

NOTAS ORIGINAIS

Um novo princípio auto-farmacológico (Bradicinina) liberado do plasma sob a ação de venenos de cobra e da tripsina (*)

M. ROCHA E SILVA

WILSON T. BERALDO

Secção de Bioquímica e Farmacodinâmica
(Instituto Biológico - São Paulo)

No curso de experiências (1) sôbre os efeitos produzidos pela injeção do veneno de *Bothrops jararaca* em cães, foi possível demonstrar, no sangue circulante, a presença de substância que produzia contração lenta do intestino isolado de cobaia, suspenso em banho de Tyrode. O princípio assim identificado era de origem endógena, porquanto o músculo apresentava-se completamente dessensibilizado ao veneno; era, além disso, resistente à ação dos anti-histamínicos (benadril, neoantergan, antistín, etc.) e à ação da atropina, o que permitia excluir a possibilidade de se tratar de histamina ou de derivado da colina. Experiências realizadas *in vitro* mostraram que a adição de pequenas doses de veneno ao sangue desfibrinado, era de molde a gerar, ao fim de meio minuto a um minuto de incubação a 37°, um princípio novo que produzia contração da musculatura lisa do intestino isolado de cobaia, do intestino isolado de coelho, do útero da rata e de outras musculaturas lisas experimentadas. As condições para a demonstra-

ção desse novo agente farmacológico são as seguintes: suspenso um fragmento de íleo de cobaia, em um banho de Tyrode de 7 cc. de capacidade, mantido a 37°, por meio de termostato (uma das extremidades de fragmento do intestino fixada ao fundo da cuba e a outra extremidade ligada a uma alavanca isotônica e de inscrição frontal), a contração da musculatura lisa é registrada em cilindro enfumaçado, de acôrdo com as técnicas habituais. A adição de 100 a 200γ do veneno de jararaca ao banho, produz forte contração do intestino, a qual resiste a sucessivas lavagens, caindo o tonus novamente ao normal, ao fim de alguns minutos. Uma nova adição do veneno, produz nova contração, porém muito menos intensa que a primeira; depois de repetidas lavagens o tonus volta ao normal. Daí por diante, o intestino apresenta-se refratário (dessensibilizado) a qualquer nova adição da mesma dose do veneno e mesmo a doses muitas vêzes maiores do que a aplicada anteriormente. A explicação para esse fato simples, constitue a definição mesma da *auto-farmacologia*, expressão introduzida por Sir Henry Dale (2) para designar fenômenos dessa natureza. No caso em questão, a toxina do veneno não constitue o agente primário da ação farmacológi-

(*) O veneno de *Bothrops jararaca* usado neste trabalho foi posto à nossa disposição pelo Instituto Butantã. Devemos agradecer, ainda a Laborerápica S. A. o ter permitido a colaboração da senhora Eline S. Prado, para a realização de experiências ainda em andamento. Uma parte substancial das manipulações do plasma foi realizada pelo nosso técnico Sr. Jaime Ferraz.

ca sôbre a musculatura lisa, mas age *indirectamente* liberando, do próprio intestino isolado, um princípio ativo (auto-farmacológico) o qual constitue o agente do efeito observado, isto é, da contração da musculatura lisa do intestino isolado. O estado refratário, ou de dessensibilização, resulta do esgotamento do princípio ativo, liberado do próprio tecido animal. Fatos semelhantes, observados por Kellaway (3) e por Feldberg e Kellaway (4) constituem a base para a interpretação de inúmeros envenenamentos produzidos pelos venenos de cobra e de abelha, toxinas bacterianas, fermentos proteolíticos do tipo da tripsina (5) e ainda o curioso fenômeno da anafilaxia, sôbre o qual não entraremos aqui em detalhes. Entre os princípios que têm sido identificados como liberados dos tecidos nessas condições, figuram: a histamina, a acetil-colina, a adenosina e uma substância que produz contração lenta do intestino isolado, a chamada *slow reacting substance* (S. R. S.). O fenômeno por nós observado revelou um novo princípio, não descrito anteriormente, e que é liberado do plasma ou do sangue total, sob a ação do veneno de *Bothrops jararaca*. Em experiências ulteriores verificamos ainda que a tripsina cristalina, fermento proteolítico, também liberta o novo princípio, quando adicionada ao sangue defibrinado. Esse princípio novo foi designado como *bradiconina* (de *brady* = lento e *kinesia* = movimento) indicando tratar-se de princípio diferente da histamina e da acetil-colina, e que produz lenta elevação do tonus, sobretudo quando adicionado em doses moderadas. Apresenta analogias com a *slow reacting substance* mas é duvidoso que tenha qualquer parentesco com a mesma: 1º) a S. R. S. nunca foi obtida a partir do plasma sanguíneo; 2º) o veneno de *Naia naia* que libera a S. R. S. da gema do ovo não libera bradiconina; 3º) a bradiconina, como veremos adiante, é um polipéptido e é destruída pela ação ulterior do próprio veneno e da tripsina; a S. R. S. nunca foi convenientemente

