

EFEITOS ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICO DE INIBIDORES PROTEOLÍTICOS VEGETAIS

Data de aceite: 04/01/2021

Silvana Cristina Pando

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Três Lagoas – MS
<http://lattes.cnpq.br/2557613056024752>

Bruno Ramos Salu

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/4217215760789690>

Luzia Aparecida Pando

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Jequié – BA
<http://lattes.cnpq.br/9815065840455790>

Vinicius Pereira da Silva Xavier

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Três Lagoas – MS
<http://lattes.cnpq.br/9041681461840109>

Laura Maria Santos do Nascimento

Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador - BA
<http://lattes.cnpq.br/6493099656860753>

Maria Luiza Vilela Oliva

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo – SP
<http://lattes.cnpq.br/5832778223847349>

RESUMO: Os inibidores proteolíticos são metabólitos importantes em decorrência das múltiplas funções que exercem, incluindo a sua relevância para a regulação da cascata

de coagulação sanguínea e fibrinólise. A caracterização estrutural desses inibidores poderá contribuir para elucidar os mecanismos de regulação desses processos e para demonstrar os potenciais terapêuticos dessas moléculas. Os inibidores foram extraídos em solução salina (0,15M, 10% p/v) e precipitação com acetona gelada 80% e purificados em colunas cromatográficas de troca iônica, exclusão molecular e afinidade. O grau de pureza foi monitorado por SDS-PAGE e a atividade inibitória foi realizada a 37°C na presença de substratos cromogênicos específicos para cada serinoprotease. A ação dos inibidores na cascata de coagulação sanguínea foi verificada pela realização dos ensaios TP e TTPa. O efeito de DrTI foi verificado em relação a agregação plaquetária *ex vivo* e em um modelo de trombose arterial carotídea em camundongos machos C57/BL6, tratados com 0,5 mg/Kg e 2 mg/Kg de DrTI, utilizando a emissão laser até atingir 0,03 mL/min ou menos. Os inibidores são do tipo Kunitz e seletivos para tripsina. Ficou evidenciado que esses inibidores atuam sobre a via intrínseca e comum da coagulação sanguínea, prolongando o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa). DrTI também inibiu a agregação plaquetária e potencialmente preveniu a formação de trombos em camundongo. CfTI, IcTI e DrTI são inibidores tipo Kunitz e atuam na cascata de coagulação sanguínea, sendo o DrTI também eficaz na prevenção de trombos.

PALAVRAS-CHAVE:

Inibidores, Serinoproteases, Coagulação Sanguínea, Kunitz, Fabaceae.

ANTICOAGULANT AND ANTITROMBOTIC EFFECTS OF PLANT PROTEOLYTIC INHIBITORS

ABSTRACT: The Proteolytic inhibitors are important metabolites due to the multiple functions they perform, including their relevance for the regulation of the blood coagulation cascade and fibrinolysis. The structural characterization of these inhibitors may contribute to elucidate the mechanisms for regulating these processes and to demonstrate the therapeutic potentials of these molecules. The inhibitors were extracted in saline solution (0.15M, 10% w/v) and precipitated with 80% cold acetone and purified on ion exchange, molecular exclusion and affinity chromatographic columns. The degree of purity was monitored by SDS-PAGE and the inhibitory activity was carried out at 37°C in the presence of specific chromogenic substrates for each serine protease. The action of inhibitors in the blood coagulation cascade was verified by performing the TP and aPTT assays. The effect of DrTI was verified in relation to *ex vivo* platelet aggregation and carotid arterial thrombosis model in male mice C57 / BL6, treated with 0.5 mg / kg and 2 mg / kg of DrTI, using laser emission until reaching 0.03 mL / min or less. The inhibitors are of the Kunitz type and selective for trypsin. It was evidenced that these inhibitors act in the intrinsic and common pathways of blood coagulation, prolonging the activated partial thromboplastin time (aPTT). DrTI also inhibited platelet aggregation and potentially prevented the formation of thrombus in mice. CfTI, IcTI and DrTI are Kunitz-type inhibitors and act in the blood coagulation cascade, and DrTI is also effective in preventing thrombus.

KEYWORDS: Inhibitors, Serine proteases, Blood coagulation, Kunitz, Fabaceae.

