

Centro de Investigaciones Biomédicas

## **CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DEL ELHIBIN: SU EFECTO EN SUERO DE PACIENTES QUEMADOS**

*Lic. Yoani Albuerne, Lic. Yoryana Vicedo, Dr. Agustín Vicedo y Dr. José C. García*

### **RESUMEN**

Elhibin es un inhibidor de proteinasas obtenido de semillas de leguminosas. Es capaz de inhibir la elastasa leucocitaria, fibroblástica y también la tripsina. Estas enzimas desempeñan un papel importante en los procesos de envejecimiento e irritación de la piel, por lo tanto, una aplicación específica del Elhibin contribuye a mantener la piel elástica, suave, tersa y húmeda. También contrarresta la inflamación e irritación producto de exposiciones excesivas al sol, agresividad de sustancias químicas y otras influencias ambientales. Teniendo en cuenta estas propiedades se decidió evaluar la capacidad inhibitoria del Elhibin sobre algunas enzimas proteolíticas, utilizando para ello técnicas colorimétricas que emplean la elastina rojo congo y la azocaseína como sustratos naturales específicos, y de manera complementaria la difusión radial. En busca de nuevas aplicaciones para el Elhibin se realizaron ensayos de inhibición de actividad proteolítica en muestras de sueros de pacientes quemados con comportamientos cinéticos o puntuales, de los cuales se conocen que aparecen alteraciones del balance de proteasas y sus inhibidores y el correspondiente descontrol de sus procesos fisiológicos. Los resultados mostraron inhibición de la actividad elastasa y tripsina dependiente de la concentración de Elhibin, no así en el caso de la colagenasa y una aplicación específica para ayudar a contrarrestar desbalances dañinos en las muestras de quemados. Se obtuvo inhibición de la actividad de elastasa y tripsina mayor que 30 % en todos los sueros analizados.

*Descriptores DeCS:* QUEMADURAS/enzimología; INHIBIDORES DE LA PROTEASA/ análisis; PEPTIDO HIDROLASAS/ análisis; PANCREATOPEPTIDASA/ análisis; COLORIMETRIA/ métodos; COLAGENASAS/ análisis.

Elhibin es un derivado de semillas de leguminosas, de actividad inhibitoria de elastasa ya conocida. La elastasa desempeña un papel esencial en los procesos de irritación y envejecimiento de la piel. Su inhibición por Elhibin contribuye a mantener la piel elástica, suave y lisa, así como ayuda a contrarrestar las influencias dañinas ambientales, de productos químicos o de otra naturaleza.

La reacción proteolítica descontrolada representa un peligro para la célula, es por ello que la actividad de las proteinasas tiene que ser cuidadosamente regulada por inhibidores específicos.

Las propiedades inhibitorias de Elhibin sobre proteinasas pueden ser demostradas mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo se comenzó por los estudios *in vitro*. Se evaluó la capacidad inhibitoria sobre

algunas enzimas proteolíticas y se valoró su posible aplicación en el paciente quemado donde la actividad proteolítica aparece incrementada.<sup>1-3</sup>

## **MÉTODOS**

Para realizar las diferentes determinaciones se emplearon técnicas de valoración de actividad proteolítica. En la evaluación de la actividad elastasa se utilizó la elastina-rojo congo como sustrato natural según la técnica de *Perlmann* y *Lorend*,<sup>4,5</sup> se midió la cantidad de elastina insoluble solubilizada por la digestión con elastasa en una hora de incubación, haciendo una determinación colorimétrica del producto liberado en la solución.

Para evaluar la actividad tripsina y colagenasa se empleó el método de azocaseína de *Charney* y *Tomarell* con las modificaciones de *Langner*,<sup>7</sup> combinado con el método de Barret de clasificación de proteasas donde resulta como cromopéptido la azocaseína, sustrato de proteinasas altamente susceptible que se incuba con la enzima. El sustrato no degradado es precipitado con TCA. La absorbancia del cromóforo que contiene péptidos en el sobrenadante brinda una medida de la degradación del sustrato de proteína.<sup>8</sup> Todas las técnicas se ejecutaron en el sistema ultra micro analítico (SUMA) de acuerdo con los procedimientos normativos operacionales del laboratorio. Además para la visualización de los resultados se acudió de manera preliminar a la técnica de difusión radial tradicional adaptada para determinar la existencia de enzimas proteolíticas. Se utilizó como sustrato la caseína y para la tinción una solución de amido *black*.<sup>4</sup>

## **RESULTADOS**

En la determinación de la posible inhibición del Elhibin sobre las enzimas

proteolíticas en estudio: elastasa, tripsina y colagenasa se emplearon técnicas colorimétricas que daban una medida cualitativa y cuantitativa de si ocurre o no el proceso. Los resultados se reportaron en valores de absorbancia, donde ATP corresponde a la actividad total del patrón y AT-E% a la actividad total de este con el inhibidor incorporado a las diferentes concentraciones.

