

Um Fator Potenciador da Bradicinina no Veneno de Bothrops jararaca

por

Sérgio Henrique Ferreira

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Em trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório (Ferreira & Rocha e Silva, 1962 e Ferreira, Corrado & Rocha e Silva, 1962) foi demonstrado que agentes quelantes de metais, como o "Dimercaprol (BAL) e ácido tioglicólico, são capazes de potenciar algumas ações da bradicinina sintética in vitro e in vivo. Enquanto investigamos se o dimercaprol poderia potenciar in situ as substâncias de reação lenta do veneno de Bothrops jararaca em íleo isolado de cobaia, observamos que o veneno per si tem pronunciada ação potenciadora em concentrações equivalentes à bradicinina. O presente trabalho objetiva caracterizar a natureza química e as ações biológicas do fator potenciador de bradicinina (BPF).

MÉTODOS

Purificação Parcial do BPF

Experimentos preliminares (Ferreira & Rocha e Silva, 1963) permitiram a purificação parcial do BPF como descrito a seguir: 2 g de veneno de Bothrops jararaca foi suspenso em 200 ml de água destilada e aquecido por 5 minutos em um banho de água fervente. Etanol absoluto (1.5 litros) foi adicionado. A mistura foi centrifugada (2.000 rev./min) durante 60 minutos e o fluido sobrenadante foi evaporado sob redução de pressão. O fator foi extraído de pó seco com três sucessivas adições de 20 ml de etanol 90%. À solução alcoólica, 4 volumes de éter etílico foram adicionados. O precipitado foi separado por centrifugação e dissolvido em 50 ml de água destilada. A solução aquosa foi então liofilizada. O pó resultante é referido nesse trabalho como "Fator Potenciador da Bradicinina (BPF)".

Propriedades Físico-Químicas do BPF

Testes de Solubilidade: Os testes de solubilidade foram feitos por agitação de 100 mg de BPF (previamente seco em tubos de vidro) com 2 ml dos seguintes solventes: etanol absoluto e acetona, éter etílico, clorofórmio e n-butanol saturado em água durante 1 hora. A atividade do fluido sobrenadante coletado por centrifugação e seco sob redução de pressão foi estimada como porcentagem dos valores controles determinados com água destilada.

Diálise: O BPF (1,5 mg) foi dissolvido em 1,5 ml de água destilada e dialisada (tubo de diálise ¼ para 3/8, Thomas Co., EUA) contra 30 volumes de água destilada com agitação constante por sistema "magneto-stir". Após 20 horas a atividade de potenciação foi estimada com as porções de dentro e fora do saco de diálise.

Hidólise Ácida: Foi feita à temperatura de 100 °C em tubos fechados por incubação de 250 mg de BPF com 6-N-ácido hidrocloreto ou 200 mg de BPF com 15-n-ácido hidrocloreto. Após intervalo de tempo determinado, a hidrólise foi interrompida no primeiro experimento por evaporação sob pressão reduzida ou em outro experimento, por neutralização com quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio. Uma amostra foi separada para reação de ninhidrina (Troll & Cannan, 1963) e outra, na qual tampão Tris, pH 7.8, foi adicionado, para estimativa biológica.

Hidrólise Enzimática: A hidrólise enzimática foi testada por incubação do BPF com tripsina ou quimiotripsina à temperatura de 37°C. As concentrações dos reagentes nas misturas de incubação foram: (1) 100 mg/ml de tripsina, 500 mg/ml de BPF (o volume de 2 ml foi completado com tampão Tris, pH 7.8); (2) 1 mg/ml de quimiotripsina, 100, 200 ou 400 mg/ml de BPF (volume de 2 ml completado com tampão Tris, pH 8.6). A hidrólise foi interrompida fervendo a mistura de incubação por 3 minutos em banho maria. A solução de enzima fervida foi adicionada às amostras controles.

