

EFEITO DO INIBIDOR DE TRIPSINA PURIFICADO DE *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz SOBRE A DESGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS E VIABILIDADE, PRODUÇÃO DE H₂O₂ E ADESÃO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Raquel Carvalho^{1*}, Iluska S. B. Moslaves², Silvana C. Pando³, Mônica C. Toffoli-Kadri⁴

¹Mestranda - PPGBiocologia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS

²Mestre - Técnico de laboratório - UFMS

³Professora - Departamento de Ciências Naturais - Três Lagoas, UFMS

⁴Professora - UFMS / Orientadora

Resumo

A tripsina é uma serino-protease do sistema digestivo. Estudos mostraram que isolados de plantas que a inibem, também o fazem com as serino-proteases atuantes na inflamação, modulando o processo. A *Libidibia ferrea* é amplamente utilizada pela população e extratos do caule e frutos foram comprovados como anti-inflamatórios. Este trabalho objetivou avaliar o inibidor de tripsina isolado das sementes de *L. ferrea* (LfTI) sobre a desgranulação de mastócitos (3 mg/kg), a viabilidade, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e adesão de macrófagos peritoneais (50 µg/mL). O LfTI não inibiu a desgranulação de mastócitos (34,67% ± 3,05%) de animais induzidos pelo composto 48/80, comparado ao controle (32,33% ± 5,77%). Ainda, o LfTI manteve viáveis os macrófagos (81,37% ± 5,82%) e inibiu a produção de H₂O₂ por macrófagos induzidos por PMA em 48,40% (controle: 10,99 ± 2,07 / H₂O₂ µM) e a adesão de macrófagos induzida por LPS em 49,40% (controle: 0,3338 ± 0,178 absorvância / 2x10⁵ células).

Autorização legal: Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA / UFMS / Protocolo nº 911/2017

Palavras-chave: *Caesalpinia ferrea*; serino protease; inibidor de protease

Introdução

As serino-proteases são enzimas proteolíticas, sendo a tripsina uma de suas representantes a qual atua no sistema digestivo. Essas enzimas desempenham um papel crucial no funcionamento do sistema imune, pois recrutam células e estimulam a liberação de substâncias pró-inflamatórias (PUENTE et al., 2003). Sob condições fisiológicas, as serino-proteases são reguladas por inibidores endógenos e o desequilíbrio pode levar a cronificação do processo e o surgimento de doenças inflamatórias (FAURSHOE; BORREGAARD 2003).

Estudos comprovaram a inibição de serino-proteases por compostos derivados de plantas (HRENN et al., 2006; WITTENAUER et al., 2015; BACHA et al., 2017) e, isolados capazes de inibir a tripsina também inibiram uma serino-protease atuante na inflamação (RIBEIRO et al., 2010; SHAMSI et al., 2018), modulando este processo. Os inibidores de tripsina purificados das espécies de Fabaceae destacam-se, uma vez que nesta família as sementes são uma das principais fontes para compostos inibidores de proteases (USSUF et al., 2001) e, no geral, são abundantes em um único indivíduo.

Dentre as espécies de Fabaceae, pode-se destacar a *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz devido ao seu uso popular principalmente contra asma, bronquite, contusões e enterocolite (BRAGA, 1976). As propriedades anti-inflamatórias para extratos dos caule e frutos de *L. ferrea* foram observadas por Carvalho et al. (1996), Freitas et al. (2012), Lima et al. (2012) e de Araujo et al. (2014).

Os inibidores de protease purificados da semente de *Caesalpinia echinata* Lam., espécie da subfamília de *L. ferrea*, reduziu a liberação de substâncias pró-inflamatórias (CRUZ-SILVA et al., 2013). Uma substância com propriedade de inibir a tripsina purificada das sementes de *L. ferrea* (LfTI – *Libidibia ferrea* Trypsin Inhibitor), apresentou atividades biológicas como ação antimicrobiana e anticoagulante (ROSENEGGER et al., 2017).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do LfTI em modelos inflamatórios murinos, como a desgranulação de mastócitos, a viabilidade, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a adesão de macrófagos peritoneais.