Para reafirmar y visualizar estos resultados se acudió de forma secundaria a la técnica de difusión radial tradicional donde en uno de los orificios se punteó elastasa y tripsina patrón y en el otro estas enzimas pero con el Elhibin.

Como se observa en los resultados, la inhibición es apreciable sobre las enzimas elastasa y tripsina donde ATP es muy superior a la actividad lograda cuando se incorporaba el inhibidor en sus diferentes concentraciones, no así en el caso de la colagenasa donde todos los valores oscilaban alrededor de un mismo punto (fig. 1).

Se obtuvieron diferencias significativas entre ambos halos que reafirman la inhibición sobre estas enzimas pertenecientes al grupo de las serín proteasas (fig. 2).

En busca de una posible aplicación del inhibidor se realizaron determinaciones de actividad elastasa y tripsina (figs. 3 y 4) en muestras de pacientes quemados que fueron tomadas a diferentes tiempos donde:

- ATP - actividad total del patrón.
- ATP/E - actividad total del patrón con el Elhibin como inhibidor.
- ATM - actividad total de la muestra.
- ATM/E - actividad total de la muestra con el Elhibin como inhibidor.

De forma similar se realizó el estudio en muestras de 20 pacientes quemados de forma puntual, como puede apreciarse en la tabla, cuyos resultados han sido ya discutidos.

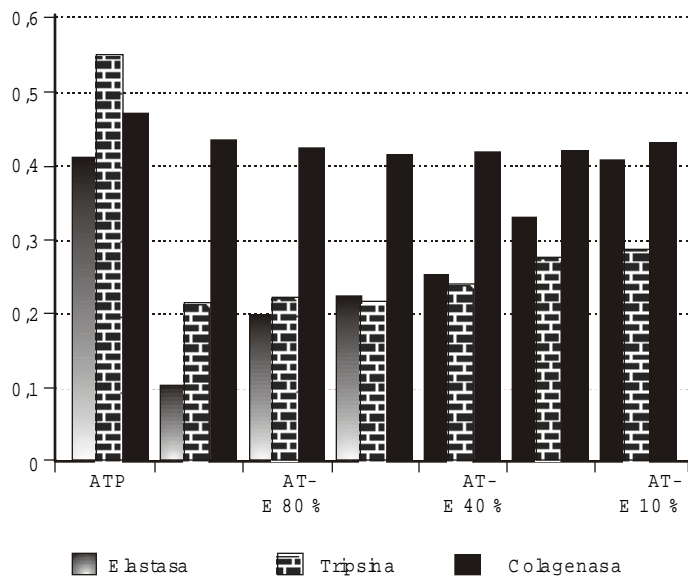
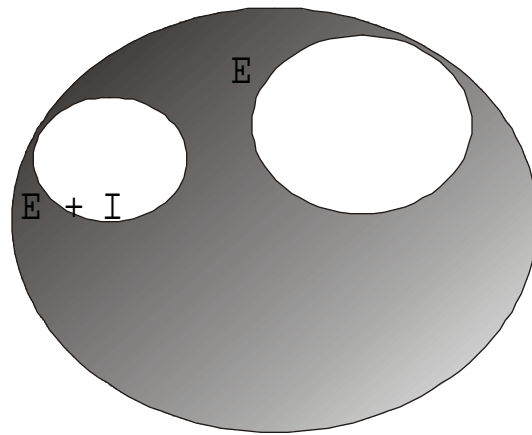