Eletroforese em papel: A eletroforese em papel foi feita em papel nº 1 (Whatman) com tampão fosfato de sódio, pH 7.7, $m=0.1$, 30 V/cm, por 9 a 15 horas. A atividade das frações foi testada em eluatos das tiras de papel ou adicionando-se o papel diretamente no líquido de banho do órgão isolado. As reações reveladoras (Smith, 1963) foram feitas concomitantemente em tiras controles.

Experimentos in vitro

A atividade do BPF foi testada em íleo de cobaia, utilizando unidade de potenciação arbitrária, a qual corresponde a dose de BPF que é capaz de potenciar o efeito de uma dose única de bradicinina para a intensidade obtida após a adição de uma dose 2 vezes maior. As doses de bradicinina sintética adicionadas ao banho (cujo volume era de 5ml)

contendo o íleo isolado de cobaia variaram de 0,2 a 0,05 mg. BPF foi adicionado 5 a 10 seg. antes da adição de bradicinina.

Embora os valores absolutos das unidades de potenciação podiam variar de um intestino para outro, os mesmos mantinham-se constantes na mesma preparação.

Experimentos in vivo

Os experimentos in vivo foram feitos avaliando-se a pressão sangüínea e arterial e a permeabilidade vascular (capilar). A pressão arterial sangüínea foi mensurada através de uma cânula inserida na artéria carótida de cães e gatos anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg). As drogas foram administradas através de um tubo de polietileno inserido na veia safena. A hipotensão foi mensurada pelo tamanho da queda e pelo cálculo da área sob traçado isométrico obtido durante 5 minutos antes da adição de bradicinina.

A permeabilidade capilar foi testada em ratos pesando de 200 a 250g, anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg; intraperitonealmente). O corante Trypan Blue (200mg) foi injetado na veia jugular 5 min antes da injeção intradérmica (0,1ml) de bradicinina (doses de 0,5 a 1mg), BPF (1 ou 2mg) ou a mistura de ambos em salina. Os animais foram sacrificados após 30min por sangramento.

As seguintes drogas e reagentes foram utilizadas: bradicinina sintética (BRS 640, Sandoz, Basel); ocitocina sintética (Sandoz, Basel); angiotensina amida (Ciba, Basel); histamina di-fosfato (Abbott); acetrecolina (Roche); quimiotripsina (Armour) e tripsina acetilada (Mann Research Laboratories).

RESULTADOS

Purificação Parcial do BPF Em relação à atividade do veneno bruto, a preparação purificada mostrou maior atividade em cerca de 8 a 10 vezes. Embora essa taxa de purificação seja pequena, o BPF obtido não estava contaminado com aminas farmacologicamente ativas e não foi capaz de liberar bradicinina quando incubado com plasma. Quando injetado intravenosamente em cães e gatos, o BPF não produziu choque e foi incapaz de coagular plasma heparinizado como veneno bruto. A "unidade de potenciação" sobre o íleo de cobaia foi de 0,5 a 0,3 mg/ml de concentração final no banho da preparação isolada.

Características do BPF Os testes de solubilidade demonstram que o fator é solúvel em 5% de tricloro ácido acético e em etanol absoluto, parcialmente solúvel em água saturada com n-butanol, e insolúvel em acetona absoluta, clorofórmio ou éter. O BPF mostrou-se termoestável (à temperatura de 110°C durante 5h) e dialisável. A hidrólise ácida sob ácido 6-N hidrocloreto inativou completamente o BPF após 5h de incubação, como demonstrado na tabela 1. Foi observado que uma simples incubação do BPF com o ácido 6-N hidrocloreto e uma evaporação imediata mediante redução da pressão foram suficientes para inativar cerca de 67% da atividade original. Deve ser ressaltado que em condições iguais de temperatura e tempo sem ácido toda a atividade do BPF pôde ser recuperada. A incubação do BPF com 1,5-N-ácido hidrocloreto como indica a tabela 1, mostrou um paralelismo entre a progressão de hidrólise e o aumento na reação de ninhidrina.

