

ATIVAÇÃO *in vitro* DO SISTEMA COMPLEMENTO COMO MECANISMO IMUNOMODULADOR INDUZIDO PELO MESOCARPO DE BABAÇU

ARAÚJO, Elza Maria Moraes de¹
ALMEIDA, Caroline Silva Costa de¹
GODINHO JUNIOR, Josemar Marcelino Ferreira¹
NASCIMENTO, Flávia Raquel Fernandes do¹
SANTOS, Ana Paula S. de Azevedo dos^{1*}

Resumo: O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), palmeira que representa o mais importante produto do extrativismo vegetal do Maranhão, produz um fruto, côco babaçu, composto predominantemente por carboidratos e que apresenta efeitos imunomodulatórios. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial imunomodulador do mesocarpo de babaçu por ativação do sistema complemento. Foi utilizado o extrato aquoso de mesocarpo de babaçu, na concentração de 40 mg/mL e filtrado após 24 horas. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford. No ensaio hemaglutinante, usou-se um lavado de hemácias 1% tratadas por uma hora com extrato nas concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40mg/mL, em triplicata, tendo como controle a suspensão de hemácias com tampão salina fosfato. A aglutinação foi verificada macro e microscopicamente, com a contagem de rosetas. O ensaio de hemólise foi feito usando o lavado de hemácias tratadas ou não com extrato na concentração de 40mg/mL, incubado por duas horas com soro normal ou inativado a 56°C, para verificar desnaturação protéica. A concentração de hemoglobina no sobrenadante da cultura representou a atividade hemolisante. Nossos resultados mostraram que ensaio de hemaglutinação não apresentou diferença macroscópica entre os grupos. Microscópicamente, a presença de rosetas seguiu um padrão dose-dependente, sugerindo a presença de lectina no extrato, entretanto a dosagem de proteínas apresentou concentrações baixas. No ensaio de hemólise, a concentração de hemoglobina foi maior na cultura de hemácias tratadas com extrato que o controle. Para confirmar a ação das proteínas do complemento, as hemácias tratadas com extrato foram incubadas com soro inativado, sendo verificada uma redução da hemólise, se igualando ao controle. Os resultados mostram que o efeito imunomodulador do mesocarpo de babaçu apresenta a participação do sistema complemento, possivelmente através da via das lectinas.

Descritores: Mesocarpo de babaçu; Imunomodulação; Sistema Complemento; Lectinas; Carboidrato.

Abstract: Evaluation of complement system activation *in vitro* as an immunomodulation mechanism induced by babassu mesocarp. Babassu (*Orbignya phalerata* Mart.), palm tree that represents the most important product extractive industry of Maranhão, produces a fruit, babassu coconut, composed mainly for carbohydrates and has immunomodulatory effects. The aim of the study was to investigate the immunomodulatory potential of babassu mesocarp by activation of the complement system. We used the aqueous extract of babassu mesocarp concentration of 40 mg/mL and filtered after 24 hours. The measure protein concentration was performed by the colorimetric method of Bradford. In the hemagglutination assay was used a suspension of erythrocytes 1% treated or not for one hour with extract concentrations 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40mg/mL in triplicate, using the suspension of erythrocytes in phosphate buffered saline as control. Agglutination was observed macroscopically and microscopically by counting rosettes. The hemolysis assay was performed using the suspension of erythrocytes treated or not with extract concentration 40 mg/mL, incubated for two hours with normal serum or inactivated at 56° to check protein denaturation. Hemoglobin concentration in the in the culture supernatant represented hemolyzing activity. Our results showed that hemagglutination assay showed no macroscopic difference between the groups. Microscopically, the presence of rosettes followed a dose-dependent, suggesting the presence of lectin in the extract, however measure protein showed low concentrations. In hemolysis assay, the concentration of hemoglobin was higher in culture of erythrocytes treated with extract than the control. To confirm the action of complement proteins, erythrocytes treated with extract were incubated with inactivated serum, being observed a reduction of hemolysis similar to control. The results show that the immunomodulatory effect of babassu mesocarp shows the participation of the complement system, possibly by way of lectins.