Metodologia

O LfTI foi obtido pelo grupo de pesquisa da Prof^ª. Dr^ª. Silvana Cristina Pando pelo processo de purificação de sementes coletadas no arboreto de leguminosas do Campus III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus/AM (03°08'S e 60°01'W). O material testemunho está depositado no Herbário INPA (n° 228.022). Para a desgranulação de mastócitos, utilizamos 3mg/kg de LfTI via subcutânea (s.c) como pré-tratamento, e para os demais ensaios, 50 µg/mL, *in vitro*. Estas concentrações foram baseadas em dados da literatura (PEREIRA et al., 2012; COSTA et al., 2016).

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* machos Swiss (18–25g), provenientes do Biotério Central da UFMS mantidos de acordo com as condições padrões de ambientação.

Para determinar a desgranulação de mastócitos, foi administrado composto 48/80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 1 µg/mL) i.p nos animais pré-tratados com o LfTI. Como controles os animais receberam salina via s.c. e salina ou composto 48/80 via i.p. Após eutanásia o mesentério foi retirado, lavado e fixado com paraformaldeído 4%, lavado, transferido para uma lâmina e corado com Hema3®. As células foram contadas e

classificadas em desgranulados ou não-desgranulados com base em padrões morfológicos e na dispersão de grânulos. Para isso, foram contados 100 mastócitos e considerados desgranulados os mastócitos que apresentaram 10 ou mais grânulos liberados. Os resultados foram apresentados em % de células desgranuladas.

Os experimentos realizados *in vitro* partiram da obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos. Para isso, foi administrado tioglicolato 3% i.p. nos animais 96h antes da coleta das células. Após eutanásia, o exsudato peritoneal foi lavado e as células coletadas em câmara de fluxo laminar e foram feitas as contagens total em Câmara de Neubauer e diferencial em lâminas coradas com Hema3® (Instant-Prov, NewProv). Após, o exsudato foi centrifugado (1000 rpm, 8 min) e as células ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método da redução do sal de tetrazolium e formação do produto solúvel formazan, seguindo o descrito por Mosmann (1983). Os resultados foram expressos em % de viabilidade comparados ao grupo controle (sem estímulo).

A liberação de H₂O₂ foi avaliada seguindo Pick e Keisari (1980), adaptado por Pick e Mizel (1981) e modificado por Russo et al. (1989). Os resultados foram expressos em µM de H₂O₂.

A adesão foi avaliada seguindo Lee e Warren (1987) e modificado por Santos et al. (2016). Os resultados foram expressos em absorvância / 2x10⁵ células.

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes (GraphPad Prism 5, GraphPad Software Inc., EUA).

Resultados e Discussão

Nossos resultados mostraram que o composto 48/80 induziu a desgranulação de 32,33% ± 5,77% dos mastócitos avaliados. Essa resposta não foi alterada (34,67% ± 3,05%) em animais que foram pré-tratados com o LfTI e estimulados com o composto 48/80 (Figura 1).

Corroborando nossos resultados, KIDO et al. (1988) observaram que uma espécie de Fabaceae, a soja (*Glycine max* (L.) Merr.; KIDO et al., 1988) não inibiu a desgranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80, porém, foi capaz de inibir a desgranulação induzida por IgE (KIDO et al., 1985; 1988; HE et al., 1999), ou seja, houve a inibição por uma via de ativação diferente da utilizada neste estudo.