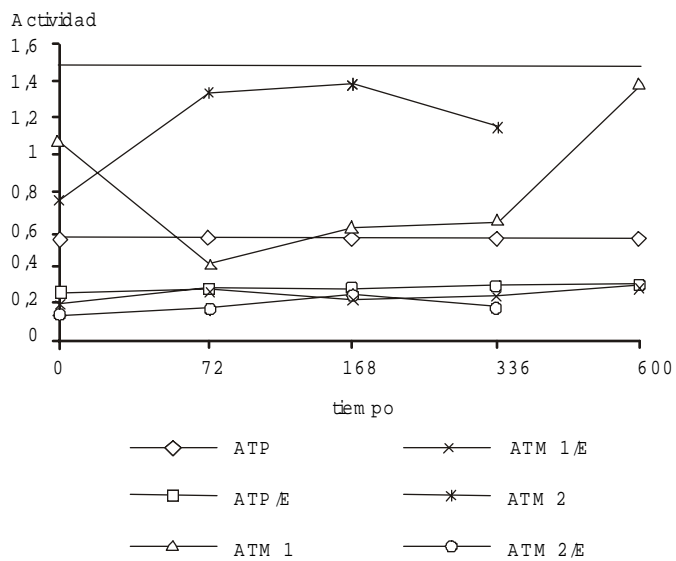
Fig. 1. Inhibición del Elhibin sobre enzimas proteolíticas.



E : Enzimas

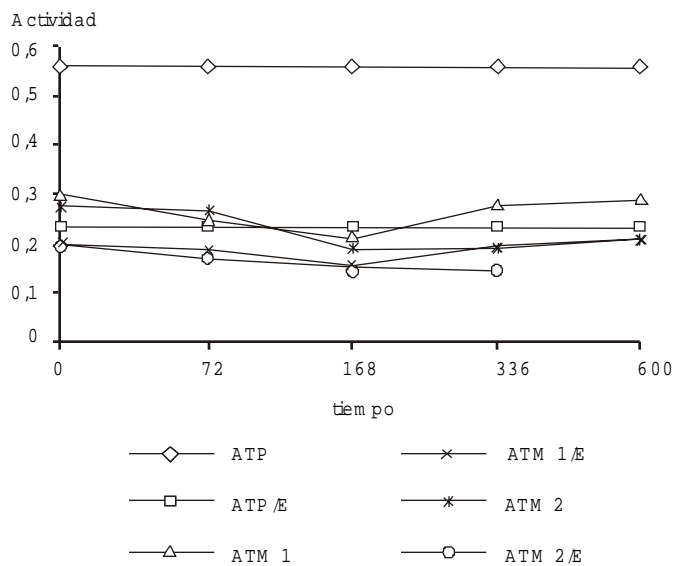
E + I : Enzimas + Inhibidor

Fig. 2. Inhibición de actividad proteolítica por Elhibin: difusión radial.



**Fig. 3.** Inhibición de elastasa por Elhibin en pacientes quemados.

ATP : actividad total del patrón, ATP/E : actividad total del patrón con el Elhibin como inhibidor, ATM : actividad total de la muestra, ATM/E : actividad total de la muestra con el Elhibin como inhibidor



**Fig. 4.** Inhibición de tripsina por Elhibin en pacientes quemados.

ATP : actividad total del patrón, ATP/E : actividad total del patrón con el Elhibin como inhibidor, ATM : actividad total de la muestra, ATM/E : actividad total de la muestra con el Elhibin como inhibidor.

TABLA. Actividad proteolítica en el paciente quemado

Actividad elastasa		Actividad tripsina	
ATM	ATM/E	ATM	ATM/E
161	,148	,826	,232
,183	,165	1,248	,303
,158	,139	,870	,240
,166	,142	1,329	,288
,176	,151	1,220	,263
,190	,173	1,139	,225
,203	,181	1,499	,283
,144	,125	,249	,185
,160	,142	1,098	,275
,187	,163	1,296	,280
,203	,187	1,399	,266
,170	,153	,721	,230
,107	,082	,409	,219
,249	,220	1,198	,290
,097	,071	,325	,293
,261	,242	,638	,203
,168	,145	,602	,217
,257	,230	,996	,225
,309	,282	,655	,204
,277	,245	,488	,193

## DISCUSIÓN

Elhibin es un inhibidor por excelencia de las enzimas elastasa y tripsina pertenecientes al grupo de las serín proteasas en una manera dosis-dependiente, no así en el caso de la metaloproteinasa colagenasa donde el patrón con inhibidor o sin él mantiene la misma absorbancia.

