



**IMPORTÂNCIA DO GRUPO α -AMINO TERMINAL DA BRADICININA E CININAS
RELACIONADAS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR**

Suemi Sugavara

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 139
IEA - DT - 139**

AGÔSTO/1979

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Klaus Reinach – Presidente
Roberto D'Utra Vaz
Helcio Modesto da Costa
Ivano Humbert Marchesi
Admar Cervellini

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

**IMPORTÂNCIA DO GRUPO α -AMINO TERMINAL DA BRADICININA E CININAS
RELACIONADAS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR**

Suemi Sugavara

**Tese para obtenção do Título de "Doutor em Ciências –
Área de Bioquímica" – Orientador Prof. José Moura Gon-
çalves. Apresentada e defendida em 18 de agosto de 1978,
no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C31

Peptide hormones

Kinins

Capillaries

Permeability

Rats

Iodine 125

Iodine 131

Tracer techniques

Evans blue

Labelled compounds

Nota: A redação, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

	Página
1 -- INTRODUÇÃO E PROPÓSITO	1
2 – MATERIAL E MÉTODOS	5
2.1 – Material Biológico	5
2.2 – Marcação do Azul de Evans com Iodo Radioativo (Iodo-125 ou Iodo-131)	5
2.2.1 – Marcação	5
2.2.2 – Purificação	5
2.2.3 – Controle	6
2.3 – Padronização do Método de Medida de Aumento da Permeabilidade Capilar em Pele de Rato	6
2.3.1 – Prova de Quantidade Básica de Radioatividade na Pele	6
2.3.2 – Curva de Identidade de Resposta	6
2.3.3 – Ensaio Quantitativo com Histamina	6
2.3.4 – Cálculo do Índice de Aumento da Permeabilidade Capilar	6
2.4 – Análise Espectrofotométrica	7
2.5 – Análise dos Grupos Guanidínicos com Reagente de Sakaguchi	7
2.6 – Análise Eletroforética	8
2.7 – Determinação de Aminoácidos N-Terminais dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas ..	9
2.7.1 – Análise do Padrão de Aminoácidos	9
2.7.2 – Análise das Cininas	9
2.7.3 – Análise dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas	10
2.7.4 – Análise de Piridoxil-Bradiginina	10
2.8 – Determinação da Curva de Atividade das Cininas e Seus Fosfopiridoxil Derivados	10
2.8.1 – Determinação da Curva de Atividade Das Cininas	10
2.8.2 – Determinação da Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas.	11
2.8.2.1 – Testes Preliminares	11
2.8.2.1.1 – Preparo das Amostras	11
2.8.2.1.2 – Determinação de Atividade	12
2.8.2.2 – Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas	12
2.9 – Teste com Anti-Histamínico	13
2.10 – Métodos Estatísticos	13
2.11 – Substâncias Químicas e Soluções	13
3 – RESULTADOS	14
3.1 – Padronização do Método de Medida do Aumento da Permeabilidade Capilar	14

	Página
3.1.1 – Distribuição da Radioatividade na Pele	14
3.1.2 – Identidade de Resposta	15
3.1.3 – Ensaio Quantitativo com Histamina	16
3.2 – Análise Espectrofotométrica	16
3.3 – Análise dos Grupos Guanidínicos com Reagente de Sakaguchi	16
3.4 – Análise Eletroforética	24
3.5 – Determinação Quantitativa de Aminoácidos N-Terminal	24
3.6 – Curva de Atividade das Cininas	24
3.7 – Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas	34
3.7.1 – Resultados Preliminares	34
3.7.2 – Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas	37
3.8 – Curva de Atividade da Acetil-Bradicinina	37
3.9 – Testes com Mepiramina	40
3.10 – Potências Relativas	40
4 – DISCUSSÃO	43
5 – CONCLUSÕES	45
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

IMPORTÂNCIA DO GRUPO α -AMINO TERMINAL DA BRADICININA E CININAS RELACIONADAS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR

Suemi Sugavara

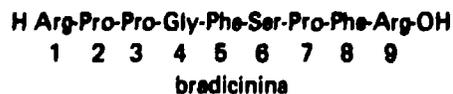
RESUMO

Um método simples e eficaz foi desenvolvido para quantificação do aumento da permeabilidade capilar na parede abdominal de rato, a partir do extravasamento do azul de Evans marcado com iodo-125 ou 131, após administração intradérmica da solução de substâncias vasoativas. Utilizando-se esta metodologia, foi estudada a importância do grupo α -amino N-terminal das moléculas de bradicinina (Bk), calidina (Kd) e metionilcalidina (Met-Kd) na permeabilidade capilar após reação com piridoxal 5'-fosfato seguida de redução com borohidreto de sódio. Há formação de uma base de Schiff com o grupo α -amino N-terminal transformando-se após redução, em derivados estáveis de fosfopiridoxil-cininas, deixando intacto o radical guanidina. A análise dos resíduos de aminoácidos dos derivados fosfopiridoxil-cininas mostrou que a quase totalidade dos α -amino grupos N-terminais se acha bloqueada pelo radical fosfopiridoxila { fosfopiridoxil-bradicinina (PP-Bk) = 98,8%; fosfopiridoxil-calidina (PP-Kd) = 95,2%; e fosfopiridoxil-metionilcalidina (PP-Met-Kd) = 98,9% }. Foram determinadas curvas de atividade para Bk, Kd, Met-Kd, acil-bradicinina (Ac-Bk), PP-Bk, PP-Kd e PP-Met-Kd. As potências relativas foram calculadas aplicando-se a representação gráfica de Lineweaver-Burk (PP-Bk cerca de 16% de atividade de Bk, Ac-Bk cerca de 31% de atividade de Bk, PP-Kd cerca de 17% de atividade de Kd, e PP-Met-Kd cerca de 12% de atividade de Met-Kd). Os resultados mostram a importância do grupo α -amino N-terminal livre das cininas nos mecanismos de ação biológica.

(Zuber)

1 - INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

Hormônios teciduais de natureza polipeptídica que afetam a musculatura lisa e possuem propriedades vasoativas são chamados cininas (Rocha e Silva)⁽⁴⁶⁾. Estas cininas não são secretadas na forma livre por glândulas específicas, mas liberadas por um precursor inativo no plasma. Entre essas cininas temos a bradicinina, calidina e a metionil-calidina, que estão química e farmacologicamente caracterizadas.



A bradicinina foi descrita pela primeira vez em 1949 por ROCHA e SILVA et alii⁽⁴⁸⁾ como sendo uma substância hipotensora e estimulante da musculatura lisa. De natureza polipeptídica, foi liberada de globulinas plasmáticas pela ação da tripsina e de enzimas proteolíticas de venenos de serpentes (*Bothrops jararaca*).

Foi na década de 1960 que ELLIOT et alii^(15,17,18,19) conjuntamente às sínteses experimentais realizadas por BOISSONNAS et alii^(5,6,7), conseguiram isolar e determinar a estrutura da bradicinina. À partir da eluição de sua estrutura foram descritas várias sínteses da bradicinina tanto pelo método convencional de síntese peptídica^(8,52) como pelo método por fase sólida de MERRIFIELD⁽³⁶⁾, os quais permitiram obter elevado número de análogos sintéticos das cininas^(37,52).

A calidina, descoberta por WERLE⁽⁵⁹⁾ em 1937, teve a sua estrutura esclarecida por PIERCE & WEBSTER⁽⁴³⁾ e independentemente por WERLE et alii⁽⁶⁰⁾. A confirmação de sua estrutura foi feita através das sínteses experimentais realizadas por NICOLAIDES et alii⁽⁴⁰⁾ e PLESS et alii⁽⁴⁴⁾.

A metionil-calidina identificada por ELLIOT et alii^(16,20) como sendo relacionada à bradicinina, contém onze resíduos de aminoácidos (metionil-lisil-bradicinina) e teve sua estrutura confirmada por sínteses experimentais realizadas por SCHRODER⁽⁵¹⁾ e por MERRIFIELD⁽³⁷⁾.

Sendo a bradicinina formada pela sequência de nove resíduos de aminoácidos, apresenta muitos pontos possíveis de ligação com o seu receptor, e como qualquer composto biologicamente ativo, é de grande interesse que se determine a relação existente entre sua estrutura e sua função. Um grande número de análogos da bradicinina tem sido sintetizados^(52,55) com o objetivo de estudar a relação entre estrutura-atividade biológica. Esses compostos sintéticos permitiram um progresso substancial na elucidação da sequência e na determinação dos resíduos de aminoácidos requeridos para a atividade farmacológica.

Análogos de bradicinina mostram que os resíduos de fenilalanina podem ser substituídos por outros aminoácidos aromáticos com significante retenção da atividade, enquanto que a incorporação de resíduos alifáticos nesta posição, causa grande perda da atividade⁽⁵²⁾. Aparentemente, o caráter aromático da cadeia lateral dos resíduos nas posições 5 e 8 é mais importante que o tamanho destes resíduos⁽⁵⁵⁾.

O resíduo de serina da bradicinina não parece desempenhar papel importante na atividade deste hormônio. Esta serina pode ser substituída tanto pela glicina como pela treonina com completa retenção de atividade^(3,4,13). Parece haver uma limitação na substituição deste resíduo por aminoácidos volumosos, pois a incorporação de fenilalanina, asparagina e tosil-lisina, produzem análogos com atividade muito baixa⁽⁵⁵⁾. Pode ser aplicada semelhante consideração ao resíduo de glicina (posição 4), mas de uma forma mais exigente, pois a Ala⁴ bradicinina é quase inativa⁽⁵²⁾.

A bradicinina contém três resíduos de prolina (posição 2, 3 e 7) que devido a sua estrutura cíclica impõe sérias restrições na conformação ou arranjo espacial da cadeia peptídica⁽¹⁰⁾. Estudos sobre a substituição das prolinas por outros resíduos de aminoácidos^(4,38,52,55,56) mostram que esse: três resíduos têm diferentes importâncias relativas. SCHRODER⁽⁵²⁾ mostra que enquanto a Ala³ bradicinina é totalmente ativa, Ala² bradicinina e Ala⁷ bradicinina são muito menos ativas, mas a substituição de Pro⁷ por β -homo-prolina não altera a atividade biológica⁽⁴¹⁾. A introdução de grupos funcionais no resíduo de Pro³ impõe alguma restrição na conformação da cadeia peptídica^(22,55).

A molécula de bradicinina possui dois resíduos de arginina (posições 1 e 9). Análogos contendo uma dessas argininas substituída por resíduos de aminoácidos com grande cadeia polar (Tabela I) retêm significante atividade^(52,55), enquanto que análogos contendo glicina ou alanina são praticamente inativos^(52,55). A substituição simultânea de ambas as argininas por resíduos, mesmo por aqueles contendo cadeia grande ou básica, dão com atividade extremamente baixa^(52,55). Investigações mostram a possibilidade de adição de resíduos de aminoácidos no grupo amino terminal da bradicinina sem a

perda de atividade (Tabela I). A análise dos análogos da bradicinina obtidos pelo prolongamento da cadeia no amino terminal da molécula, mostra três compostos cujas atividades biológicas são semelhantes à bradicinina (Tabela I) quando avaliadas pela medida do aumento da permeabilidade capilar em cobaias. Todavia, quando este ensaio é realizado em pele de ratos, a Met-Kd apresenta-se mais ativa (cerca de dez vezes) do que a Bk ou Kd (Tabela I), sendo a cinina GAML-Bk ainda mais potente⁽⁴⁵⁾. O alongamento no sentido C-terminal afeta extraordinariamente a atividade biológica. Quando um simples resíduo de aminoácido é adicionado nesta extremidade, a potência é notoriamente reduzida conhecendo-se apenas uma exceção, a filocinina { Bk-Ile-Tyr(SO₄) }. Isto mostra a importância do grupo carboxila terminal da cadeia na ligação com o receptor⁽⁵⁷⁾. Esta observação tem sido, também, aplicada para muitos outros hormônios peptídicos⁽⁵⁷⁾. A alta atividade encontrada na filocinina pode indicar que o grupo sulfúrico, fortemente ácido ligado à tirosina, seria capaz de tomar o sítio usualmente ocupado pela carboxila da arginina; poderia ser também, devido à rápida conversão da filocinina em bradicinina. Esta conversão é observada no sangue de coelho⁽⁵⁵⁾. A grande importância do grupo carboxila terminal sugere a hipótese de que este é o ponto inicial da ligação com o receptor para auxiliar o alinhamento da molécula ao longo da superfície do receptor com posterior união peptídeo-receptor⁽⁵⁵⁾.

As avaliações das potências de bradicinina e seus análogos são realizadas, na grande maioria, pela medida da pressão sanguínea de coelhos e cobaias ou por contração da musculatura lisa (útero de rato e fêto de cobaia), sendo poucas através da medida do aumento da permeabilidade capilar.

Pouco tem sido feito no sentido de investigar a importância do α -amino grupo de moléculas de bradicinina e de seus análogos. A literatura nos apresenta o estudo da acetil-bradicinina realizado por STEWART et alii^(55,57) e da bromo-acetil-bradicinina realizado por TURK et alii⁽⁵⁸⁾.

O estudo comparativo dos análogos da bradicinina com bloqueio do α -amino grupo N-terminal das moléculas e determinação da atividade pela medida do aumento da permeabilidade capilar não tem sido efetuado.

Tomando como material de estudo a bradicinina, calidina e metionilcalidina, que possuem atividade sobre a permeabilidade capilar (Tabela I), propomos verificar a importância do α -amino grupo N-terminal destas moléculas na atividade biológica. Modificamos sua estrutura molecular com a introdução do radical fosfopiridoxila utilizando piridoxal 5'-fosfato.

O piridoxal 5'-fosfato, derivado da vitamina B₆, apresentando em sua estrutura um grupo aldeídico, tem a capacidade de formar base de Schiff reversível com várias aminas. Esta reação de adição muito conhecida para aminas primárias e aldeídos, tem sido aproveitada para reagir o piridoxal e piridoxal-5'-fosfato com grupos amino livres dos resíduos de lisina existentes nas mais diversas proteínas. A possibilidade de redução do composto formado levando a um derivado estável, com radical piridoxila irreversivelmente fixado à proteína, aumenta a potencialidade deste procedimento nos estudos de bloqueio de radicais amino e serve também como marcador de proteínas.

O uso de corantes, que se ligam às proteínas do plasma e podem, portanto, indicar o aumento da permeabilidade capilar pela coloração da área, no local de extravasamento da proteína, foi bem estabelecida por MENKIN E MENKIN⁽³⁶⁾. Tais métodos têm sido muito usados no estudo da mudança da permeabilidade capilar com drogas e substâncias que liberam a histamina e 5-hidroxi-triptamina^(14,49,53,54).

Há muitos trabalhos que procuram a quantificação de corante extravasado. Por exemplo, LOCKETT e JARMAN⁽³³⁾ têm comparado a intensidade do azul de Evans no local de extravasamento com uma série de padrões. Outros expressam os seus resultados em termos de médias do diâmetro das manchas azuis⁽¹⁾ ou de intensidade gradual da coloração por método simplesmente visual⁽⁴²⁾. Posteriormente, temos os trabalhos de JUDAH e WILLOUGHBY⁽³¹⁾, FRIMMER e MULLER⁽²⁷⁾ e REIS et alii⁽⁴⁵⁾ utilizando o método de extração de corante do local de extravasamento para depois determiná-lo quantitativamente. Todos esses métodos utilizados para determinar o aumento da permeabilidade capilar ou são imprecisos ou muito trabalhosos.

