e colaboradores (2010) nos ajuda a compreender o porquê desse efeito surpreendente dessas lectinas. Foi demonstrado por esse grupo de pesquisa que a lectina ConA apresenta atividade protetora de promoção de apoptose em células tumorais apenas quando o gene de supressão de tumor p53 está ativado, ou seja, em situações onde a própria célula reconhece o dano ali existente e tenta recrutar mecanismos internos para a sua morte. Nas células com padrão metabólico normal, ou seja, sem qualquer lesão e conseqüentemente sem ativação de p53, a capacidade pró-apoptótica de ConA é abolida (AMIN et al., 2010).

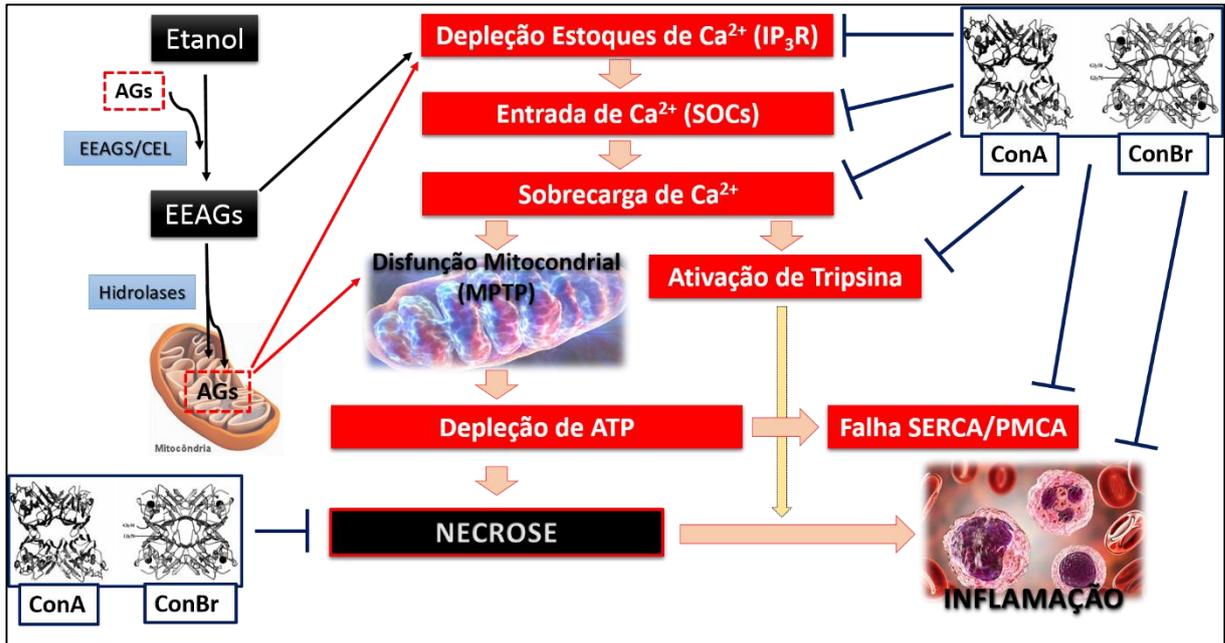
Diante de tantas propriedades benéficas dessas proteínas contra as lesões celulares e pancreatite aguda experimental causadas por Etanol/POA, resolvemos avaliar a possibilidade de toxicidade promovida por essas moléculas, a qual, caso existisse, excluiria qualquer potencialidade de uso terapêutico. Nesse sentido, o fígado é um órgão bastante sensível e passível de toxicidade de uma diversidade de substâncias, em vista disso, foi realizada nesta investigação a dosagem de transaminases hepáticas, as quais são marcadores rotineiramente utilizados na clínica para avaliar a funcionalidade desse órgão (ÇAĞLI et al., 2015). Ambas as lectinas não apresentaram nenhuma alteração nas dosagens de TGO e TGP, mantendo os valores em níveis basais, excluindo, assim, a possibilidade de toxicidade hepática causada por ConA e ConBr, reforçando ainda mais a potencialidade de uso dessas moléculas como possível alternativa terapêutica para a pancreatite aguda.

## 7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou, de forma pioneira, o perfil de atuação das lectinas ConA e ConBr como moléculas protetoras contra a pancreatite aguda alcoólica, correlacionando os efeitos celulares e sistêmicos nesse modelo de doença. Assim, ConA e ConBr previnem o aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  causado por metabólitos não oxidativos do etanol, possivelmente via interação com SOCs ou  $IP_3R$ , evitando dessa forma o aumento de  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , ativação prematura de zimogênios e necrose da célula acinar pancreática, sendo os dois últimos efeitos dependentes, pelo menos em parte, da interação com resíduos de açúcar nas células acinares. Ambas as lectinas protegem as células pancreáticas contra situações patológicas, mas não alteram o perfil de aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  oscilatório fisiológico causado pelo precipitante endógeno CCK. Além disso, ConA promove apoptose, possivelmente pela sua capacidade de internalização celular, enquanto ConBr está associada predominantemente à membrana plasmática, não promovendo morte celular nesse processo.

Através da pesquisa translacional, foi demonstrado que essas lectinas vegetais são eficazes na prevenção da necrose causada por precipitante alcoólico em células acinares pancreáticas humanas. Além disso, estas moléculas auxiliam no tratamento do processo doloroso e inflamatório da pancreatite aguda alcoólica experimental, possivelmente pela capacidade dessas moléculas de minimizarem as lesões celulares associadas ao estímulo lesivo de Etanol/POA, como a diminuição do aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  e necrose. Estes dados, em conjunto, reforçam o papel de ConA e ConBr como potenciais moléculas para investigações de tratamento no curso da pancreatite aguda alcoólica.

## 8. MODELO HIPOTÉTICO



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, A.; AWLA, D.; THORLACIUS, H.; REGNÉR, S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. **J Leukoc Biol.**, v. 90, p. 975–82, 2011.

ALENCAR, N.M.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediat. Inflamm.**, v. 8, p. 107–113, 1999.

AMIN, A.R.; PAUL, R.K.; THAKUR, V.S.; AGARWAL, M.L. A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, Concanavalin A. **Cancer Res.**, v. 15, n. 67, e. 12, p. 5617-21, 2007.

AMIN, A.R.; THAKUR, V.S.; GUPTA, K.; JACKSON, M.W.; HARADA, H.; AGARWAL, M.K.; SHIN, D.M.; WALD, D.N.; AGARWAL, M.L. Restoration of p53 functions protects cells from concanavalin A-induced apoptosis. **Mol Cancer Ther.**, v. 9, n. 2, p. 471-9, 2010.

AMMANN, R.W.; HEITZ, P.U.; KLÖPPEL, G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. **Gastroenterology**, v. 111, p. 224-231, 1996.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol.** v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ARMSTRONG, J.A.; CASH, N.J.; OUYANG, Y.; MORTON, J.C.; CHVANOV, M.; LATAWIEC, D.; AWAIS, M.; TEPIKIN, A.V.; SUTTON, R.; CRIDDLE, D.N. Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. **J Biol Chem.**, p. 8032-8047, 2018.

ASHBY, M.; TEPIKIN, A.V. Polarized calcium and calmodulin signaling in secretory epithelia. **Physiol. Rev.** v. 82, p. 701–734, 2002.

ASHMOLE, I.; et al. CRACM/Orai ion channel expression and function in human lung mast cells. **J Allergy Clin Immunol** v. 129(6), p. 1628–1635, 2012.

ASSREUY, A.M.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; DE SOUZA, M.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6, n. 3, p. 201-10, 1997.

