

## Avaliação dos Efeitos Cardíacos de Lectina Solúvel em Água (WSMoL) de Sementes de *Moringa Oleifera*

*Evaluation of the Cardiac Effects of a Water-Soluble Lectin (Wsmol) from Moringa Oleifera Seeds*

Ainhoa Rodríguez de Yurre,<sup>1\*</sup> José Dayvid Ferreira da Silva,<sup>2\*</sup> Marília Kalinne da Silva Torres,<sup>2</sup> Eduarda Lopes Martins,<sup>1</sup> Isalira Peroba Ramos,<sup>1</sup> Wênio Sandoval Filho Lima da Silva,<sup>2</sup> Jéssica da Silva Sarpa,<sup>2</sup> Caio César da Silva Guedes,<sup>2</sup> Thiago Henrique Napoleão,<sup>2</sup> Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho,<sup>2</sup> Patrícia Maria Guedes Paiva,<sup>2</sup> Emiliano Medei<sup>1</sup>

Universidade Federal do Rio de Janeiro,<sup>1</sup> Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Universidade Federal de Pernambuco,<sup>2</sup> Recife, PE – Brasil

\* Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho

### Resumo

**Fundamento:** As sementes de *Moringa oleifera*, que são utilizadas para clarificação de água, contêm uma lectina chamada WSMoL que tem mostrado atividade antibacteriana e imunomoduladora *in vitro*. Devido ao seu valor nutritivo e potencial terapêutico, as folhas e as sementes dessa árvore são consumidas em algumas comunidades. Algumas lectinas de plantas não são tóxicas para mamíferos, mas tem sido relatado que outras são prejudiciais quando ingeridas ou administradas por outros meios.

**Objetivo:** Como um dos passos necessários para determinar a segurança de WSMoL, nós avaliamos os possíveis efeitos cardiotoxicos desta proteína purificada.

**Métodos:** Durante 21 dias consecutivos, a WSMoL foi administrada a camundongos por gavagem. Foram investigadas as funções eletrofisiológicas, mecânicas e metabólicas *in vivo* e *ex vivo* por meio de registros eletrocardiográficos, ressonância magnética nuclear e respirometria de alta resolução.

**Resultados:** O tratamento com WSMoL não induziu alterações nos níveis de glicose no sangue ou peso corporal em comparação com o grupo controle. Adicionalmente, as relações peso cardíaco/peso corporal e peso cardíaco/comprimento tibial estavam semelhantes em ambos os grupos. A ingestão de lectina também não modificou a tolerância à glicose ou resistência à insulina. Não foram observadas alterações nos parâmetros eletrocardiográficos ou na duração do potencial de ação cardíaco. Os corações dos camundongos dos grupos controle e WSMoL mostraram função ventricular esquerda preservada. Além disso, a WSMoL não induziu alterações na função mitocondrial (em todos os casos,  $p > 0,05$ ).

**Conclusões:** A administração de WSMoL demonstrou ter um perfil de segurança cardíaca. Estes resultados contribuem à avaliação de segurança do uso de sementes de *M. oleifera* para tratar água, visto que essa lectina está presente na preparação empregada por algumas populações com esse fim. (Arq Bras Cardiol. 2020; 114(6):1029-1037)

**Palavras-chave:** *Moringa Oleifera*; Lectinas; Glicosídeos; Carboidratos; Coração; Segurança Hídrica; Camundongos.

### Abstract

**Background:** *Moringa oleifera* seeds, which are used for water clarification, contain a lectin named WSMoL which has shown *in vitro* antibacterial and immunomodulatory activity. Due to their nutritional value and therapeutic potential, the leaves and seeds of this tree are eaten in some communities. Some plant lectins are non-toxic to mammals, but others have been reported to be harmful when ingested or administered by other means.

**Objective:** As one of the steps needed to define the safety of WSMoL, we evaluated possible cardiotoxic effects of this purified protein.

**Methods:** WSMoL was administered for 21 consecutive days to mice by gavage. Electrophysiological, mechanical, and metabolic cardiac functions were investigated by *in vivo* and *ex vivo* electrocardiographic recordings, nuclear magnetic resonance, and high-resolution respirometry.

**Results:** The treatment with WSMoL did not induce changes in blood glucose levels or body weight in comparison with control group. Moreover, the heart weight/body weight and heart weight/tibia length ratios were similar in both groups. Lectin ingestion also did not modify glucose tolerance or insulin resistance. No alterations were observed in electrocardiographic parameters or cardiac action potential duration. The heart of mice from the control and WSMoL groups showed preserved left ventricular function. Furthermore, WSMoL did not induce changes in mitochondrial function (in all cases,  $p > 0.05$ ).

**Conclusions:** The administration of WSMoL demonstrated a cardiac safety profile. These results contribute to the safety evaluation of using *M. oleifera* seeds to treat water, since this lectin is present in the preparation employed by some populations to this end. (Arq Bras Cardiol. 2020; 114(6):1029-1037)

**Keywords:** *Moringa Oleifera* (WSMoL), Lectins, Glycosides; Carbohydrates; Heart; Water Security; Mice.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Emiliano Medei •

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Av. Carlos Chagas Filho, 373, CCS, Bloco G. CEP 21941-901, Rio de Janeiro, RJ – Brasil

E-mail: emedei70@biof.ufrj.br

Artigo recebido em 20/02/2018, revisado em 04/05/2019, aceito em 23/06/2019

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190071>

### Introdução

*Moringa oleifera* Lamarck (Moringaceae) é uma árvore nativa da região sul do Himalaia, amplamente cultivada na Ásia e nos trópicos, principalmente devido ao seu uso para clarificação de água. Tem sido cultivada como um remédio tradicional, utilizada nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica,<sup>1,2</sup> e também é usada para tratar várias doenças, como câncer e doenças crônicas e infecciosas.<sup>3,4</sup>

Uma lectina solúvel em água isolada das sementes de *M. oleifera* (WSMoL) tem demonstrado atividade inseticida,<sup>5-7</sup> e estudos *in vitro* demonstraram sua atividade antibacteriana contra bactérias corrosivas e patogênicas.<sup>8-10</sup> A WSMoL demonstrou atividade anti-inflamatória *in vitro* em macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarídeos,<sup>11</sup> e foi capaz de ativar linfócitos humanos a partir de culturas de células mononucleares do sangue periférico, mostrando um efeito imunomodulador.<sup>12</sup> Também tem sido comprovado que WSMoL é uma das proteínas coagulantes encontradas nas sementes de *M. oleifera*,<sup>8,13</sup> e é capaz de reduzir a turbidez e a ecotoxicidade de amostras de água coletadas de um riacho poluído.<sup>14</sup>