Tabela I

Potências Relativas de Análogos de Bradicinina*

SUBSTÂNCIA	ATIVIDADE BIOLÓGICA			
	permeabilidade capilar (cobaia)	útero de rato (isolado)	fleo de cobaia (isolado)	pressão sanguínea (coelho)
Bk	1	1	1	1
Ala ¹ Bk	—	<1/1500	<1/1500	~1/1000
Cit ¹ Bk	—	1/400 – 1/600	—	1/250 ^(cobaia)
Glu ¹ Bk	—	—	—	1/300 ^(cobaia)
Gly ¹ Bk	—	<1/1500	—	<1/1000
Lys ¹ Bk	—	1/500	1/150 – 1/300	1/250
Orn ⁹ Bk	—	—	—	1/50 ^(cobaia)
Ala ¹ Bk	—	1/500	<1/800	<1/1000
Cit ⁹ Bk	—	1/400	—	1/20 ^(cobaia)
Gly ⁹ Bk	—	1/1500	<1/1500	~1/1000
His ⁹ Bk	—	—	~1/500	~1/1000
Lys ⁹ Bk	—	1/500	1/5	1/10 – 1/30
Orn ⁹ Bk	—	—	1/100	1/400
Arg Bk	—	1	1/10	1/3 – 1/4
Gly Bk	1	1 – 2	1	1/2 – 1/3
Orn Bk	—	1/10	1/3	1/5 – 1/10
Phe Bk	—	1	1/2	1/5
Lys Bk (Kd)	1	1/10	1	2
Acetil Bk	1/5	1/2	—	—
Br Acetil Bk	—	3/5	—	—
Met Lys Bk	1, 10 ^(rato)	1/3 – 1/4	1/3 – 1/4	2 – 3
Lys Lys Bk	—	1/2	—	10
Phe Lys Bk	—	1	1/15	1,5 – 2
Ser Lys Bk	—	1	1/10	2 – 3
Lys Lys Lys Bk	—	1/5	1/5	8 – 10
Ser Lys Met Lys Bk	—	1/8	1/15	1
Gly Arg Met Lys Bk	11 ^(rato)	—	—	—
Bk NH	—	1/100	—	—
Bk Arg	1/100	1/25	—	—
Bk Gly	1/100	1/150	—	—
Bk Ser	—	1/500	—	~1/35
Bk Ile Tyr (SO ₄)	—	1/2	—	1

* Dados obtidos das referências 45, 52, 55, 56 e 58.

A possibilidade da aplicação de radioisótopos simplifica sobremaneira a verificação do aumento da permeabilidade capilar. Assim, FRIMMER⁽²⁶⁾ empregou o ouro coloidal e polifosfato radioativo para determinar o aumento da permeabilidade capilar produzido pela bradicinina, tripsina, histamina e outros agentes, que atuam na parede capilar.

Em nossas experiências, a quantificação do aumento da permeabilidade capilar na pele de ratos foi efetuada com tecnologia própria, utilizando um método por nós desenvolvido, empregando o azul de Evans marcado com iodo radioativo.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material Biológico

Foram usados ratos machos da raça Wistar, pesando aproximadamente 200 g cada, dos quais removiam-se, previamente, os pelos da região abdominal, com auxílio de um aparelho elétrico ("Electric Hair Clipper, Horstator Piccolo 55").

No decorrer de cada experiência os ratos foram mantidos sob anestesia com éter anestésico (éter etílico) pela técnica de máscara aberta.

2.2 – Marcação do Azul de Evans com Iodo Radioativo (Iodo-125 ou Iodo-131)

2.2.1 – Marcação

O método de marcação do azul de Evans {6,6'-[(3,3'-dimetil-4,4'-bifenilileno)bis(azo)]bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftaleno-disulfato tetrassódico]} com iodo radioativo foi de MANI e KULKARNI⁽³⁴⁾ com algumas modificações. Este método compõe-se de duas fases: diazotação do corante e iodação do corante já diazotado.

A fase inicial da diazotação do corante foi feita em meio ácido a 0°C (banho de gelo) sob agitação constante, conforme a seguinte técnica: num tubo de marcação, tomou-se 5 ml de solução aquosa de azul de Evans a 0,6%, acidificou-se com 0,5 ml de H₂SO₄, 1 M, e adicionou-se 0,5 ml de nitrito de sódio a 9,2 mg/ml e esperou-se trinta minutos. Após a reação, tomou-se uma alíquota e verificou-se o excesso de nitrito com o teste de amido iodetado. Procedeu-se, então, a destruição do nitrito acrescentando 0,5 ml de solução de sulfato de amônio a 20 mg/ml, esperando-se quinze minutos.

A iodação do corante diazotado foi realizada adicionando-se 0,2 ml de solução de iodo radioativo, na forma de iodeto de sódio, isento de carregador e redutor (20-30 mCi de iodo-131 ou 1-2 mCi de iodo-125) e 0,1 ml de solução de iodeto de potássio a 10 mg/ml. Fechou-se bem o tubo, retirou-se do banho de gelo e, ainda sob agitação constante, foi mantido por seis horas em banho termostaticado a 55°C e depois por mais uma hora em banho-maria.

2.2.2 – Purificação

A purificação do azul de Evans marcado com iodo radioativo, foi feita por diálise contra solução fisiológica durante vinte horas.

A radioatividade do produto marcado e purificado foi determinada no calibrador de dose "Mediac" (Mediac Dose Calibrator, model 6372, Nuclear Chicago Corporation).

2.2.3 – Controle

A pureza radioquímica do corante foi confirmada por eletroforese em papel Whatman nº 1 (30 x 2,5 cm) com cerragador de iodeto de sódio, usando tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, tempo de migração = 45 minutos e amperagem = 1,5 mA/fita.

O iodeto foi revelado com acetato de chumbo a 10% e a porcentagem de radioisótopo livre calculada pela distribuição de radioatividade ao longo da fita.

A radioatividade ao longo da fita foi determinada no cintilador gama de "poço", dotado de um cristal de iodeto de sódio com impureza de tálio (series 1185), Automatic Gamma Counting System, Nuclear Chicago Corporation).

2.3 – Padronização do Método de Medida de Aumento da Permeabilidade Capilar em Pele de Rato

Inicialmente foram feitos testes preliminares para verificar a homogeneidade de distribuição da radioatividade na pele (quantidade básica de radioatividade na pele), bem como a resposta a uma mesma dose de substância vasoativa, para depois realizar os ensaios quantitativos com histamina.

2.3.1 – Prova de Quantidade Básica de Reatividade na Pele

Administrou-se, por via endovenosa, 0,1 ml de azul de Evans ^{131}I a 0,3% com $10\ \mu\text{Ci/ml}$ de atividade, para cada 100 g de peso animal. Decorridos dez minutos, fez-se a sangria total do animal por decaptação e retirou-se a pele abdominal. Inverteu-se a pele e com auxílio de perfurador circular de 15 mm de diâmetro, foram retiradas seis amostras (três de cada lado). A radioatividade dessas amostras foi determinada no contador gamma de "poço". Para minimizar os erros estatísticos, o tempo de contagem das amostras foi de dez minutos.

2.3.2 – Prova de Identidade de Resposta

Administrou-se a mesma dose de azul de Evans e decorridos dez minutos foram injetadas, subcutaneamente, cinco doses de 0,1 ml de solução de histamina ($25\ \mu\text{g/ml}$) em diferentes pontos da região abdominal e uma dose (0,1 ml) de solução fisiológica. Dez minutos após a última administração subcutânea, fez-se a sangria total e retirou-se a pele abdominal do rato. Os locais de administração da histamina e da solução fisiológica foram cortados bem como uma região controle de pele e, em seguida, determinou-se a radioatividade de cada disco no contador gama de "poço". O tempo de contagem foi de dez minutos.

2.3.3 – Ensaio Quantitativo com Histamina

Usando-se solução de histamina e 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 e $100\ \mu\text{g}$ por ml de solução fisiológica, procedeu-se da mesma maneira como no item anterior, injetando-se a mesma dose de azul de Evans ^{131}I , o mesmo número de pontos e o mesmo volume de droga vasoativa. Após a sangria total e retirada da pele do animal, cortou-se além das regiões de administração subcutânea, uma região controle de pele. Determinou-se a radioatividade das amostras fazendo-se contagens de dez minutos no contador gama de "poço".

2.3.4 – Cálculo do Índice de Aumento da Permeabilidade Capilar

Para o cálculo do índice de aumento da permeabilidade capilar utilizou-se a seguinte fórmula:

$$R = \frac{C_a - (C_{sf} - C_p)}{C_p}$$

onde:

C_a = contagem da pele no local de administração da droga

C_{sf} = contagem da pele no local de administração da solução fisiológica

C_p = contagem da pele.

2.4 – Análise Espectrofotométrica

Para verificar a formação de base de Schiff entre o α -amino grupo das cininas e a carbonila do PLP, bem como a possível interação do grupo guanidínico das cininas com PLP, foram realizadas análises espectrofotométricas das seguintes soluções a pH 7,0:

a) PLP

concentração utilizada = $1,5 \times 10^{-4}$ M em solução fisiológica

b) PLP + cinina (Bk ou Kd ou Met-Kd)

concentrações utilizadas: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M

cinina = $6,0 \times 10^{-4}$ M

Tomou-se 0,5 ml de PLP a $1,5 \times 10^{-4}$ M em solução fisiológica e adicionou-se cerca de 400 μ g de cinina (Bk ou Kd ou Met-Kd).

c) PLP + glicociamina

concentrações utilizadas: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M

glicociamina = $3,0 \times 10^{-3}$ M

Tomou-se 0,5 ml da PLP a $1,5 \times 10^{-4}$ M em solução fisiológica e adicionou-se cerca de 175 μ g de glicociamina.

As leituras das densidades óticas dessas amostras foram realizadas no espectrofotômetro "Carl Zeiss PMQ II", antes e após a redução com borohidreto de sódio, na região de comprimento de onda entre 250 a 500 nm, tomando-se solução fisiológica como branco.

A redução dessas amostras foram efetuadas adicionando-se borohidreto de sódio e ácido succínico para liberação total de hidrogênio. Após a decomposição total de NaBH_4 , as soluções foram neutralizadas com bicarbonato de sódio.

2.5 – Análise de Grupos Guanidínicos com Reagente de SAKAGUCHI

Seguindo a metodologia desenvolvida por SAKAGUCHI para doseamento colorimétrico de arginina⁽⁵⁰⁾ foram realizadas determinações de grupos guanidínicos de arginina, fosfopiridoxil-arginina, glicociamina e glicociamina + piridoxal 5' fosfato.

As soluções empregadas foram:

solução A: arginina a $0,6 \times 10^{-4}$ M em solução fisiológica

solução B: glicociamina a $0,6 \times 10^{-4}$ M em solução fisiológica

solução C: piridoxal 5'-fosfato a 30×10^{-4} M em solução fisiológica neutralizado com bicarbonato de sódio.

A partir das soluções acima foram preparadas, a 0°C , as seguintes amostras:

amostra a: arginina

Em 0,5 ml de solução A, adicionou-se 2,0 ml de solução fisiológica.

amostra b: arginina reduzida com borohidreto de sódio

Em 0,5 ml de solução A, adicionou-se borohidreto de sódio (5 mg) e a seguir, ácido succínico para liberação total de hidrogênio. O volume foi levado a 2,5 ml com solução fisiológica e o pH da solução ajustado para 7,0 com bicarbonato de sódio.

amostra c: (arginina + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio

Em 0,5 ml da solução A, adicionou-se 0,5 ml da solução C e esperou-se 50 minutos. Após esse período, acrescentou-se borohidreto de sódio e em seguida ácido succínico para composição total de NaBH_4 . O volume foi completado a 2,5 ml com solução fisiológica e o pH foi ajustado para 7,0 com NaHCO_3 .

amostra d: glicociamina

Tomou-se 0,5 ml de solução B e adicionou-se 2,0 ml de solução fisiológica.

amostra e: (glicociamina + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio

Em 0,5 ml de solução B juntou-se 0,5 ml de solução C e esperou-se 50 minutos. Decorrido esse período, acrescentou-se borohidreto de sódio e a seguir, ácido succínico para decomposição total de NaBH_4 . Adicionou-se 1,5 ml de solução fisiológica e o pH da solução foi ajustado para 7,0 com NaHCO_3 .

amostra f: PLP reduzido com borohidreto de sódio

Em 0,5 ml de solução C adicionou-se borohidreto de sódio e ácido succínico. Após a decomposição total de NaBH_4 o volume foi levado a 2,5 ml e o pH ajustado para 7,0 com NaHCO_3 .

Para análise de grupos guanidínicos das amostras acima foram adicionados reativos na seguinte ordem: 1º) 0,5 ml de solução de α -naftol a 0,02% e 0,5 ml de NaOH a 10%, esperou-se de dois a três minutos (0°C); 2º) duas gotas de hipobromito de sódio (2 g de bromo em 100 ml de NaOH a 5%); e 3º) 0,5 ml de uréic a 40%.

Os ensaios foram realizados em triplicata, lendo-se as densidades óticas no espectrofotômetro "Carl Zeiss PMQ II", a 520 nm, usando solução fisiológica à qual foi adicionado o reativo de Sakaguchi como branco. Paralelamente, foi determinada a curva de absorvância das amostras a, c, d e e após a adição do reativo de Sakaguchi.

2.6 – Análise Eletroforética

Os fosfopiridoxil derivados das cininas utilizados na análise eletroforética foram preparados a partir de 200 μg de cinina (Bk, Kd e Met-Bk) diluídos em 0,3 ml de solução fisiológica, adicionando-se

100 μ l de PLP a 20 mg/ml de solução fisiológica. Esta mistura, com pH 7,0, foi deixada em repouso por 50 minutos a 0°C. Após esse período, adicionou-se 10 mg de borohidreto de sódio e, a seguir, ácido succínico em quantidade suficiente para decomposição total de NaBH₄. Obteve-se assim, uma solução contendo, aproximadamente, cerca de 500 μ g de fosfopiridoxil derivado de cinina por ml de solução.

Cerca de 100 μ l desse produto foi semeado na parte central de tiras de papel Whatman nº 1, de 2,5 x 30 cm, para eletroforese. Paralelamente, foram preparadas fitas contendo 100 μ l de solução de cinina (Bk, Kd e Met-Kd) a 500 μ g/ml de solução fisiológica que serviram de padrão. As eletroforeses foram realizadas em grupos de quatro fitas (duas fitas de cinina padrão e duas fitas de fosfopiridoxil derivado), em cubas contendo tampão fosfato 0,01 M, pH 7,3, com voltagem = 400 V, amperagem = 3 mA, e tempo de corrida = três horas. Após o término da corrida, as fitas foram secadas e cortadas ao meio no sentido longitudinal e reveladas com ninidrina e reativo de Sakaguchi.

2.7 – Determinação de Aminoácidos N-Terminais dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

A determinação de aminoácidos N-terminais das moléculas dos fosfopiridoxil derivados das cininas foi realizada no analisador de aminoácidos (Aminoacid Analyzer, model 120C, Beckman) após hidrólise ácida, seguindo-se a metodologia empregada por BENESCH et alii⁽²⁾ no estudo da hemoglobina.

Paralelamente às análises dos PP-derivados, foram realizadas análises das respectivas cininas e de um padrão de aminoácidos, que serviram de referência para o cálculo da porcentagem de bloqueio, pelo PLP, dos aminoácidos N-terminais nos derivados obtidos.

2.7.1 – Análise do Padrão de Aminoácidos

Partindo-se de uma solução estoque padronizada de mistura de aminoácidos (aminoacid calibration mixture, Beckman) preparou-se uma solução contendo 0,1 μ mol de cada aminoácido em tampão citrato 0,2 N, pH 2,2. Esta solução foi analisada quanto à composição em aminoácidos: básicos, ácidos e neutros.

A análise quanto ao conteúdo de aminoácidos básicos foi realizada utilizando coluna de resina de troca iônica PA 35 (custon resin type 35, Beckman) de 5,5 x 0,9 cm. O eluente foi tampão citrato 0,35 N, pH 5,8 com fluxo de 70 ml/h, levando-se aproximadamente 55 minutos para eluição total. A determinação da composição de aminoácidos, ácidos e neutros, foi realizada em coluna de resina de troca iônica AA 15 (custon resin type AA 15, Beckman) de 60 x 0,9 cm. Foram utilizados como eluentes, tampão citrato 0,2 N, pH 3,28 e tampão citrato 0,2 N, pH 4,25. Iniciou-se a eluição com tampão pH 3,28 que foi substituído pelo tampão pH 4,25, após 85 minutos do início da corrida, levando-se aproximadamente 115 minutos para eluição total dos aminoácidos com um fluxo de 70 ml/hora.