BAHNSON, T.D.; PANDOL, S.J.; DIONNE, V.E. Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca<sup>2+</sup> entry in pancreatic acinar cells. **J Biol Chem** v. 268(15), p. 10808–10812, 1993.

BALLIANA, A.G.; MOURA, B.B.; INCKOT, R.C.; BONA, C. Development of *Canavalia ensiformis* in soil contaminated with diesel oil. **Environ Sci Pollut Res Int.** v. 24, n. 1, p. 979-986, 2017.

BALZARINI, J.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C.F.; DE CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; VANDEN MOOTER, G.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; SCHOLS, D. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 48, n. 10, p. 3858-3870, 2004.

BANO, D. et al. Cleavage of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in excitotoxicity. **Cell** v. 120, p. 275–285, 2005.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; DO NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 85, n. 1, p.160-9, 2006.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol Invest.** v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.

BATISTA, J.; RALPH, M.T.; VAZ, R.V.; SOUZA, P.; SILVA, A.B.; NASCIMENTO, D.; SOUZA, L.T.; RAMOS, M.V.; MASTROENI, P.; LIMA-FILHO, J.V. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, v. 25, p. 52-60, 2017.

BEST, C.A.; LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of Ethanol intake. **Frontiers in Bioscience**, v. 8, p. 202-217, 2003.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M. Selectins. **J. Clin. Investig.**, v. 91, p. 379–387, 1993.

BHARMAL, S.H.; PENDHARKAR, S.A.; SINGH, R.G.; GOODARZI, M.O.; PANDOL, S.J.; PETROV, M.S. Relationship between circulating levels of pancreatic proteolytic enzymes and pancreatic hormones. **Pancreatology**, v. 17, p. 876–883, 2017.

BIBHAS R.; ARUP K. P.; JOYJYOTI, D.; SUJIT, K. B.; BIRENDRA, B.; PRASHANT, S.; TAPAS K. M. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, 96–102, 2014.

BLOMME, B.; VAN STEENKISTE, C.; CALLEWAERT, N.; VAN VLIERBERGHE, H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J. Hepatol.**, v. 50, p. 592–603, 2009.

BOEHM, S.; HUCK, S. Presynaptic inhibition by concanavalin A: are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? **J Neurochem**. v. 71, n. 6, p. 2421-2430, 1998.

BRADLEY G. K. **Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology**, 5<sup>a</sup>ed. EUA, 624 p. 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. (2007) Informações de saúde - 2006 [acesso em 2014 out 25]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/mrbr.def>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações em Saúde - 2011 [acesso em 2014 out 25]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>.

BREITENBACH B.C.L.C.; MARCELINO, S.S.P, FELIX, O.W.; DE MOURA, M.C.; VIANA, P.E.; SOARES, G.F.; GUEDES, P.P.M.; NAPOLEÃO, T.H.; DOS SANTOS, C.M.T. Lectins as antimicrobial agents. **J Appl Microbiol.**, v. 25, n. 5, p. 1238-1252, 2018.

BRINCHMANN, M.F.; PATEL, D.M.; IVERSEN, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. **Mediators Inflamm.**, 2018.

BRINDA, K.V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Sci.** v. 13, n. 7, p. 1735-1749, 2004.

BURDAKOV, D. et al. Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. **Cell Calcium** v. 38, p. 303–310, 2005.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ALMEIDA DA ROCHA, I.M.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochim Biophys Acta.** v. 1430, p. 2, p. 367-375, 1999.

CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; HOOPER, L.V. Refolding, purification, and characterization of human and murine RegIII proteins expressed in Escherichia coli. **Protein Expr Purif.** v. 48, n. 1, p. 151-159, 2006.

ÇAĞLI, K.; BAŞAR, F.N.; TOK, D.; TURAK, O.; BAŞAR, Ö. How to interpret liver function tests in heart failure patients? **Turk J Gastroenterol.**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2015.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CERANOWICZ, P.; CIESZKOWSKI, J.; WARZECHA, Z.; DEMBINSKI, A. Experimental models of acute pancreatitis. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 69, p. 264-269, 2015.

CERVANTES, A.; SINGH, R.G.; PENDHARKAR, S.A.; BHARMAL, S.H.; PETROV, M.S. Profile of gut hormones, pancreatic hormones and proinflammatory cytokines in New Zealand Maori. **Gastroenterol Res.**, v. 11, n. 4, p. 280-289, 2018.

CHANDRASEKARAN, G.; LEE, Y.C.; PARK, H.; WU, Y.; SHIN, H.J. Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). **Int J Med Mushrooms**. v. 18(4), p. 291-299, 2016.

CHANG, C.P.; YANG, M.C.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; LEI, H.Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**. v. 45, n. 2, p. 286-296, 2007.

CLEMENS, D.; SCHNEIDER, K.J.; ARKFELD, C. K.; GRODE, J. R.; WELLS, M. A.; SINGH, S. Alcoholic pancreatitis: New insights into the pathogenesis and treatment. **World J Gastrointest Pathophysiol.**, v.7, n.1, p. 48-58, 2016.

CLEMENS, D.L.; WELLS, M.A.; SCHNEIDER, K.J.; SINGH, S. Molecular mechanisms of alcohol associated pancreatitis. **World J Gastrointest Pathophysiol.**, v. 5, n. 3, p. 147-57, 2014.

CRASKE, M. et al. Hormone-induced secretory and nuclear translocation of calmodulin: oscillations of calmodulin concentration with the nucleus as an integrator. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 96, p. 4426–4431, 1999.

CRIDDLE, D. N.; et al. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol triphosphate receptors and loss of ATP synthesis. *Gastroenterology* v. 130(3), p. 781–793, 2006.

CRIDDLE, D. N.; GERASIMENKO, J. V.; BAUMGARTNER, H. K.; JAFFAR, M.; VORONINA, S.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; GERASIMENKO, O. V. Calcium

signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1285-1294, 2007.

CRIDDLE, D. N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H. K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E. C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 40485-40492, 2006.

CRIDDLE, D. N.; MURPHY, J.; FISTETTO, G.; BARROW, S.; TEPIKIN, A. V.; NEOPTOLEMOS, J. P.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p.781–793, 2006.

CRIDDLE, D. N.; RARATY, M. G. T.; NEOPTOLEMOS, J. P.; TEPIKIN, A. V.; PETERSEN, O. H.; SUTTON, R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: Mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **PNAS**, v. 10, p. 10738-10743, 2004.

CRIDDLE, D.N.; GERASIMENKO, J.V.; BAUMGARTNER, H.K.; JAFFAR, M.; VORONINA, S.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; GERASIMENKO, O.V. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1285–1294, 2007.

CRIDDLE, D.N.; RARATY, M.G.; NEOPTOLEMOS, J.P.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H.; SUTTON, R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, n. 29, p. 10738–10743, 2004.

DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; DE SOUSA, F.A.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J Biol Chem.** v. 273, n. 20, p. 12082-8, 1998.

DA SILVA, P.M.; DE MOURA, M.C.; GOMES, F.S.; DA SILVA T. D.; SILVA DE O.A.P.; DE MELLO, G.S.V.; DA ROCHA, P.M.G.; DE MELO, R.M.J.B.; COELHO, L.C.B.B.;

MACEDO, A.J.; DE FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Int J Biol Macromol.** v. 108, p. 391-400, 2018.

DE CAMPOS, T.; BRAGA, C. F.; KURYURA, L.; HEBARA, D.; ASSEF, J. C.; RASSLAN, S. Changes in the management of patients with severe acute pancreatitis. **Arq Gastroenterol.**, v. 45, p. 181-185, 2008.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.; SOUZA, E.P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; MORENO, F.B.; FREITAS, B.T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO, W.F.JR.; CAVADA, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct Biol.** v. 2, p. 47-52, 2007.