Tabela 1 - HIDRÓLISE ÁCIDA DO FATOR POTENCIADOR DA BRADICININA (BPF)

A recuperação é expressa em porcentagem da atividade inicial do BPF.

TABLE I
ACID HYDROLYSIS OF BRADYKININ POTENTIATING FACTOR (BPF)
The recovery is expressed in percentage of initial activity of BPF

Expt.	Sample	Time of hydrolysis (min)	Hydrochloric acid strength (N)	Total BPF added (μg)	Ninhydrin (Klett units)	Activity recovered (%)
1	Control	0	—	250	50	100
	I	0	6	250	143	33
	II	300	6	250	590	0
2	Control	0	—	200	45	100
	I	15	1.5	200	60	33
	II	30	1.5	200	97	28
	III	60	1.5	200	106	6.6

Os resultados de dois experimentos nos quais o BPF foi incubado com tripsina estão demonstrados na figura 1. Uma pequena, porém progressiva degradação da atividade do BPF foi observada. Na incubação com quimiotripsina por 24 horas nenhuma inativação do BPF foi observada.

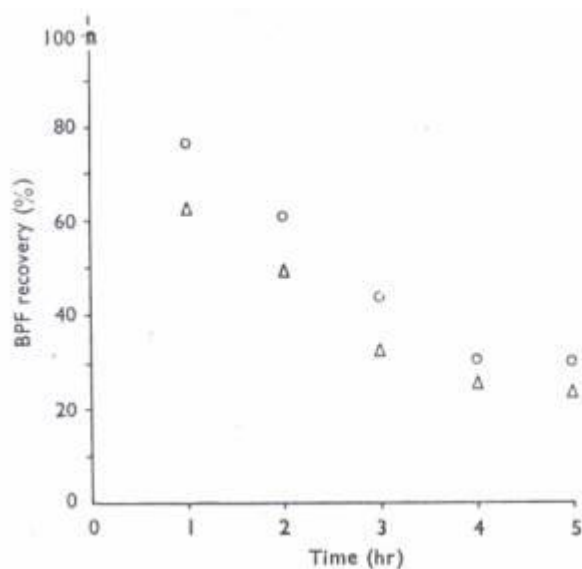


Fig. 1- Recuperação do BPF após a incubação com tripsina a 37°C. Os pontos representam valores referentes a dois experimentos diferentes. Os reagentes na mistura de incubação foram: tripsina (100 mg), BPF (500 mg) e tampão Tris, pH 7.8, até 2 ml.

Como demonstra a figura 2, na eletroforese em papel, o material ativo migrou para o anodo em duas bandas distintas ambas fluorescentes no ultravioleta e positivas nos testes de Sakaguchi e Ninhydrin.

