

Efeitos De Um Novo Inibidor Peptídico De Quimase Sobre Alterações De Permeabilidade Vascular, Proliferação E Migração De Células Da Musculatura Lisa De Aorta

Introdução

O aumento de permeabilidade vascular, proliferação e migração de células vasculares ocorre em uma série de eventos hipertroficados associados a alterações cardiovasculares como hipertensão, insuficiência cardíaca, diabetes ou aneurisma de aorta [1]. A angiotensina II (Ang II), que tem sua produção aumentada em várias dessas condições, pode ser gerada por quimase proveniente não só de células vasculares, mas também de células inflamatórias como mastócitos e neutrófilos.

Neste trabalho descrevemos a caracterização farmacológica de um novo inibidor peptídico de serino-proteinases obtido das sementes de *Canavalia ensiformes* capaz de inibir quimase de mastócitos e de células da musculatura lisa de aorta.

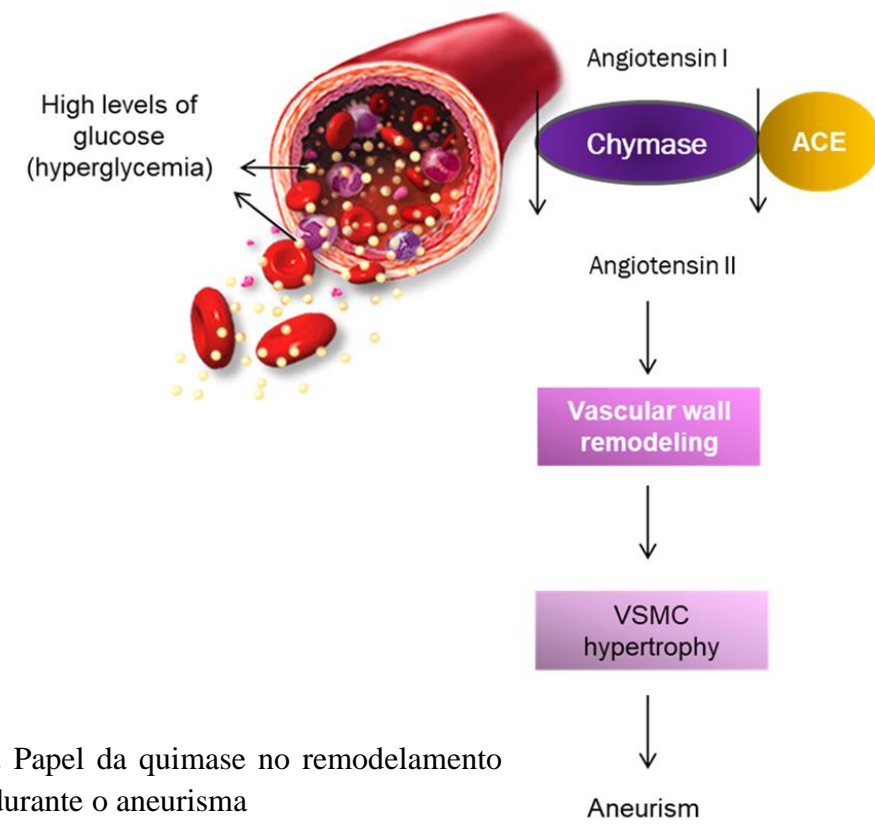


Figura 1. Papel da quimase no remodelamento vascular durante o aneurisma

Metodologia

O inibidor foi isolado por métodos de cromatografia líquida e caracterizado por espectrometria de massas. As alterações vasculares foram estudadas *in vivo* em modelo de permeabilidade vascular em ratos e *in vitro* em cultura de células da musculatura lisa de aorta (linhagem A7r5).