DERLER, I.; et al. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. **Cell Calcium** v. 53(2), p. 139–151, 2013.

DE SOUZA, S. V.; SINGH, R. G.; YOON, H. D.; MURPHY, R.; PLANK, L. D.; PETROV, M. S. Pancreas volume in health and disease: a systematic review and meta-analysis. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 12, n. 8, p. 757-766, 2018.

DOLAI, S.; et al. Effects of ethanol metabolites on exocytosis of pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology** v. 143(3), p. 832–843, 2012.

DOYLE, K.M.; BIRD, D.A.; AL-SALIHI, S.; HALLAQ, Y.; CLUETTE-BROWN, J.E.; GOSS, K.A.; LAPOSATA, M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. **J Lipid Res.**, v. 35, p. 428-437, 1994.

DWYER, J.M.; JOHNSON, C. The use of concanavalin A to study the immunoregulation of human T cells. **Clinical and Experimental Immunology.** v. 46, n. 2, p. 237–249, 1981.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v. 316, p. 49-110, 2015.

ESTRADA-MARTÍNEZ, L.E.; MORENO-CELIS, U.; CERVANTES-JIMÉNEZ, R.; FERRIZ-MARTÍNEZ, R.A.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. **Int J Mol Sci.** v. 18, n. 7, p. E1403, 2017.

EVERTS, I.; PETROSKI, R.; KIZELSZTEIN, P.; TEICHBERG, V.I.; HEINEMANN, S.F.; HOLLMANN, M. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. **J Neurosci.** v. 19, n. 3, p. 916-927, 1999.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; DA SILVEIRA, A. L.; RAMOS, M. V.; MARQUES-SANTOS, L. F.; ARAUJO, D. A. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 25, n. 5, p. 290-6, 2011.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; SILVEIRA, A. L.; CAVALCANTI, B. C.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D. A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 1161–1169, 2012.

FESKE, S.; et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. **Nature** v. 441(7090), p. 179–185, 2006.

FREITAS, P.A.; ASSREUY, A.M.; LOPES, É.A.; CELEDÔNIO, N.R.; SOARES, C.E.; RODRIGUES, N.V.; SOUSA, P.L.; BENEVIDES, R.G.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; SANTOS, C.F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 2, p. 201-9, 2013.

FRIEDERICH, N. **Disease of the Pancreas. Cycloaedia of the Practice of Medicine.** Vol 18. New York: William Wood, 1878: 254-312.

FROSSARD, J.L.; STEER, M.L.; PASTOR, C.M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v. 371, v. 143-52, 2008.

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; LIMA, M.M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS, M.A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO, W.F.JR.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol.** v. 152, n. 3, p. 185-194, 2005.

GAISER, S.; DANILUK, J.; LIU, Y.; TSOU, L.; CHU, J.; LEE, W.; LONGNECKER, D.S.; LOGSDON, C.D.; JI, B. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. **Gut**, v. 60, n. 10, p. 1379-88, 2011.

GAISER, S.; DANILUK, J.; LIU, Y.; TSOU, L.; CHU, J.; LEE, W.; LONGNECKER, D.S.; LOGSDON, C.D.; JI, B. Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. **Gut**, v. 60, p. 1379–88, 2011.

GARBER, A.; FRAKES, C.; ARORA, Z.; CHAHAL, P. Mechanisms and Management of Acute Pancreatitis. **Gastroenterol Res Pract.** v. 15, p. 2018: 2098, 2018.

GERASIMENKO, J.V.; et al. Calmodulin protects against alcohol-induced pancreatic trypsinogen activation elicited via Ca<sup>2+</sup> release through IP<sub>3</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 108(14), p. 5873–5878, 2011.

GERASIMENKO, J.V.; GRYSHCENKO, O.; FERDEK, P.E.; STAPLETON, E.; HÉBERT, T.O.; BYCHKOVA, S.; PENG, S.; BEGG, M.; GERASIMENKO, O.V.; PETERSEN, O.H. Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 6; p. 13186-91, 2013.

GERASIMENKO, J.V.; GERASIMENKO, O.V.; PETERSEN, O.H. The role of Ca<sup>2+</sup> in the pathophysiology of pancreatitis. **J Physiol**, v. 592, n. 2, p. 269–280, 2014.

GERASIMENKO, J.V.; LUR, G.; SHERWOOD, M.W.; EBISUI, E.; TEPIKIN, A.V.; MIKOSHIBA, K.; GERASIMENKO, O.V.; PETERSEN, O.H. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on Ca<sup>2+</sup> release via acid store IP<sub>3</sub> receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 106, n. 26, p. 10758-63, 2009.

GERASIMENKO, J.V.; PENG, S.; TSUGORKA, T.; GERASIMENKO, O.V. Ca<sup>2+</sup> signalling underlying pancreatitis. **Cell Calcium**. v. 70, p. 95-101, 2018.

GERASIMENKO, J.V.; SHERWOOD, M.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H.; GERASIMENKO, O.V. NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. **J Cell Sci** v. 119, p. 226–238, 2006.

GERASIMENKO, J.V.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H.; GERASIMENKO, O.V. Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. **Curr Biol** v. 8(24), p. 1335–1338, 1998.

GOLDSTEIN, I.J.; PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. **Elsevier**. pp. 33–247. (2012).

GHOSH, S.; PLAYFORD, R.J. Bioactive natural compounds for the treatment of gastrointestinal disorders. **Clin Sci (Lond)**. v. 104, n. 6, p. 547-556, 2003.

GONZÁLEZ, A.; PARIENTE, J.A.; SALIDO, G.M. Ethanol impairs calcium homeostasis following CCK-8 stimulation in mouse pancreatic acinar cells. **Alcohol**, v. 42, p. 565-573, 2008.

GUERINI, D. et al. Exporting calcium from cells. **Cell Calcium** v. 38, p. 281–289, 2005.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur J Biochem**. v. 248, n. 1, p. 43-58, 1997.

GRYSHCHENKO O, GERASIMENKO J.V.; PENG, S.; GERASIMENKO, O.V.; PETERSEN, O.H. Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: physiology and pathophysiology. **J Physiol**, v. 596, n. 14, p. 2663-2678, 2018.

GU, H.; WERNER, J.; BERGMANN, F.; WHITCOMB, D. C.; BÜCHLER, M. W.; FORTUNATO, F. Necro-inflammatory response of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of acute alcoholic pancreatitis. **Cell Death Dis.**, v. 4, e. 816, 2013.

GUKOVSKAYA, A.S.; VAQUERO, E.; ZANINOVIC, V.; GORELICK, F.S.; LUSIS, A.J.; BRENNAN, M.L.; HOLLAND, S.; PANDOL, S.J. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 122, p. 974–84, 2002.

GUKOVSKAYA, A.S.; GUKOVSKY, I.; JUNG, Y.; MOURIA, M.; PANDOL, S. Cholecystokinin induces caspase activation and mitochondrial dysfunction in pancreatic acinar cells. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 22595–22604, 2002.

HABER, P.S.; APTE, M.V.; APPLGATE, T.L.; NORTON, I.D.; KORSTEN, M.A.; PIROLA, R.C.; WILSON, J.S. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. **J Lab Clin Med.**, v. 132, p. 294-302, 1998.

HABTEZION, A. Inflammation in Acute and Chronic Pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 31, e. 5, p. 395–399, 2015.