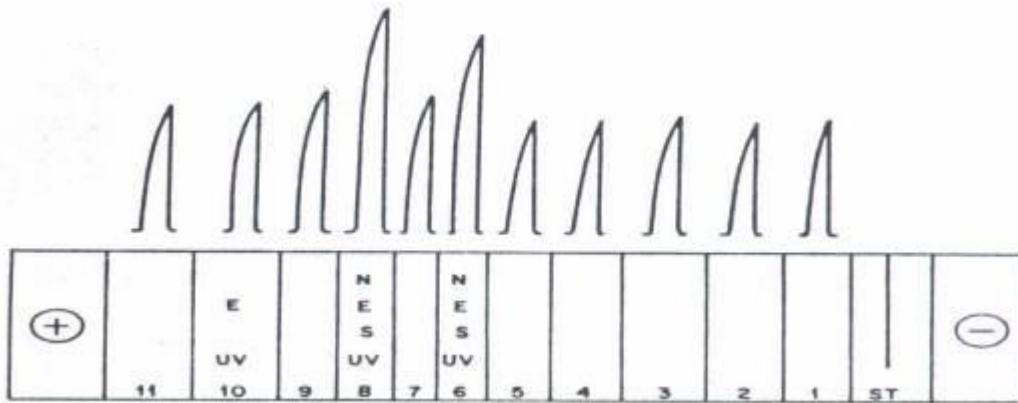


Fig. 2- Eletroforese em papel feita em tampão fosfato, pH 7.7, m = 0.1 durante 12 h. Tiras controles foram desenvolvidas com reagentes ninhidrina, Sakaguchi e Erlich. Os limites das bandas foram determinados por fluorescência em ultravioleta. O painel superior demonstra o ensaio do BPF sobre o íleo isolado de cobaia. Previamente foi adicionada uma dose padrão de bradicinina em alíquota do eluato da fração da eletroforese. A atividade potenciadora do BPF sobre a bradicinina pode ser detectada nas bandas nos. 6 e 8.

Potenciação in vitro Em preparações isoladas o BPF também potenciou o efeito estimulador da angiotensina sobre o íleo de cobaia (Tabela 2) e da ocitocina sobre o útero de rata (Tabela 3) apesar da bradicinina parecer ser mais sensível a seus efeitos. Nossos resultados demonstram que as preparações de íleo de cobaia são também mais sensíveis à potenciação da bradicinina pelo BPF quando comparado as preparações de útero de ratas.

Tabela 2 - POTENCIAÇÃO DA BRADICININA E DA ANGIOTENSINA PELO BPF SOBRE ÍLEO DE COBAIA.

Cada experimento foi feito sobre intestinos de diferentes animais. A concentração final de Bradicinina (BK) e de Angiotensina (Ang) foi de 0.01 mg/ml.

Expt.	Final concentration of BPF (µg/ml.)	Height of contraction			Height of contraction		
		Brady (mm)	Brady+ BPF (mm)	Increase (%)	Angio (mm)	Angio+ BPF (mm)	Increase (%)
1	0.2	33	37	12	27	26	—
2	0.2	19	30	57	19	21	10
3	0.2	36	47	30	37	41	10
4	0.2	27	40	48	24	29	20
5	2	26	68	161	20	20	0
6	2	42	87	107	36	44	22
7	2	20	61	205	21	22	5
8	2	21	64	204	24	35	4
9	20	35	72	105	35	35	0
10	20	38	74	100	30	45	50
11	20	22	71	238	20	28	40
12	20	31	130	319	22	27	22

Tabela 3 - POTENCIAÇÃO DA BRADICININA E OCITOCINA SOBRE O ÚTERO ISOLADO DE RATAS.

Cada experimento foi feito sobre órgãos isolados de diferentes animais. Os resultados demonstram a altura da contração medida em mm e a potenciação é expressa como porcentagem de aumento em relação à resposta controle. As doses de bradicinina e ocitocina adicionados a 5ml do líquido de banho foram de 0.003 mg e 0.005 U, respectivamente. As concentrações de BPF referem-se ao volume do líquido de banho.

Expt.	Contraction heights for bradykinin and BPF					Contraction heights for oxytocin and BPF				
	Brady-kinin (mm)	BPF 2 μ g/ml. (mm)	Increase (%)	BPF 20 μ g/ml. (mm)	Increase (%)	Oxytocin (mm)	BPF 2 μ g/ml. (mm)	Increase (%)	BPF 20 μ g/ml. (mm)	Increase (%)
1	27	44	63	47	74	17	—	—	19	11
2	39	40	2	49	26	32	40	25	46	44
3	29	29	0	33	37	30	30	0	35	17
4	24	34	41	41	71	13	19	46	44	234
5	24	26	8	32	33	27	31	15	34	26
6	15	19	26	23	53	30	33	10	35	17

Como demonstra a figura 3, os efeitos induzidos pela histamina ou acetilcolina foram potenciados significativamente pelo BPF.