Está bem demonstrado que muitos antibióticos e algumas classes de drogas anti-inflamatórias estão frequentemente associados a efeitos cardiotoxicos.<sup>15,16</sup> Entre os eventos adversos no sistema cardiovascular, estão a ocorrência de insuficiência cardíaca com disfunção ventricular sistólica, arritmias e isquemia miocárdica.<sup>17</sup> Classicamente, como uma consequência de cardiotoxicidade, podem ser observadas alterações no eletrocardiograma (ECG), tais como o prolongamento do intervalo QT, o qual tem sido observado em pacientes que usaram várias classes de drogas antimicrobianas, incluindo macrólidos e fluoroquinolonas.<sup>18-20</sup> Entre os macrólidos, a administração intravenosa de eritromicina apresenta o risco maior de aumento do intervalo QT, e arritmias fatais têm sido relatadas quando foi usada isoladamente ou em combinação com outras drogas que prolongam o intervalo QT.<sup>16</sup> Portanto, a proteção da função cardíaca atualmente está um desafio constante para a indústria farmacêutica, autoridades reguladoras e médicos que enfrentam reações clínicas adversas de vários agentes terapêuticos na prática clínica.

WSMoL tem surgido como um potencial medicamento antibacteriano e como um agente imunomodulador. Algumas lectinas de plantas não são tóxicas para mamíferos,<sup>21,22</sup> enquanto outras têm sido relatadas como prejudiciais quando ingeridas ou administradas por outros meios, como injeção intraperitoneal.<sup>23</sup> Portanto, como um dos passos necessários para determinar a segurança de WSMoL, este estudo avaliou os possíveis efeitos cardiotoxicos desta proteína.

### Métodos

#### Material das plantas e isolamento da lectina

Foram coletadas sementes de *moringa oleifera* em Recife (Pernambuco, Brasil) com a autorização (nº 38690) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e armazenadas a -20 °C. Uma amostra do material coletado foi armazenada como um atestado de espécie (número 73345) no herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo

de Pernambuco. Foi registrado o acesso (A6CAB4C) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

A WSMoL foi isolada a partir do pó das sementes de acordo com o protocolo previamente descrito por Coelho et al.,<sup>5</sup> Resumidamente, as proteínas foram extraídas em água destilada, e, após filtração e centrifugação, o extrato foi tratado com sulfato de amônio com saturação de 60%<sup>24</sup> durante 4 h a 28 °C. Após outra centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em água e dialisado durante 8 h contra água destilada (4 h) e NaCl 0,15 M (4 h). A fração dialisada (100 mg de proteínas) foi carregada em uma coluna de quitina equilibrada com NaCl 0,15 M (taxa de fluxo de 20 mL/h), e o WSMoL foi eluído com 1,0 M de ácido acético. A lectina isolada foi dialisada contra água destilada com três trocas de líquido para eliminação do eluente. A atividade de ligação de carboidratos da lectina foi monitorada durante o processo de purificação pelo ensaio da atividade hemaglutinante, de acordo com o método descrito por Paiva e Coelho.<sup>25</sup>

#### Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos C57BL/6 mantidos no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob condições controladas de temperatura constante (23 °C), com um ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre a comida e água. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Pesquisa em Animais adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e os protocolos aplicados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFRJ, sob número de protocolo DFBCICB041. Os camundongos foram utilizados para experimentos durante 21 dias.

#### Condições experimentais

Os animais foram separados em dois grupos experimentais: CNTRL (grupo controle) e WSMoL (animais tratados com WSMoL). Vários estudos do nosso grupo têm extensivamente realizado experimentos com WSMoL utilizando concentrações entre 10 µg/ml e 0,2 mg/ml<sup>5-12</sup> com a finalidade de testar diversos efeitos biológicos de WSMoL. No presente estudo, para testar a cardiotoxicidade desta proteína purificada, foi utilizada uma concentração de WSMoL 10 vezes mais alta. Deste modo, os animais do grupo WSMoL foram tratados com a lectina (proteína purificada) por gavagem, com uma concentração 5 mg/kg do peso corporal (equivalente a 2 mg/ml) durante 21 dias. Os animais no grupo CNTRL foram tratados com água milli-Q por gavagem durante 21 dias.

#### Hipertrofia cardíaca

Com a finalidade de avaliar a existência de possível hipertrofia cardíaca, os corações dos camundongos foram pesados, e os dados foram normalizados, calculando as relações peso cardíaco/peso corporal (PC/PCorp) e peso cardíaco/comprimento tibial (PC/CT).<sup>26,27</sup> Após a pesagem, os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical. Subsequentemente, os corações foram extraídos, lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), secados para remover o excesso de líquido e pesados. O comprimento tibial foi medido com um paquímetro.

### Glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose intraperitoneal e teste de tolerância à insulina intraperitoneal

As concentrações de glicemia de jejum foram determinadas a partir do sangue das veias da cauda usando um glicosímetro automatizado (Contour™ TS Bayer), teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGI) e o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTII), os camundongos foram mantidos em jejum por 6 h e 4 h, respectivamente. Após o período de jejum, os animais receberam, por via intraperitoneal, 2 g/kg de glicose para o TTGI ou 0,5 IU/kg de insulina TTII,<sup>28</sup> e níveis de glicemia de jejum foram monitorizados 0, 15, 30, 60, 120 min após injeção de um corte na cauda. Foi calculada a área sob a curva (AUC) utilizando todos os pontos no tempo, descontando os valores basais de glicose para cada animal.

### Eletrocardiografia e ecocardiografia

Para avaliar a atividade elétrica cardíaca *in vivo*, foi realizado um registro de eletrocardiograma (ECG) nos animais conscientes utilizando um método não invasivo,<sup>29</sup> a saber: dois eletrodos subcutâneos implantados sob anestesia com isoflurano nas patas dianteiras direita e esquerda, correspondendo à derivação I do ECG. No momento do registro, os eletrodos foram conectados por cabos flexíveis a um amplificador diferencial caseiro acoplado em CC (generosamente fornecido por Dr. Ariel Escobar, University of California, Merced, EUA), utilizando um filtro passa-baixo de 500 Hz e uma frequência de aquisição de 1 kHz. O sinal foi digitalizado usando Digidata 1440A (Axon Instruments, San José, CA, EUA) e registrado usando um programa de aquisição baseado em Labview (National Instruments, Austin, TX, EUA). Foram analisadas as durações dos seguintes intervalos: PR, RR, QRS e QJ.