HALESTRAP, A.P.; RICHARDSON, A.P. The mitochondrial permeability transition: a current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 78, p. 129-41, 2015.

HAMADA, S.; MASAMUNE, A.; SHIMOSEGAWA, T. Management of acute pancreatitis in Japan: analysis of nationwide epidemiological survey. **World J Gastroenterol.**, v. 22, p. 6335–44, 2016.

HARDMAN, K.D.; AGARWAL, R.C.; FREISER, M.J. Manganese and calcium binding sites of concanavalin A. **J Mol Biol.** v. 157, n. 1, p. 69-86, 1982.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry.** v. 11, n. 26, p. 4910-4929, 1972.

HEBEL, R.; STROMBERG, M.W. **Anatomy of the laboratory rat.** Baltimore, Willinas & Wilkins, 1976.

HEIDT, D.; MULHOLLAND, M.; SIMONE, D. **Pancreas: anatomy and structural anomalies.** **Textbook of Gastroenterology.** 5. ed. Tadataka Yamada, 1747-1754 p, 2009.

HENRY, B. M.; SKINNINGSRUD, B.; SAGANIAK, K.; PEKALA, P. A.; WALOCHA, J. A.; TOMASZEWSKI, K. A. Development of the human pancreas and its vasculature - An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. **Ann Anat.**, v. 6, n. 221, v. 115-124, 2018.

HO, M.R.; LOU, Y.C.; WEI, S.Y.; LUO, S.C.; LIN, W.C.; LYU, P.C.; CHEN, C. Human RegIV protein adopts a typical C-type lectin fold but binds mannan with two calcium-independent sites. **J Mol Biol.** v. 402, n. 4, p. 682-695, 2010.

HOMMEL, K.A.; MODI, A.C.; PIAZZA-WAGGONER, C.; MYERS JD. Topical Review: Translating Translational Research in Behavioral Science. **J Pediatr Psychol.**, v. 40, n. 10, p. 1034-40, 2015.

HOTH, M.; PENNER, R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. **Nature** v. 355(6358), p. 353–356, 1992.

HU, G.; SHEN, J.; CHENG, L.; GUO, C.; XU, X.; WANG, F.; HUANG, L.; YANG, L.; HE, M.; XIANG, D.; ZHU, S.; WU, M.; YU, Y.; HAN, W.; WANG, X. Reg4 protects against acinar cell necrosis in experimental pancreatitis. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 820-8, 2011.

HU, J.; LI, P.; ZHANG, T. Rhubarb combined with trypsin inhibitor for severe acute pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. **Phytother Res.**, v. 32, n. 8, p. 1450-1458, 2018.

HUANG, C.L.; HUANG, N.K.; SHYUE, S.K.; CHERN, Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. **J Neurochem.** v. 86, n. 5, p. 1247-1259, 2003.

HUANG, W.; BOOTH, D. W.; CANE, M. C.; CHVANOV, M.; JAVED, M. A.; ELLIOTT, V. L.; ARMSTRONG, J. A.; DINGS DALE, H.; CASH, N.; LI, Y.; GREENHALF, W.; MUKHERJEE, R.; KAPHALIA, B. S.; JAFFAR, M.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; CRIDDLE, D. N. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 63, p. 1313-1324, 2014.

HUANG, W.; CANE, M.C.; MUKHERJEE, R.; SZATMARY, P.; ZHANG, X.; ELLIOTT, V.; OUYANG, Y.; CHVANOV, M.; LATAWIEC, D.; WEN, L.; BOOTH, D.M.; HAYNES, A.C.; PETERSEN, O.H.; TEPIKIN, A.V.; CRIDDLE, D.N.; SUTTON, R. Caffeine protects against experimental acute pancreatitis by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release. **Gut**, v. 66, n. 2, p. 301-313, 2017.

INA, C.; SANO, K.; YAMAMOTO-TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA-OIKAWA, H.; TAKEKAWA, H.; TAKEHARA, Y.; UEDA, H.; OGAWA, H. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochim Biophys Acta**. v. 1726, n. 1, p. 21-27, 2005.

JACQUES, A.V.; RIEGER, D.K.; MAESTRI, M.; LOPES, M.W.; PERES, T.V.; GONÇALVES, F.M.; PEDRO, D.Z.; TASCA, C.I.; LÓPEZ, M.G.; EGEEA, J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochem Int**. v. 62, n. 6, p. 836-842, 2013.

JIANG, Q.L.; ZHANG, S.; TIAN, M.; ZHANG, S.Y.; XIE, T.; CHEN, D.Y.; CHEN, Y.J.; HE, J.; LIU, J.; OUYANG, L. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Prolif.**, v. 48, p. 17–28, 2015.

JIN, T.; JIANG, K.; DENG, L.; GUO, J.; WU, Y.; WANG, Z.; SHI, N.; ZHANG, X.; LIN, Z.; ASRANI, V.; JONES, P.; MITTAL, A.; PHILLIPS, A.; SUTTON, R.; HUANG, W.; YANG, X.; XIA, Q.; WINDSOR, J.A. Response and outcome from fluid resuscitation in acute pancreatitis: a prospective cohort study. **HPB (Oxford)**, v. 20, n. 11, p. 1082-1091, 2018.

JONAS, L.; PUTZKE, H. Light and electron microscopic studies of lectin binding. Glycocalix of rat pancreatic cells. II. Light microscopic changes after induction of an oil-olive pancreatitis. **Acta Histochem.**, v. 93, p. 388–396, 1992.

KAWABATA, S.; MIURA, T.; MORITA, T.; KATO, H.; FUJIKAWA, K.; IWANAGA, S.; TAKADA, K.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. Highly sensitive peptide-4-methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. **European journal of biochemistry /FEBS**, v. 172, p. 17-25, 1988.

KIM, J.Y. et al. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca<sup>2+</sup>-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. **Gastroenterology** v. 122, p. 1941–1953, 2002.

KIM, M. S.; et al. Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca<sup>2+</sup> influx and the severity of acute pancreatitis. **Gastroenterology** v. 137, n. 4, p. 1509–1517, 2009.

KIM, J.Y.; KIM, D.H.; KIM, D.S.; KIM, J.H.; JEONG, S.Y.; JEON, H.B.; LEE, E.H.; YANG, Y.S.; OH, W.; CHANG, J.W. Galectin-3 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta<sub>42</sub> neurotoxicity in vitro. **FEBS Lett.** v. 584, n. 16, p. 3601-3608, 2010.

KOHARUDIN, L.M.; GRONENBORN, A.M. Antiviral lectins as potential HIV microbicides. **Curr Opin Virol.** v. 7, p. 95-100, 2014.

KRAUSE, E.; PFEIFFER, F.; SCHMID, A.; SCHULZ, I. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. **J Biol Chem** v. 271(51), p. 32523–32528, 1996.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 12-42, 2017.

LAI, Y.C.; CHUANG, Y.C.; CHANG, C.P.; YEH, T.M. Macrophage migration inhibitory factor has a permissive role in concanavalin A-induced cell death of human hepatoma cells through autophagy. **Cell Death and Disease**, v. 6, 2015.

LANG, F.; EYLENSTEIN, A.; UMILINA, E. Regulation of Orai1/STIM1 by the kinases SGK1 and AMPK. **Cell Calcium**. v. 52(5), p. 347-54, 2012.

LANKISCH, P.G.; APTE, M.; BANKS, P.A. Acute pancreatitis. **Lancet**, n. 386, p. 85–96, 2015.

LAPOSATA M. Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. **Prog Lipid Res.**, v. 37, 1998.