CEUA-HCPA: 17-0033

Resultados

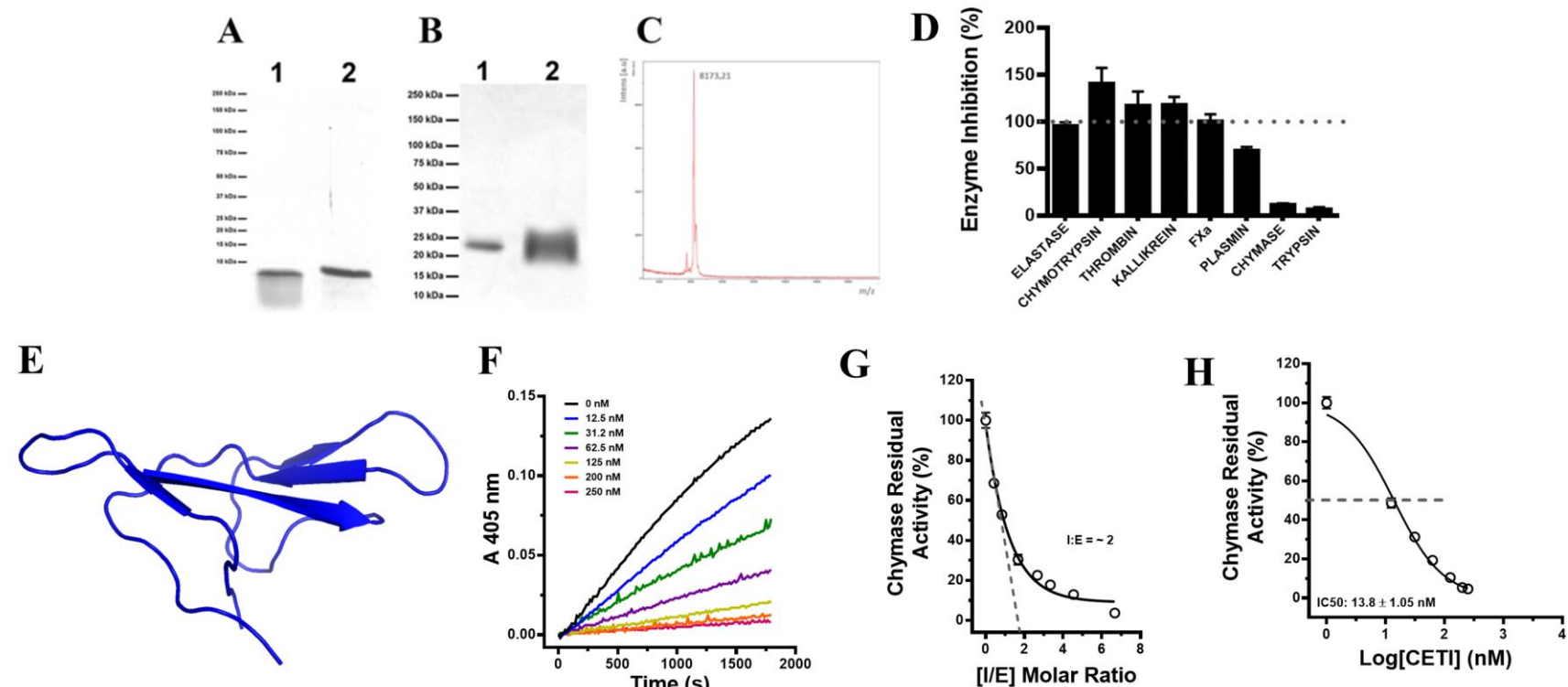


Figura 2. Caracterização estrutural e bioquímica de um novo inibidor isolado de *C. ensiformes* (CETI). A. SDS-PAGE (6-20%) do CETI purificado. Coluna 1: CETI em condições não redutoras; Coluna 2: CETI em condições redutoras. B. Nu-PAGE (6-20%) do CETI purificado. Coluna 1: CETI em condições não redutoras; Coluna 2: CETI em condições redutoras. C. Análise de pureza e determinação da massa molecular monomérica por MALDI-TOF. D. A capacidade inibitória do CETI sobre diferentes enzimas foi determinada utilizando substratos sintéticos específicos para cada uma delas. CETI foi capaz de inibir especificamente tripsina e quimase. E. Modelo da estrutura tridimensional do CETI obtido por homologia à estrutura cristalográfica do inibidor de sementes de soja (sp|P01055|IBB1_SOYBN). O modelo foi obtido no SWISS-MODEL (protein structure homology-modelling server, <https://swissmodel.expasy.org/>) e visualizados no Swiss PDB-Viewer. F. Cinética de progressão de diferentes concentrações do CETI pré-incubados com quimase (75 nM). A reação foi disparada pela adição do substrato AAPF-PNA. G. Estequiometria da interação CETI-quimase. H. Curva dose-resposta de inibição de quimase.