A função cardíaca foi avaliada por ecocardiografia (ECHO) *in vivo* utilizando o Sistema de Imagem de Alta Resolução Vevo 770 (VisualSonics, Toronto, Canadá) acoplado a um transdutor de 30 MHz, sob anestesia com isoflurano. As imagens foram adquiridas na modalidade bidimensional e analisadas por um investigador cego. Foram calculados o volume diastólico final, o volume sistólico final, a fração de ejeção e a mudança de área fracionada do ventrículo esquerdo utilizando o método de Simpson. Resumidamente, estes parâmetros de função cardíaca foram avaliados em um corte do eixo paraesternal longitudinal e em quatro imagens do eixo curto no modo B em alta resolução temporal, obtidas em diferentes níveis ventriculares, como descrito anteriormente.<sup>30</sup>

### Potencial de ação

Para realizar registros do potencial de ação (PA) cardíaco em coração intato, um sistema de perfusão retrógrada de Langendorff foi utilizado para manter os corações funcionais *ex vivo* durante horas, como previamente descrito.<sup>31,32</sup> Para evitar danos no tecido cardíaco pela formação de coágulos sanguíneos, os animais foram injetados por via intraperitoneal, com Na<sup>+</sup>-heparina, 15 min antes da eutanásia que foi realizada por deslocamento cervical. Os corações foram rapidamente removidos, canulados pela aorta e continuamente perfundidos com uma solução de Tyrode oxigenada contendo o seguinte (em mM): NaCl 140, KCl 5,3, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,33, HEPES 10 e glicose 10. O pH foi calibrado para 7,4 com NaOH a 32 °C. Para diminuir

a contração mecânica, os corações foram perfundidos com Tyrode contendo 4 mM de Blebbistatin (Selleckchem, Houston, TX, EUA).

Foram usados microeletrodos de vidro borossilicato (10–40 MΩ) para registrar os sinais elétricos. Estes microeletrodos foram preenchidos com solução de KCl 3 M e inseridos em um suporte (MEH1SF12, World Precision Instrument [WPI], Sarasota, FL, EUA) incorporado em um micromanipulador (MM33 links, WPI) conectado à entrada de um pré-amplificador (Electro 705, WPI). Os microeletrodos foram colocados na superfície do ventrículo esquerdo e a leitura do microeletrodo foi ajustada em zero. Os sinais amplificados foram digitalizados (NI USB 6281, National Instrument) e analisados com um programa caseiro em LabView (generosamente desenvolvido e fornecido por Dr. Ariel Escobar, University of California, Merced, CA, EUA).

Os parâmetros analisados foram a duração do potencial de ação (DPA) a 30% e 90% de repolarização (DPA<sub>30</sub> e DPA<sub>90</sub>, respectivamente).

### Isolamento das mitocôndrias cardíacas dos camundongos

O isolamento das mitocôndrias cardíacas dos camundongos foi adaptada do protocolo descrito por Affourtit et al.,<sup>33</sup> com pequenas modificações. Os corações foram rapidamente dissecados e lavados em tampão Chappell-Perry (CP) gelado, contendo o seguinte (em mM): KCl 100, Tris-HCl 50, EGTA 2 com pH de 7,2. Os corações foram pesados, picados com lâminas e lavados 4 a 5 vezes com tampão CP. O tecido foi subsequentemente incubado por 5 min com tampão CP suplementado com albumina a 0,5%, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de ATP e 125 U/100 mL de protease tipo VIII, na proporção de 1 mL/100 mg de tecido. Após isso, os corações foram homogeneizados (Ultra-turrax homogenizer [IKA®], Campinas, SP, Brasil), configuração baixa, 3 s, 3 vezes), e o homogenato resultante foi centrifugado. O sobrenadante foi centrifugado e o sedimento foi lavado e ressuspenso em tampão CP gelado e finalmente centrifugado. O sedimento mitocondrial final foi ressuspenso em um volume pequeno de tampão CP. A dosagem de proteína da preparação obtida foi realizada pelo método descrito por Lowry et al.<sup>34</sup>. As preparações mitocondriais isoladas foram submetidas à respirometria de alta resolução para medir os fluxos de consumo de oxigênio.

### Respirometria de alta resolução

Para as análises de consumo de oxigênio, foram usadas mitocôndrias isoladas. Os experimentos foram realizados em um respirômetro O2k de alta resolução (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria, UE) a 37°C com meio de respiração mitocondrial (MIR05) contendo o seguinte (in mM): EGTA 0,5, MgCl<sub>2</sub> 3, K-MES 60, taurina 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20, HEPES 20, sacarose 110 e 1 g/L BSA livre de gordura com pH de 7,1. O protocolo utilizado para avaliar a função mitocondrial foi adaptado de Pesta e Gnaiger,<sup>35</sup> consistindo na adição sequencial de múltiplos substratos e inibidores, a saber: 5 mM piruvato, 2,5 mM malato, 10 mM glutamato, 100 μM 5'-difosfato de adenosina (ADP), 1 mM ADP, 10 mM succinato, 0,2 μg/mL oligomicina e 2 μM antimicina A. A relação de controle respiratório (RCR) foi calculada pelo fluxo de oxigênio após a adição do succinato

na presença de ADP, dividido pelo fluxo após a oligomicina. A capacidade fosforilativa máxima do sistema de transporte de elétrons (OXPHOS) foi calculado pelo consumo de oxigênio após a adição do succinato menos o consumo de oxigênio residual (ROX), o qual foi estimado após a adição da antimicina A. O vazamento inespecífico de prótons foi determinado pelo fluxo de oxigênio não sensível à oligomicina menos o ROX. Um protocolo distinto foi realizado, alterando a sequência dos substratos, para calcular o vazamento de elétrons, a relação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pelo fluxo de  $O_2$ . A ordem de titulação deste protocolo foi a seguinte: 5 mM piruvato, 2,5 mM malato, 10 mM glutamato, 10 mM succinato, 1 mM ADP e 0,2  $\mu$ g/mL oligomicina. Os dados foram analisados em software DatLab 5 (Oroboros Instruments) e expressos em pmol  $O_2$ /mg/s.