LAPOSATA, E.A.; LANGE, L.G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. **Science**, v. 231, p. 497-499, 1986.

LATHA, V.L.; RAO, R.N.; NADIMPALLI, S.K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of Dolichos lablab (Indian lablab beans). **Protein Expr Purif**. v. 45, n. 2, p. 296-306, 2006.

LERCH, M.M.; GORELICK, F.S. Early trypsinogen activation in acute pancreatitis. **Med Clin North Am.**, v. 84, n. 3, p. 549-63, 2000.

LERCH, M.M.; HALANGK, W.; MAYERLE, J. Preventing pancreatitis by protecting the mitochondrial permeability transition pore. **Gastroenterology**, v. 144, p. 265-69, 2013.

LEUNG, P. S. Physiology of the pancreas. In: **The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in the Pancreas**. Netherlands: Springer, 13-27 p, 2010.

LI, C.Y.; XU, H.L.; LIU, B.; BAO, J.K. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Curr Mol Pharmacol.**, v. 3, n. 3, p. 123-8, 2010.

LIN, S.S.; LEVITAN, I.B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends Neurosci**. v. 14, n. 7, p. 273-277, 1991.

LI, W.W.; YU, J.Y.; XU, H.L.; BAO, J.K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 414, n. 2, p. 282-6, 2011.

LIU, J.; et al. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. **Curr Biol** v. 15(13), p. 1235–1241, 2005.

LITYNSKA, A.; PRZYBYUULO, M.; POCHEC, E.; HOJA-UULUKOWICZ, D.; CIOUULCZYK, D.; LAIDLER, P.; GIL, D. Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. **Melanoma Res.**, v. 11, p. 205–212, 2001.

LIU, B.; LI, C.Y.; BIAN, H.J.; MIN, M.W.; CHEN, L.F.; BAO, J.K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, p. 1–6, 2009.

LOGSDON, C.D.; JI, B. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 10, n. 6, p. 362-70, 2013.

LONGNECKER, D. **Anatomy and Histology of the Pancreas. Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base**, 2014.

LOPEZ, O.; FRANCONETTI, A.; FERNANDEZ-BOLANOS, J.G. Carbohydrates: potential sweet tools against cancer. **Curr Med Chem**, 2018.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta**. v. 1383(1), p. 9-36, 1998.

LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J Mol Biol**, 335: 1227–1240, 2004.

LUR, G.; et al. Ribosome-free terminals of rough ER allow formation of STIM1 puncta and segregation of STIM1 from IP(3) receptors. **Curr Biol** v. 19(19), p. 1648–1653, 2009.

LV, H.; LIU, A.; ZHAO, Y.; QIAN, J. Comparison of clinical characteristics of radiological forms of autoimmune pancreatitis. **HPB (Oxford)**, v. 20, n. 11, p. 1021-1027, 2018.

MENTEYNE, A.; BURDAKOV, A.; CHARPENTIER, G.; PETERSEN, O.H.; CANCELA, J.M. Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers. **Curr Biol** v. 16(19), p. 1931–1937, 2006.

MILAT, A.J.; LI, B. Narrative review of frameworks for translating research evidence into policy and practice. **Public Health Res Pract.**, v. 27, n. 1, 2017.

MIYASAKA, K.; FUNAKOSHI, A. Luminal feedback regulation, monitor peptide, CCK-releasing peptide, and CCK receptors. **Pancreas**, v. 16, p. 277–283, 1998.

MOREIRA, R.A.; AINOUZ, I.L.; DE OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; v. 2, p. 211-218, 1991.

MUKHERJEE, R.; MARENINOVA, O.A.; ODINOKOVA, I.V.; HUANG, W.; MURPHY, J.; CHVANOV, M.; JAVED, M.A.; WEN, L.; BOOTH, D.M.; CANE, M.C.; AWAIS, M.; GAVILLET, B.; PRUSS, R.M.; SCHALLER, S.; MOLKENTIN, J.D.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H.; PANDOL, S.J.; GUKOVSKY, I.; CRIDDLE, D.N.; GUKOVSKAYA, A.S.; SUTTON, R.; NIHR Pancreas Biomedical Research Unit. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. **Gut**, v. 65, n. 8, p. 1333-46, 2016.

MURPHY, P. B.; PASKAR, D.; HILSDEN, R.; KOICHOPoulos, J.; MELE, T. S. Acute care surgery: a means for providing cost-effective, quality care for gallstone pancreatitis. **World J Emerg Surg.**, v. 28, p.12-20, 2017.

NATHAN, J.D.; ROMAC, J.; PENG, R.Y.; PEYTON, M.; MACDONALD, R.J.; LIDDLE, R.A. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ameliorates secretagogue-induced pancreatitis in mice. **Gastroenterology**, v.128, p.717-27, 2005.

NAWROT-PORABKA, K.; JAWOREK, J.; LEJA-SZPAK, A.; KOT, M.; LANGE, S. The role of antisecretory factor in pancreatic exocrine secretion: studies in vivo and in vitro. **Exp Physiol.**, v. 100, n. 3, p. 267-277, 2015.

NETTER, F.H. **Atlas de anatomia humana 5/ E** - Edição especial com Netter 3d, 5ed, Elsevier, 2011.

NORTON, I.D.; APTE, M.V.; HABER, P.S.; MCCAUGHAN, G.W.; PIROLA, R.C.; WILSON, J.S. Cytochrome P4502E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. **Gut**, v. 42, p. 426-430, 1998.

NG, S. W.; DI, C. J.; SINGARAVELU, K.; PAREKH, A.B. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. **J Biol Chem** v. 283(46), p. 31348–31355, 2008.

OIVA, J.; MUSTONEN, H.; KYLÄNPÄÄ, M.L.; KUULIALA, K.; SIITONEN, S.; KEMPPAINEN, E.; PUOLAKKAINEN, P.; REPO, H. Patients with acute pancreatitis complicated by organ dysfunction show abnormal peripheral blood polymorphonuclear leukocyte signaling. **Pancreatology**, v. 13, p. 118–24, 2013.

ORIÁ, R.B., BRITO, G.A.C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. 1ª. ed. São Paulo: Blucher, 38p., 2016.

OWYANG, C. Discovery of a cholecystokinin releasing peptide: biochemical characterization and physiological implications. **Chin J Physiol**, v. 42, p. 113–120, 1999.

PANDA, P.K.; MUKHOPADHYA, Y.S.; BEHERA, B.; BHOL, C.S.; DEY, S.; DAS, D.N.; SINHA, N.; BISSOYI, A.; PRAMANIK, K.; MAITI, T.K.; BHUTIA, S.K. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sci**. v. 111, n. 1-2, p. 27-35, 2014.

PANDOL, S. J. Acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 22, p. 481-486, 2010.

PAREKH, A.B.; PUTNEY, J.W. JR. Store-operated calcium channels. **Physiol Rev** v. 85(2), p. 757–810, 2005.

PARK, C.Y.; et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. **Cell** v. 136(5), p. 876–890, 2009.

PENDHARKAR, S.A.; ASRANI, V.M.; MURPHY, R.; CUTFIELD, R.; WINDSOR, J.A.; PETROV, M.S. The role of gut–brain axis in regulating glucose metabolism after acute pancreatitis. **Clin Transl Gastroenterol.**, v. 8, n. 1, 2017.

PETERSEN, O.H. Stimulus-secretion coupling: Cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells. **J Physiol.**, v. 448, p. 1 – 51, 1992.

PETERSEN, O.H. Ca<sup>2+</sup> signalling and Ca<sup>2+</sup>-activated ion channels in exocrine acinar cells. **Cell Calcium** v. 38, p. 171–200, 2005.