isolada e, portanto, nada se sabe sôbre a sua natureza ou comportamento em face de agentes proteolíticos.

A demonstração da existência da bradiconina pode ser feita de maneira simples e elegante, tomando-se o intestino isolado de cobra, previamente dessensibilizado ao veneno de *Bothrops jararaca*. Na maioria dos casos, o sangue defibrinado de cão ou de boi não contém qualquer princípio estimulante da musculatura lisa e, portanto, pode ser adicionado ao banho sem que resulte qualquer efeito sôbre o mesmo. Portanto, o músculo mostra-se insensível à ação do veneno e também do sôro ou do sangue total, quando adicionados isoladamente. Quando os dois (veneno e sôro) são misturados previamente, incubados durante 1 minuto e adicionada a mistura ao banho de Tyrode, contendo o intestino isolado, segue-se uma contração forte do intestino, como mostra a figura 1.

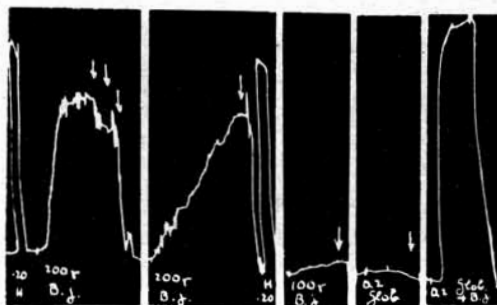


FIG. 1 — Traçado das contrações do intestino isolado de cobra. Nas três primeiras secções, dessensibilização ao veneno de *Bothrops jararaca*. Na quarta secção, adição de 0,2 cc. da solução de globulina de boi. Na quinta secção, 2 cc. de globulina + 0,2 mg. do veneno foram incubados durante 2 minutos e, em seguida, 0,2 cc. da mistura adicionados ao banho, resultando forte contração. H = solução de histamina 1: 2 milhões.

O fenômeno curioso é que a incubação mais prolongada do sôro com o veneno leva à destruição do princípio gerado, embora o músculo continue a reagir a uma nova mistura de veneno e sôro, o que mostra que não se encontra dessensibilizado ao agente ativo gerado naquelas condições. Como fenômenos semelhantes são também observados

com um fermento proteolítico (tripsina) e como os venenos mais ativos são também os mais proteolíticos, foi admitida como provável tratar-se de um fenômeno de proteólise. Nesse caso, a liberação da bradicinina seria o resultado da ruptura de uma ligação péptida e a sua destruição, o resultado da ruptura de outras ligações péptidas nela existentes. Por outras palavras, a bradicinina teria a constituição de um polipéptido (formado pela ligação, em cadeia, de vários amino-ácidos), o qual, por sua vez, estaria ligado às proteínas do plasma por uma ligação —CO-NH—. Trabalhos em andamento, realizados pela nossa assistente Sylvia O. Andrade, usando a técnica de cromatografia em papel, desenvolvida recentemente por Consden, Gordon e Martin (6) levaram à demonstração de que a bradicinina é realmente um polipéptido, aliás complexo, apresentando pelo menos 8 a 10 resíduos de amino-ácidos.