### Produção mitocondrial de $H_2O_2$

O  $H_2O_2$  mitocondrial foi medido monitorizando-se a taxa de aparecimento de resorufina a 563/587 nm (excitação/emissão) em um espectrofotômetro de fluorescência (Varian Cary Eclipse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A mesma concentração de mitocôndria isolada que foi utilizada nos experimentos de consumo de oxigênio foi acrescentada em 2 mL de MIR05 suplementado com 5,5  $\mu$ M Amplex red, 2 U/mL peroxidase e 40 U/mL superóxido dismutase. Os ensaios de produção de  $H_2O_2$  foram realizados a 37 °C, e os substratos, inibidores e desacopladores foram acrescentados na ordem seguinte: 5 mM piruvato, 2,5 mM malato, 10 mM glutamato, 10 mM succinato, 1 mM ADP, 0,2  $\mu$ g/mL oligomicina, 2 títulos de 0,5  $\mu$ M de cianeto de carbonila-4-(trifluorometoxi) fenil-hidrazona (FCCP) e 2  $\mu$ M antimicina A. Os dados gerados em unidades arbitrárias de fluorescência foram analisados no software Origin Pro-8 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA) e normalizados em pmol de  $H_2O_2$ /mg/min a partir da calibração padrão das curvas de  $H_2O_2$  realizadas na presença do mesmo número de mitocôndrias isoladas para cada experimento.

### Análise estatística

Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (com intervalo interquartil). Para comparar os resultados entre os grupos CNTRL e WSMoL, foi utilizado o teste t de Student não pareado, quando apropriado. De outra maneira, os dados que apresentaram distribuição não gaussiana (teste Kolmogorov-Smirnov) foram comparados pelo teste Mann-Whitney. Foram consideradas significativas as diferenças entre as variáveis quando o valor p era  $< 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Nós não utilizamos métodos estatísticos para predeterminar o tamanho das amostras. Os tamanhos das amostras foram estimados com base na disponibilidade da amostra e em estudos experimentais anteriores do sistema cardiovascular.<sup>29,30</sup>

### Resultados

O tratamento de 21 dias com WSMoL não induziu alterações ( $p > 0,05$ ) nos níveis de glicose no sangue (Figura 1A) nem no peso corporal (Figura 1B), em comparação com o grupo CNTRL. Além disso as relações PC/PCorp

(Figura 1C) e PC/CT (Figura 1D) foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) em ambos os grupos, indicando que nenhuma hipertrofia cardíaca foi desenvolvida. O tratamento também não modificou a tolerância à glicose (Figura 1E) ou a resistência à insulina (Figura 1F), em comparação com os camundongos não tratados ( $p > 0,05$ ), revelando a ausência de alterações no metabolismo de carboidratos.

A Figura 2 mostra os parâmetros de ECG no 21º dia de tratamento. Os intervalos PR, RR, QRS e QJ (Figura 2C–F) não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre os grupos WSMoL e CNTRL. A  $DPA_{30}$  e a  $DPA_{90}$  foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) entre os camundongos tratados e não tratados (Figura 2G–J). Portanto, os dados obtidos aqui consistentemente demonstraram que o tratamento com WSMoL foi seguro para o comportamento elétrico de corações de camundongo.

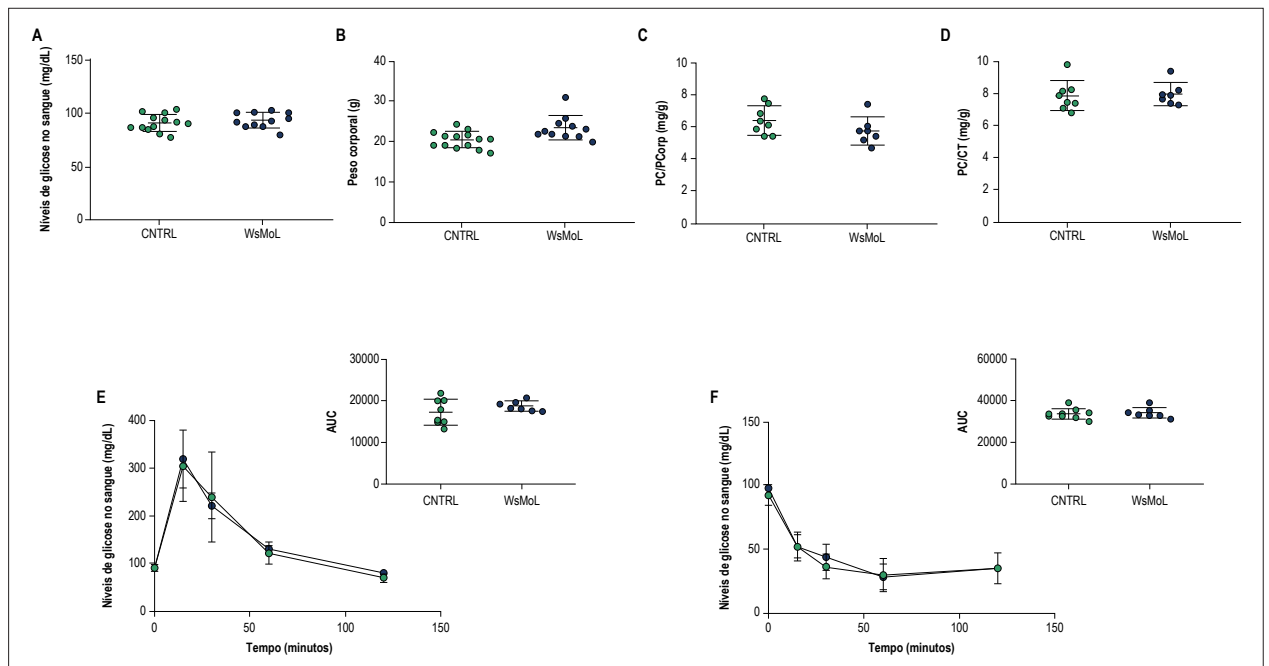
Considerando que tem sido demonstrado que alguns antibióticos podem prejudicar a função e a estrutura do ventrículo esquerdo, nós estudamos a função do ventrículo esquerdo detalhadamente utilizando ECHO (Figura 3). Os camundongos dos grupos CNTRL e WSMoL apresentaram estrutura e função ventricular esquerda preservada, conforme indicada pela ausência de diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nos parâmetros seguintes: fração de ejeção (Figura 3A), alteração da área fracionária (Figura 3B), volume sistólico (Figura 3C), volume diastólico final (Figura 3D), volume sistólico final (Figura 3E) e massa ventricular esquerda (Figura 3F). Como um conjunto, esses dados demonstram que o tratamento com WSMoL não prejudicou a função ventricular esquerda.

Finalmente, para verificar se WSMoL interfere na fisiologia da função mitocondrial cardíaca, nós empregamos abordagens experimentais para analisar duas funções mitocondriais importantes: fosforilação oxidativa e produção de espécies reativas de oxigênio. O tratamento de 21 dias com WSMoL não induziu alterações no consumo de oxigênio mitocondrial, conforme demonstrado na Figura 4A–E. Além disso, o tratamento não interferiu com a taxa de produção de  $H_2O_2$  na presença de diversos substratos, inibidores e desacopladores (Figura 4F), e não alterou o vazamento de elétrons (Figura 4G) em comparação com o grupo CNTRL.