PETERSEN, O.H.; SUTTON, R. Ca<sup>2+</sup> signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. **Trends Pharmacol Sci.** v. 27(2), p. 113-20, 2006.

PETERSEN, O.H.; TEPIKIN, A.V. Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. **Annu Rev Physiol.**, v. 70, p. 273 – 299, 2008.

PETROV, M.S.; SHANBHAG, S.; CHAKRABORTY, M.; PHILLIPS, A.R.; WINDSOR, J.A. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 139, p. 813-20, 2010.

PEUMANS, W.J; VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiol.* v. 109, p. 347-352, 1995.

PINTO, N.V.; SANTOS, C.F.; CAVADA, B.S.; DO NASCIMENTO, K.S.; PEREIRA, J.F.N.; PIRES, A.D.E.F.; ASSREUY, A.M. Homologous *Canavalia* lectins elicit different patterns of antinociceptive responses. **Nat Prod Commun.**, n. 11, p. 1621-4, 2013.

PIRES, A.F; ASSREUY, A. M.; LOPES, É. A.; CELEDÔNIO, N. R.; SOARES, C. E.; RODRIGUES, N. V.; SOUSA, P. L.; BENEVIDES, R. G.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n.2, p. 201–209, 2013.

PIRES, A.F.; CAVADA, B.S.; SOUZA, A.N.C.; LARANJEIRA, E.P.P.; CAJAZEIRAS, J.B.; ASSREUY, A.M.P.; SANTOS, C.F. Alternative pathways involved in the antinociceptive effect of *Canavalia brasiliensis* lectin: nitric oxide and the adrenergic system. **Current Topics in Pharmacology**, v.18, 2014.

RALPH, M.T.; SILVA, D.L.; DE ALENCAR, N.M.; RAMOS, M.V.; LIMA-FILHO, J.V. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. **Int Immunopharmacol.**, v. 31, p. 233-8, 2016.

RARATY, M. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 97, p. 13126–13131, 2000.

REECE, W. O. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. 3<sup>a</sup>ed. Sao Paulo, SP: Roca, 468 p., 2008.

REIS, E.A.G.; ATHANAZIO, D.A.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; DE PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; CARMO, T.M.A.; REIS, A.; TROCOLLI, G.; CRODA, J.; HARN, D.; et al. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Trop.**, v. 108, p. 160–165, 2008.

RICE, L.V.; et al. Characterization of selective Calcium-Release Activated Calcium channel blockers in mast cells and T-cells from human, rat, mouse and guinea-pig preparations. **Eur J Pharmacol** v. 704(1-3), p. 49–57, 2013.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F.D.; MOREIRA, R.A.; AINOZ, I.L.; BEGBIE, R.; WATT, W.B.; PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major alpha subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Eur J Biochem.** v. 144, n. 1, p. 101-111, 1984.

RIEGER, D.K.; NAVARRO, E.; BUENDIA, I.; PARADA, E.; GONZÁLEZ-LAFUENTE, L.; LEON, R.; COSTA, A.P.; HEINRICH, I.A.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LOPEZ, M.G.; EGEA, J.; LEAL, R.B. ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential

Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. **Neurochem Res.**, v. 42, n. 2, p. 347-359, 2017.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration with arylaminonaphthalenesulfonates. **Arch Biochem Biophys.** v. 224, n. 2, p. 479-84, 1983.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J.T.; DE-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res.** v. 25, n. 8, p. 823-826, 1992.

ROMPIANESI, G.; HANN, A.; KOMOLAFE, O.; PEREIRA, S.P.; DAVIDSON, B.R.; GURUSAMY, K.S. Serum amylase and lipase and urinary trypsinogen and amylase for diagnosis of acute pancreatitis. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 4, 2017.

ROSTOCK, M.; HUBER, R.; GREINER, T.; FRITZ, P.; SCHEER, R.; SCHUELER, J.; FIEBIG, H.H. Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts. **Anticancer Res.**, v. 25, p. 1969–1975, 2005.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J.** v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.

RUHUL AMIN, A.R.M.; RAJIB, K.P.; VIJAY, S.T.; MUNNA, L.A. A Novel Role for p73 in the Regulation of Akt-Foxo1a-Bim Signaling and Apoptosis Induced by the Plant Lectin, Concanavalin A. **Cancer Res.**, v. 67, p.12-15, 2007.

RUHUL AMIN, A.R.M.; VIJAY, S.T.; KALPANA, G.; MARK, W.J.; HISASHI, H.; MUKESH, K.A.; DONG, M.S.; DAVID, N.W.; MUNNA, L.A. Restoration of p53 Functions Protects Cells from Concanavalin A–Induced Apoptosis. **American Association for Cancer Research**, v. 2, p. 471-479, 2010.

RUMBUS, Z.; TOTH, E.; POTO, L.; VINCZE, A.; VERES, G.; CZAKO, L.; OLAH, E.; MARTA, K.; MIKO, A.; RAKONCZAY, Z. J.; BALLA, Z.; KASZAKI, J.; FOLDESI, I.;

MALETH, J.; HEGYI, P.; GARAMI, A. Bidirectional Relationship Between Reduced Blood pH and Acute Pancreatitis: A Translational Study of Their Noxious Combination. **Front Physiol.**, v. 9, n. 1360, 2018.

RUSSI, M.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D.K.; COSTA, A.P.; LOPES, M.W.; CUNHA, R.M.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; TASCA, C.I.; LEAL, R.B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochem Res.** v. 37, n. 2, p. 288-297, 2012.

SALUJA, A.K.; BHAGAT, L.; LEE, H.S.; BHATIA, M.; FROSSARD, J.L.; STEER, M. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. **Am. J. Physiol.** v. 276, p. G835–G842, 1999.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Lett.** v. 405, n. 1, p. 114-128, 1997.

SATOH, T.; KATO, K. Structural Aspects of ER Glycoprotein Quality-Control System Mediated by Glucose Tagging. **Adv Exp Med Biol.** v. 1104, p. 149-169, 2018.

SCHERER, W.J.; UDIN, S.B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. **Brain Res.** v. 667, n. 2, p. 209-215, 1994.

SEHGAL P, SZALAI P, OLESEN C, PRAETORIUS HA, NISSEN P, CHRISTENSEN SB, ENGEDAL N, MØLLER JV. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup>-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca<sup>2+</sup> depletion and the unfolded protein response. **J Biol Chem.** 2017 Dec 1;292(48):19656-19673.

SEO, S.W.; JUNG, W.S.; LEE, S.E.; CHOI, C.M.; SHIN, B.C.; KIM, E.K.; KWON, K.B.; HONG, S.H.; YUN, K.J.; PARK, R.K.; SHIN, M.K.; SONG, H.J.; PARK, S.J. Effects of bee venom on cholecystokinin octapeptide-induced acute pancreatitis in rats. **Pancreas**, v. 36, p. 22–29, 2008.

SILVA, F.O.; SANTOS, P.; FIGUEIRÔA, E.O.; DE MELO, C.M.; DE ANDRADE, L.N.J.K.; ARRUDA, F.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; DO NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; PORTO, A.L.; PEREIRA, V.R. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Res Vet Sci**. v. 96, n. 2, p. 276-282, 2014.

SHALBUEVA, N.; MARENINOVA, O.A.; GERLOFF, A.; YUAN, J.; WALDRON, R.T.; PANDOL, S.J.; GUKOVSKAYA, A.S. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 144, p. 437-446, 2013.