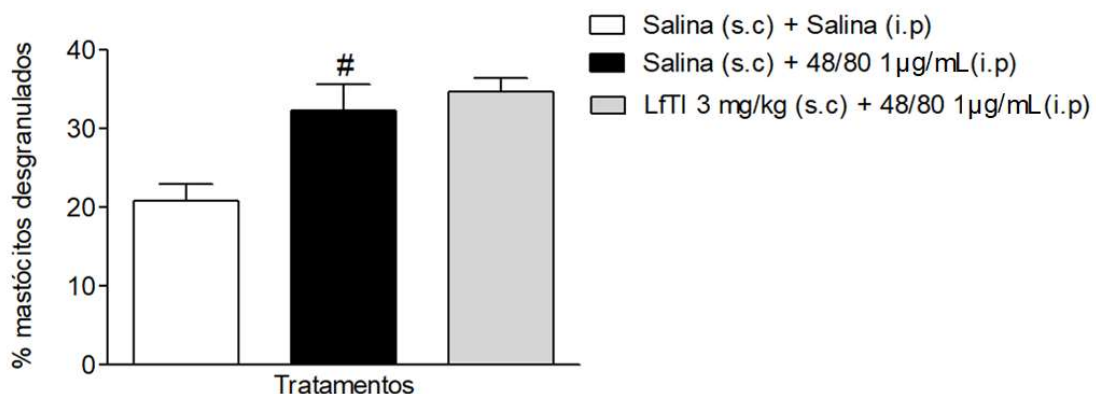


FIGURA 1: Efeito do inibidor de tripsina *Libidibia ferrea* (LfTI) sobre a desgranulação de mastócitos peritoneais de camundongos

Analisando os resultados *in vitro*, observamos que na presença de LfTI, os macrófagos permaneceram viáveis (81,37% ± 5,82%; Figura 2).

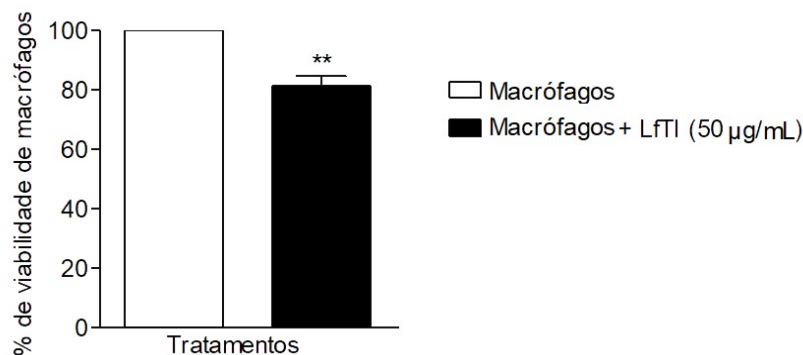


FIGURA 2: Efeito do inibidor de tripsina *Libidibia ferrea* (LfTI) sobre a viabilidade de macrófagos

Nossos ensaios mostraram que na presença do estímulo PMA, a produção de H₂O₂ por macrófagos aumentou em 87,22% (10,99 ± 2,07 / H₂O₂ µM) quando comparado ao controle (5,87 ± 3,10 / H₂O₂ µM, Figura

3). Essa produção foi inibida pelo tratamento com LfTI em 48,40% ($5,67 \pm 1,70$ / H_2O_2 μM). O LfTI não alterou a produção de H_2O_2 por macrófagos ($4,99 \pm 2,94$ / H_2O_2 μM) quando comparado ao controle.

Estudos demonstraram que inibidores de protease reduziram a formação de H_2O_2 em outro tipo celular envolvido na inflamação, os polimorfonucleares (FRENKEL et al., 1987; TAMURA et al., 1992), inclusive os inibidores derivados das sementes de espécies de Fabaceae (YAVELOW et al., 1982).