1 | INTRODUÇÃO

Os inibidores proteolíticos são metabólitos importantes em decorrência das múltiplas funções que exercem, destacando a sua relevância para a regulação de processos biológicos, como a liberação de hormônios e peptídeos, ativação de receptores, a regulação da expressão gênica através da clivagem proteolítica da cauda de histonas e cascata de coagulação sanguínea e fibrinólise. O mecanismo de regulação mediado por esses inibidores está relacionado ao fato destes serem específicos para determinadas enzimas envolvidas nesses processos biológicos, principalmente as serinoproteases. Os inibidores vegetais que mais tem contribuído para esses modelos de estudos são do tipo Kunitz e Bowman-Birk e são classificados de acordo a especificidade pelas enzimas alvo, presença de pontes dissulfeto e número de sítios reativos. A caracterização estrutural desses inibidores poderá contribuir tanto para a elucidação dos mecanismos de regulação desses processos, como para a demonstração do seu potencial de aplicabilidade terapêutica (Machado et al. 2013; Bezerra et al. 2016).

2 | OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi investigar o efeito de inibidores proteolíticos isolados de sementes de leguminosas sobre o processo de coagulação sanguínea (*in vivo e in vitro*) e sistema fibrinolítico.

3 | METODOLOGIA

Os inibidores foram extraídos por meio de solução salina e precipitação com acetona gelada 80% e, posteriormente, purificados em colunas cromatográficas de troca iônica, exclusão molecular e afinidade. O monitoramento do grau de pureza foi realizado por eletroforese em SDS-PAGE 12,5%. A atividade inibitória foi realizada na presença de concentrações fixas de enzimas, a 37 °C, pH 8,0, com período de 10 minutos de pré-incubação, na presença de substratos cromogênicos específicos. A ação dos inibidores na cascata de coagulação sanguínea foi verificada pela realização dos ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de protrombina (TP), conforme descrito na literatura. O efeito de DrTI foi verificado em relação a agregação plaquetária *ex vivo* e em um modelo de trombose arterial carotídea em camundongos machos C57/BL6, tratados com 0,5 mg/Kg e 2 mg/Kg de DrTI, utilizando a emissão laser até atingir 0,03 mL/min ou menos.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inibidores proteolíticos estudados são do tipo Kunitz e inibem serinoproteases digestivas como a tripsina, mas não quimotripsina (Patthy et al. 2015). Esses resultados corroboram com dados de que a maioria dos inibidores pertencentes à família Kunitz de leguminosas apresenta, geralmente, uma subunidade em torno de 20 kDa e que possuem um sítio de ligação para tripsina e/ou quimotripsina (Bhattacharyya e Babu 2017). IcTI (Inibidor de tripsina de *Inga capitata*), CfTI (Inibidor de tripsina de *Caesalpinia ferrea*) e DrTI (Inibidor de tripsina de *Delonix regia*) não tiveram efeito sobre o tempo de protrombina (TP), mas prolongaram o tempo de coagulação sobre tromboplastina parcial ativada (TTPa) quando comparados ao controle, sugerindo potencial efeito inibitório sobre serinoproteases da via intrínseca. O DrTI atuou especificamente sobre as serinoproteases HuPK (calicreína plasmática humana) e Fator XIa, não sendo efetivo contra plasmina, trombina nem fator Xa, tal como outros inibidores de leguminosas (Pando et al. 2001; Oliva et al. 2009; Salu et al. 2018). Os fatores da via intrínseca e via comum são serinoproteases e, portanto, esses resultados podem estar correlacionados com a interação seletiva destes inibidores com essas enzimas que compõem as vias da cascata de coagulação sanguínea. DrTI inibiu a agregação plaquetária (Figura 2) e potencialmente preveniu a formação de trombos em camundongo (Figura 3) (Salu et al. 2018), tal como outros inibidores (Brito et al. 2014).