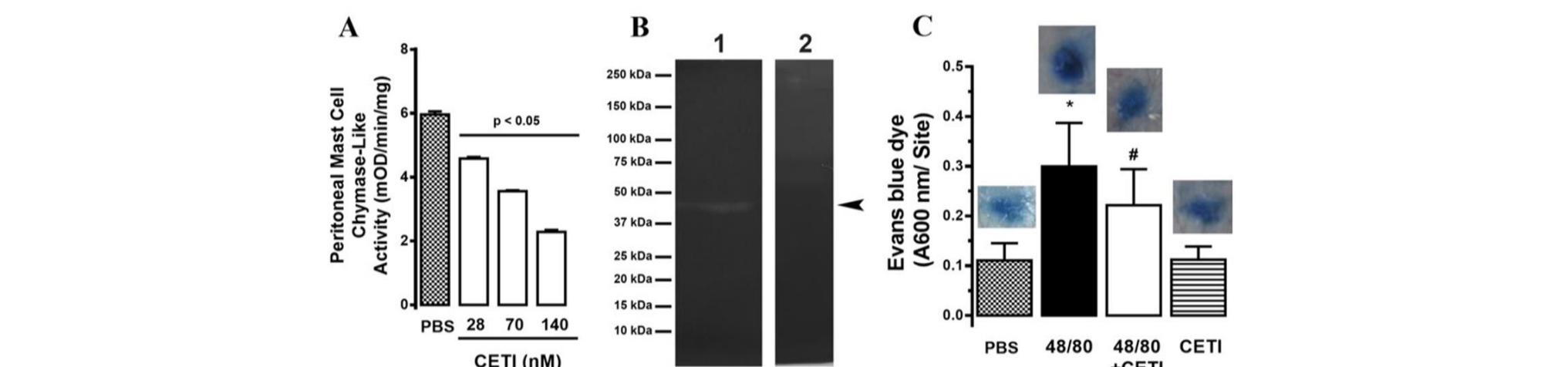


Figura 4. CETI inibe quimase secretada por mastócitos isolados do peritônio de ratos e reduz a permeabilidade vascular *in vivo*. (A) CETI inibe de maneira dose-dependente a atividade tipo-quimase de um extrato preparado a partir de mastócitos isolados do peritônio de ratos previamente estimulados pela injeção de carragenina (i.p.). (B) A atividade proteolítica da quimase obtida dos mastócitos peritonéus foi detectada em zimograma de caseína. Coluna 1: extrato de mastócitos peritonéus; Coluna 2: extrato de mastócitos + CETI (80 nM). (C) CETI inibe o aumento da permeabilidade vascular induzida *in vivo* pela injeção do composto 48/80, um degranulador de mastócitos. Nesse caso, ratos foram injetados previamente via i.v com o corante azul de evans e, após injeção subcutânea dos estímulos (PBS, 48/80 ou 48/80+CETI e CETI) no dorso dos animais, a quantidade de corante extravasado no local da injeção foi quantificada por espectrofotometria. * $p < 0.05$ vs PBS; # $p < 0.05$ vs 48/80.