Estas análises serviram para determinar as constantes relativas às áreas correspondentes a 0,1 μ mol de cada aminoácido.

2.7.2 – Análise das Cininas

A hidrólise das cininas foi realizada em meio ácido, sob vácuo, em ampolas de vidro com capacidade de 5 ml. Tomou-se 250 μ l de uma solução contendo cerca de 1,2 a 1,5 mg de cinina por ml de ácido oxálico 10⁻³ M⁽³⁰⁾, completou-se o volume a 1 ml com água deionizada e adicionou-se 1 ml de HCl concentrado (concentração final = 6N). Cuidadosamente, sob vácuo, as ampolas foram fechadas e procedeu-se a hidrólise deixando as amostras por 20 horas a 110°C. Após esse período, as ampolas foram cortadas e secou-se o material em um dessecador contendo pentóxido de fósforo e hidróxido de sódio.

Para eliminação total de HCl, o resíduo foi dissolvido em 1 ml de água deionizada e secado nas mesmas condições, repetindo-se essa operação por duas vezes. O material seco e livre de HCl foi dissolvido em 700 μ l de tampão citrato 0,2 N, pH 2,2.

As análises de aminoácidos foram realizadas em duplicata, seguindo a metodologia empregada no item anterior, tomando-se alíquotas de 250 μ l de cada amostra.

Nos hidrolisados de Bk e Kd foi determinada a composição de aminoácidos básicos, e no hidrolisado de Met-Kd a composição de aminoácidos neutros e ácidos.

As quantidades de aminoácidos foram calculadas relacionando-se as áreas de cada pico com as respectivas constantes relativas, determinadas no item anterior.

2.7.3 – Análise dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

Os fosfopiridoxil derivados das cininas foram preparados nas próprias ampolas de hidrólise, tomando-se 250 μ l das mesmas soluções utilizadas no item anterior e PLP na proporção de 50:1 de cinina (200 μ l de uma solução de PLP por ml). Essa mistura foi deixada em repouso por 50 minutos a 0°C, após o que adicionou-se 250 μ l de NaBH₄ (20 mg/ml de NaOH 10⁻³ N) e quantidade suficiente de ácido succínico para decomposição de NaBH₄. O volume foi completado a 1 ml com água deionizada.

A hidrólise ácida e a secagem dessas amostras, bem como as análises de aminoácidos, foram realizadas nas mesmas condições anteriores (item 2.7.2). Assim, nos hidrolisados de PP-Bk e PP-Kd foi determinada a composição de aminoácidos básicos e no hidrolisado de PP-Met-Kd, a composição de aminoácidos neutros e ácidos. A quantidade de cada aminoácido foi determinada relacionando-se as áreas de cada pico com as constantes relativas, obtidas pela análise da mistura padrão de aminoácidos.

2.7.4 – Análise de Piridoxil-Bradicinina

Duas amostras de piridoxil-bradicinina foram preparadas a 0°C, pH 7,0, nas ampolas de hidrólise, utilizando-se diferentes tempos de reação (50 minutos e duas horas). Tomou-se 250 μ l da solução de bradicinina utilizada no item 2.7.2. e adicionou-se 200 μ l de uma solução de piridoxal a 30 mg/ml. Decorrido o tempo de reação, 250 μ l de NaBH₄ (20 mg de NaBH₄/ml de NaOH 10⁻³ M) foram adicionados e a seguir quantidade suficiente de ácido succínico para decomposição total de NaBH₄. O volume foi completado para 1 ml com água deionizada.

A hidrólise ácida, e secagem das amostras, bem como a análise de aminoácidos foram realizados nas mesmas condições do item 2.7.2. Assim, foi determinada a composição de aminoácidos básicos e a sua quantidade determinada relacionando-se as áreas de cada pico com as constantes de áreas obtidas pela análise da mistura padrão de aminoácidos.

2.8 – Determinação da Curva de Atividade das Cininas e Seus Fosfopiridoxil Derivados

A determinação da curva de atividade das cininas e seus fosfopiridoxil derivados sobre a permeabilidade capilar foi realizada em pele de ratos pelo método descrito no item 2.3, utilizado para ensaio quantitativo com histamina. Assim, a dose de corante radioativo usado como traçador, bem como o número de pontos de administração subcutânea, foram os mesmos citados no referido item, variando apenas a concentração das soluções das substâncias vasoativas.

2.8.1 – Determinação da Curva de Atividade das Cininas

Dez minutos após a administração do azul de Evans radioativo, foram injetadas subcutaneamente na pele abdominal de ratos: num ponto, 0,1 ml de solução fisiológica; em 5 pontos, 0,1 ml de soluções contendo diferentes quantidades de cininas.

A concentração das soluções empregadas foram: 5 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg e 60 µg por ml de solução fisiológica para cada uma das seguintes cininas: Bk, Kd e Ac-Bk; 2,5 µg, 5,0 µg, 10 µg, 20 µg e 30 µg por ml de solução fisiológica para Met-Kd.

Quinze minutos após a última administração subcutânea, fêz-se a sangria total dos animais por decaptação. Retirou-se a pele abdominal e, após sua inversão, cortou-se amostras nos locais de administração para determinação da radioatividade. Além dessas seis amostras, foi retirada uma região controle da pele. Determinou-se a radioatividade pela leitura dessas amostras no contador gama e, aplicando-se a fórmula indicada no item 2.3.4., foi calculado a índice de aumento da permeabilidade capilar.

2.8.2 – Determinação da Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

Para determinação da curva de atividade dos fosfopiridoxil derivados da Bk, Kd e Met-Kd sobre a permeabilidade capilar, inicialmente foram realizados testes preliminares.

2.8.2.1 – Testes Preliminares

Os testes preliminares consistiram na verificação da atividade sobre a permeabilidade capilar de:

- a) cinina;
- b) cinina reduzida com borohidreto de sódio;
- c) PLP reduzido com borohidreto de sódio;
- d) (cinina + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio;
- e) Cinina + PLP reduzido pelo borohidreto de sódio.

2.8.2.1.1 – Preparo das Amostras

As amostras a, b, c, d e e foram preparadas a 0°C em banho de gelo, a partir das seguintes soluções:

solução A: cinina (Bk ou Kd ou Met-Kd) a 50 µg/ml de solução fisiológica

solução B: PLP a 25 mg/ml de solução fisiológica neutralizada com bicarbonato de sódio

solução C: NaBH₄ a 12 mg/ml de solução de NaOH 10⁻³ M.

amostra a: cinina (25 µg/ml).

Tomou-se 500 µl de solução A e adicionou-se 500 µl de solução fisiológica para levar o volume a 1 ml.

amostra b: cinina reduzida com borohidreto de sódio.

Em 500 μ l da solução A adicionou-se 400 μ l de solução fisiológica e 100 μ l de solução C. Imediatamente após a adição da solução C, iniciou-se a decomposição total do borohidreto de sódio pela adição de quantidades suficientes de ácido succínico para liberação total de hidrogênio. Após esse procedimento, o pH da solução foi ajustado para 7,0 com pequenas quantidades de bicarbonato de sódio.

amostra c: PLP reduzido com borohidreto de sódio.

Tomou-se 10 μ l de solução B, adicionou-se 890 μ l de solução fisiológica e 100 μ l de solução C. Logo após a adição da solução C, acrescentou-se quantidades suficientes de ácido succínico para liberação total de hidrogênio. Em seguida, a solução foi neutralizada juntando-se bicarbonato de sódio.

amostra d: cinina + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio.

Tomou-se 500 μ l de solução A, adicionou-se 390 μ l de solução fisiológica e 10 μ l de solução B. Esperou-se cinco minutos e adicionou-se 100 μ l de solução C e ácido succínico em quantidade suficiente para liberação total de hidrogênio. Ajustou-se o pH da solução para 7,0 com bicarbonato de sódio.

amostra e: cinina + PLP reduzido pelo borohidreto de sódio.

Tomou-se 10 μ l de solução B, adicionou-se 390 μ l de solução fisiológica e 100 μ l de solução C. Em seguida, juntou-se ácido succínico em quantidade suficiente para liberação total de hidrogênio. Ajustou-se o pH da solução para 7,0 com bicarbonato de sódio e adicionou-se 500 μ l de solução A.

2.8.2.1.2 – Determinação de Atividade

Dez minutos após a administração do azul de Evans radioativo, injetou-se, subcutaneamente, na pele abdominal de rato, 0,1 ml de solução fisiológica de 0,1 ml das amostras a, b, c, d e e. Para o teste da Met-Kd as soluções a, b, c, d e e foram diluídas ao meio, das quais foram injetadas, igualmente, 0,1 ml. Quinze minutos após a última administração subcutânea, fez-se a sangria total dos animais por decaptação e retirou-se a pele abdominal. Após a inversão da pele, com auxílio de perfuradores circulares, cortou-se os locais de administração subcutânea para determinação da radioatividade. Cortou-se também uma região da pele para determinação da radioatividade básica. Os índices de aumento da permeabilidade capilar foram determinados utilizando-se a fórmula no item 2.3.4.

2.8.2.2 – Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

Os diversos fosfopiridoxil derivados das cininas utilizados na determinação da curva de atividade, foram preparados partindo-se de uma solução contendo 2 mg de cinina por ml de ácido oxálico 10^{-3} M⁽³⁰⁾. Tomou-se 100 μ l dessa solução, adicionou-se 1 ml de solução fisiológica e 100 μ l de solução de PLP a 20 mg/ml de solução fisiológica. Esta mistura foi deixada em repouso por 50 minutos a 0°C, pH 7,0. Após esse período, adicionou-se 0,5 ml de solução de NaBH₄ a 20 mg/ml de NaOH 10^{-3} M e quantidade suficiente de ácido succínico para liberação total de hidrogênio. O volume da solução foi completado para 2 ml com solução fisiológica e o pH ajustado para 7,0 com bicarbonato de sódio.

Partindo da solução acima, preparou-se misturas contendo 600, 400, 200, 100 e 50 μ l por ml de soro fisiológico para os derivados da Bk e Kd e, misturas contendo 300, 200, 100, 50 e 25 μ l por ml de solução fisiológica para fosfopiridoxil derivado da Met-Kd. A concentração destas soluções correspondem, respectivamente, a 60, 40, 20, 10 e 5 μ g ou 30, 20, 10, 5 e 2,5 μ g de cinina inicial por ml de solução fisiológica.

Injetou-se, subcutaneamente, 0,1 ml dessas soluções na pele abdominal de ratos, que receberam previamente uma dose e.v. de azul de Evans radioativo.

Além das doses de fosfopiridoxil derivados, injetou-se subcutaneamente 0,1 ml de solução fisiológica. Quinze minutos após a última administração subcutânea, fêz-se a sangria total dos animais por decaptação e retirou-se a pele abdominal. Após a inversão da pele, foram cortados os locais de administração e mais uma região controle da pele e determinou-se a radioatividade dessas amostras no contador gama de "poço".

O índice de aumento da permeabilidade capilar de cada amostra de pele foi determinado utilizando-se a fórmula indicada no item 2.3.4.

2.9 – Teste com Anti-Histamínico

Este teste consistiu em verificar se no processo de aumento da permeabilidade capilar provocado pelos fosfopiridoxil derivados das cininas ocorria a liberação de histamina. Utilizou-se assim, a mepiramina como anti-histamínico e a histamina como seu controle.

As soluções de fosfopiridoxil derivados empregadas foram preparadas conforme o item 2.8.2.2. Tomou-se 0,6 ml ou 0,3 ml dessas soluções e diluiu-se a 1 ml com solução fisiológica, preparando-se assim soluções contendo 60 µg de Bk ou Kd e 30 µg de Met-Kd por ml de solução fisiológica. A concentração da solução de histamina utilizada foi de 40 µg/ml de solução fisiológica e a da mepiramina de 5 mg/ml de solução fisiológica⁽¹⁾.

Empregando-se a mesma dose de corante marcado referido no item 2.3.1., procedeu-se da seguinte maneira: 10 minutos após a administração e.v. do azul de Evans radioativo, injetou-se i.d., em diferentes locais do lado direito da pele abdominal de rato, 0,1 ml de solução fisiológica, 0,1 ml de solução de histamina e duas doses de 0,1 ml de solução de fosfopiridoxil derivado. Esperou-se 15 minutos para ocorrer a ação das drogas vasoativas e, por via endovenosa, injetou-se mepiramina na dose de 0,5 mg por 100 g de peso animal⁽¹⁾. Cinco minutos após essa administração (e.v.), repetiu-se as administrações subcutâneas, no lado esquerdo da parede abdominal. Decorridos 15 minutos da última administração subcutânea, sacrificou-se o animal, fazendo-se sangria total por decaptação. Retirou-se a pele abdominal e após a inversão cortou-se os locais de administração subcutânea e mais uma região da pele para controle.

Determinou-se a radioatividade das amostras de pele no contador gama de "poço" e calculou-se o índice de aumento da permeabilidade capilar utilizando-se a fórmula citada no item 2.3.4.

2.10 – Métodos Estatísticos

Para verificar os níveis de significância entre as médias obtidas utilizou-se o teste t de Student⁽²¹⁾.

As respostas do aumento da permeabilidade vascular às várias doses utilizadas dos peptídeos vasoativos foram representadas num sistema de coordenadas aritméticas tomando-se os respectivos inversos tal como no gráfico de Lineweaver-Burk para reações enzimáticas. Assim, obtivemos pelo método dos mínimos quadrados uma linha de regressão que nos facultou calcular as potências das diferentes cininas e seus respectivos derivados.

2.11 – Substâncias Químicas e Soluções

As seguintes substâncias químicas e soluções foram empregadas no presente trabalho:

- Iodo-125 (Hoechst)
na forma de iodeto de sódio, isento de carregador e redutor.

- Iodo-131 (obtido na C.P.M.R. do Instituto de Energia Atômica, São Paulo) na forma de iodeto de sódio, isento de carregador e redutor.
- Azul de Evans (Merck).
- Calidina triacetato* (sintetizada na Escola Paulista de Medicina).
- Bradicinina triacetato* (sintetizada na Escola Paulista de Medicina).
- Metionilcalidina triacetato* (sintetizada na Escola Paulista de Medicina).
- Acetilbradicinina (sintetizada por Stewart).
- Histamina dicloridrato (Sigma Chemical Company).
- Piridoxal 5'-fosfato (Sigma Chemical Company).
- Piridoxal HCl (Sigma Chemical Company).
- Borohidreto de Sódio (Sigma Chemical Company).
- Maleato de Mepiramina (Merck).
- Resina de troca iônica PA 35 (Custom Spherical Resin, type PA 35, Beckman).
- Resina de troca iônica AA 15 (Custom Research Resin, type PA 35, Beckman).
- Solução de amino iodetado, preparado segundo a Farmacopéia Brasileira II, página 1102.
- Solução de azul de Evans ¹²⁵I ou ¹³¹I com atividade de 10 μ Ci/ml e atividade específica de 3,33 μ Ci/mg.
- Os demais reagentes empregados foram da melhor procedência comercial.

3 – RESULTADOS

3.1 – Padronização do Método de Medida do Aumento da Permeabilidade Capilar

Os dados obtidos durante a padronização da metodologia da medida da permeabilidade capilar foram separados em distribuição da radioatividade, identidade de resposta e ensaio quantitativo com histamina.

3.1.1 – Distribuição da Radioatividade na Pele

A Tabela II mostra os resultados das contagens de radioatividade nas amostras de pele de diferentes regiões da parede abdominal. Nota-se pelos dados que há homogeneidade na distribuição do traçador na pele de animais após sua sangria total.