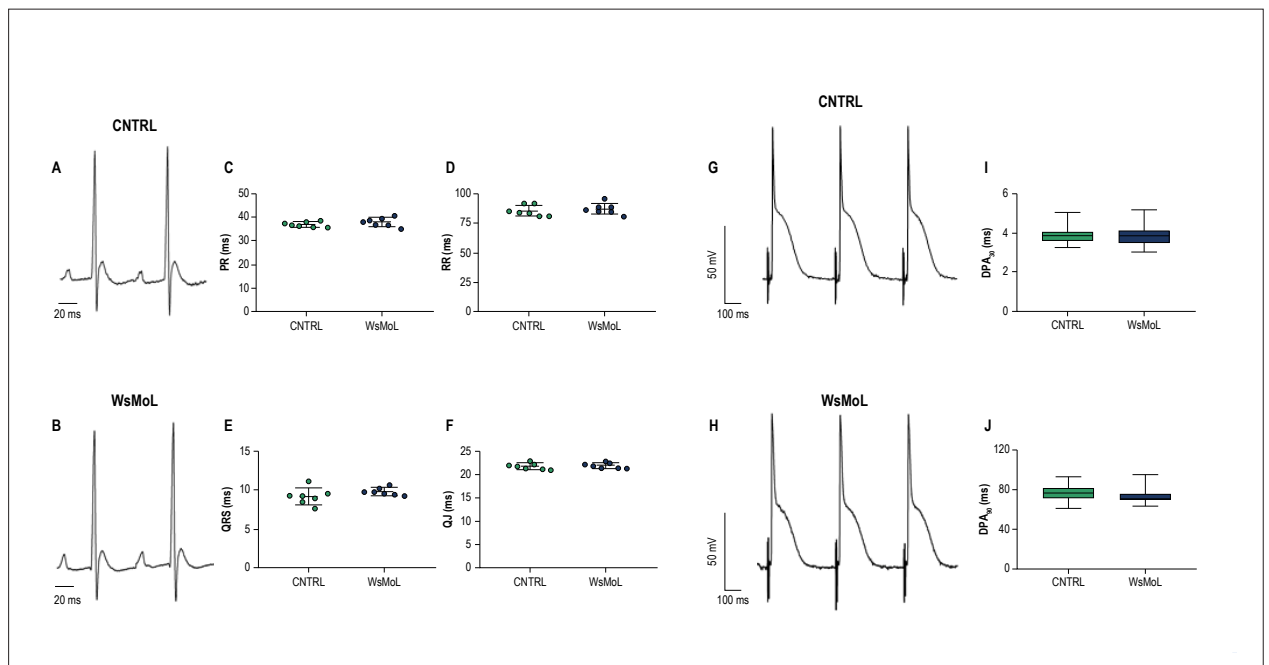
### Discussão

A alta toxicidade de algumas drogas atualmente utilizadas para o tratamento várias doenças é uma grande preocupação em sistemas de saúde. Por exemplo, diversas classes de antibióticos são cardiotoxícas.<sup>18-20</sup> Neste cenário, compostos naturais têm sido cada vez mais estudados devido ao seu potencial na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos.<sup>36</sup> Porém é importante também avaliar a segurança de compostos naturais utilizados para fins alimentares e médicos. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstraram as atividades antibacterianas e imunomoduladoras da WSMoL,<sup>8-10</sup> que também é uma proteína coagulante das sementes de *M. oleifera*. Neste estudo, nós avaliamos os potenciais efeitos cardiotoxícos da WSMoL, quando administrada por via oral em camundongos. Estudos de segurança são imperativos, mesmo quando as lectinas são administradas por via oral, visto que tem sido relatado que algumas proteínas desta classe podem atravessar a barreira intestinal e ser encontradas sistemicamente.<sup>37</sup>