SHALBUEVA, N.; MARENINOVA, O.A.; GERLOFF, A.; YUAN, J.; WALDRON, R.T.; PANDOL, S.J.; GUKOVSKAYA, A.S. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. **Gastroenterology**, n. 144, p. 437-446, 2013.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem**. v. 30, p. 59-75, 1995.

SHERWOOD, M.W.; et al. Activation of trypsinogen in large endocytic vacuoles of pancreatic acinar cells. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 104(13), p. 5674-5679, 2007.

SHI, Z.; AN, N.; ZHAO, S.; LI, X.; BAO, J.K.; YUE, B.S. In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Prolif.**, v. 46, n. 1, p. 86-96, 2013.

SHI, Z.; CHEN, J.; LI, C.Y.; AN, N.; WANG, Z.J.; YANG, S.L.; HUANG, K.F.; BAO, J.K. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, p. 248-256, 2014.

SHI, Z.; CHEN, J.; LI, C.Y.; AN, N.; WANG, Z.J.; YANG, S.L.; HUANG, K.F.; BAO, J.K. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 35, n. 2, p. 248-56, 2014.

SINGH, S.; SINGH, D.K. Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaea acuminata*. *Phytother Res.* v. 13, n. 3, p. 210-213, 1999.

SINGH, P.; GARG, P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. **Indian J Gastroenterol.**, v. 35, n. 3, p. 153-66, 2016.

SKANDALAKIS, J.E.; SKANDALAKIS, P.J. **Surgical anatomy and technique**. New York: Springer, p. 381-91, 2009.

SOUZA, M.A.; CARVALHO, F.C.; RUAS, L.P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj. J.*, v. 30, p. 641–657, 2013.

SRINIVAS, B.K.; SHIVAMADHU, M.C.; JAYARAMA, S. Angio-Suppressive Effect of Partially Purified Lectin-like Protein from *Musa acuminata* pseudostem by Inhibition of VEGF-Mediated Neovascularization and Induces Apoptosis Both In Vitro and In Vivo. **Nutr Cancer.** v. 29, p. 1-16, 2018.

STAUDER, H.; KREUSER, E.D. Mistletoe extracts standardised in terms of mistletoe lectins (ML I) in oncology: current state of clinical research. **Onkologie.** v. 25, n. 4, p. 374-380, 2002.

STREB, H.; IRVINE, R.F.; BERRIDGE, M.J.; SCHULZ, I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. **Nature.** v. 306 (5938), p. 67 – 69, 1983.

SUSEELAN, K.N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K.B.; KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Arch Biochem Biophys.** v. 407, n. 2, p. 241-247, 2002.

THALHAMMER, A.; EVERTS, I.; HOLLMANN, M. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by the lectin's sugar specificity at kainate but not AMPA receptors. **Mol Cell Neurosci.** v. 21, n. 4, p. 521-533, 2002.

TALUKDAR, R.; SWAROOP-VEGE, S. Early management of severe acute pancreatitis. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 13, p. 123-130, 2011.

THIRUVENGADAM, M.; GAJENDRAN, M.; THIRUVENGADAM, S.; RAGHURAM, K.; SEEMA, R.; DEVARAJ, P. Acute Pancreatitis. **Disease-A-Month**, v. 58, p. 98-144, 2012.

TRÖGER, W.; GALUN, D.; REIF, M.; SCHUMANN, A.; STANKOVIĆ, N.; MILIĆEVIĆ, M. Viscum album [L.] extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A randomised clinical trial on overall survival. **Eur. J. Cancer**, v. 49, p. 3788–3797, 2013.

VAN KRUCHTEN, R.; et al. Antithrombotic potential of blockers of store-operated calcium channels in platelets. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** v. 32(7), p. 1717–1723, 2012.

VORONINA, S. et al. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells. Implications for bile-induced pancreatic pathology. **J. Physiol.** V. 540, p. 49–55, 2002.

VORONINA, S. et al. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating Djm. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 27327–27338, 2004.

UNITT, J.; HORNIGOLD, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **Biochem Pharmacol.** v. 81, n. 11, p. 1324-1328, 2011.

WAKUI, M. et al. Receptor-activated cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> spiking mediated by inositol trisphosphate is due to Ca<sub>2</sub>C-induced Ca<sub>2</sub>C release. **Cell** v. 63, p. 1025–1032, 1990.

WANG, G.J.; GAO, C.F.; WEI, D.; WANG, C.; DING, S.Q. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 15, p. 1427-1430, 2009.

WANG, H.; NG, T.B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiol Biochem.** v. 44, n. 4, p. 181-185, 2006.

WANG, J.; CHEN, G.; GONG, H.; HUANG, W.; LONG, D.; TANG, W. Amelioration of experimental acute pancreatitis with dachengqi decoction via regulation of necrosis-apoptosis switch in the pancreatic acinar cell. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

WANG, Y.; FUENTES, H.E.; ATTAR, B.M.; JAISWAL, P.; DEMETRIA, M. Evaluation of the prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 17, n. 6, p. 893-897, 2017.

WEN, L.; VORONINA, S.; JAVED, M.A.; AWAIS, M.; SZATMARY, P.; LATAWIEC, D.; CHVANOV, M.; COLLIER, D.; HUANG, W.; BARRETT, J.; BEGG, M.; STAUDERMAN, K.; ROOS, J.; GRIGORYEV, S.; RAMOS, S.; ROGERS, E.; WHITTEN, J.; VELICELEBI, G.; DUNN, M.; TEPIKIN, A.V.; CRIDDLE, D.N.; SUTTON, R. Inhibitors of ORAI1 Prevent Cytosolic Calcium-Associated Injury of Human Pancreatic Acinar Cells and Acute Pancreatitis in 3 Mouse Models. **Gastroenterology**, v. 149, n. 2, p. 481-92, 2015.

WERNER J, et al. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. **Gastroenterology** v. 113(1), p. 286–294, 1997.

WILLEMER, S.; KOHLER, H.; NAUMANN, R.; KERN, H.F.; ADLER, G. Glycoconjugate pattern of membranes in the acinar cell of the rat pancreas. **Histochemistry**, v. 93, p. 319-326, 1990.

YAGI, H.; KATO, K. Functional roles of glycoconjugates in the maintenance of stemness and differentiation process of neural stem cells. **Glycoconj J.**, v. 34, n. 6, p. 757-763, 2017.

YANG, Z.W.; MENG, X.X.; XU, P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 19, n. 11, p. 2513-2520, 2015.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C.C.; NG, T.B. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules**. v. 20, n. 3, p. 3791-3810, 2015.

YU, L-T.; YANG, M-Q.; LIU, J-L.; ALFRED, M.O.; LI, X.; ZHANG, X-Q.; ZHANG, J.; WU, M-Y.; WANG, M.; LUO, C. Recombinant Reg3a protein protects against experimental acute pancreatitis in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 422, p. 150-159, 2016.

YUAN, J.P.; et al. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. **Nat Cell Biol** v. 11(3), p. 337–343, 2009.

Zheng, Q.; Yang, L.; Yang, J.; Zhou, S.; Zhou, L.; Han, R.; Hao, X.; Ma, Y. [Heparin-binding hemagglutinin enhances *Mycobacterium smegmatis* infection by inhibiting autophagy in A549 cells]. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**. v. 30, n. 7, p. 696-699, 2014.

ZIATABAR, S.; ZEPF, J.; RICH, S.; DANIELSON, B.T.; BOLLYKY, P.I.; STERN, R. Chitin, chitinases, and chitin lectins: Emerging roles in human pathophysiology. **Pathophysiology**. v. 25, n. 4, p. 253-262, 2018.