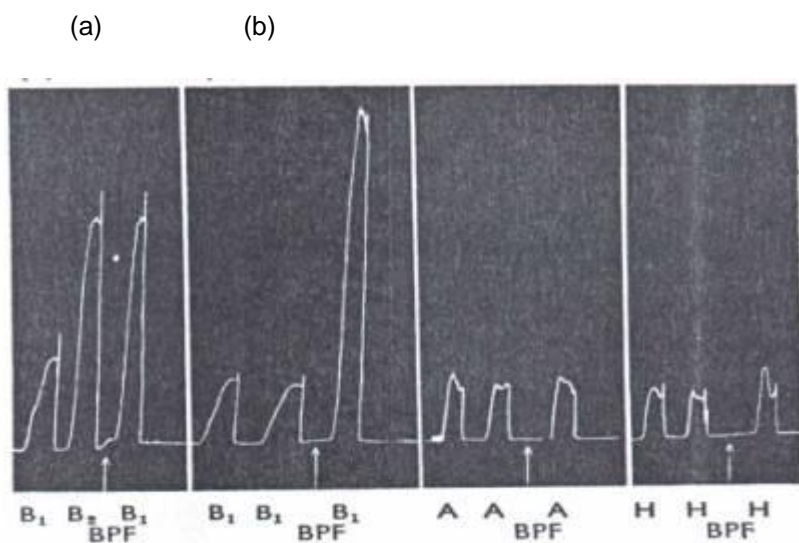


Fig. 3- Ações do BPF sobre as contrações induzidas pela bradicinina, acetilcolina e histamina no íleo de cobaia. (a) Uma “unidade potenciadora”, a dose de BPF (2 mg, indicada pela flecha) capaz de aumentar o efeito de uma dose única de bradicinina (B₁ = 0.05 mg) na intensidade da dose de bradicinina 2 vezes maior (B₂ = 0.1 mg). (b) 10 mg de BPF foi adicionado (como indica a flecha) antes da administração de bradicinina (B₁), acetilcolina (A = 0.01 mg) e histamina (H = 0.02 mg). O volume de perfusão do banho foi 5 ml.

Potenciação in vivo Quando administrado intravenosamente em doses potenciadoras (0,2 a 2 mg/kg) BPF apresentou somente efeitos hipotensores pequenos e transientes.

Alguns experimentos em gatos estão resumidos na tabela 4 e demonstram os efeitos das injeções de BPF (2mg/kg) em vários intervalos antes da administração de bradicinina (1mg/kg). A sensibilidade da bradicinina manteve-se aumentada 30 min após a administração de BPF como demonstra a figura 4. Resultados similares foram obtidos em cães. O fato de ser salientado é que nem a histamina nem a acetilcolina foram potenciadas pelo BPF nas preparações in vivo.

Tabela 4 - AÇÕES DO BPF (2 mg/Kg) SOBRE O EFEITO HIPOTENSOR DA BRADICININA SINTÉTICA (1 mg/Kg) EM GATOS.

A área de hipotensão foi medida calculando-se a área entre a linha de base original e o traçado gravado durante 5 minutos após a administração de BK.

Depois do BPF

Expt.	Before BPF			Within 5 min			After 30 min		
	Blood pressure (mm Hg)	Initial fall (mm)	Hypotension area (sq. mm)	Blood pressure (mm Hg)	Initial fall (mm)	Hypotension area (sq. mm)	Blood pressure (mm Hg)	Initial fall (mm)	Hypotension area (sq. mm)
1	150	10	30	150	74	375	150	56	262
2	160	30	67	160	60	275	—	—	—
3	140	20	50	140	86	360	130	60	275
4	170	20	55	170	80	315	130	50	130
5	140	18	40	150	58	340	130	48	260
Mean \pm s.e.		19.6 \pm 3.3	48 \pm 7.0		72 \pm 5.5	333 \pm 18.0		53.5 \pm 2.7	232 \pm 3.41