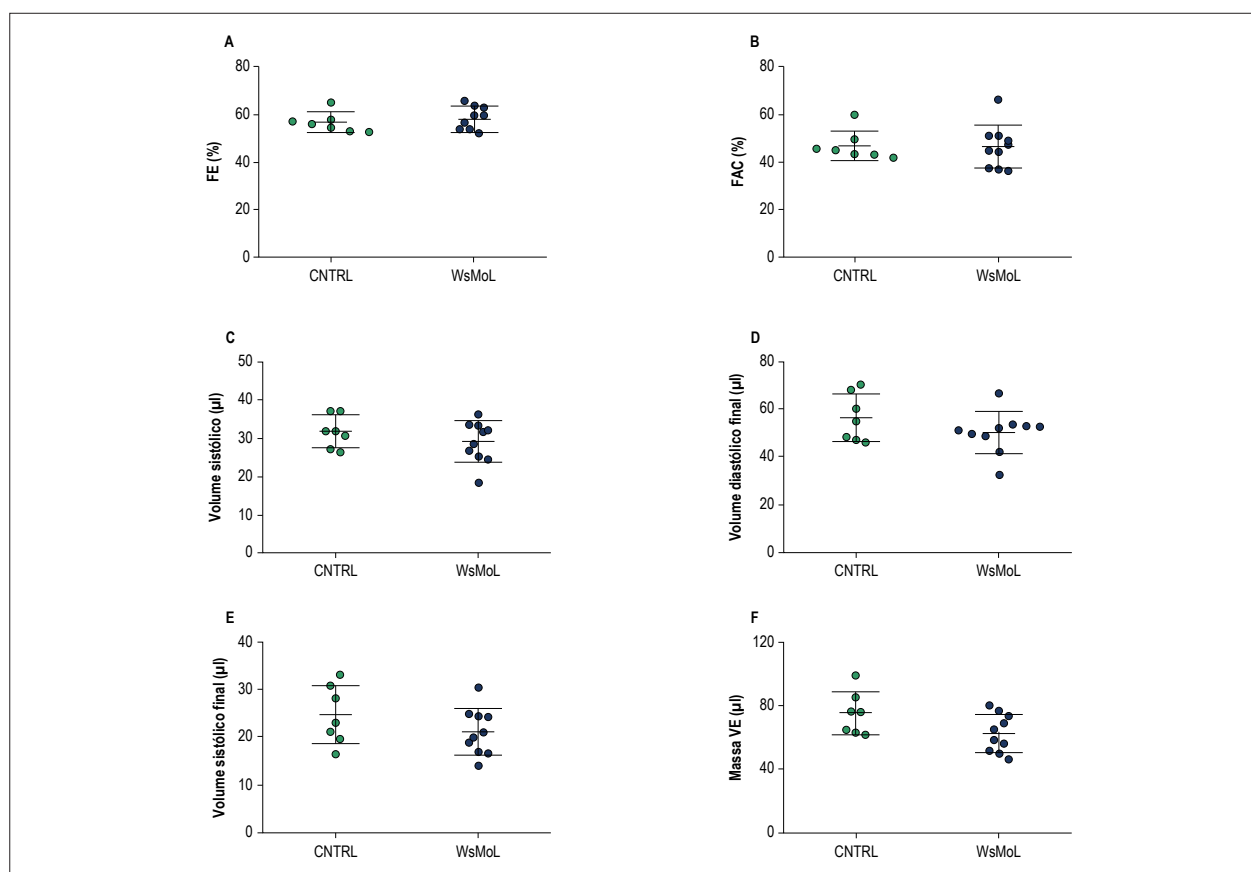




**Figura 1** – Tratamento com WSMoL durante 21 dias não induziu alterações metabólicas. (A) Níveis de glicose no sangue após 21 dias de tratamento com solução salina (CNTRL) ou solução de WSMoL (WSMoL) (CNTRL n = 14 camundongos e WSMoL n = 11 camundongos), (B) peso corporal dos grupos CNTRL e WSMoL (CNTRL n = 14 camundongos e WSMoL n = 11 camundongos), (C) relação peso cardíaco/peso corporal (CNTRL n = 8 camundongos e WSMoL n = 7 camundongos) e (D) relação peso cardíaco/comprimento tibial, demonstrando que o tratamento com 5mg/kg de peso corporal de WSMoL preserva a estrutura cardíaca (CNTRL n = 8 camundongos e WSMoL n = 7 camundongos), (E) teste de tolerância à glicose intraperitoneal e (F) teste de tolerância à insulina intraperitoneal com seus gráficos de AUC correspondentes inseridos (CNTRL n = 9 camundongos e WSMoL n = 7 camundongos). Cada ponto representa valores individuais e as linhas representam valores médios. ○: Camundongos CNTRL; ●: Camundongos WSMoL. Foram realizadas as comparações entre grupos utilizando teste t de Student não pareado. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão.



**Figura 2** – WSMoL não comprometeu atividade elétrica cardíaca in vivo ou in vitro. Registros de ECG representativos in vivo dos grupos (A) CNTRL e (B) WSMoL. Os intervalos (C) PR, (D) RR, (E) QRS e (F) QJ sumarizaram os dados obtidos após 21 dias de tratamento com WSMoL (CNTRL n = 7 camundongos; 2.034 medições e WSMoL n = 7 camundongos; 2.038 medições). Cada ponto representa valores individuais e as linhas representam valores médios. Registros representativos in vitro do potencial de ação dos grupos (G) CNTRL e (H) WSMoL são mostrados. Os efeitos do tratamento com WSMoL na duração do potencial de ação (DPA) a (I) 30% e (J) 90% de repolarização são sumarizados (CNTRL n = 5 corações; 483 medições e WSMoL n = 4 corações; 545 medições). Cada ponto representa valores individuais e as linhas representam valores médios. Foram realizadas as comparações entre grupos utilizando teste t de Student não pareado, e dados que não apresentaram distribuição gaussiana (teste Kolmogorov-Smirnov) foram comparados pelo teste Mann-Whitney. ○: Camundongos CNTRL; ●: Camundongos WSMoL. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão para dados com distribuição gaussiana e como mediana e intervalo interquartil para dados com distribuição não gaussiana.



**Figura 3** – Função e estrutura do ventrículo esquerdo estavam preservadas após tratamento com WSMoL. Os resultados obtidos por ECHO dos dois grupos estão sumarizados nos seguintes: (A) fração de ejeção ventricular, (B) alteração da área fracionária, (C) volume sistólico, (D) volume diastólico final (E) volume sistólico final e (F) massa ventricular esquerda (CNTRL n = 7 camundongos e WSMoL n = 10 camundongos). Foram realizadas as comparações entre grupos utilizando teste t de Student não pareado. Cada ponto representa valores individuais e as linhas representam valores médios. ○: Camundongos CNTRL; ●: Camundongos WSMoL. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão.

Existe uma crença que a origem natural de um produto garanta a sua segurança em humanos. Porém alguns compostos naturais podem desencadear alguns efeitos tóxicos, inclusive no nível cardíaco. Por exemplo, o alcalóide aconitina, um ingrediente de Fuzi (um medicamento tradicional chinês), foi indicado como a causa de taquicardia ventricular Bidirecional.<sup>38</sup>

É também sabido que diversos antibióticos são capazes de bloquear os canais de potássio hERG, prolongando o intervalo QT e a DPA.<sup>39-41</sup> Guo et al.,<sup>42</sup> observaram o prolongamento da DPA utilizando eritromicina em miócitos ventriculares de camundongos recém-nascidos. Zhang et al.,<sup>43</sup> também demonstraram que a azitromicina, quando administrada em porquinhos-da-índia, causou prolongamentos significativos das DPA<sub>50</sub> e DPA<sub>90</sub>.

Neste sentido, nós avaliamos os efeitos do tratamento com WSMoL na atividade elétrica cardíaca tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, em camundongos, observando a sua segurança cardiológica.

Outro efeito observado em alguns antibióticos é o comprometimento da função e estrutura ventricular esquerda, como observado por Zhang et al.,<sup>43</sup>. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que antibióticos e outros compostos naturais podem prejudicar a função mitocondrial.<sup>44,45</sup> No entanto,