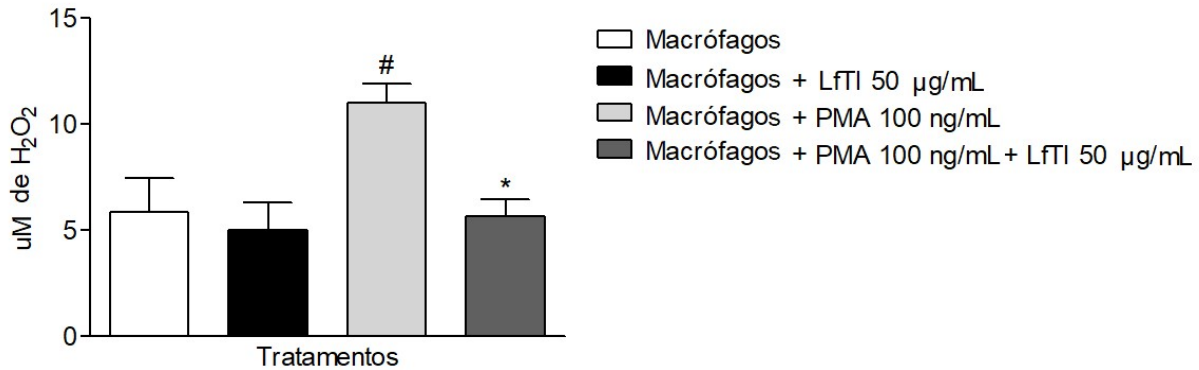


FIGURA 3: Efeito do inibidor de tripsina *Libidibia ferrea* (LfTI) sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos peritoneais

Considerando a adesão de macrófagos em superfície de poliestireno, observamos que, na presença do estímulo LPS, a adesão dos macrófagos aumentou em 121,79% ($0,3338 \pm 0,178$ absorvância / 2×10^5 células) quando comparado ao controle ($0,1505 \pm 0,029$ Absorvância / 2×10^5 células, figura 4). Esse efeito foi inibido em 49,40% ($0,1686 \pm 0,02$ Absorvância / 2×10^5 células) após o tratamento com LfTI. O LfTI não alterou a adesão celular dos macrófagos ($0,1932 \pm 0,025$ Absorvância / 2×10^5 células).

O LPS utilizado neste estudo como estímulo, é classificado como um dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). As PAMPs ativam o sistema NADPH que produz Espécies Reativas de Oxigênio, como o H_2O_2 , que, por sua vez, expressam moléculas de adesão (FRATICELLI et al., 1996), como as integrinas que estão presentes na membrana dos macrófagos (CRUVINEL et al., 2010). Dessa forma, ressaltamos o efeito inibitório do LfTI na produção desse reativo de oxigênio, provavelmente inibindo a expressão de moléculas de adesão em macrófagos, inibindo consequentemente sua adesão.

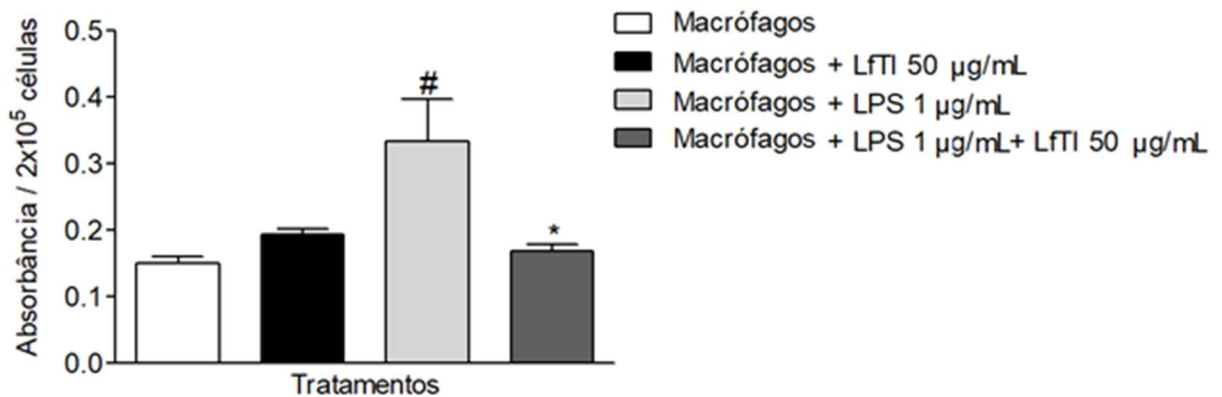


FIGURA 4: Efeito do inibidor de tripsina *Libidibia ferrea* (LfTI) sobre a capacidade de adesão de macrófagos peritoneais.

Conclusões

Concluindo, podemos afirmar que o inibidor de tripsina extraído das sementes de *Libidibia ferrea* não inibe a desgranulação de mastócitos, não altera a viabilidade celular, inibe a produção de H_2O_2 e a adesão de macrófagos, de acordo com os modelos avaliados neste estudo em camundongos e macrófagos peritoneais murinos.