(*) Gentilmente doado pelos Professores J. L. Prado e A. C. M. Paiva, da Escola Paulista de Medicina.

Tabela II
Distribuição de Radioatividade na Pele*

Ratos	c. p. m. x 10			
	1	2	3	4
Amostras				
1	12.610	8.706	14.810	10.420
2	13.661	8.878	16.199	10.880
3	11.373	9.796	13.940	10.491
4	13.461	8.303	13.269	9.305
5	11.965	8.393	16.244	10.220
6		8.545	14.443	10.225
\bar{M}^{**}	12.614	8.770	14.817	10.259
$\pm s^{***}$	971	554	1.204	525

* A tabela mostra a distribuição da radioatividade em seis regiões da pele abdominal de ratos, 10 minutos após a administração endovenosa de 1 μ Ci de azul de Evans 131 I por 100 g de peso animal.

** Média.

*** Desvio padrão.

3.1.2 – Identidade de Resposta

A identidade de resposta a uma mesma dose foi verificada injetando-se cinco doses de 2,5 μ g de solução de histamina em diferentes pontos da região abdominal. A Tabela III' mostra os resultados obtidos nessa experiência. Nota-se na Tabela que as médias dos índices de aumento da permeabilidade capilar dos quatro animais testados foram de $4,2 \pm 0,4$; $4,4 \pm 0,3$; $5,2 \pm 0,7$; e $4,2 \pm 0,4$.

Tabela III
Identidade de Resposta*

Ratos	Valores de R			
	1	2	3	4
Amostras				
1	4,4	4,6	5,6	3,6
2	4,1	4,0	5,8	4,5
3	3,6	4,4	5,2	3,9
4	4,6	4,7	4,0	4,5
5	4,5	4,1	5,5	4,3
\bar{M}	4,2	4,4	5,2	4,2
$\pm s$	0,4	0,3	0,7	0,4

* A tabela mostra os índices de aumento de permeabilidade capilar (R), 10 minutos após a administração subcutânea de 2,5 μ g de histamina em diferentes pontos da pele abdominal de ratos, usando azul de Evans 131 I como traçador.

3.1.3 – Ensaio Quantitativo com Histamina

Os índices de aumento da permeabilidade capilar obtidos após a administração de diferentes doses de histamina encontram-se na Tabela IV e Figura 1.

Na tabela nota-se que 0,1 μg de histamina produz um índice de aumento de permeabilidade capilar (R) de $1,5 \pm 0,5$; 0,2 μg de $1,6 \pm 0,3$; 0,3 μg de $2,0 \pm 0,8$; 0,4 μg de $1,9 \pm 0,4$; 0,5 μg de $2,0 \pm 0,8$; 1,0 μg de $2,6 \pm 0,6$; 2,5 μg de $4,9 \pm 0,4$; 5,0 μg de $6,7 \pm 0,9$; e 10,0 μg de $5,4 \pm 1,6$. Verifica-se, portanto, que entre a dose de 0,1 a 0,5 μg não há aumento de índice (R) correspondente ao aumento da droga vasoativa (Figura 1). O aumento de índice (R) correspondente é verificado somente na faixa de dose de 0,5 a 5,0 μg da droga.

3.2 – Análise Espectrofotométrica

Os resultados das leituras de densidade ótica, na região de comprimento de onda entre 250 a 500 nm, do PLP e dos complexos resultantes da interação PLP e cininas, estão expostos nas Figuras 2, 3 e 4.

Verifica-se nas Figuras 2A e 4A, que a curva de absorvância das misturas PLP + Bk e PLP + Met-Kd acha-se ligeiramente deslocada para a região de maior comprimento de onda em relação à curva de absorvância do PLP. Quando se trata do complexo PLP-Kd, Figura 3A, observa-se que a absorção máxima é nitidamente menor quando comparada ao máximo de absorção do PLP.

Nas curvas de absorvância obtidas para as misturas PLP + cininas, os máximos de absorção ocorrem na região próxima a 400 nm, que conforme os dados encontrados na literatura^(12,24), correspondem ao espectro característico da base de Schiff.

As curvas de absorção obtidas após a estabilização dos complexos, estão expostas nas Figuras 2B, 3B e 4B. Nessas Figuras, observa-se que os máximos de absorção deslocam-se para a região de menor comprimento de onda (290 nm). Nota-se também que a absorção máxima dos complexos reduzidos é nitidamente menor quando comparada a do PLP reduzido e, de acordo com os dados da literatura^(23,25), corresponde ao espectro de absorção de produtos estáveis resultantes da redução da base de Schiff.

As curvas de absorvância da mistura (glicociamina + PLP) antes e após a redução com borohidreto de sódio mostraram serem idênticas às curvas obtidas para PLP (Figura 5), indicando que o grupo guanidínico não reage com o grupo carbonílico do PLP.

3.3 – Análise dos Grupos Guanidínicos com o Reagente de Sakaguchi

Os resultados das análises de grupos guanidínicos com o reagente de Sakaguchi encontram-se na Tabela V. A tabela mostra a absorvância em 520 nm (média de três ensaios) obtida para arginina, arginina após a redução com borohidreto de sódio, (arginina + PLP) seguido de redução com borohidreto de sódio, glicociamina, (glicociamina + PLP) seguido de redução com borohidreto de sódio, e PLP reduzido com borohidreto de sódio. Nota-se na tabela que o tratamento da arginina com borohidreto de sódio não altera a reatividade do grupo guanidínico (D.O. = 0,75). As densidades óticas encontradas para glicociamina e (glicociamina + PLP) são iguais (D.O. = 0,40), o mesmo não ocorrendo quando se compara as colorações para arginina e (arginina + PLP) onde se observa que a absorção da PP-Arg é bem menor (D.O. = 0,56).

Tabela IV

Atividade da Histamina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Dose								
	0,1 µg	0,2 µg	0,3 µg	0,4 µg	0,5 µg	1,0 µg	2,5 µg	5,0 µg	10,0 µg
1	—	1,9	—	1,9	2,3	—	—	—	—
2	—	1,4	—	2,2	1,5	—	—	—	—
3	2,2	1,9	3,0	2,6	3,0	—	—	—	—
4	1,5	1,8	2,1	1,5	1,3	—	—	—	—
5	1,2	1,5	—	1,5	—	—	—	—	—
6	—	1,0	1,2	1,6	—	—	—	—	—
7	1,2	1,8	1,5	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	2,1	4,6	6,1	—
9	—	—	—	—	—	—	4,9	6,3	5,8
10	—	—	—	—	—	2,2	4,4	6,5	3,6
11	—	—	—	—	—	2,5	4,9	6,1	4,8
12	—	—	—	—	—	3,5	5,5	8,3	7,3
\bar{M}	1,5	1,6	2,0	1,9	2,0	2,6	4,9	6,7	5,4
$\pm s$	0,5	0,3	0,8	0,4	0,8	0,6	0,4	0,9	1,6

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) em pele de ratos, 10 minutos após a administração subcutânea de diferentes doses de histamina usando como traçador azul de Evans ¹³¹I.

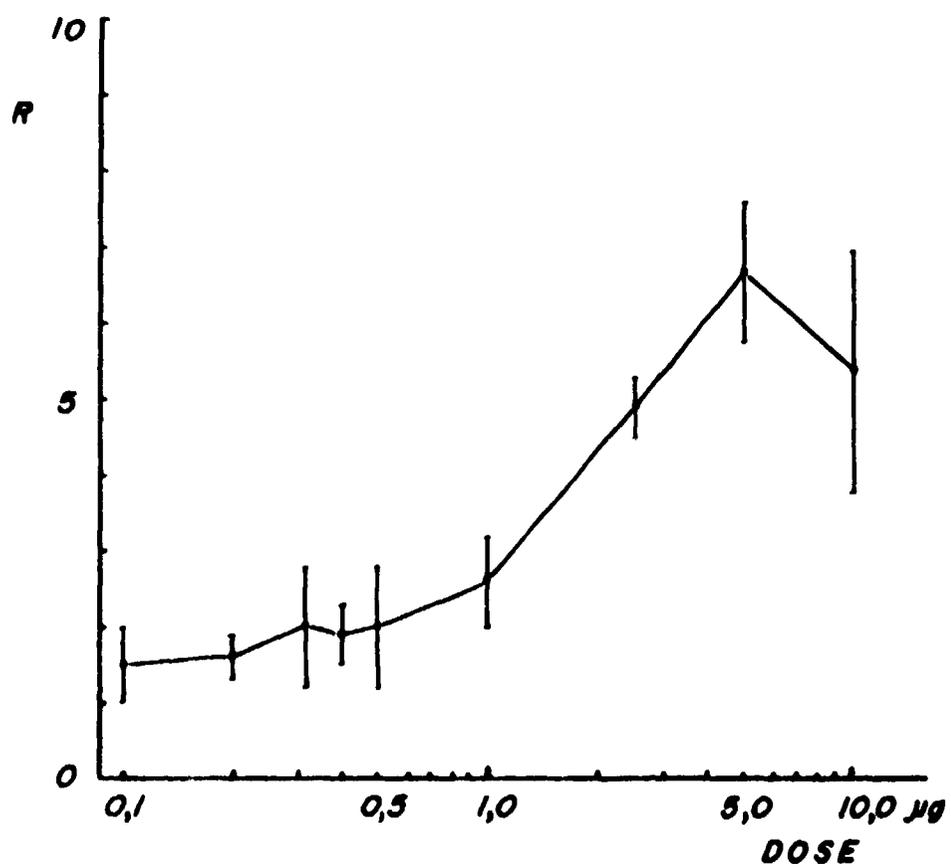


Figura 1 - CURVA LOG DOSE-RESPOSTA DA HISTAMINA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de diferentes doses de histamina, usando como traçador azul de Evans ¹³¹I.

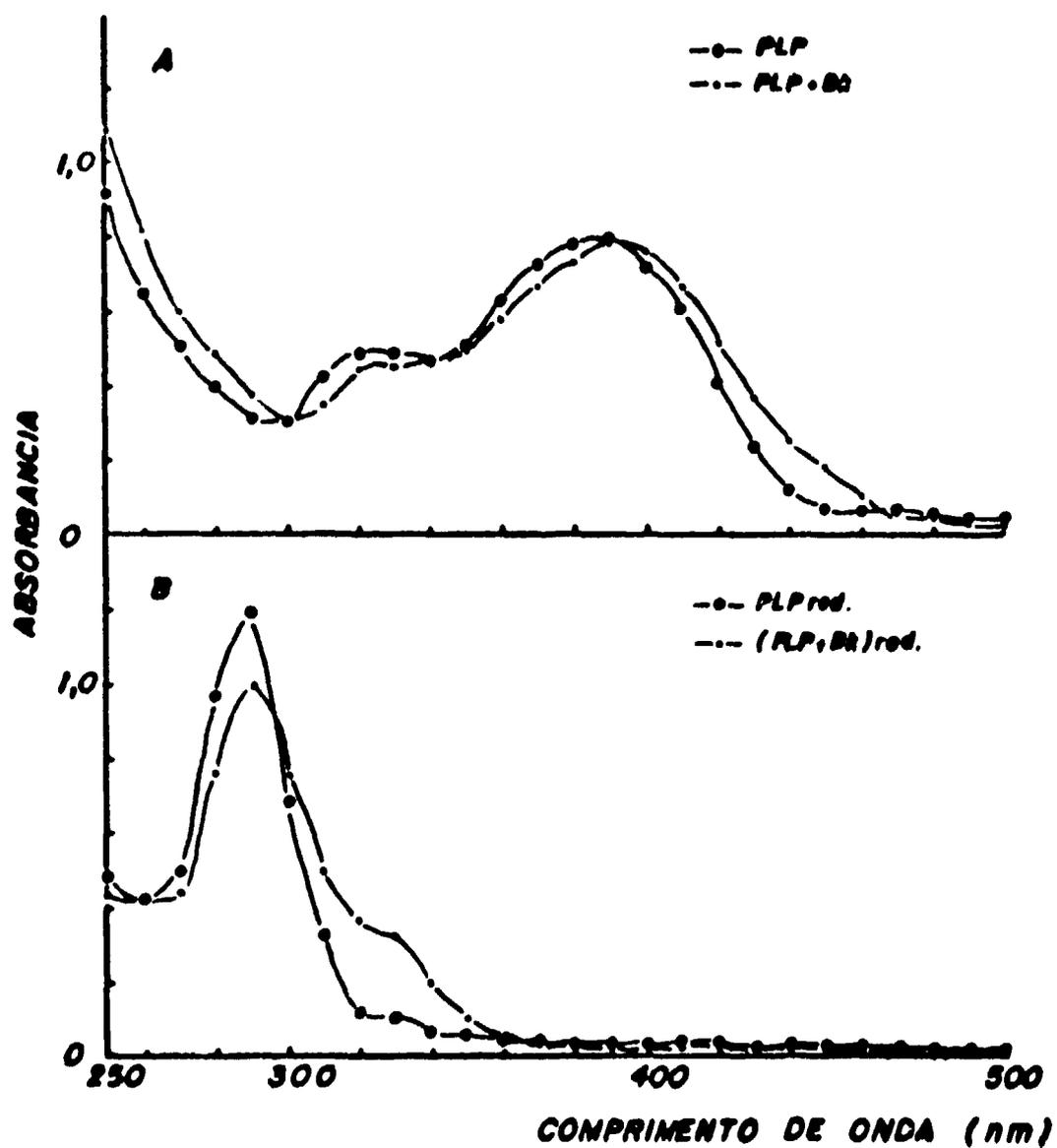


Figura 2 -- CURVA DE ABSORBÂNCIA DE PLP-Bk. Espectros de absorção das soluções de PLP e PLP + Bk antes (A) e após (B) a redução com bo:ohidreto de sódio. pH = 7,0, concentrações: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M e Bk = $6,0 \times 10^{-4}$ M.

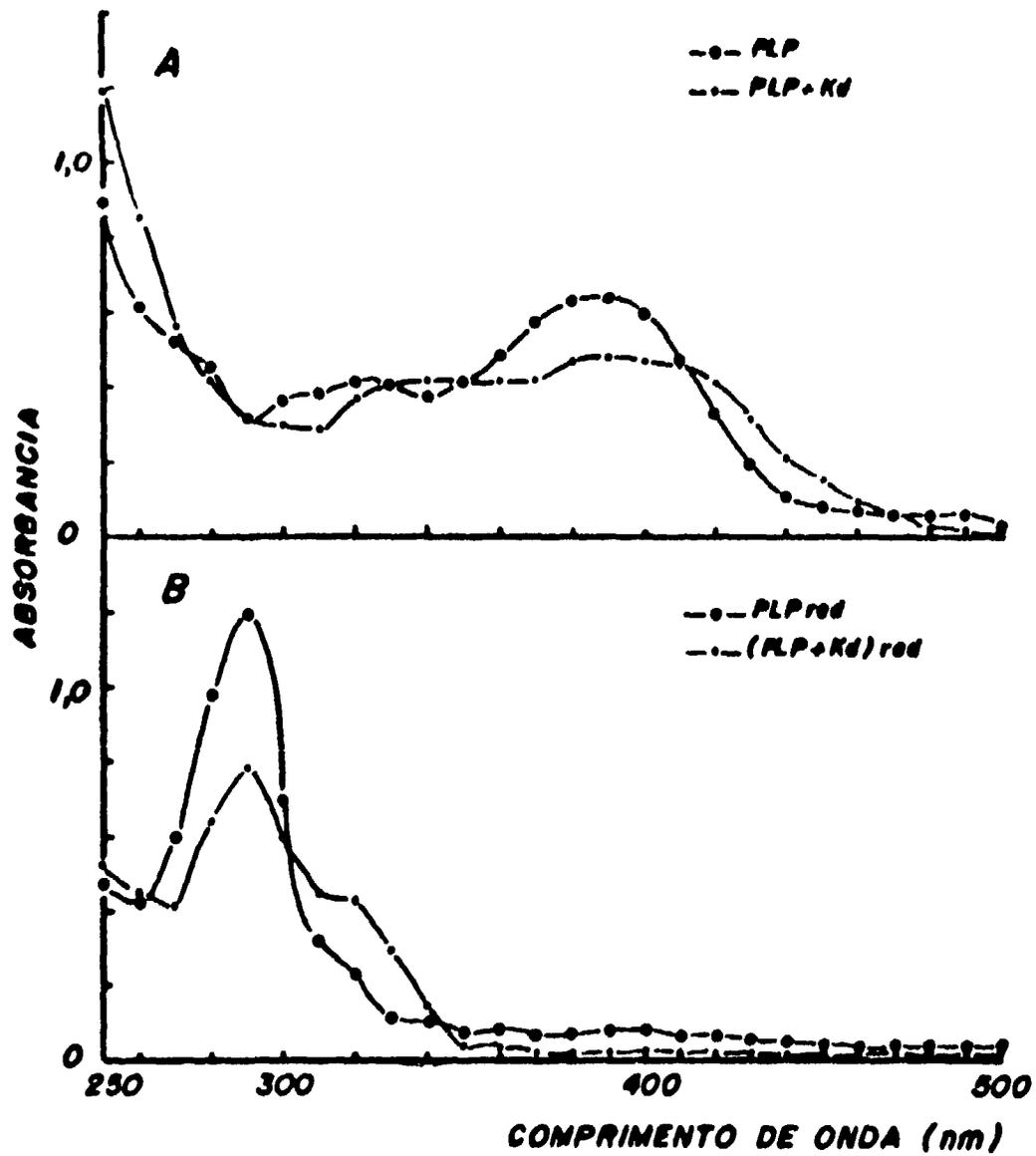


Figura 3 - CURVA DE ABSORBÂNCIA DE PLP-Kd. Espectros de absorção das soluções de PLP e PLP + Kd antes (A) e após (B) e redução com borohidreto de sódio, pH 7,0, concentrações: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M e Kd = $6,0 \times 10^{-4}$ M.