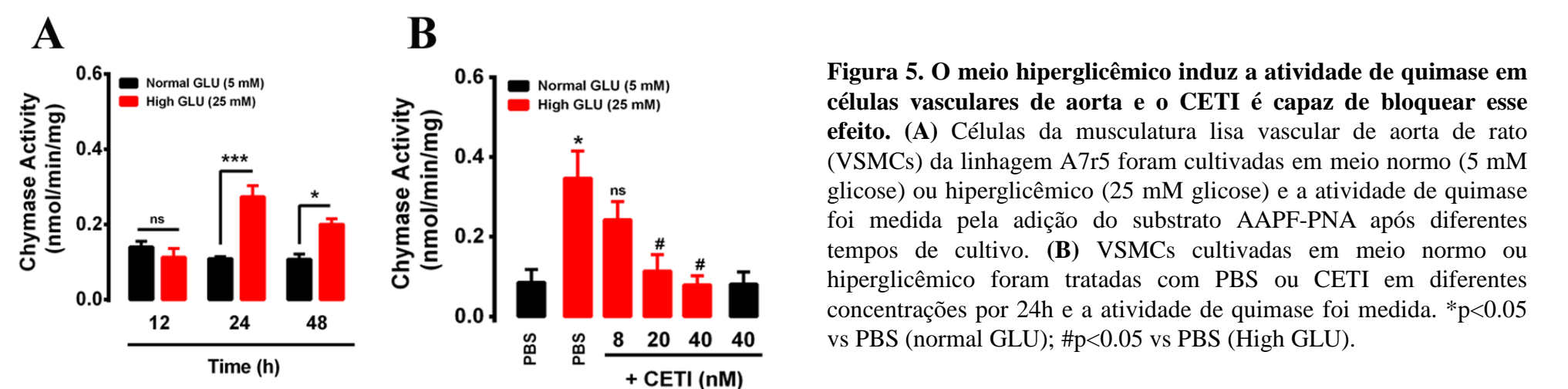


Figura 5. O meio hiperglicêmico induz a atividade de quimase em células vasculares de aorta e o CETI é capaz de bloquear esse efeito. (A) Células da musculatura lisa vascular de aorta de rato (VSMCs) da linhagem A7r5 foram cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) e a atividade de quimase foi medida pela adição do substrato AAPF-PNA após diferentes tempos de cultivo. (B) VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico foram tratadas com PBS ou CETI em diferentes concentrações por 24h e a atividade de quimase foi medida. * $p < 0.05$ vs PBS (normal GLU); # $p < 0.05$ vs PBS (High GLU).

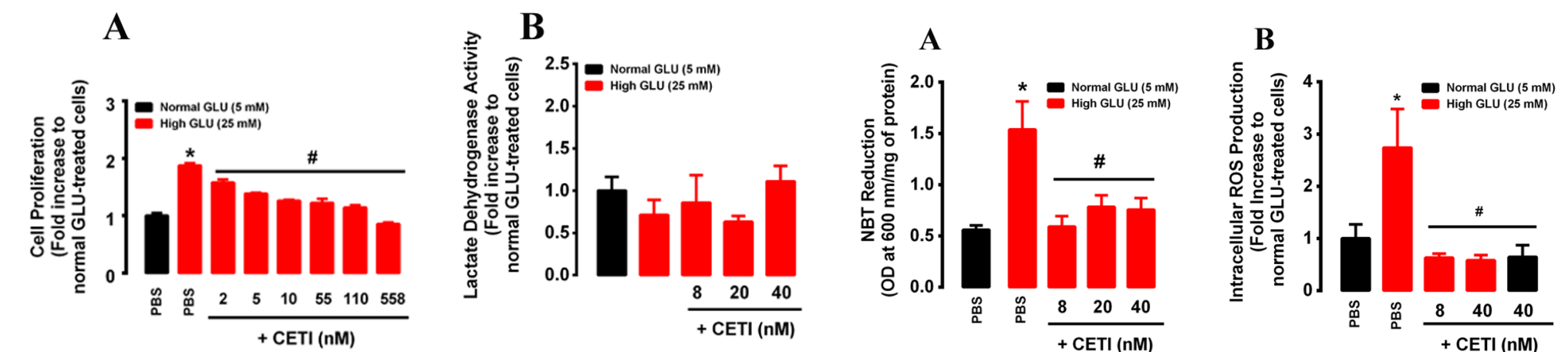


Figura 6. CETI reduz a proliferação celular em meio hiperglicêmico, mas não é tóxico para células vasculares de aorta. (A) VSMCs (linhagem A7r5) cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) foram tratadas com diferentes concentrações de CETI e a proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT após 24h. (B) A toxicidade do CETI sobre as VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico foi estimada pela dosagem de LDH no sobrenadante de cultura após 24h. * $p < 0.05$ vs PBS (normal GLU); # $p < 0.05$ vs PBS (High GLU).

Figura 7. O meio hiperglicêmico induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o CETI reduz esse efeito em células vasculares. (A) Os níveis de superóxido foram estimados em VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico tratadas ou não com CETI através da redução de NBT. (B) A produção de ROS total intracelular foi medida nas VSMCs cultivadas em meio normo ou hiperglicêmico tratadas com PBS ou CETI através da oxidação da sonda fluorescente H2DCFDA após 24h. * $p < 0.05$ vs PBS (normal GLU); # $p < 0.05$ vs PBS (High GLU).