Descriptors: Babassu Mesocarp; Immunomodulation; Complement System; Lectins; Carbohydrate.

¹ Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão.

INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.) é uma palmeira nativa do Piauí, sul do Pará e Maranhão, ocorrendo espontaneamente e formando extensos cocais semelhantes a monoculturas⁹. O fruto desta espécie, coco babaçu, possui três componentes: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O epicarpo corresponde a 15% do peso total do fruto, o mesocarpo a 20% e o endocarpo a 58% do peso¹¹.

Nesse aspecto, o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu possui inúmeras atividades imunomoduladoras e uma composição riquíssima em carboidratos^{2,8,12}. Estas biomoléculas têm sido estudadas por terem relevância em processos biológicos diversos como, por exemplo, molécula ativadora do sistema imune⁶. Experimentos mostram algumas atividades dessas moléculas relacionadas à ativação de macrófagos e atividade antitumoral frente a diversos modelos¹⁰.

Os carboidratos adquirem uma maior importância quando atuam como sinalizadores e receptores, fazendo com que a comunicação entre moléculas e outras células seja estabelecida. As Lectinas Ligantes de Manose (MBL), que são receptores de manose na superfície dos macrófagos, apresentam domínios de reconhecimento de carboidrato e ligam-se a estruturas de manose presentes na superfície de patógenos permitindo a opsonização e fagocitose dos microorganismos^{7,14}.

A MBL é uma proteína com importante participação no sistema imunológico inato e representa a proteína central da ativação da via das lectinas do complemento. A via das lectinas é ativada pela ligação da MBL a resíduos de manose e outros açúcares encontrados na superfície de vírus, bactérias, leveduras, fungos e superfícies celulares diversas^{5,14}.

Assim, o babaçu representa uma grande perspectiva medicamentosa para o estado do Maranhão, visto que, devido à alta porcentagem de carboidratos em sua composição, ele pode ser capaz de modular o sistema imune ao ativar o sistema complemento, atuando, dessa maneira, como um adjuvante imunológico.

MATERIAL E MÉTODOS

Identificação do material vegetal e preparo do extrato

Para o preparo do extrato foi utilizado o pó do mesocarpo de babaçu fornecido pela Cooperativa das Quebradeiras de Côco do Maranhão. A farinha de mesocarpo de babaçu (1g) foi suspensa em 25 mL de água destilada, obtendo-se uma concentração de 40 mg/mL. Essa suspensão foi mantida a 4°C. Após 24 horas, foi feita a filtração para obtenção do extrato aquoso do mesocarpo de babaçu (EAMB).

Determinação de proteínas no extrato

A determinação de proteínas do EAMB foi feita pelo método colorimétrico de Bradford³ (1976), utilizando albumina bovina como solução padrão. A leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro, a 415 nm.

Avaliação de atividade hemaglutinante do mesocarpo de babaçu

A atividade hemaglutinante realizou-se segundo a metodologia descrita por Calderón de la Barca, Ochoa e Valencia⁴ (1985). Ademais, as amostras de sangue foram coletadas de doadores saudáveis, tipo A e O, Rh positivos, lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, para a obtenção do concentrado de hemácias. Este foi diluído em PBS para obtenção da solução de hemácia 1%. O EAMB, concentração 40 mg/mL, sofreu diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Em placa de 96 poços, transferiu-se 100 µL de EAMB, uma concentração em cada coluna, e 100 µL da solução de hemácia a 1%, em triplicata para o sangue A+ e duplicata para o sangue O+. Utilizou-se PBS com solução de hemácia a 1% como controle negativo. A reação foi incubada por 1 hora em estufa. A avaliação da hemaglutinação foi feita macroscopicamente e microscopicamente através da contagem de rosetas, em lâminas de vidro, estabelecendo a média de rosetas em cada 10 campos.