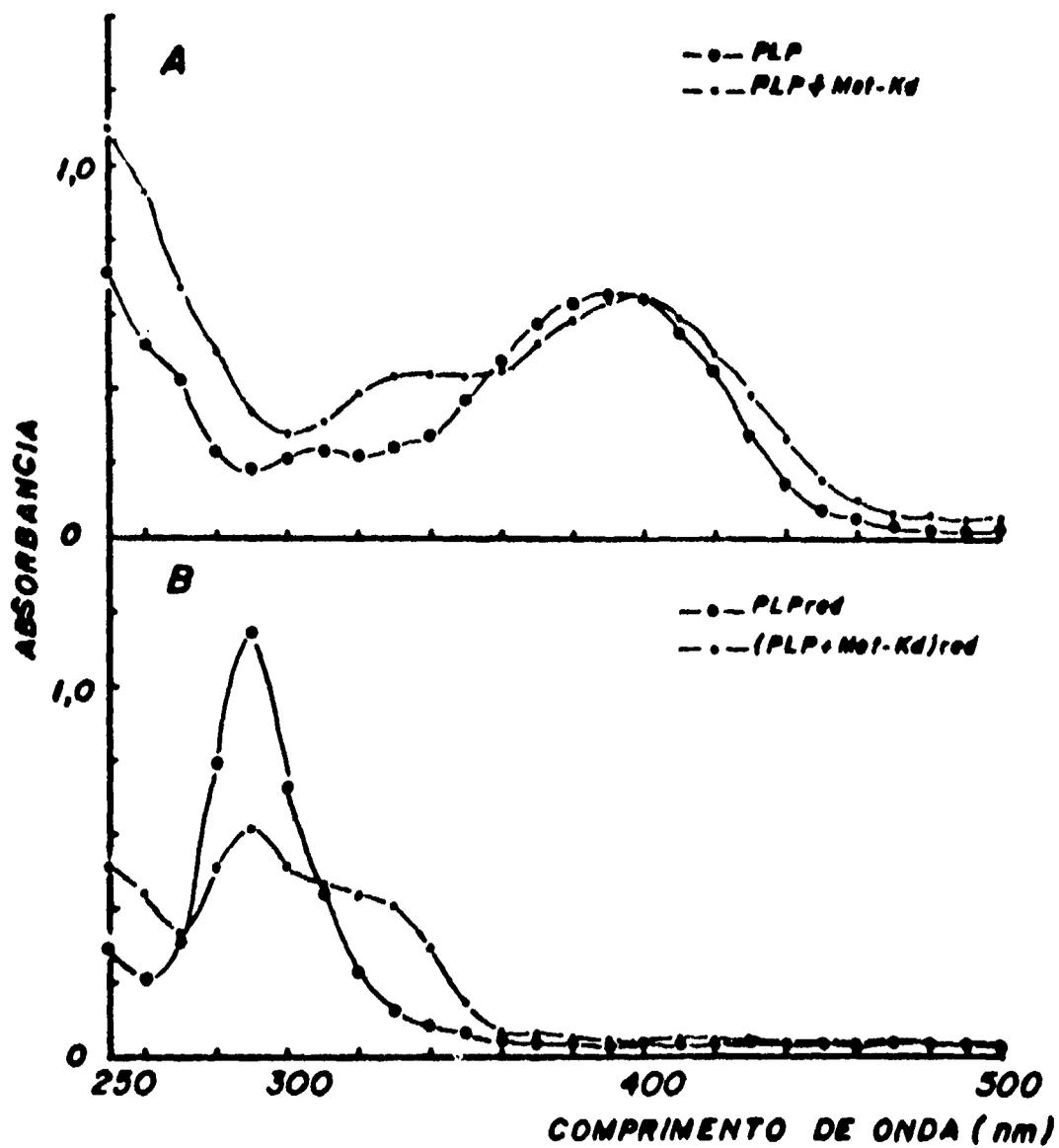
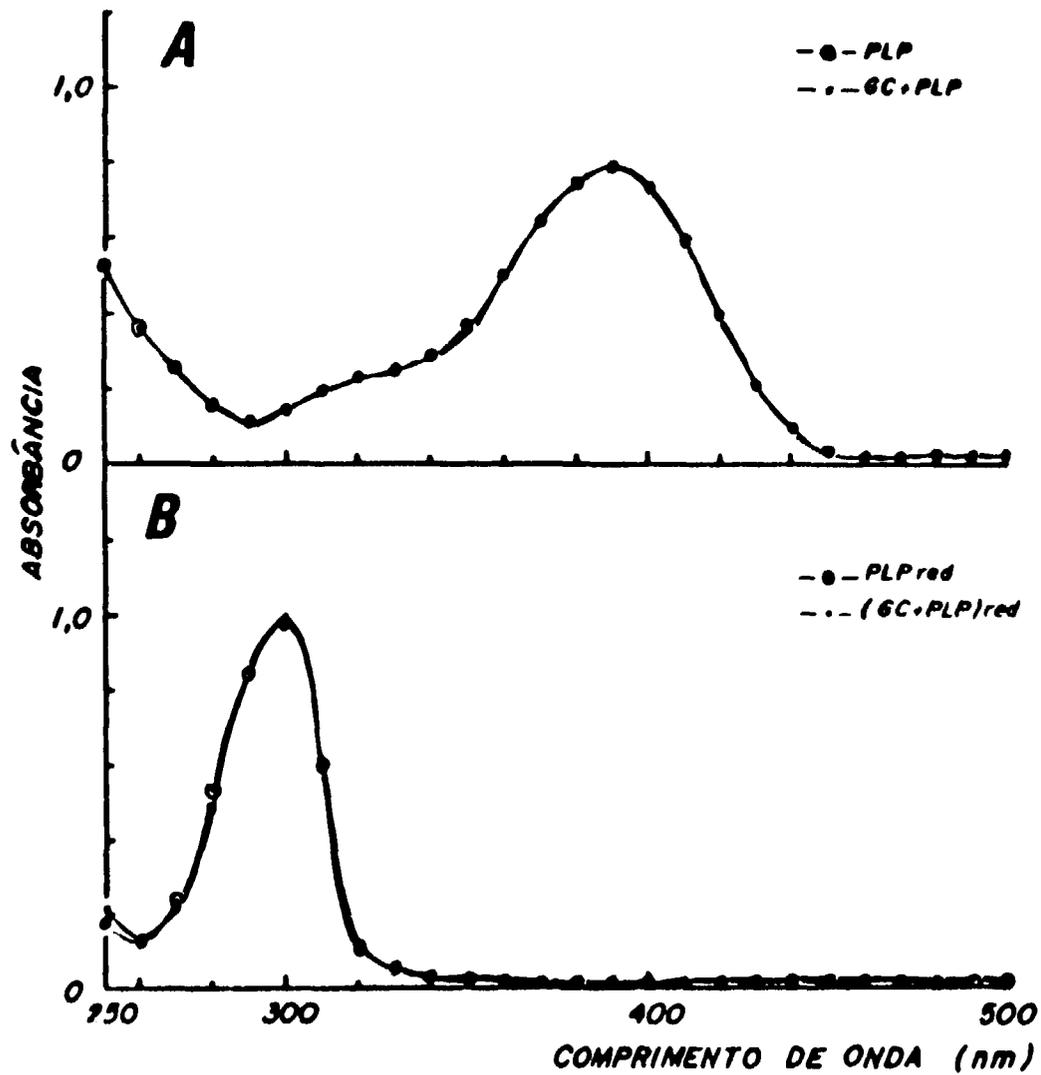


Figura 4 -- CURVA DE ABSORBÂNCIA DE PLP-Met-Kd. Espectros de absorção das soluções de PLP + Met-Kd antes (A) e após (B) a redução com borohidreto de sódio. pH = 7,0, concentrações: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M e Met-Kd = $6,0 \times 10^{-4}$ M.



CURVA DE ABSORBÂNCIA DE PLP + GLICOCIAMINA. Espectros de absorção das soluções de PLP e PLP + glicociamina antes (A) e após (B) a redução com borohidreto de sódio. pH = 7,0, concentrações: PLP = $1,5 \times 10^{-4}$ M e glicociamina = $3,0 \times 10^{-3}$ M.

Tabela V

Análise de Grupos Guanidínicos com Reagente de Sakaguchi*

Amostras	D. O. (520 nm)
Arg	0,75
Arg + Bh	0,75
Arg + PLP	0,56
Glicociamina	0,40
Glicociamina + PLP	0,40

* Absorbância a 520 nm de solução a $1,2 \times 10^{-5}$ M de arginina ou glicociamina e reagente de Sakaguchi.

A figura das curvas de absorção ótica das soluções coloridas desenvolvidas pelo reagente de Sakaguchi com arginina e PP-arginina mostra que no último caso há decréscimo da intensidade de absorção da luz em relação a solução de arginina (Figura 6). A solução de glicociamina apresenta curva de absorção com abaixamento mais acentuado. Na mesma figura, observamos ainda identidade de curva de absorção para os casos de glicociamina e (glicociamina + PLP) seguida de redução, mostrando que o PLP não reagiu com o grupo guanidínico.

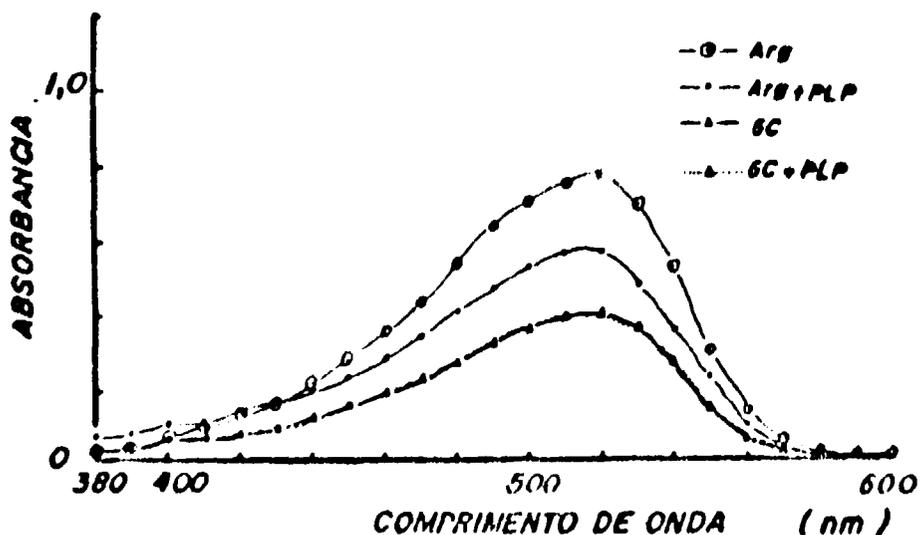


Figura 6 - CURVA DE ABSORBÂNCIA DE ARGININA E GLICOCIAMINA COM REAGENTE DE SAKAGUCHI. Espectro de absorção das soluções coloridas desenvolvidas pelo reagente de Sakaguchi com arginina, PP-arginina, glicociamina e glicociamina + PLP.

3.4 – Análise Eletroforética

A revelação das fitas de eletroforese mostra os seguintes resultados:

- a) a reação característica do grupo α -amino com ninidrina foi negativa para todos os PP derivados das cininas e positiva para todas as cininas;
- b) a reação de Sakaguchi, para os grupos guanidínicos, foi positiva para todas as fitas de eletroforese; e
- c) em todas as fitas de eletroforese a migração se fez para o polo negativo, havendo uma diferença de distância percorrida entre as cininas e seus respectivos PP derivados, como mostra a Tabela VI. Verifica-se, também na tabela, que a velocidade de migração dos PP derivados para o polo negativo foi menor. Assim, foram obtidos percursos de 4,0 cm a partir da origem para as cininas (Bk, Kd e Met-Kd) e de 2,5 cm, 2,2 cm e 3,0 cm para PPBk, PPKd e PP Met-Kd, respectivamente.

3.5 – Determinação Quantitativa de Aminoácidos N-Terminal

Os resultados obtidos na determinação quantitativa dos aminoácidos N-terminais das cininas e seus fosfopiridoxil derivados estão expostos na Tabela VII.

Nota-se na tabela que partindo de uma solução de bradicinina contendo cerca de 0,336 μ moles de resíduos de arginina foram encontrados, após a reação com PLP, cerca de 0,170 μ moles do referido aminoácido. Porcentualmente, essa quantidade corresponde a 50,6% do conteúdo total de arginina da molécula de bradicinina. Calculando-se a porcentagem de bloqueio do grupo α -amino da molécula tem-se como resultado cerca de 98,8%.

Quanto a análise de Arg do piridoxil-bradicinina, nota-se que: a) da reação do piridoxal com bradicinina por 50 minutos, obtém-se cerca de 0,222 μ moles de arginina a partir de uma solução de Bk contendo 0,285 μ moles; essa quantidade corresponde a 78% do conteúdo total de arginina da solução de Bk empregada, ou seja, 44% de resíduos N-terminal das moléculas de Bk acham-se bloqueados pelo radical piridoxil; e b) piridoxil-bradicinina obtido através da reação de PL e Bk por duas horas apresenta 74% dos resíduos de Arg N-terminal bloqueados pelo radical piridoxil, pois a partir de uma solução contendo cerca de 0,307 μ moles de arginina foram encontrados cerca de 0,193 μ moles, ou seja, 63% de arginina total.

Na tabela, nota-se ainda que, de uma solução de calidina contendo cerca de 0,145 μ moles de lisina, obtém-se cerca de 0,007 μ moles do referido aminoácido, após a reação com PLP. Porcentualmente, essa quantidade corresponde a 4,8% do total de lisina existente na molécula, indicando que cerca de 95,2% foi alterada pela ação do PLP.

Verifica-se ainda na tabela que, partindo de uma solução de metionilcalidina contendo cerca de 0,090 μ moles de resíduos de metionina são encontrados somente cerca de 0,001 μ moles do referido aminoácido, após a reação com PLP. Isto corresponde a cerca de 1,1% do conteúdo total de metionina da solução analisada. Conclui-se, portanto, que cerca de 98,9% de α -amino grupos das moléculas de metionilcalidina estão bloqueados pelo PLP.