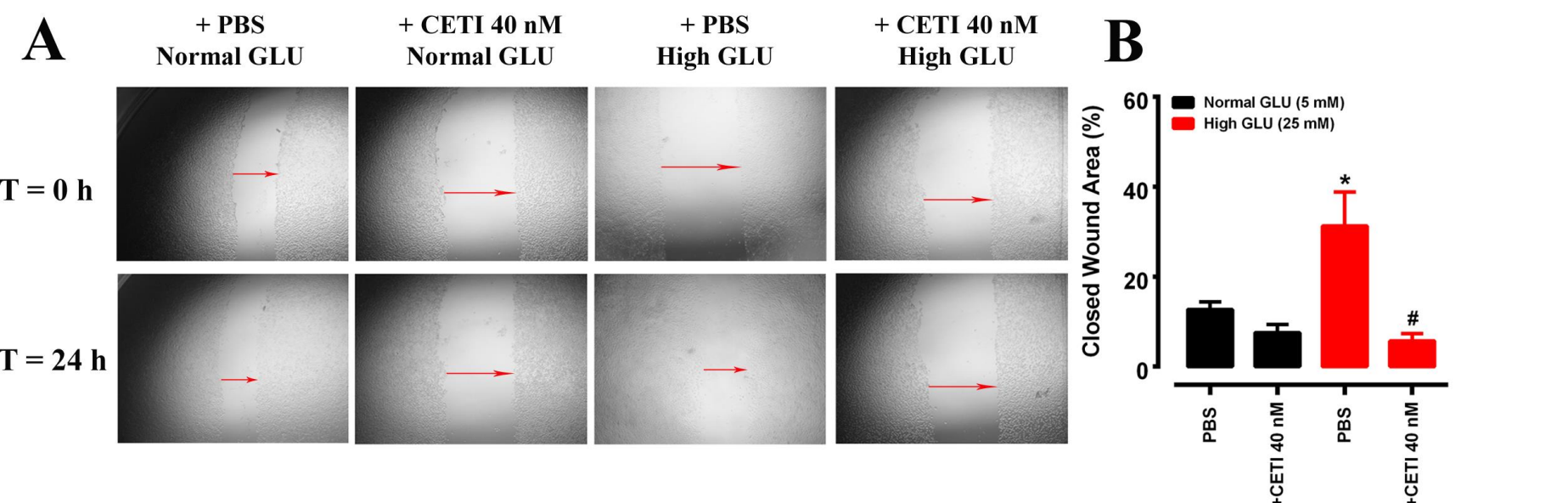


Figura 8. CETI reduz a migração de células vasculares induzida em meio hiperglicêmico. VSMCs (linhagem A7r5) cultivadas em meio normo (5 mM glicose) ou hiperglicêmico (25 mM glicose) foram tratadas com CETI (40 nM) ou PBS e a migração foi estimada pelo ensaio de wound healing onde uma fenda é feita na monocamada e a taxa de migração é medida pela área não ocupada pelas células. (A) Imagens representativas das VSMCs em meio normo ou hiperglicêmico 0 e 24h após o tratamento. (B) Quantificação da área da fenda ocupada pelas células (estimativa de migração celular) em meio normo ou hiperglicêmico induz migração e o bloqueio de quimase pelo CETI reduz esse estímulo. * $p < 0.05$ vs PBS (normal GLU); # $p < 0.05$ vs PBS (High GLU).