Para esses trabalhos de análise cromatográfica, foi preciso desenvolver uma técnica de purificação da bradicinina. Verificamos inicialmente que o precursor da bradicinina (*bradicininógeno*) encontra-se na fração globulina, precipitada pelo sulfato de amônio, entre 35 a 45 por cento de saturação. Depois de precipitação pelo sulfato de amônio, o material é colhido por centrifugação, redissolvido em mínimo de água destilada e dializado durante 60 horas, à temperatura ambiente, contra água corrente. Depois de diálise, as globulinas totais são tratadas com 1/10 de volume de uma solução de veneno a 1/1000 (1 mgm por cc.); a mistura é incubada durante 2 a 3 minutos, a 37° e, em seguida, despejada em dois volumes de álcool etílico em ebulição; depois de 10 minutos, o material é filtrado em Buchner e o filtrado evaporado em vácuo e o resíduo secado por tratamentos sucessivos pelo éter e pela acetona. O pó colhido (bradicinina bruta) é então submetida a uma extração por ácido acético glacial. O extrato acético, depois de centrifugado, é, então, tratado com oito volumes de éter. O precipitado, colhido por centrifugação, apresenta atividade equivalente a 4 vezes a da bradicinina bruta. Esse material, bem solúvel em água sobretudo se a extração pelo ácido acético é repetida uma ou duas vezes, pode ser ainda purificado por uma ou duas extrações com álcool etílico a 80% e ulterior precipitação com

acetona. A bradicinina assim purificada, com atividade 12 a 15 vezes à da bruta, apresenta-se como um pó ligeiramente amarelado e não mais contém amino-ácidos livres. Pela hidrólise com ácido clorídrico concentrado, liberam-se os amino-ácidos, os quais estão sendo identificados pela cromatografia em papel. Em experiências ainda em andamento, senhora Eline S. Prado, usando coluna de óxido de alumínio, pôde elevar a atividade a 35 vezes a do material bruto.

O material purificado, produz forte contração da musculatura lisa, quando adicionado ao banho de Tyrode, na dose de 10 a 15 γ , portanto, numa concentração final de 1 a 2 por um milhão. Produz queda da pressão arterial do coelho, gato e cão. Cerca de cinco a dez mgms de material purificado, produz queda prolongada da pressão arterial do coelho, de certo modo análoga à produzida pelo veneno quando injetado na veia. Injetada em cobaia, na dose de 5 a 10 miligramas, em cobaia de 250 gramas de peso, a bradicinina produz um quadro curioso de morte que sobrevém ao fim de algumas horas, depois de prolongado coma. O animal permanece 2 a 4 horas em decúbito lateral, respiração apenas perceptível, e raros movimentos das patas dianteiras; os reflexos são progressivamente abolidos, passando o animal, imperceptivelmente, do coma à morte. As quantidades existentes no plasma normal são perfeitamente compatíveis com a possibilidade da bradicinina constituir o intermediário último, ou mais importante, para a produção do choque observado quando o veneno ou a tripsina cristalina são injetados na veia. Não deixa de constituir um fato curioso que o agente causador da morte, não seja o próprio veneno da cobra, mas exista préformado no organismo, esperando por um fermento proteolítico para ser libertado e causar o choque.

Um outro aspecto interessante do problema é o fato de que a mesma globulina (*bradicininógeno*) que gera a bradicinina, quando em contacto com o veneno, é a mesma fração que gera a hipertensina (hipertensi-

nógeno), quando em contacto com a renina. Portanto, a mesma fração do plasma possui, sob forma inativa, os precursores de dois princípios de ação antagônica: um vaso-presor (hipertensina) e outro hipotensor (bradicinina), o que lembra situação semelhante existente no lóbulo anterior da hipófise, o qual contém dois princípios de efeitos bem distintos: a pitressina e a oxitocina, os quais dificilmente podem ser separados pelos métodos extrativos comuns.

BIBLIOGRAFIA

1. ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T. e ROSENFELD, G. — *American Journal of Physiology. Em curso de publicação.* (1949).
2. DALE, H. H. — *Bull. J. Hopkins Hosp.* 53, 297 (1933).
3. KELLAWAY, C. H. — *Brit. J. exp. Path.* 10, 281 (1929).
4. FELDBERG, W. e KELLAWAY, C. H. — *Journal Physiology.* 90, 257 (1937).
5. ROCHA E SILVA, M. — *Arq. Inst. Biol.* 9, 145 (1938) e 10,93 (1939).
6. CONSDEN, R., GORDON, A. H. e MARTIN, A. J. P. — *Biochem. Journ.* 38, 224 (1944).