3.6 – Curva de Atividade das Cininas

Os dados obtidos pela administração das cininas em pele de ratos encontram-se nas Tabelas VIII, IX e X, e nas Figuras 7 e 12.

Tabela VI
Eletroforese das Cininas e Fosfopiridoxil Derivados*

Amostra	Distância Percorrida (cm)	Amostra	Distância Percorrida (cm)
Bk	4,0	PP Bk	2,5
Kd	4,0	PP Kd	2,2
Met Kd	4,0	PP Met Kd	3,0

* Eletroforese em papel Whatman nº 1 (2,5 x 3,0 cm), voltagem 400 V, amperagem 3 mA, tempo de corrida de 3 horas, tampão fosfato pH 7,3, 0,01 M.

Tabela VII
Análise de Aminoácidos N-Terminais*

COMPOSTO	Arg (μ mol)	Arg (%)	Bloqueio (%)
Bk (padrão)	0,336	100	—
PP Bk	0,170	50,6	98,8
Bk (padrão)	0,285	100	—
P Bk (50 min)	0,222	78	44
Bk (padrão)	0,307	100	—
P Bk (2 h)	0,193	63	74
COMPOSTO	a.a. N-terminal (μ mol)	a.a. N-terminal (%)	Bloqueio (%)
Kd (padrão)	0,145	100	—
PP Kd	0,007	4,8	95,2
Met Kd (padrão)	0,090	100	—
PP Met Kd	0,001	1,1	98,9

* A tabela mostra os resultados da análise de aminoácidos N-terminais de bradicinina, calidina, metionilcalidina, piridoxil-bradicinina e de seus fosfopiridoxil derivados após a hidrólise.

Tabela VIII

Atividade da Bradicininna na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	—	9,0	9,4	26,1	—
2	—	5,3	9,1	15,0	—
3	—	7,2	10,4	27,0	—
4	4,4	7,5	13,6	—	—
5	4,0	7,9	9,9	—	—
6	3,4	4,5	7,3	—	—
7	3,6	6,1	7,7	—	—
8	1,8	3,2	5,6	—	—
9	6,1	6,4	9,7	—	—
10	3,3	—	—	16,3	27,2
	—	—	—	—	27,2
11	3,1	—	—	17,1	22,9
	—	—	—	—	20,9
12	3,6	—	—	18,2	21,1
13	3,8	—	—	19,8	23,3
14	3,7	—	—	14,5	15,6
15	3,7	—	—	11,7	18,7
	—	—	—	13,6	—
\bar{M}	3,7	6,3	9,2	17,9	22,1
$\pm s$	1,0	1,8	2,2	5,1	4,0

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de bradicinina na pele abdominal de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁸l.

Tabela IX
Atividade da Calidina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	5,0	7,0	16,7	18,3	20,0
2	3,6	5,3	13,4	20,1	—
3	4,7	5,4	5,3	11,8	18,1
4	2,8	4,5	6,5	14,7	18,4
5	3,3	4,6	10,1	13,9	18,4
6	1,7	4,9	6,1	16,8	17,6
7	2,6	4,4	6,8	10,7	16,5
8	3,5	6,7	13,0	19,7	21,7
9	4,1	6,2	9,2	—	29,0
10	—	—	7,4	17,1	17,7
11	2,4	5,0	—	9,8	26,4
\bar{M}	3,4	5,4	9,4	15,3	20,4
$\pm s$	1,0	1,0	3,8	3,7	4,2

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (valores de R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de calidina na pele abdominal de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I.

Tabela X
Atividade da Metionilcalidina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	0,25 µg	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	3,0 µg
1	6,0	7,0	15,7	27,4	—
2	4,5	7,3	9,1	23,4	23,8
3	5,8	9,8	16,6	35,8	33,3
4	—	4,7	8,8	16,0	18,7
5	—	3,9	8,4	17,2	19,8
6	5,4	6,0	8,4	16,2	16,6
7	—	5,3	7,7	19,6	22,8
8	4,9	—	8,6	17,1	22,0
\bar{M}	5,3	6,3	10,4	21,6	22,4
$\pm s$	0,6	2,0	3,5	7,0	5,4

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (valores de R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de metionilcalidina na pele abdominal de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹³¹I.

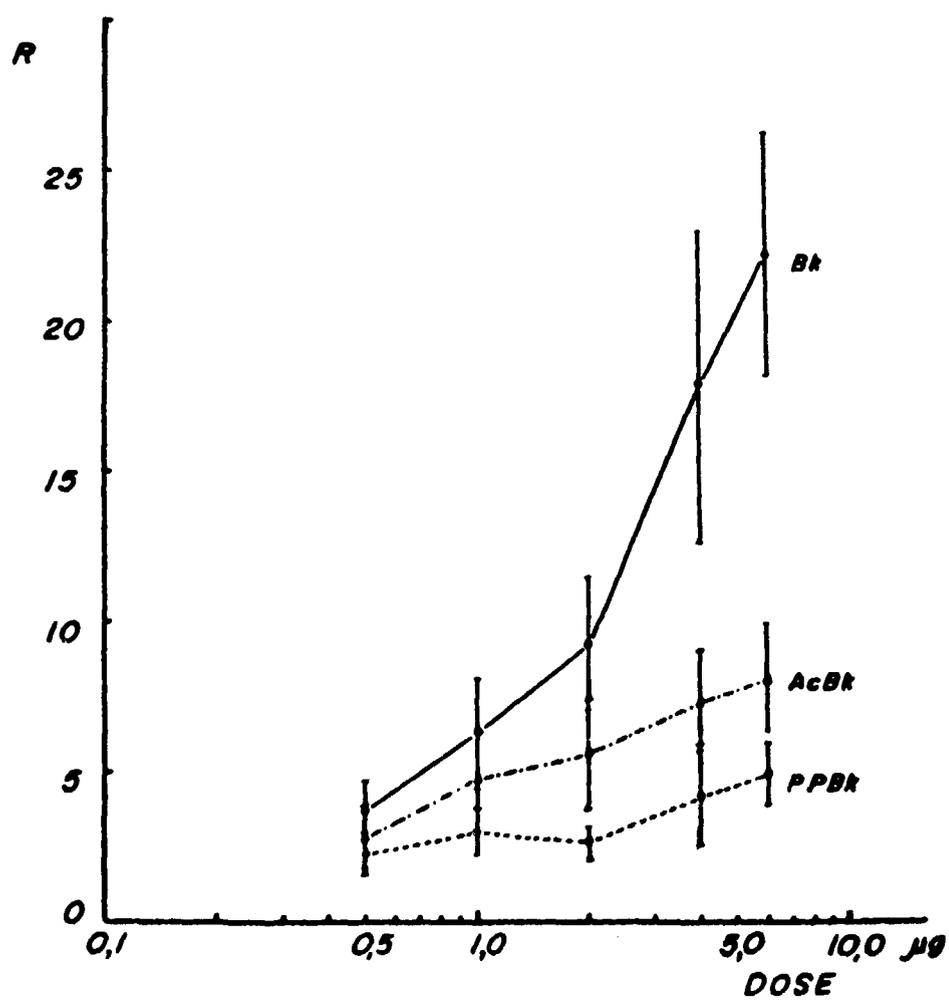


Figura 7 - CURVA LOG DOSE-RESPOSTA DE BRADICININA, ACETIL-BRADICININA E FOSFOPIRIDOXIL-BRADICININA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de diferentes doses de Bk, Ac-Bk e PP-Bk, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I.

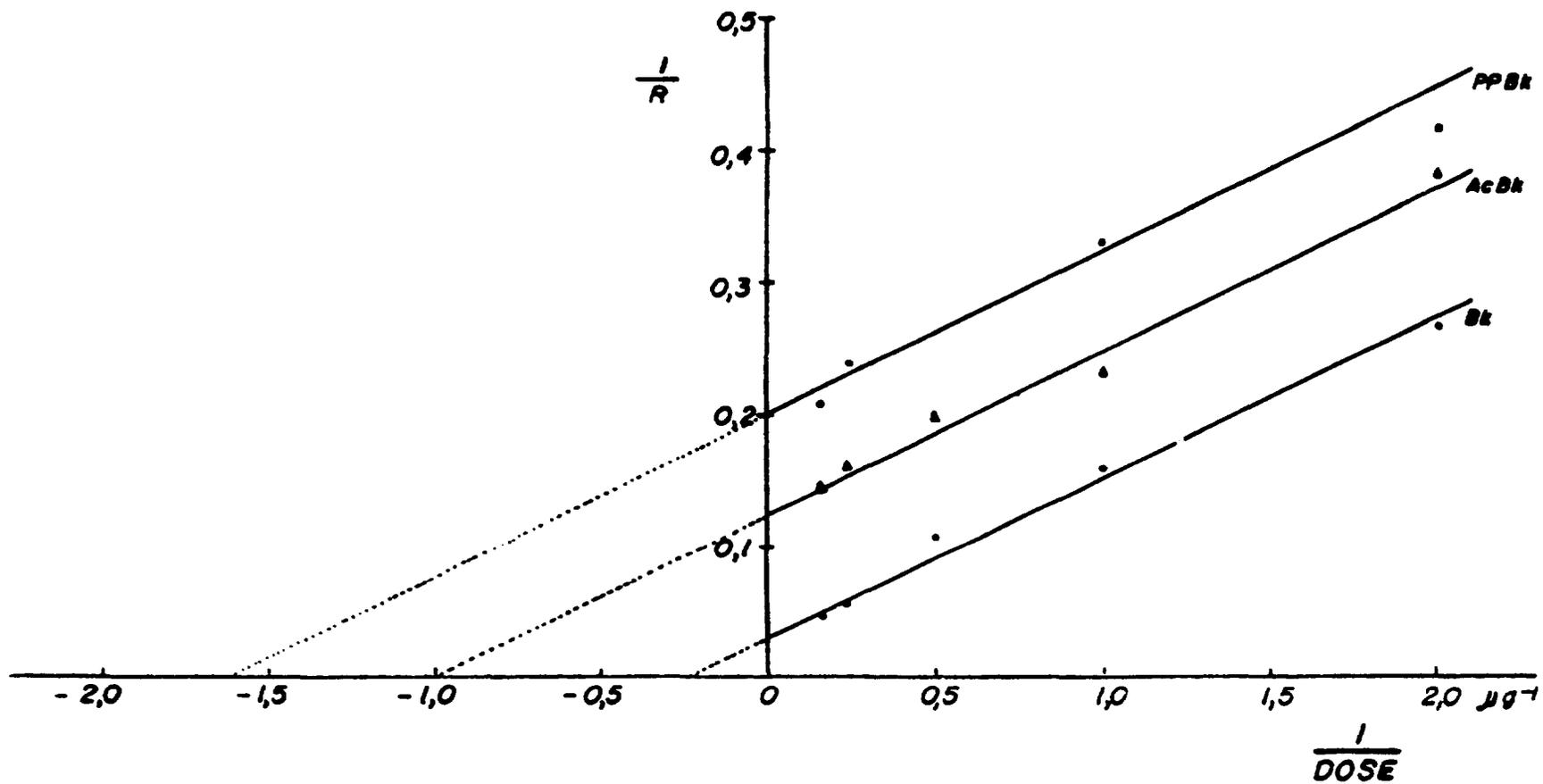


Figura 8 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER-BURK DE DOSE-RESPOSTA DA BRADICININA, ACETIL-BRADICININA E FOSFOPIRIDOXIL-BRADICININA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de diferentes doses de Bk, Ac-Bk e PP-Bk, usando como traçador azul de Evans ^{1,2,5} I.

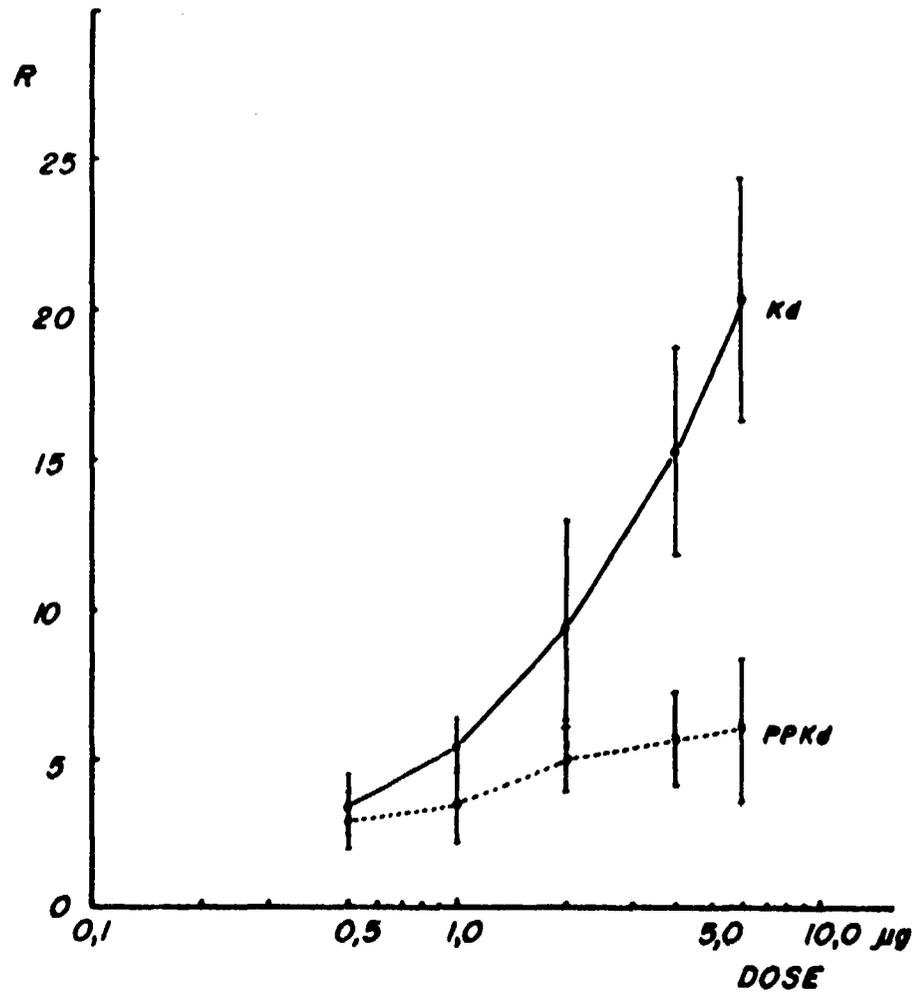


Figura 9 - CURVA LOG DOSE-RESPOSTA DE CALIDINA E FOSFOPIRIDOXIL-CALIDINA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de Kd e PP-Kd, em pele de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I.