Avaliação da atividade Hemolítica

Amostra de sangue do tipo O+ foi coletada e centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos para separação do soro. Uma alíquota de soro foi mantida a 37°C e outra aquecida a 56°C em banho-maria. As hemácias foram então lavadas com PBS e centrifugadas, para obtenção do concentrado de hemácias. Este foi diluído somente em PBS e diluído em PBS e EAMB, este último em contato por 1 hora, obtendo assim, duas soluções de hemácia a 1%. Transferiu-se para placa de 96 poços 100 µL da solução de hemácia a 1% acrescido de 20 µL de soro a 37°C em um poço. No outro poço adicionou-se 100 µL da solução de hemácia a 1% acrescido de 20 µL de soro a 56°C. Repetiu-se o procedimento em outra coluna, utilizando a solução de hemácia tratada com EAMB. Como controle, utilizamos solução de hemácia a 1% com PBS. A reação foi incubada por 2 horas em estufa. Em seguida, a placa sofreu centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos. A atividade hemolítica foi avaliada através de visualização da placa macroscopicamente, seguida de dosagem de hemoglobina. Para dosagem de hemoglobina transferiu-se o sobrenadante para outra microplaca e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 415nm.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.), com análise de variância one-way ANOVA, seguido de Newman-Keuls, e test t student, com significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dosagem de Proteínas

A quantificação de proteínas do EAMB na concentração de 40mg/mL foi de 0.034 mg, representando menos de 1% do peso total do pó de mesocarpo usado na preparação do extrato.

Atividade Hemaglutinante

No ensaio de atividade hemaglutinante não foi observada diferença entre os grupos quando feita a análise macroscópica. Contudo, na observação das hemácias por microscopia, foram identi-

ficadas rosetas, características de hemaglutinação. Os resultados mostraram maior quantidade de rosetas nas maiores concentrações do extrato aquoso de mesocarpo de babaçu, independente da tipagem sanguínea (Figura 1 e Figura 2).

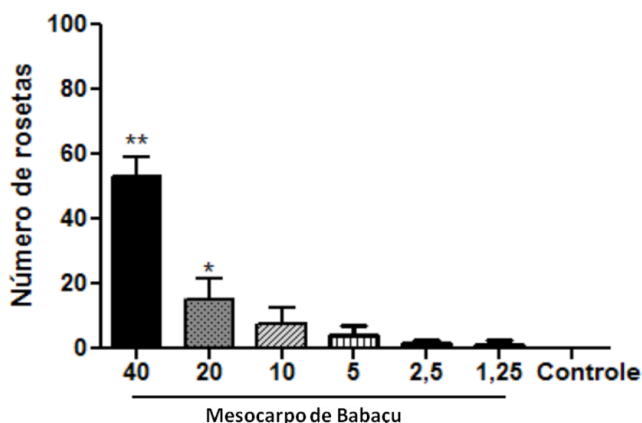


Figura 1-Quantidade de rosetas com hemácias A+ quantificadas após tratamento com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu em diferentes concentrações. As barras representam a média com desvio padrão. A análise estatística foi o teste t comparando os grupos tratados com controle, sendo, ** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$.

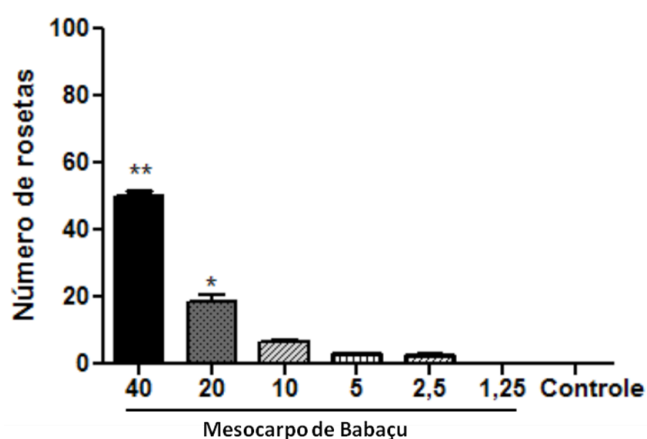


Figura 2-Quantidade de rosetas com hemácias O+ quantificadas após tratamento com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu em diferentes concentrações. As barras representam a média com desvio padrão. A análise foi o teste t comparando os grupos tratados com o controle, sendo ** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$.