**ANEXOS**

## ANEXO I



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DE CONA E CONBR EM MODELOS DE LESÃO PANCREÁTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* INDUZIDA POR ÁCIDO BILIAR E ETANOL/ÁCIDO PALMITOLEICO", protocolo nº25/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 23 de maio de 2016.

Vigência do projeto	01/03/2016 a 31/12/2019
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	736
Peso/Idade	25-30g - Adulto
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 23 de maio de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siapa: 1520734

## ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do Efeito de Proteínas Vegetais nos Fenômenos de Morte Celular em Células Acinares Pancreáticas Humanas

**Pesquisador:** Samara Rodrigues Bonfim Damasceno

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 57397816.5.0000.5054

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.764.066

**Apresentação do Projeto:**

Avaliação do Efeito de Proteínas Vegetais nos Fenômenos de Morte Celular em Células Acinares Pancreáticas Humanas.

A pancreatite é uma doença inflamatória do pâncreas que envolve uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Essa doença desenvolve-se rapidamente, podendo levar a complicações fatais como insuficiência pulmonar, renal e circulatória (BHATIA et al., 2000). Apesar dos estudos exaustivos, inúmeras lacunas persistem na fisiopatologia da pancreatite aguda, sendo ainda uma questão controversa (LONGO et al., 2011). Acredita-se que a exposição a um fator causal, como cálculos biliares, álcool e trauma, desencadeia uma cascata de eventos patológicos, resultando em alterações locais e sistêmicas (LONGO et al., 2011; THIRUVENGADAM et al., 2012). Produtos naturais, como proteínas vegetais, têm sido amplamente utilizados na tentativa de melhor compreender a fisiopatologia da pancreatite aguda. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos das lectinas ConA e ConBr em células acinares pancreáticas humanas no modelo de lesão celular induzida por sais biliares e álcool, bem como o envolvimento da morte celular em tal processo.

Para tanto, o presente projeto será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), bem

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**CEP:** 60.430-275

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.764.066

como à credenciação pelo Conselho Nacional de Saúde (CONEP)/ Ministério da Saúde (MS) e só será executado após sua aprovação. Os tecidos pancreáticos serão retirados de doadores de órgãos disponibilizados pela central de transplantes da secretaria de saúde do estado do Ceará, já doadores de outros órgãos para transplante. As células isoladas a partir deste tecido serão utilizadas para estudos de morte celular, utilizando técnicas de microscopia confocal e biologia molecular em tal processo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar os efeitos das lectinas ConA e ConBr em células acinares pancreáticas humanas no modelo de lesão celular induzida por sais biliares e álcool, bem como o envolvimento da morte celular em tal processo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Esta pesquisa não acarretará riscos para os envolvidos; em contrapartida, trará benefícios para a sociedade, fornecendo subsídios para uma melhor compreensão dessa doença tão complexa, cuja cura ainda é desconhecida.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Foram realizados os ajustes solicitados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme as resolução 466 de 12 de dezembro de 2012.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

SEGUNDO A RESOLUÇÃO 466 DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012.

As PENDÊNCIAS FORAM ATENDIDAS E OS DOCUMENTOS LISTADOS ABAIXO FORAM ANEXADOS e OS AJUSTES FORAM COLOCADOS NO TCLE

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**CEP:** 60.430-275

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.764.066

1-documento comprobatório da morte encefálica.

2-consentimento explícito, diretiva antecipada da vontade da pessoa, ou consentimento dos familiares e/ou do representante legal.

Acrescentado a inexistência de ônus econômico financeiro adicional à família.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_735449.pdf	21/09/2016 13:26:26		Aceito
Outros	11_Documento_Morte_Encefalica.pdf	21/09/2016 13:25:57	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	03_TCLE_Modificado.pdf	21/09/2016 13:22:20	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	02_Apresentacao_de_Projeto_SAMARA.pdf	28/06/2016 15:57:34	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Outros	10_Termo_de_Compromisso.pdf	20/06/2016 19:30:25	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Outros	09_Termo_de_Fiel_Depositario.pdf	20/06/2016 19:27:48	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Cronograma	08_cronograma.pdf	20/06/2016 19:25:14	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Declaração de Pesquisadores	07_Declaracao_de_Concordancia.pdf	20/06/2016 19:24:41	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Outros	06_CV_Samara_Rodrigues_Bonfim_Damasceno.pdf	20/06/2016 19:23:55	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito
Declaração de Instituição e	05_Carta_de_Anuencia.pdf	20/06/2016 19:19:22	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceito

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE **Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



Continuação do Parecer: 1.764.066

Infraestrutura	05_Carta_de_Anuencia.pdf	20/06/2016 19:19:22	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceitc
Orçamento	04_Declaracao_de_Orcamento.pdf	20/06/2016 19:05:58	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceitc
Folha de Rosto	01_FOLHA_DE_ROSTO.pdf	20/06/2016 19:04:24	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceitc
Outros	00_Carta_de_solicitacao_de_apreciacao.pdf	08/06/2016 09:38:42	Samara Rodrigues Bonfim Damasceno	Aceitc

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FORTALEZA, 06 de Outubro de 2016

---

**Assinado por:**  
**FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE **Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

## ANEXO III

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

Pelo presente termo de consentimento, eu \_\_\_\_\_ (Responsável pela doação),  
 \_\_\_\_\_ (identidade), \_\_\_\_\_ (naturalidade), \_\_\_\_\_  
 (estado civil), residente a \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ (endereço), cidade de \_\_\_\_\_,  
 (parentesco) do \_\_\_\_\_  
 (doador), internado no Hospital \_\_\_\_\_ no  
 dia \_\_\_\_\_, prontuário: \_\_\_\_\_, que teve sua morte encefálica  
 (comprovada através do termo de declaração de morte encefálica - Res. CFM nº 1.480 de  
 08/08/97) e/ou PCR às \_\_\_\_\_ do dia \_\_\_\_\_, e após exames clínicos e  
 complementares por equipe médica especializada, autorizo, de minha livre e espontânea  
 vontade, a remoção de fragmentos de tecido pancreático, bem como o acesso ao prontuário  
 médico do (a) mesmo (a), os quais serão utilizados para fins científicos nos termos da lei n. 879  
 de 22 de julho de 1993. Fui informado (a) claramente que a referida remoção é realizada pela  
 mesma incisão (corte) utilizada para retirada dos órgãos para transplante, não havendo dano  
 estético adicional ao doador e que a retirada do tecido pancreático destina-se a fins de pesquisa  
 científica de doutorado, cujo objetivo é compreender melhor a fisiopatologia da pancreatite  
 aguda, bem como testar produtos naturais na perspectiva de amenizar os efeitos deletérios  
 causados às células acinares do pâncreas no curso dessa doença. Essa pesquisa não terá ônus  
 financeiro adicional à família e não acarretará riscos para os envolvidos; em contrapartida, trará  
 benefícios para a sociedade, fornecendo subsídios para uma melhor compreensão dessa doença  
 tão complexa, cuja cura ainda é desconhecida. A publicação dos resultados deste estudo não  
 terá identificação do doador.

Endereço dos responsáveis pela pesquisa:

Nomes: Samara Rodrigues Bonfim Damasceno (Doutoranda)

Pedro Marcos Gomes Soares (Professor Orientador)

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo – 1315. Bairro Rodolfo Teófilo.

Complemento: Centro de Biomedicina 2º andar – Laboratório de Estudos da Fisiologia Gastrointestinal (LEFFAG).

Telefones para contato: (85) 3366-8588

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a referida pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa (responsável pela doação):

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha (se o responsável pela doação não souber ler):

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do (a) pesquisador (a):

\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_