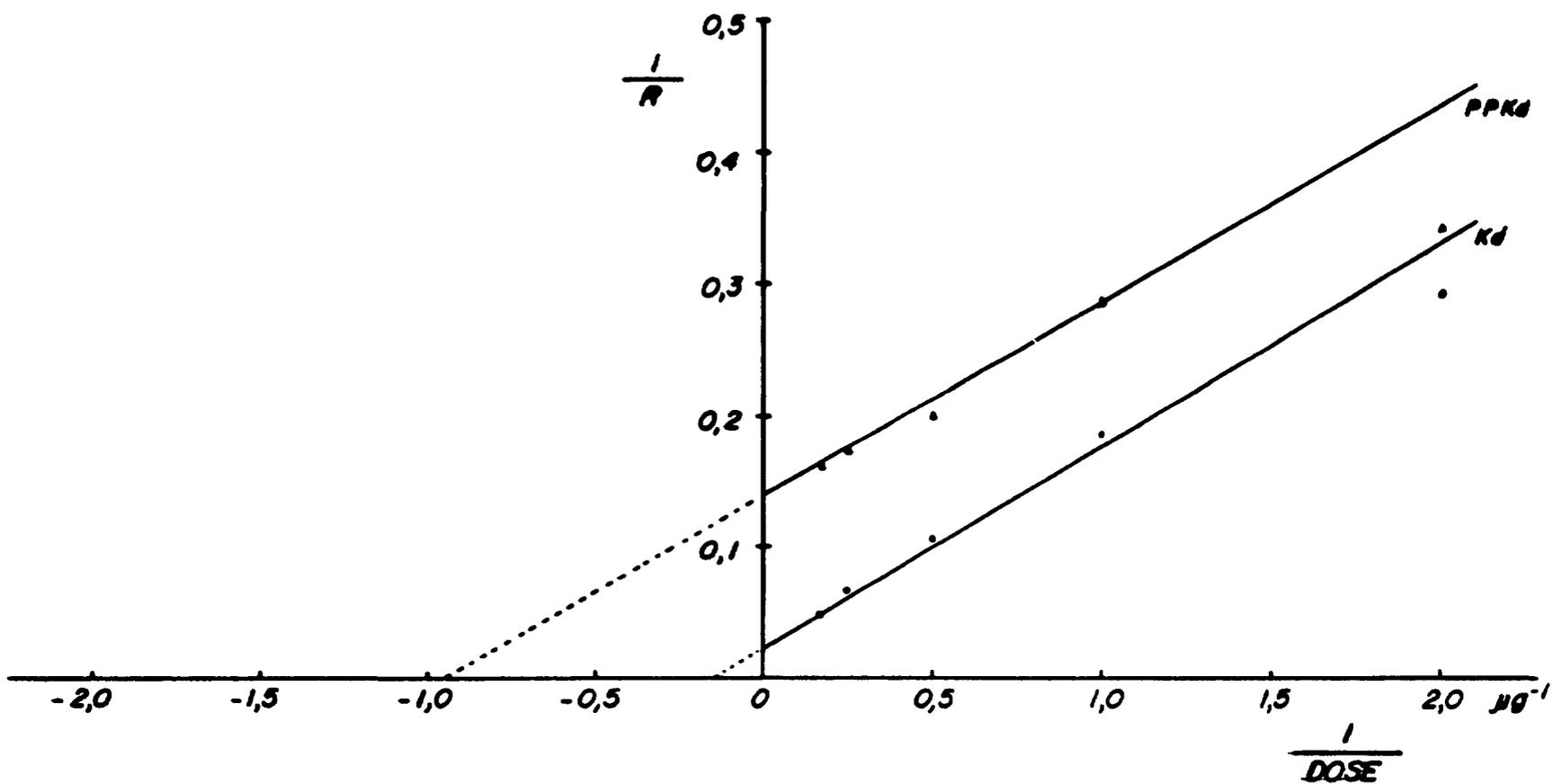


Figura 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER-BURK DE DOSE RESPOSTA DE CALIDINA E FOSFOPIRIDOXIL-CALIDINA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de diferentes doses de Kd e PP-Kd, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador.

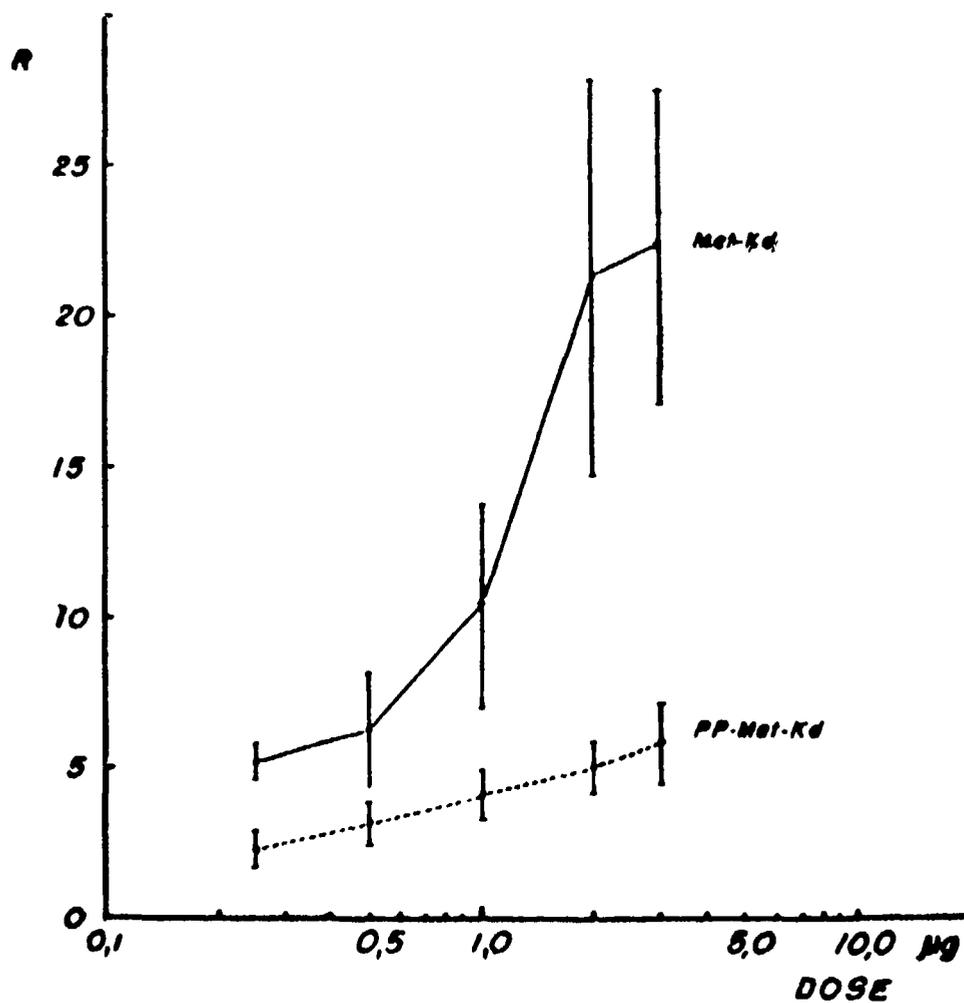


Figura 11 - CURVA LOG DOSE-RESPOSTA DE METIONILCALIDINA E FOSFOPIRIDOXIL-METIONILCALIDINA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de Met-Kd e PP-Met-Kd, em pele de ratos, usando azul de Evans ¹³¹I como traçador.

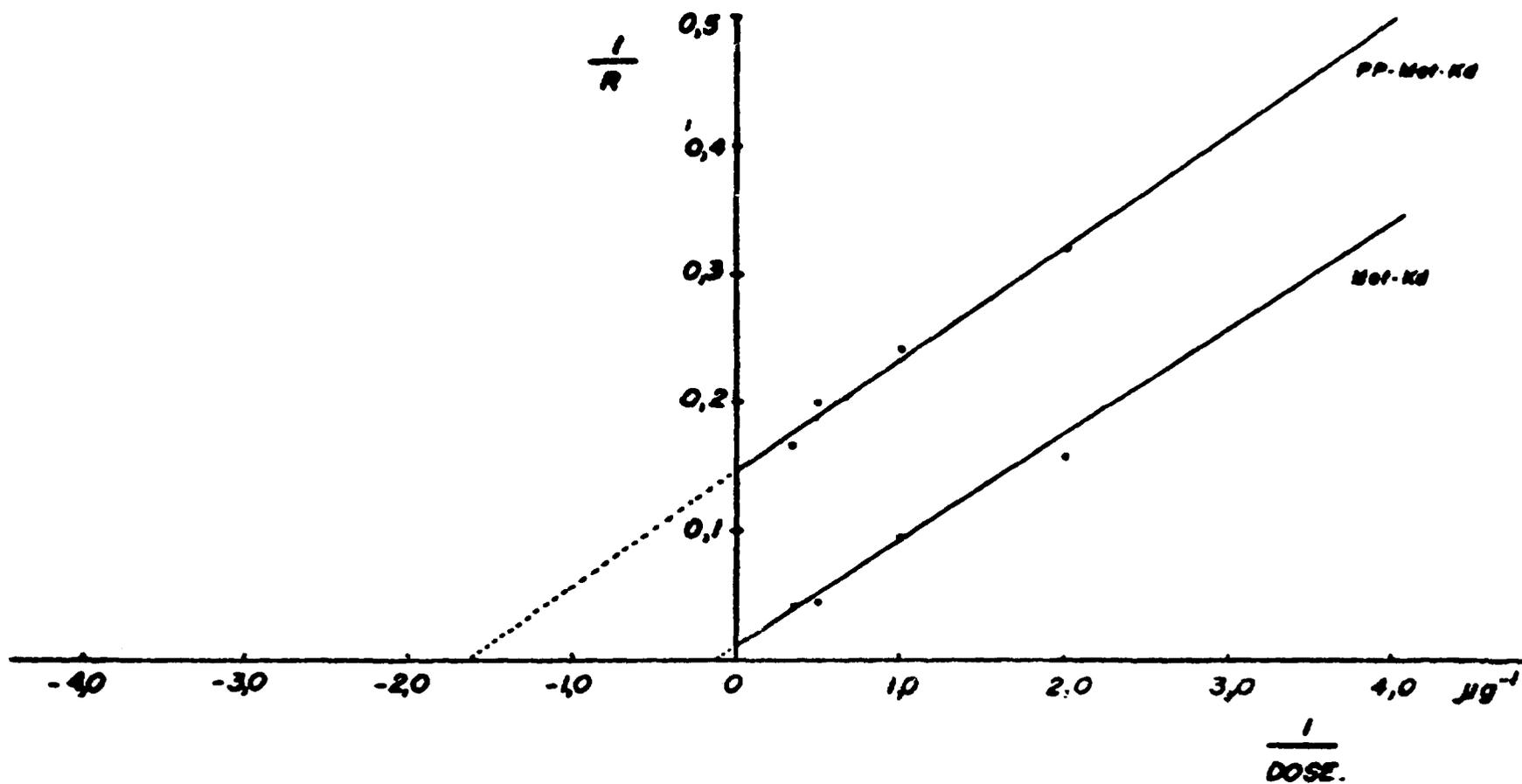


Figura 12 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE LINEWEAVER-BURK DE DOSE-RESPOSTA DA METIONILCALIDINA E FOSFOPIRIDOXIL-METIONIL-CALIDINA. Índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de diferentes doses de Met-Kd e PP-Met-Kd, usando azul de Evans ¹³¹I como traçador.

Os resultados obtidos pela ação da bradicinina na permeabilidade capilar encontram-se na Tabela VIII, onde as respostas (R) são os índices de aumento da permeabilidade capilar obtidos pela administração de diferentes doses de bradicinina; Figura 7, a curva log dose-resposta; e Figura 8, a curva da recíproca dos dados da referida tabela. A tabela nos mostra que, pela administração de 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg e 6,0 µg de bradicinina, obtém-se, respectivamente, respostas médias de $3,7 \pm 1,0$; $6,3 \pm 1,8$; $9,2 \pm 2,2$; $17,9 \pm 5,1$; e $22,1 \pm 4,0$. Calculando-se a linha de regressão correspondente à recíproca desses dados obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,122 \pm 0,006 \\ \text{intersecção} &= 0,033 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,01 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,995 \pm 0,004 \\ P &< 0,001 \end{aligned}$$

A Tabela IX mostra os resultados obtidos pela administração de diferentes doses de calidina na pele abdominal de ratos. A administração de 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg e 6,0 µg, resulta nos seguintes valores de R: $3,4 \pm 1,0$; $5,4 \pm 1,0$; $9,4 \pm 3,8$; $15,3 \pm 3,7$; e $20,4 \pm 4,2$. Como no caso anterior, calculando-se a linha de regressão correspondente aos inversos destes dados, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,162 \pm 0,002 \\ \text{intersecção} &= 0,024 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,002 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,999 \pm 0,0004 \\ P &< 0,001 \end{aligned}$$

Nas Figuras 9 e 10 observam-se as representações gráficas dos dados da Tabela IX, respectivamente em curva log dose-resposta e curva da recíproca dos dados.

Encontram-se na Tabela X os dados obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de metionilcalidina em pele de ratos, e nas Figuras 11 e 12, a representação gráfica desses dados em curva log dose-resposta e recíproca dos dados. Mostra a tabela, que as médias dos valores dos índices de aumento da permeabilidade capilar foram: $5,3 \pm 0,6$; $6,3 \pm 2,0$; $10,4 \pm 3,5$; $21,6 \pm 7,0$; e $22,4 \pm 5,4$; respectivamente para as doses de 0,25 µg, 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg e 3,0 µg de metionilcalidina. Calculando-se a linha de regressão correspondente aos inversos destes dados, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,071 \pm 0,005 \\ \text{intersecção} &= 0,018 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,007 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,993 \pm 0,007 \\ P &< 0,01 \end{aligned}$$

3.7 – Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

3.7.1 – Resultados Preliminares

Os dados obtidos nos ensaios preliminares à determinação da curva de atividade dos fosfopiridoxil derivados das cininas encontram-se nas Tabelas XI, XII e XIII.

Na Tabela XI estão os resultados dos ensaios realizados com bradicinina (dose = 2,5 µg). Nesta tabela, cujos dados estão expressos em índices de aumento da permeabilidade capilar, as médias obtidas foram: $10,8 \pm 1,7$; $10,8 \pm 1,7$; $1,1 \pm 0,1$; $3,3 \pm 0,4$; e $10,8 \pm 1,7$; respectivamente para bradicinina, bradicinina reduzida com borohidreto de sódio, PLP reduzido, (bradicinina + PLP) reduzidos com borohidreto de sódio, e bradicinina + PLP reduzido. Nota-se, portanto, que os valores médios obtidos

Tabela XI

Ensaio Preliminares da Fosfopiridoxil-Bradicinina*

Rato n ^o	Doses				
	Bk	Bk + Bh	PLP red	(Bk + PLP) red	Bk + PLP red
1	10,2	11,2	1,0	3,0	10,5
2	8,5	8,3	1,0	2,9	8,2
3	11,7	12,0	1,1	3,8	11,8
4	12,2	11,5	1,1	3,5	12,0
\bar{M}	10,6	10,8	1,1	3,3	10,6
$\pm s$	1,7	1,7	0,1	0,4	1,7
	P	0,9 > P < 0,8	< 0,001	< 0,001	> 0,9

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos de Bk, Bk reduzida com borohidreto de sódio, (Bk + PLP) reduzidos com borohidreto de sódio, Bk + PLP reduzido com borohidreto de sódio e PLP reduzido com borohidreto de sódio, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador. Dose de Bk = 2,5 µg.

Tabela XII

Ensaio Preliminares da Fosfopiridoxil-Calidina*

Rato n ^o	Doses				
	Kd	Kd + Bh	PLP red	(Kd + PLP) red	Kd + PLP red
1	9,5	9,8	1,0	4,9	9,6
2	12,0	11,6	1,1	5,8	12,2
3	13,0	12,8	1,0	6,0	12,5
4	11,2	11,7	1,1	5,6	11,5
\bar{M}	11,4	11,5	1,0	5,6	11,4
$\pm s$	1,5	1,2	0,1	0,5	1,2
	P	> 0,9	< 0,001	< 0,001	> 0,9

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea, em pele de ratos, de Kd, Kd reduzido com borohidreto de sódio, (Kd + PLP) reduzidos com borohidreto de sódio, Kd + PLP reduzido com borohidreto de sódio e PLP reduzido com borohidreto de sódio, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador. Dose de Kd = 2,5 µg.