Conclusões

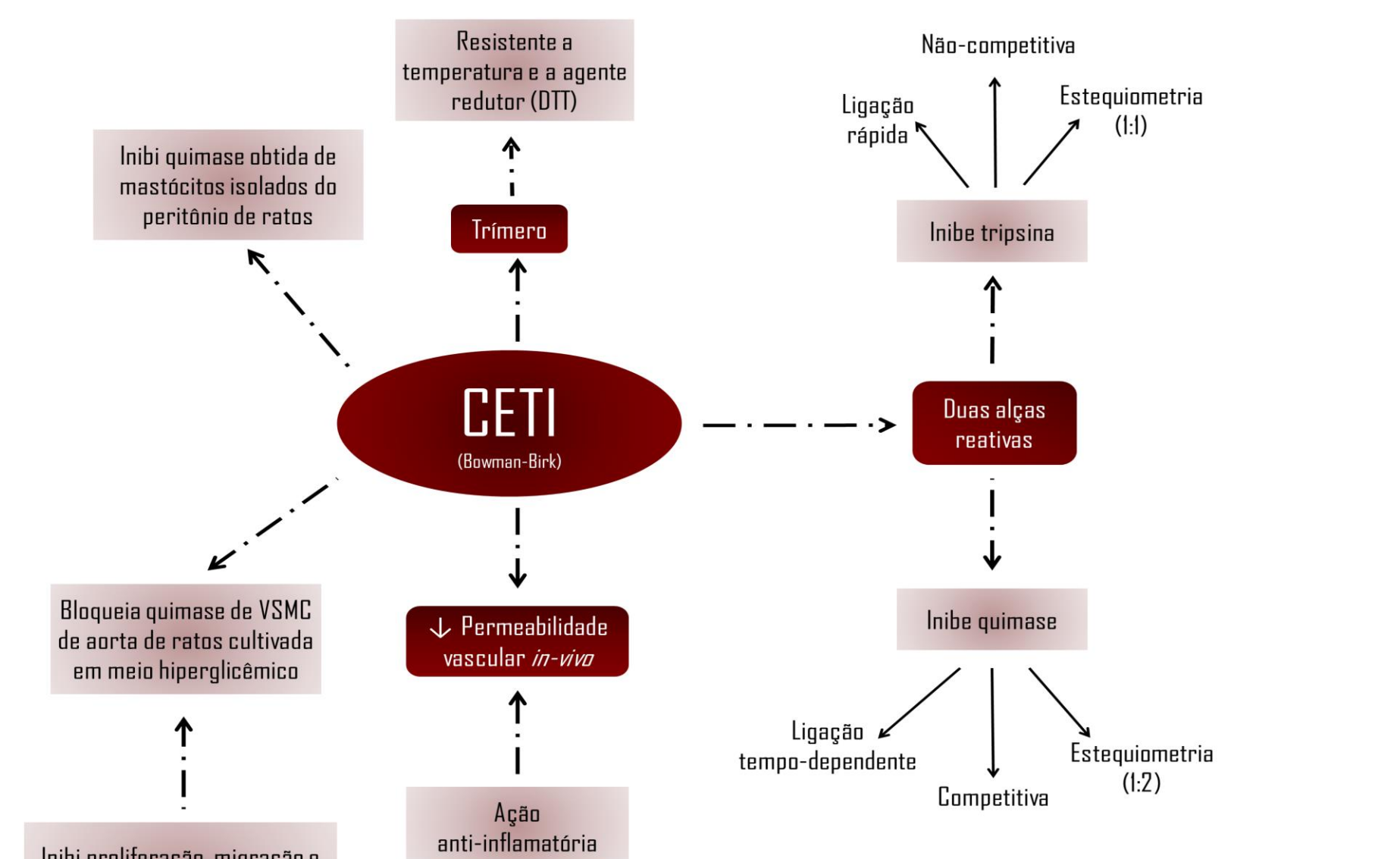


Figura 3. CETI é um inibidor de quimase tempo-dependente (lento), competitivo e clássico. A. CETI inibe quimase de maneira tempo-dependente, ou seja, a incubação prévia (20 min) I-E favorece a atividade inibitória. B. Razão da velocidade de reação na presença do inibidor (V_s) pela velocidade na ausência de inibidor (V_0) em diferentes concentrações de quimase. C. Variação do IC50 pela concentração de quimase. Notar a inclinação próxima de zero, indicando que CETI é um inibidor clássico, seguindo as equações de Michaelis-Menten. D. Gráfico de Lineweaver-Burk em diferentes concentrações de substrato indicando que CETI é um inibidor competitivo de quimase. E. Regressão linear da inclinação (obtida pelo gráfico de Lineweaver-Burk) versus a concentração de inibidor para obtenção do K_i verdadeiro. F. Esquema de inibição CETI-quimase (inibição competitiva).