Referências bibliográficas

- BACHA, Abir Ben et al. Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 148, 2017.
- BRAGA, Renato. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **Colecao Mossoroense**, V., v. 315, p. 540, 1976.
- CARVALHO, José C T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.
- COSTA, Mirian Feliciano et al. *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 403, 2016.
- CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

- CRUZ-SILVA, Ilana et al. Using a *Caesalpinia echinata* Lam. protease inhibitor as a tool for studying the roles of neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase 3 in pulmonary edema. **Phytochemistry**, v. 96, p. 235-243, 2013.
- DE ARAUJO, Aurigena Antunes et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.
- FAURSCHOU, Mikkel; BORREGAARD, Niels. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.
- FRATICELLI, Aureliano et al. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1310, n. 3, p. 251-259, 1996.
- FREITAS, A. C. C. et al. Biological activities of *Libidibia (Caesalpinia) ferrea* var. *parvifolia* (Mart. ex Tul.) LP queiroz pod preparations. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- FRENKEL, Krystyna et al. Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H₂O₂ formation by activated human polymorphonuclear leukocytes. **Carcinogenesis**, v. 8, n. 9, p. 1207-1212, 1987.
- HE, Shaoheng et al. Inhibitors of chymase as mast cell-stabilizing agents: contribution of chymase in the activation of human mast cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 517-523, 1999.
- HRENN, Andrea et al. Plant phenolics inhibit neutrophil elastase. **Planta medica**, v. 72, n. 12, p. 1127-1131, 2006.
- KIDO, H.; FUKUSEN, N.; KATUNUMA, N. Antibodies and inhibitor of chymase are incorporated into mast cell granules and inhibit histamine release. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, p. 95-100, 1988.
- KIDO, H.; FUKUSEN, N.; KATUNUMA, N. Antibody and inhibitor of chymase inhibit histamine release in immunoglobulin E-activated mast cells. **Biochemistry international**, v. 10, n. 6, p. 863-871, 1985.
- LEE, M. T.; WARREN, M. K. CSF-1-induced resistance to viral infection in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 9, p. 3019-3022, 1987.
- LIMA, Sandrine Maria A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 169-175, 2012.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- PEREIRA, Lívia de Paulo et al. Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: potential anti-inflammatory usage. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 642-648, 2012.
- PICK, Edgar; KEISARI, Yona. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.
- PICK, Edgar; MIZEL, Diane. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of immunological methods**, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.
- PUENTE, Xose S. et al. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 544, 2003.
- RIBEIRO, Jannison KC et al. New properties of the soybean trypsin inhibitor: inhibition of human neutrophil elastase and its effect on acute pulmonary injury. **European journal of pharmacology**, v. 644, n. 1-3, p. 238-244, 2010.
- ROSENEGGER, Paloma Fernandes et al. Investigation of antimicrobial and anticoagulant effects of trypsin inhibitor from *Libidibia ferrea* var. *cearensis*. **Journal of Medical and Biological Science**, v.4, p.1, 2017.
- RUSSO, Momtchilo et al. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite immunology**, v. 11, n. 4, p. 385-395, 1989.
- SANTOS, Ed Wilson et al. High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. **Nutrire**, v. 41, n. 1, p. 6, 2016.
- SHAMSI, Tooba Naz et al. Trypsin Inhibitors from *Cajanus cajan* and *Phaseolus limensis* Possess Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activity. **Journal of dietary supplements**, p. 1-12, 2018.
- TAMURA, K. et al. Effect of synthetic protease inhibitors on superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical production by human polymorphonuclear leukocytes. **Hepato-gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 59-61, 1992.
- USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. **Current Science**, p. 847-853, 2001.
- WITTENAUER, Judith et al. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**, v. 101, p. 179-187, 2015.
- YAVELOW, Jonathan; GIDLUND, Monica; TROLL, Walter. Protease inhibitors from processed legumes effectively inhibit superoxide generation in response to TPA. **Carcinogenesis**, v. 3, n. 2, p. 135-138, 1982.