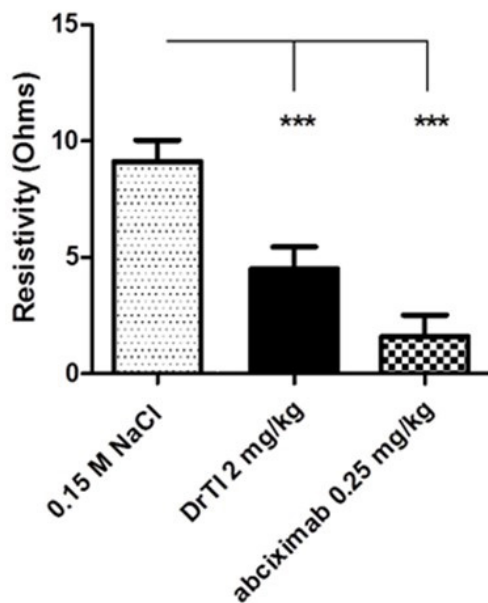


Figura 2. Efeito do DrTI e Abciximab na agregação plaquetária ex vivo.

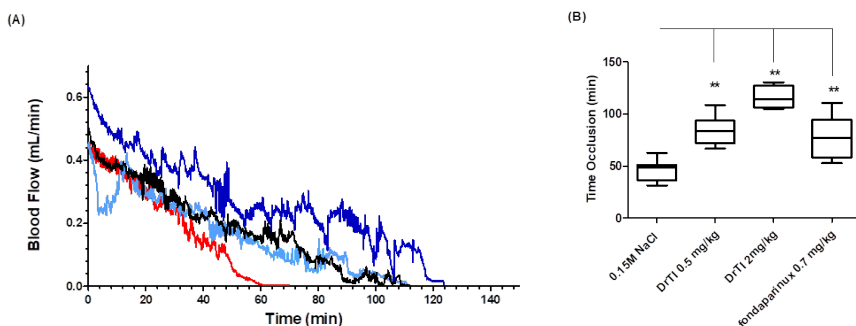


Figura 3. **(A)** Curvas representativas do fluxo sanguíneo da artéria carótida em camundongos C57 black 6. Comparação entre 0,15 M NaCl (vermelho, n=11), (0.7 mg/kg) fondaparinux (preto, n=7), (0.5 mg/kg) DrTI (azul claro, n=6) e (2mg/kg) DrTI (azul escuro, n=5), em resposta à injúria vascular trombótica. **(B):** Avaliação do tempo de oclusão da artéria carótida. **p<0.01 para os grupos comparados ao controle. n= número de animais por grupo.

51 CONCLUSÃO

Os inibidores isolados IcTI, CfTI e DrTI são do tipo Kunitz, seletivos para serinoproteases e mostraram-se capazes de inibir a via intrínseca da cascata de coagulação sanguínea, não tendo efeito sobre a via extrínseca. DrTI inibiu a agregação plaquetária e potencialmente preveniu a formação de trombos em camundongo. Com esses

resultados obtidos, é possível, posteriormente, realizar a caracterização desses inibidores com a perspectiva de se obter biomoléculas que possam ser utilizadas em aplicações biotecnológicas ou terapêuticas.

REFERÊNCIAS

BEZERRA et al. Exploiting the biological roles of the trypsin inhibitor from *Inga vera* seeds: A multifunctional Kunitz inhibitor. **Process Biochem.**, 51, 792-803, 2016.

BHATTACHARYYA, A. AND BABU, C.R. *Caesalpinia bonduc* serine proteinase inhibitor CbTI-2: Exploring the conformational features and antimalarial activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, 103, 294-306, 2017.

BRITO M.V, et al. The Kallikrein Inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* (BbKI) shows antithrombotic properties in venous and arterial thrombosis models. **Thrombosis Research**, 133, 945-951, 2014.

MACHADO, R.J.A. et al. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. **PLoS ONE**, v. 8. 2013.

OLIVA, M.L.V; SAMPAIO, M.U. Action of plant proteinase inhibitors on enzymes of physiopathological importance. **An. Acad Bras. Cienc**, 81 (3), 615-621, 2009.

PANDO, S.C., et al. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, 57(5), 625-631, 2001.

PATTHY, A.T., et al. Isolation and characterization of a protease inhibitor from *Acacia karroo* with a common combining loop and overlapping binding sites for chymotrypsin and trypsin. **Arch. Biochem. Biophys**, 565, 9-16, 2015.

SALU, et al. Improving the understanding of plasma kallikrein contribution to arterial thrombus formation using two plant protease inhibitors. **Platelets**, v:1-9, 2018.