S. H. FERREIRA

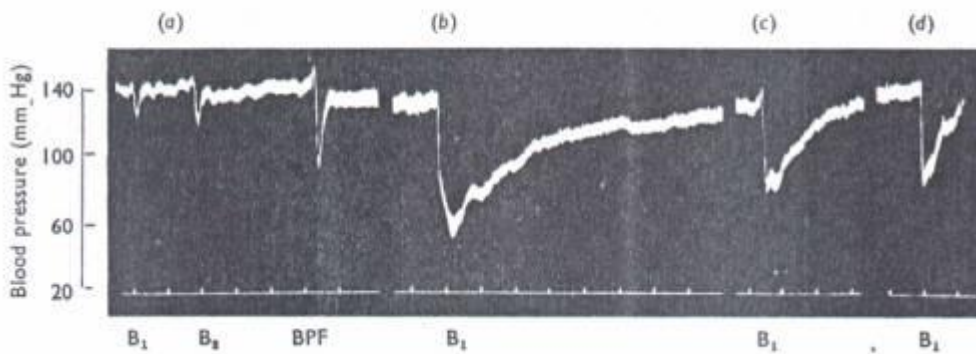


Fig. 4- Efeito do fator potenciador de bradicinina (BPF) sobre a hipotensão arterial induzida por bradicinina em gatos. (a) Antes; (b), (c) e (d) 3, 15 e 30 minutos após 2 mg/Kg de BPF. B1= 1 mg/kg e B2= 2 mg/kg de bradicinina sintética. As drogas foram administradas intravenosamente. Marcadores de tempo, 1 min.

Experimentos in vivo também foram feitos em permeabilidade vascular (capilares) e potenciação típica do efeito da bradicinina (1mg) pelo BPF (2mg) como demonstra a figura 5, somente as maiores doses de BPF (10mg) produziram por si algum "estragamento do corante azul"

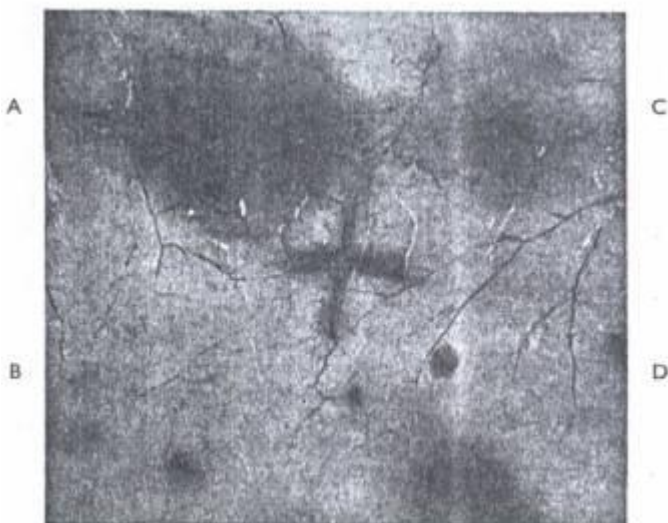


Fig. 5- Potenciação do efeito da bradicinina pelo BPF sobre a permeabilidade capilar. A fotografia demonstra áreas azuladas na pele de ratos que receberam corante Trypan Blue intravenosamente seguido da injeção intradérmica de 0.1 ml das seguintes soluções: A- bradicinina (1 mg) e BPF (2 mg); B, bradicinina (1 mg); C, salina; e D, BPF (1 mg).

DISCUSSÃO

As descobertas descritas no presente manuscrito indicam que o veneno de *Bothrops jaracaca* contém um fator que potencia in vivo e in vitro algumas das ações farmacológicas da bradicinina.