Atividade Hemolisante

O ensaio de atividade hemolisante foi usado para verificar a ativação da resposta imune pelo sistema complemento. Hemácias tratadas com EAMB apresentaram, ao final da cultura, maior concentra-

ção de hemoglobina livre no sobrenadante apresentando uma média de densidade óptica (DO) de 0,37 ($\pm 0,014$), e as não tratadas mostraram a DO de 0,13 ($\pm 0,014$). Após o aquecimento do soro a 56°C, com inativação das proteínas do sistema complemento, a DO média foi 0,13 ($\pm 0,028$), e 0,14 ($\pm 0,014$), para as hemácias tratadas e não tratadas com EAMB, respectivamente (Figura 3).

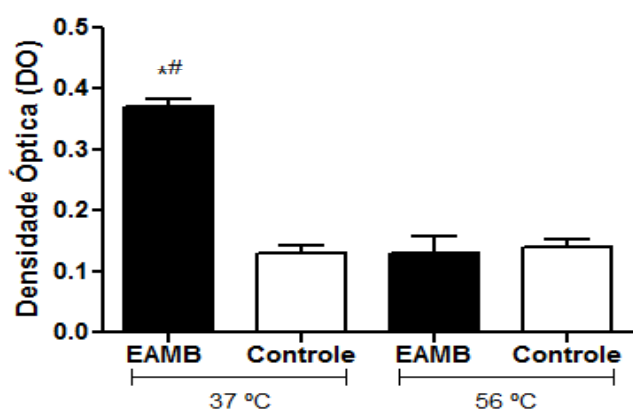


Figura 3-Concentração de hemoglobina no sobrenadante de cultura de hemácias, tratadas ou não com extrato aquoso de mesocarpo de babaçu (EAMB) 40mg/mL. As barras representam a média com desvio padrão. A análise estatística realizada foi ANOVA com pós-teste Newman-Keuls. * $p < 0,01$ quando comparado com o controle, em presença de soro a 37°C # $p < 0,01$ quando comparado com o EAMB em presença de soro a 56°C.

DISCUSSÃO

O mesocarpo de babaçu é um produto obtido do fruto de uma palmeira que se destaca pela sua distribuição fitogeográfica no estado do Maranhão e que tem importância no uso popular tanto como alimentação como para o tratamento de diversas doenças. Efeitos imunomodulatórios do mesocarpo de babaçu já foram descritos anteriormente, entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos de ação⁷.

Estudos mostraram que o pó obtido do mesocarpo de babaçu apresenta uma constituição rica em carboidratos, chegando a apresentar 99% de carboidratos, sendo um mucopolissacarídeo (MP1) rico em glicose como principal constituinte¹. Estes dados concordam com as análises realizadas neste

trabalho, na qual a constituição protéica obtida no extrato aquoso de mesocarpo de babaçu foi baixa. As proteínas são biomoléculas importantes por participarem de diversos mecanismos da resposta imunológica, tanto na imunidade inata como também na adaptativa¹.

O sistema complemento é composto de glicoproteínas que circulam no sangue de forma inativa, que após mecanismos de clivagem proteolítica, tornam-se ativas e atuam na opsonização, indução da resposta inflamatória, além de formarem um sistema de ataque a células alvo, formando complexos protéicos na membrana que levam a lise celular¹⁴. Uma das formas de ativação do sistema complemento é a via das Lectinas, que se refere a uma classe de proteínas que podem se ligar reversivelmente a carboidratos^{6,14}. Baseado nesta propriedade, o presente trabalho realizou o ensaio de hemaglutinação, que permite identificar a presença de lectinas e verificou a capacidade de ativação do sistema complemento, através da hemólise, mediado por carboidratos presentes no extrato aquoso de mesocarpo de babaçu. Os resultados mostraram que o tratamento com EAMB induziu hemaglutinação de forma dose-dependente, sugerindo a presença de lectinas. Entretanto, a dosagem de proteínas apresentou valores baixos, sugerindo que a hemaglutinação observada pode estar sendo mediada pela interação de carboidratos com proteínas de membrana das hemácias ou a presença de superlectinas no extrato sendo capazes de induzir hemaglutinação em baixas concentrações protéicas por possuírem dois ou mais domínios gigantes de carboidratos¹³. O ensaio de hemólise mostrou maior concentração de hemoglobina na cultura de hemácias tratadas com EAMB incubadas com soro. As proteínas do sistema complemento presentes no soro, quando ativadas pela via das lectinas, induzem a lise celular liberando hemoglobina. Para confirmar se a lise celular estava sendo causada pelas proteínas do sistema complemento, o soro foi aquecido provocando a desnaturação protéica. Os resultados mostraram uma diminuição da hemólise comparada com o soro não desnaturado. Este resultado reforça o mecanismo de ativação do sistema imune mediada pelo sistema complemen-