Como puede apreciarse en los gráficos, en todos los casos ya sea para el patrón o las muestras, la inhibición sobre las enzimas es apreciable pues los valores de actividad de las muestras sin el inhibidor

son muy superiores a los de éstas con el inhibidor incorporado a cada uno de los tiempos. Pudiera considerarse un resultado preliminar en la posible elaboración de un producto que actúe de forma directa sobre estas enzimas que aparecen elevadas en el paciente quemado y un poco buscar solución a la patología desde parámetros bioquímicos (figs. 3 y 4).

El Elhibin como inhibidor al parecer encaja de forma precisa en el centro activo de estas proteinasas, enmascarando de forma completa dicho centro activo de forma tal que inactiva la enzima. Este proceso resulta muy beneficioso para el organismo si se tiene en cuenta que estas enzimas no sólo contribuyen a la ruptura de proteínas envejecidas o modificadas, sino que intervienen también en numerosos mecanismos de regulación como la maduración de hormonas, respuesta inmune, coagulación de la sangre, desarrollo embrionario e inflamación, entre otros. Las reacciones proteolíticas descontroladas son perjudiciales a la célula y al organismo, y deben ser reguladas por inhibidores específicos.<sup>9</sup>

Cuando se incorporó el Elhibin en las muestras de suero de los pacientes quemados la actividad inhibitoria es apreciable, por lo que la incorporación de este inhibidor en una formulación junto a otros componentes antioxidantes y vitamínicos constituye una aplicación importante del producto sobre las quemaduras, al actuar directamente sobre parámetros bioquímicos que se modifican durante esta lesión cutánea como es el incremento de la actividad proteolítica.

## SUMMARY

Elhibin is a proteinase inhibitor obtained from seeds of Leguminosae. It is able to inhibit the leucocitary and fibroblastic elastase and also triptase. These enzymes play an important role in the aging and skin irritation processes, therefore, an specific application of Elhibin contributes to maintain the skin elastic, soft, glossy and

moist. It also counteracts the inflammation and irritation caused by excessive exposures to the sun, the aggressiveness of chemical substances and other environmental influences. Taking into account these properties, it was decided to evaluate the inhibitory capacity of Elhibin on some proteolytic enzymes by using some colorimetric techniques that utilize the Congo red elastin and azocasein as specific natural substrates and the radial diffusion as a complement. In order to find new applications for Elhibin, assays of proteolytic activity inhibition were carried out in samples of serum from burned patients with kinetic or punctual behaviours and with alterations of the balance of proteases and their inhibitors and the corresponding discontrol of their physiological processes. The results showed inhibition of the elastase and trypsin activity depending on the concentration of Elhibin. This did not occur in the case of collagenase and a specific application helping to counteract harmful unbalances in the samples of burned patients. It was obtained inhibition of the elastase and trypsin activity over 30% in all the analyzed sera.

*Subject headings:* BURNS/enzimology; PROTEASE INHIBITORS/analysis; PEPTIDE HYDROLASES/analysis; PANCREATOPEPTIDASE/analysis; COLORIMETRY/methods; COLLAGENASES/analysis.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Barisoni D, Ballevite P, Sorio A, Borazzi M, Zarmani R, Bortolani A. Monitoring of elastase in plasma of burned patients in relation to other inflammation parameters. *J. Burns* 1991;17(2):141-6.
2. Prager M, Herring M, Germany B. Elastase and Alpha 1 antiprotease in burn wound exudates. *J Burn* 1991;12:300-5.
3. Prager M, Baxter C, Hartline B. Proteolytic activity in burn wound exudates and comparison of fibrin degradation products and protease inhibitors in exudates and sera. *J, Burn* 1994;15(2):130-6.
4. Kirschke H, Langner J, Wiederranders B, Bohley P. Proteinases in mammalian tissues and cells. *Endopeptidases* 1982:72-125.
5. Perlmann GE, Lorend L. *Methods enzymology Vol-19, Proteolytic Enzymes* 1970:665-73.
6. Charney J, Tomarelli RM. Azocasein method. *J Biol Chem* 1947;171:501.
7. Langner J, Barrett AJ. Clasification of endopeptidases using specific inhibitors. *Acta Biol Med Gern* 1973;31:1-18.
8. Barnett AJ, Kirschke H. *Methods Enzymology. Vol 80, Proteolytic Enzymes* 1981;80:26-36.
9. PENTAPHARM LTD Basel / Switzerland. Elhibin: Soy Protein: 1998:2-18.

Recibido: 3 de abril del 2000. Aprobado: 27 de junio del 2000.

Lic. *Yoani Albuerne*. Centro de Investigaciones Biomédicas. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.