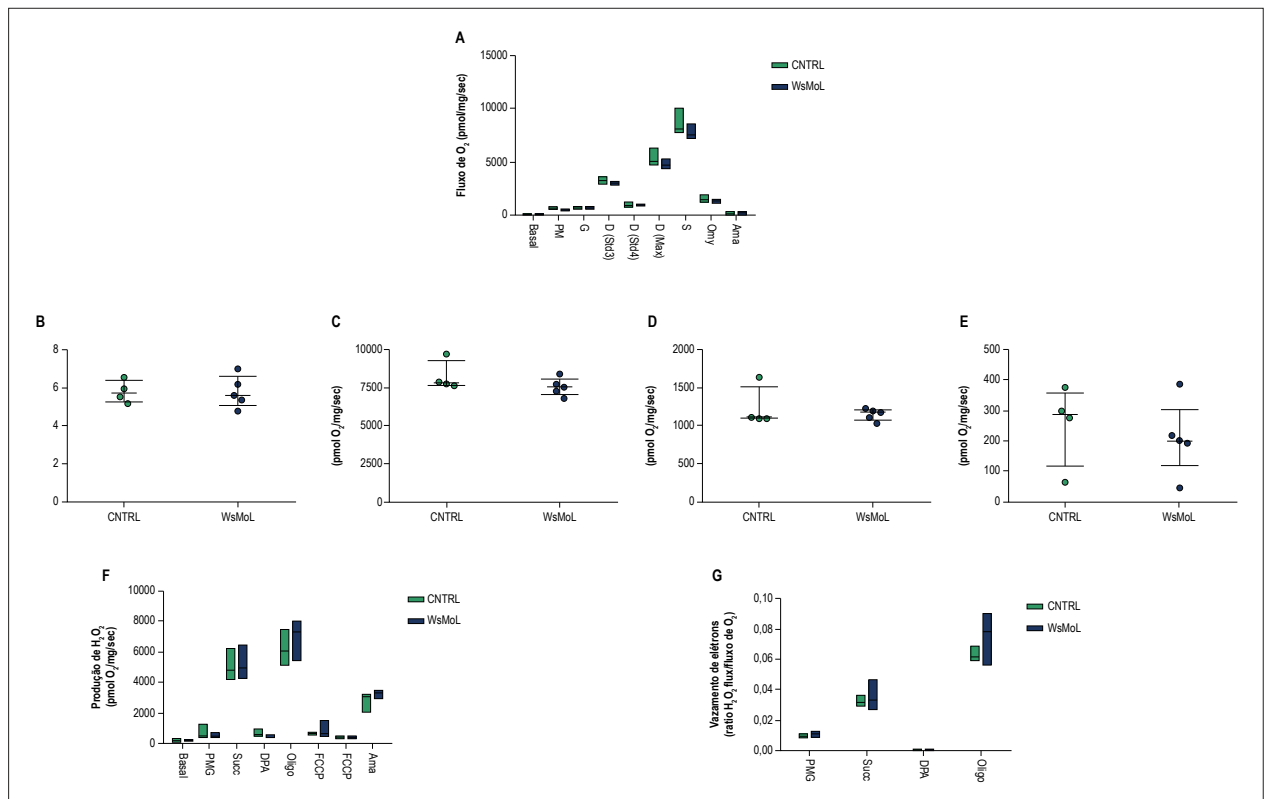
após 21 dias de tratamento com WSMoL, nós observamos que a função ventricular esquerda e a função mitocondrial estavam preservadas.

## Conclusão

Os dados apresentados aqui indicam que a administração de WSMoL por gavagem não teve efeitos cardiotoxicos em camundongos tratados durante 21 dias. Estes resultados contribuem para a avaliação de segurança do uso de sementes para o tratamento da água, visto que essa lectina está presente na preparação empregada por algumas populações com este fim.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas de pesquisa para os pesquisadores (THN, PMGP, EHM). Também agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Código Financeiro: 001) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0661-



**Figura 4 – WSMoL não alterou a função mitocondrial após 21 dias de tratamento.** (A) Fluxos de consumo de O<sub>2</sub> na respirometria de alta resolução dos grupos CNTRL e WSMoL, (B) relação de controle respiratório (RCR), (C) capacidade fosforilativa máxima do sistema de transporte de elétrons (OXPHOS), (D) vazamento inespecífico de prótons (LEAK), (E) consumo de oxigênio residual (ROX), (F) taxas de produção mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (G) vazamento de elétrons nos grupos CNTRL e WSMoL. (CNTRL n = 4 corações e WSMoL n = 5 corações). Cada ponto representa valores individuais e as linhas representam valores médios. ○: Camundongos CNTRL; ●: Camundongos WSMoL. Foram realizadas as comparações entre grupos utilizando teste t de Student não pareado, e dados que não apresentaram distribuição gaussiana (teste Kolmogorov-Smirnov) foram comparados pelo teste Mann-Whitney. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão para dados com distribuição gaussiana e como mediana e intervalo interquartil para dados com distribuição não gaussiana.

2.08/15) pelo apoio financeiro. O JDFS gostaria de agradecer à FACEPE (IBPG-0841-2.08 / 15) pela bolsa de pós-graduação e à CAPES pela assistência à mobilidade (88881.068531/2014-01; PROCAD/2013 - 88887.124150/2014-00). Além disso, os autores agradecem o professor Ariel Escobar, da Universidade da Califórnia, que nos deu apoio para registrar e analisar os registros de potencial de ação em corações intactos. Por fim, os autores agradecem ao professor Antonio Galina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo apoio nos experimentos mitocondriais.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e obtenção de financiamento: Paiva PMG, Medei E; Obtenção de dados: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Torres MK, Martins EL, Ramos IP, Silva WSFL, Sarpa JS, Guedes CCS; Análise e interpretação dos dados e análise estatística: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Martins EL, Ramos IP; Redação do manuscrito e revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Rodriguez de Yurre A, da Silva JDF, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB, Medei E. Rodriguez de Yurre A e da Silva JDF contribuíram igualmente para este trabalho.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

## Vinculação acadêmica

Este estudo está vinculado ao programa de pós-graduação em ciências biológicas e fisiologia da UFRJ e ao programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia da UFPE.

## Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número de protocolo DFBCICB041. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