A atividade do BPF pode ser inibida por incubação longa com tripsina ou por hidrólise ácida o que sugere uma estrutura polipeptídica. O BPF foi incapaz de potencializar as ações da histamina ou da acetilcolina sobre o íleo de cobaia. Esse fato sugere que a potenciação observada com a bradicinina depende de um mecanismo que difere da sensibilização de preparações de músculo liso. O BPF per si não induz respostas nas preparações isoladas utilizadas. A ação do BPF pode ser explicada pela inibição de enzimas que degradam polipeptídeos (peptidases) presentes possivelmente no músculo. Estudos prévios demonstraram que o BPF pode inibir enzimas plasmáticas e de eritrócitos hemolisados de cobaia. Um efeito inibitório foi obtido utilizando-se a dose de 40 mg/ml de BPF, mas doses de 200 vezes maiores não reverteram efetivamente a destruição de bradicinina como a observada após a adição de 250 mg/ml de dimercaprol.

Em alguns trabalhos (Ferreira & Rocha e Silva, 1962; Ferreira et al., 1962; Corrado, 1963; Rocha e Silva, 1963) nós temos descrito como alguns tio-compostos como o dimercaprol e o ácido tio-glicólico potenciaram as ações hipotensoras da bradicinina em coelhos e cão. A dose efetiva de dimercaprol variou entre 3 a 10 mg/kg. Entretanto, em gatos, os resultados foram desapontadores uma vez que a droga produziu uma potenciação do efeito vasodilatador produzido pela bradicinina de pequena intensidade e duração. Outros tio-compostos foram testados por Erdös & Wohler, (1963) como potenciadores da bradicinina em ensaios de pressão arterial em cobaias. Os achados de Erdös & Wohler, (1963) demonstraram que o dimercaprol estava entre as mais potentes substâncias utilizadas, portanto confirmando nossos resultados anteriores.

Considerando que o BPF é mais ativo in vivo que o dimercaprol, ele tornou-se o mais efetivo potenciador da bradicinina descrito. O BPF não é limitado ao veneno de *Bothrops jaracaca*. Atividades similares foram observadas em veneno de *Bothrops jararacussu*, *B. neuwiedii* e *B. atrox*. Nenhuma atividade potenciadora foi detectada em veneno de *Crotalus*.

RESUMO

1- O veneno de *Bothrops jaracaca* contém um fator que potencia algumas das ações farmacológicas da bradicinina.

2- Esse fator potenciador da bradicinina (BPF) parece constituir um novo princípio, o mais efetivo potenciador da bradicinina in vivo que conhecemos.

3- A purificação, a natureza fisico-química e as ações farmacológicas do BPF são descritas.

O autor é grato ao Professor M. Rocha e Silva por suas críticas construtivas e encorajamento. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e pelo Serviço Público de Saúde, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, Md, EUA. (NB 02953-03).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Corrado, A. P. (1963). Recent investigations of the pharmacology of bradykinin and their physiopathological implication. *Settim med.*, suppl. 1, 51.

Erdos, E. G. & Wohler, J.R. (1963). Inhibition "in vivo" of the enzymatic inactivation of bradykinin and kallidin. *Biochem. Pharmacol.*, 12, 1193- 1199.

Ferreira, S. H., Corrado, A. P. & Rocha e Silva, M. (1962). Potenciação do efeito hipotensor da bradicinina por inibição da enzima bradicinínolítica plasmática. *Ciênc. E Cult.*, 14, 238.

Ferreira, S. H., & Rocha e Silva, M. (1962). Potentiation of bradykinin by dimercaptopropanol (BAL) and other inhibitors of its destroying enzyme in plasma. *Biochem. Pharmacol.*, 11, 1123- 1128.

Ferreira, S. H., & Rocha e Silva, M. (1963). Potenciação de polipeptídeos por um fator presente no veneno de *B. Jararaca*. *Ciênc. E Cult.*, 15, 276.

Rocha e Silva, M. (1963). The physiological significance of bradykinin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 104, 190-210.

Smith, I. (1963). *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, 2nd edit. London : Heinemann.

Troll, W. & Cannan, K. (1953). A modified photometric ninhydrin method for analysis of amino and imino acids. *J. biol. Chem.*, 200, 803-806.