to através da interação de carboidratos e proteínas, sendo a via da lectinas uma das mais prováveis.

A existência de carboidratos capazes de induzir imunoestimulação tem importância não só pelo aspecto biofarmacológico, colaborando para o entendimento dos mecanismos imunológicos e na busca de fármacos, como também na elaboração de adjuvantes imunológicos importantes para composição de vacinas. Estas potencialidades podem agregar valor ao produto regional e incentivar técnicas extrativistas que ajudam na preservação da espécie e geram renda para as comunidades locais.

CONCLUSÃO

A partir de todos os resultados obtidos, o presente trabalho mostrou que o extrato aquoso do mesocarpo de babaçu tem a capacidade de induzir hemaglutinação e hemólise por ativação do sistema complemento, sugerindo a participação de proteínas do tipo lectinas em associação com carboidratos presentes na composição do extrato. Assim, o trabalho colabora para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade imunomoduladora de importante produto do extrativismo vegetal do Maranhão, levantando possíveis aplicações deste na geração de bioprodutos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento: FAPEMA, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro aos projetos e pelas bolsas recebidas.

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Introdução à imunologia. Imunologia Celular e Molecular. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 3-74.
2. Barroqueiro, ESB, Nascimento, FRF, Guerra, RNM. Efeitos do tratamento com mesocarpo de babaçu sobre a produção de anticorpos para hormônio tireoidiano-tiroxina. Rev. Do Hosp. Univers. UFMA 2001; 3: 25-27.
3. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72(1): 248-254.
4. Calderón de la Barca AM, Ochoa JL, Valencia ME. Effect of the extractoin of a hemagglutinin on the nutritive value of Amaranthus leocarpus seeds. J food Sci 1985; 50(6): 1700-1702.
5. Carvalho, EG. Investigação da Lectina Ligante de Manose (MBL) em pacientes com doença celíaca [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
6. Elisandra, GC, Shirley RRU, Lorete MSK, IARA TMR. Lectina Ligante de Manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. Rev. Bras. Alerg. Imunopatolog. 2007; 30(05): 187-193.
7. Janeway, CA, Travers P, Walport M, Shlomchik, M. O sistema complemento e a imunidade inata. Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 63-84.
8. Nascimento, FR, Barroqueiro, ES, Azevedo, AP, Lopes, AS, Ferreira, SC, Silva, LA, et al. Ativação de macrófagos induzida por *Orbignya phalerata* Mart. J Ethnopharmacol 2006; 103: 53-58.
9. Prance, GT. Manual de Botânica do Maranhão. Gráfica Universitária da Universidade Federal do Maranhão. São Luís, Maranhão, 1985.
10. Rosemberg, SA. Principles and applications of biologic therapy. Cancer: principles & practice of oncology. 4 ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993, p. 276-292.
11. Rosenthal, FRT. O amido do coco de babaçu, algumas propriedades dos grânulos e das pastas. Rev Bras Tecno 1975; 6: 29-33.

12. Silva, BP, Parente, JP. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. *Fitoterapia*. 2001; 72(8): 887-93.
13. Sulák O, Cioci G, Lameignére E, Balloy V, Round A, Gutsche I, et al. *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. *PLoS Pathog*. 2011. [citado agosto 2012]. Disponível em: URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3164656/pdf/ppat.1002238.pdf>.
14. Teijo F. Evolution of the Lectin-Complement Pathway and its role in Innate Immunity. *Nature Reviews* 2002; 2: 346-351.

***Autor para correspondência:**

Ana Paula S. de Azevedo dos Santos

E-mail: apsazevedo@yahoo.com.br