## Referências

- Hassan FAG, Ibrahim MA. Moringa oleifera: nature is most nutritious and multi purpose tree. *Int J Sci Res Publ.* 2013;3(4):1-5.
- Santos A, Luz LA, Pontual EV, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB. Moringa oleifera: resource management and multiuse life tree. *Adv Res.* 2015;4(6):388-402.
- Sreelatha S, Jeyachitra A, Padma PR. Antiproliferation and induction of apoptosis by Moringa oleifera leaf extract on human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1270-5.
- Vergara-Jimenez M, Almatrafi M, Fernandez M. Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease. *Antioxidants.* 2017;6(4):pii:E91.
- Coelho JS, Santos ND, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, Zingali RB, et al. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. *Chemosphere.* 2009;77(7):934-8.
- de Oliveira CFR, de Moura MC, Napoleão TH, Paiva PMG, Coelho LCBB, Macedo MLR. A chitin-binding lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, Anagasta kuehniella. *Pestic Biochem Physiol.* 2017 Oct;142:67-76.
- Santos ND, de Moura KS, Napoleão TH, Santos GK, Coelho LC, Navarro DM, et al. Oviposition-stimulant and ovidical activities of Moringa oleifera lectin on Aedes aegypti. *PLoS One.* 2012;7(9):e44840.
- Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AF, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, Morais MM, et al. Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from Moringa oleifera. *Lett Appl Microbiol.* 2011;53(2):186-92.
- Moura MC, Trentin DS, Napoleão TH, Primon-Barros M, Xavier AS, Carneiro NP, et al. Multi-effect of the water-soluble Moringa oleifera lectin against Serratia marcescens and Bacillus sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. *J Appl Microbiol.* 2017;123(4):861-74.
- Moura MC, Napoleão TH, Coriolano MC, Paiva PM, Figueiredo RC, Coelho LC. Water-soluble Moringa oleifera lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(3):666-76.
- Araújo LC, Aguiar JS, Napoleão TH, Mota FV, Barros AL, Moura MC, et al. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from Moringa oleifera seeds. *PLoS One.* 2013;8(12):e81973.
- Coriolano MC, de Santana Brito J, de Siqueira Patriota LL, de Araujo Soares AK, de Lorena VMB, Paiva PMG, et al. Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from Moringa oleifera seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Protein Pept Lett.* 2018;25(3):295-301.
- de Moura KS, da Silva HR, Dornelles LP, Coelho LC, Napoleão TH, de Oliveira MD, et al. Coagulant activity of water-soluble moringa oleifera lectin is linked to lowering of electrical resistance and inhibited by monosaccharides and magnesium ions. *Appl Biochem Biotechnol.* 2016;180(7):1361-71.
- Freitas JHES, de Santana KV, do Nascimento ACC, de Paiva SC, de Moura MC, Coelho LCBB, et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble Moringa oleifera seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. *Chemosphere.* 2016 Nov;163:133-41.
- Costache II, Petriş A. Cardiotoxicity of anthracyclines. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2011;115(4):1200-7.
- Iannini PB. Cardiotoxicity of macrolides, ketolides and fluoroquinolones that prolong the QTc interval. *Expert Opin Drug Saf.* 2002;1(2):121-8.
- De Vecchis R, Ariano C, Di Biase G, Noutsias M. Malignant ventricular arrhythmias resulting from drug-induced QTc prolongation: a retrospective study. *J Clin Med Res.* 2018;10(7):593-600.
- Li X, Wang M, Liu G, Zhou L, Wang Z, Li C. Macrolides use and the risk of sudden cardiac death. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(6):535-7.
- Liu X, Ma J, Huang L, Zhu W, Yuan P, Wan R, et al. Fluoroquinolones increase the risk of serious arrhythmias: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(44):e8273.
- Quinn KL, Macdonald EM, Gomes T, Mamdani MM, Huang A, Juurlink DN, et al. Macrolides, digoxin toxicity and the risk of sudden death: a population-based study. *Drug Saf.* 2017;40(9):835-40.
- da Silva PM, de Moura MC, Gomes FS, da Silva Trentin D, Silva de Oliveira AP, de Mello GSV, et al. PgTeL, the lectin found in Punica granatum juice, is an antifungal agent against Candida albicans and Candida krusei. *Int J Biol Macromol.* 2018 Mar;108:391-400.
- Procópio TF, de Siqueira Patriota LL, de Moura MC, da Silva PM, de Oliveira APS, do Nascimento Carvalho LV, et al. CasuL: a new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *Int J Biol Macromol.* 2017 May;98:419-29.
- Dang L, Van Damme EJM. Toxic proteins in plants. *Phytochemistry.* 2015 Sep;117:51-64.
- Green AA, Hughes WL. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: *Methods in Enzymology.* Amsterdam: Elsevier BV; 1955.
- Paiva PMG, Coelho LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from Cratylia mollis mart. (camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol.* 1992;36(2):113-8.
- Schaible TF, Scheuer J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. *J Appl Physiol.* 1979;46(4):854-60.
- Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* 1982;243(6):H941-7.
- Arguin C, Bourzac J-F, Placet M, Molle CM, Paquette M, Beaudoin J-F, et al. The loss of P2X7 receptor expression leads to increase intestinal glucose transit and hepatic steatosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):12917.
- Monnerat G, Alarcón ML, Vasconcellos LR, Hochman-Mendez C, Brasil G, Bassani RA, et al. Macrophage-dependent IL-1 $\beta$  production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nat Commun.* 2016 Nov;7:13344.
- Benavides-Vallve C, Corbacho D, Iglesias-Garcia O, Pelacho B, Albiasu E, Castaño S, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction. *PLoS One.* 2012;7(7):e41691.
- Ferreiro M, Petrosky AD, Escobar AL. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release underlies the development of phase 2 in mouse ventricular action potentials. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(5):H1160-72.
- Mejía-Alvarez R, Manno C, Villalba-Galea CA, del Valle Fernández L, Costa R, Fill M, et al. Pulsed local-field fluorescence microscopy: a new approach for measuring cellular signals in the beating heart. *Pflug Arch.* 2003;445(6):747-58.
- Affourtit C, Quinlan CL, Brand MD. Measurement of proton leak and electron leak in isolated mitochondria. *Methods Mol Biol.* 2012;810:165-82.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods Mol Biol.* 2012;810:25-58.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016;79(3):629-61.



37. Lehr CM. Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1994;11(2-3):119-60.
38. Zhao YT, Wang L, Yi Z. An unusual etiology for bidirectional ventricular tachycardia. *Can J Cardiol.* 2016;32(3):395.e5-6.
39. Han SN, Yang SH, Zhang Y, Duan YY, Sun XY, Chen Q, et al. Blockage of hERG current and the disruption of trafficking as induced by roxithromycin. *Can J Physiol Pharmacol.* 2013;91(12):1112-8.
40. Kauthale RR, Dadarkar SS, Husain R, Karande VV, Gatne MM. Assessment of temperature-induced hERG channel blockade variation by drugs. *J Appl Toxicol.* 2015;35(7):799-805.
41. Nogawa H, Kawai T, Yajima M, Miura M, Ogawa T, Murakami K. Effects of probucol, a typical hERG expression inhibitor, on in vivo QT interval prolongation in conscious dogs. *Eur J Pharmacol.* 2013;720(1-3):29-37.
42. Guo J, Zhan S, Lees-Miller JP, Teng G, Duff HJ. Exaggerated block of hERG (KCNH2) and prolongation of action potential duration by erythromycin at temperatures between 37 degrees C and 42 degrees C. *Heart Rhythm.* 2005;2(8):860-6.
43. Zhang M, Xie M, Li S, Gao Y, Xue S, Huang H, et al. Electrophysiologic studies on the risks and potential mechanism underlying the proarrhythmic nature of azithromycin. *Cardiovasc Toxicol.* 2017;17(4):434-40.
44. Singh R, Sripada L, Singh R. Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell. *Mitochondrion.* 2014 May;16:50-4.
45. Warmbrunn MV, Schilling JM, Dhanani M, Glukhov E, Gerwick LG, Gerwick WH, et al. Novel marine compounds modulate mitochondrial function in H9c2 cells: potential new pharmaceutical targets to control cardiac metabolism. *FASEB J.* 2018;32(1 suppl):702.1.