Tabela XIII

Ensaio Preliminares da Fosfopiridoxil-Metionilcalidina*

Rato n ^o	Doses				
	Met Kd	Met Kd + Bh	PLP red	(Met Kd + PLP) _{red}	Met Kd + PLP red
1	14,5	14,0	1,1	5,6	13,9
2	15,0	15,7	1,0	4,5	15,4
3	10,5	11,0	1,0	4,0	10,7
4	13,1	12,0	1,1	3,9	12,5
\bar{M}	13,3	13,2	1,0	4,5	13,1
$\pm s$	2,0	2,1	0,1	0,8	2,0
	P	> 0,9	< 0,001	< 0,001	0,9 > P < 0,8

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea em pele de ratos, de Met-Kd, Met-Kd reduzida com borohidreto de sódio, (Met Kd + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio, Met Kd + PLP reduzido com borohidreto de sódio e PLP reduzido com borohidreto de sódio, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador. Dose de Met Kd = 1,25 µg.

para bradicinina após o tratamento com borohidreto de sódio e para bradicinina + PLP reduzido não diferem do valor médio obtido para bradicinina. Pelo teste t de Student comprovou-se que não há significância entre essas médias ($0,9 > P > 0,8$ e $P > 0,9$ respectivamente). Quanto à diferença de média existente entre a bradicinina e bradicinina após a reação com PLP, o teste t mostrou ser altamente significativo ao nível de $P < 0,001$.

A Tabela XI mostra os dados obtidos nos ensaios preliminares realizados com a calidina (dose = 2,5 µg). Quanto aos dados desta tabela, verifica-se que os valores médios encontrados foram: $11,4 \pm 1,5$; $11,5 \pm 1,2$; e $11,4 \pm 1,2$; respectivamente para Kd, Kd após tratamento com borohidreto de sódio e Kd + PLP reduzido com borohidreto de sódio. Aplicando-se o teste t, verifica-se não haver significância entre essas médias ($P > 0,9$). As médias dos índices de aumento da permeabilidade capilar encontradas para PLP reduzido e (Kd + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio foram de $1,0 \pm 0,1$ e $5,6 \pm 0,5$, respectivamente. As diferenças de médias existentes entre a Kd e as duas acima mostraram ser altamente significantes ao nível de $P < 0,001$.

Os dados obtidos nos ensaios preliminares realizados com metionilcalidina (dose = 1,25 µg) estão expostos na Tabela XIII. Como nos casos anteriores, nota-se que as médias dos índices de aumento da permeabilidade capilar encontradas para Met-Kd, Met-Kd após redução com borohidreto de sódio e Met-Kd + PLP reduzido foram semelhantes ($13,3 \pm 2,0$; $13,2 \pm 2,1$; e $13,1 \pm 2,0$; respectivamente). As pequenas variações existentes entre as médias mostraram não ser significativas pela aplicação do teste t ($P > 0,9$ e $0,9 > P > 0,8$). A tabela mostra ainda, os índices de aumento da permeabilidade capilar obtidos para PLP reduzido e (Met-Kd + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio. O teste t revelou que as diferenças existentes entre a média obtida para metionilcalidina ($13,3 \pm 2,0$) e as médias obtidas para PLP reduzido ($1,0 \pm 0,1$) e (Met-Kd + PLP) reduzidos pelo borohidreto de sódio foram altamente significantes ao nível de $P < 0,001$.

3.7.2 – Curva de Atividade dos Fosfopiridoxil Derivados das Cininas

Os dados obtidos pela administração de diferentes doses de fosfopiridoxil derivados das cininas na pele abdominal de ratos estão expostos nas Tabelas XIV, XV e XVI, e nas Figuras 7 a 12.

A Tabela XIV mostra as respostas, em índices de aumento da permeabilidade capilar, obtidas pela administração subcutânea de diferentes doses de fosfopiridoxil bradicinina. Nota-se na tabela que as médias das respostas foram: $2,2 \pm 0,6$; $3,0 \pm 0,7$; $2,6 \pm 0,5$; $4,2 \pm 1,3$; e $4,5 \pm 1,3$; respectivamente para as doses de $0,5 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$, $2,0 \mu\text{g}$, $4,0 \mu\text{g}$ e $6,0 \mu\text{g}$ de fosfopiridoxil bradicinina. A representação gráfica destes dados em log dose-resposta acha-se na Figura 7 e em recíproca dos dados na Figura 8. Efetuando-se o cálculo da linha de regressão correspondente à recíproca dos dados dessa tabela, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,126 \pm 0,013 \\ \text{intersecção} &= 0,205 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,020 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,999 \pm 0,016 \\ P &< 0,02 \end{aligned}$$

As respostas obtidas pela administração de diferentes doses de fosfopiridoxil calidina estão expostas na Tabela XV. Nota-se nessa tabela que as médias dos índices de aumento da permeabilidade capilar foram: $3,0 \pm 0,9$; $3,4 \pm 1,1$; $5,7 \pm 1,7$; $6,2 \pm 2,3$; respectivamente para as doses de $0,5 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$, $2,0 \mu\text{g}$, $4,0 \mu\text{g}$, e $6,0 \mu\text{g}$ de fosfopiridoxil calidina. Esses dados acham-se representados graficamente em curva log dose-resposta e em curva aritmética dos inversos dos dados nas Figuras 9 e 10. Tomando-se a recíproca dos dados dessa tabela, obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,159 \pm 0,017 \\ \text{intersecção} &= 0,136 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,008 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,999 \pm 0,007 \\ P &< 0,01 \end{aligned}$$

Na Tabela XVI temos os resultados obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de fosfopiridoxil metionilcalidina. As médias dos dados obtidos foram: $2,3 \pm 0,7$; $3,4 \pm 0,8$; $4,5 \pm 0,9$; $5,3 \pm 1,0$; e $5,8 \pm 1,5$; respectivamente para as doses de $0,25 \mu\text{g}$, $0,5 \mu\text{g}$, $1,0 \mu\text{g}$, $2,0 \mu\text{g}$ do referido fosfopiridoxil derivado. A sua representação gráfica em curva log dose-resposta acha-se na Figura 11 e em curva da recíproca dos dados na Figura 12. Tomando-se a recíproca dos dados obteve-se:

$$\begin{aligned} \text{coeficiente angular} &= 0,072 \pm 0,008 \\ \text{intersecção} &= 0,150 \text{ com erro padrão de estimativa de } 0,011 \\ \text{coeficiente de correlação} &= 0,993 \pm 0,010 \\ P &< 0,01 \end{aligned}$$

3.8 – Curva de Atividade da Acetil-Bradicinina

Os resultados obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de acetil-bradicinina em pele de ratos, que receberam previamente por via endovenosa azul de Evans ¹³¹I, estão expostos na Tabela XVII e Figuras 7 e 8.

A tabela mostra em índices de aumento da permeabilidade capilar, as respostas obtidas quando se administra diferentes doses de acetil-bradicinina. Esses valores foram: $2,8 \pm 1,0$; $4,7 \pm 1,5$; $5,6 \pm 2,0$;

Tabela XIV

Atividade de Fosfopiridoxil-Bradicinina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	3,2	3,6	2,6	4,8	4,2
2	1,7	1,9	2,8	3,4	4,4
3	2,9	3,3	2,6	4,2	6,8
4	1,5	—	1,8	2,3	2,4
5	2,1	—	2,6	—	4,0
6	1,9	3,0	3,2	4,0	4,9
7	2,3	2,6	—	4,5	4,9
8	—	3,9	—	6,4	—
\bar{M}	2,2	3,0	2,6	4,2	4,5
$\pm s$	0,6	0,7	0,5	1,3	1,3

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de fosfopiridoxil-bradicinina na pele de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I.

Tabela XV

Atividade de Fosfopiridoxil-Calidina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	3,4	3,3	4,6	5,0	5,5
2	2,4	2,7	4,4	3,9	5,0
3	3,9	4,7	5,9	8,5	10,2
4	3,5	4,8	5,4	5,9	6,9
5	4,1	5,0	6,0	8,1	8,8
6	—	3,8	4,4	4,5	7,4
7	2,0	2,5	3,5	4,1	4,8
8	1,9	1,8	3,3	—	4,1
9	—	2,6	4,0	—	3,1
\bar{M}	3,0	3,4	4,6	5,7	6,2
$\pm s$	0,9	1,1	1,0	1,7	2,3

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de fosfopiridoxil-calidina na pele de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I.

Tabela XVI

Atividade da Fostopiridoxil-Metionilcalidina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	Valores de R				
	0,25 µg	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	3,0 µg
1	2,1	3,9	5,5	7,4	—
2	—	4,3	5,1	5,8	6,1
3	2,8	—	3,9	4,9	7,2
4	2,8	3,0	—	4,8	6,5
5	2,0	3,6	5,7	—	8,4
6	2,1	2,9	4,3	4,4	6,5
7	2,4	4,8	5,7	4,5	4,5
8	3,3	3,3	3,8	—	6,4
9	1,4	2,3	4,1	—	3,5
10	1,3	2,1	—	4,9	3,8
11	3,3	3,4	3,3	6,1	—
12	1,4	—	3,6	4,9	5,3
\bar{M}	2,3	3,4	4,5	5,3	5,8
$\pm s$	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de fostopiridoxil-metionilcalidina na pele abdominal de ratos, usando como traçador de Evans ¹²⁵I.

Tabela XVII

Atividade da Acetil-Bradicinina na Permeabilidade Capilar*

Rato n ^o	Doses				
	Valores de R				
	0,5 µg	1,0 µg	2,0 µg	4,0 µg	6,0 µg
1	—	—	7,8	8,6	9,7
2	—	4,4	7,8	6,8	8,2
3	—	5,0	8,6	6,8	10,5
4	4,2	4,8	5,4	7,2	—
5	2,9	4,1	4,6	—	—
6	1,7	—	3,6	4,5	5,4
7	1,7	—	3,2	—	5,5
8	3,1	4,7	5,1	—	8,6
9	2,1	2,6	4,6	7,0	—
10	3,6	7,4	—	9,7	—
\bar{M}	2,8	4,7	5,6	7,2	8,0
$\pm s$	1,0	1,5	2,0	1,6	2,1

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de diferentes doses de Acetil-bradicinina na pele abdominal de ratos, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador.

7,2 ± 1,6; e 8,0 ± 2,1; respectivamente para as doses de 0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg, 4,0 µg e 6,0 µg de acetil-bradicinina.

A Figura 7 mostra a curva log dose-resposta dos dados da Tabela XVII, e a Figura 8 mostra a curva dose-resposta da recíproca desses dados. A linha de regressão da recíproca dos dados dessa tabela tem:

coeficiente angular = 0,122 ± 0,007

intersecção = 0,106 com erro de estimativa de 0,012

coeficiente de correlação = 0,993 ± 0,006

P < 0,001

3.9 – Testes com Mepiramina

Os resultados dos testes dos fosfopiridoxil derivados das cininas em presença de anti-histamínico (mepiramina) encontram-se expostos nas Tabelas XVIII, XIX e XX.

A Tabela XVIII mostra o efeito da administração endovenosa de mepiramina sobre o aumento da permeabilidade capilar provocado por fosfopiridoxil bradicinina. Nesta tabela, nota-se que doses de 6,0 µg de fosfopiridoxil bradicinina produzem índices médios de 3,6 ± 1,9 e 3,6 ± 0,8, antes e após a administração endovenosa de 0,5 mg de mepiramina por 100 g de peso animal. Nota-se ainda que doses de 4,0 µg de histamina, utilizadas como testemunho, injetadas nas mesmas condições, fornecem valores médios de R de 10,1 ± 2,3 e 1,0, respectivamente para antes e após a administração de mepiramina. Aplicando-se o teste t de Student aos dados da tabela, obtém-se P > 0,9 para fosfopiridoxil bradicinina e P < 0,001 para histamina.

Quanto ao teste realizado com fosfopiridoxil calidina, os valores médios de aumento da permeabilidade capilar encontrados para a dose de 6,0 µg foram 7,5 ± 2,5 e 7,1 ± 1,7, respectivamente para antes e após a administração de mepiramina (Tabela XIX). Verifica-se ainda, pela aplicação do teste t que essas médias são da mesma ordem de grandeza (0,8 > P < 0,7). A histamina que serviu de testemunho mostrou ser bastante sensível à ação da mepiramina, assim, as médias dos valores dos índices de aumento da permeabilidade capilar obtidos antes e após a administração da mepiramina foram 9,1 ± 2,0 e 1,2 ± 0,2 (P < 0,001).

Mostram-se na Tabela XX os dados obtidos nos testes realizados com fosfopiridoxil metionilcalidina. A administração de 3,0 µg de fosfopiridoxil metionilcalidina apresentou índices médios 6,7 ± 2,1 e 6,9 ± 1,8 para antes e após mepiramina. Esta pequena variação encontrada entre as médias não mostrou ser significativa (0,9 > P < 0,8). A tabela mostra ainda os resultados obtidos para doses de 4,0 µg de histamina que serviram de testemunho. As médias dos índices de aumento da permeabilidade capilar foram 8,0 ± 2,3 e 1,0 ± 0,1, respectivamente para as doses injetadas antes e após a administração de mepiramina. A aplicação do teste t revelou que a diferença entre essas médias é altamente significativa ao nível de P < 0,001.

3.10 – Potências Relativas

A Tabela XXI mostra os valores das potências relativas dos fosfopiridoxil derivados das cininas calculadas conforme o item 2.10.

Verifica-se na tabela que a fosfopiridoxil bradicinina retém cerca de 16% e acetil-bradicinina 31% da atividade de bradicinina. A fosfopiridoxil calidina retém aproximadamente 17% da atividade da calidina e a fosfopiridoxil metionilcalidina 12% da atividade de metionilcalidina.

Tabela XVIII

Efeito da Mepiramina na Atividade de Fosfopiridoxil-
Bradicinina sobre a Permeabilidade Capilar*

Rato nº	Doses		Valores de R	
			Histamina (4 µg)	PP BK (6,0 µg)
	antes	após	antes	após
1	12,8	1,0	6,0	3,0
	-	-	2,9	4,0
2	8,9	1,0	1,7	3,6
	-	-	2,3	4,0
3	7,6	1,0	4,3	3,2
	-	-	6,8	2,7
4	11,2	1,0	2,8	5,0
	-	-	1,9	3,0
M	10,1	1,0	3,6	3,6
± s	2,3	-	1,9	0,8
P	< 0,001		> 0,9	

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de 4 µg de histamina e 6 µg de fosfopiridoxil-bradicinina em pele de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I, antes e após administração endovenosa de 0,5 mg de mepiramina por 100 g de peso animal.

Tabela XIX

Efeito da Mepiramina na Atividade de Fosfopiridoxil-
Calidina sobre a Permeabilidade Capilar*

Rato nº	Doses		Valores de R	
			Histamina (4 µg)	PP KD (6,0 µg)
	antes	após	antes	após
1	6,9	1,0	4,0	5,8
	-	-	4,4	5,2
2	9,5	1,2	10,6	8,4
	-	-	10,3	9,5
3	8,3	1,0	6,6	4,7
	-	-	7,7	7,3
4	11,7	1,4	7,5	7,8
	-	-	9,0	7,9
M	9,1	1,2	7,5	7,1
± s	2,0	0,2	2,5	1,7
P	< 0,001		0,8 > P < 0,7	

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de 4 µg de histamina e 6,0 µg de fosfopiridoxil-calidina em pele de ratos, usando azul de Evans ¹²⁵I como traçador, antes e depois da administração de 0,5 mg de mepiramina por 100 g de peso animal.

Tabela XX

Efeito da Mepiramina na Atividade da Fosfopiridoxil Metionilcalidina sobre a Permeabilidade Capilar*

Rato n.º	Doses		Valores de R			
			Histamina (4 µg)		PP Met Kd (3,0 µg)	
	antes	após	antes	após		
1	9,9	1,0	8,6	9,0		
	—	—	11,2	9,7		
2	7,3	1,0	5,6	6,4		
	—	—	6,2	6,5		
3	4,5	1,0	7,3	7,8		
	—	—	6,8	7,2		
4	7,9	1,2	3,9	3,6		
	—	—	4,6	4,5		
5	10,2	1,0	6,9	7,2		
	—	—	5,8	7,4		
M	8,0	1,0	6,7	6,9		
± s	2,3	0,1	2,1	1,8		
P	<0,001		0,9 > P < 0,8			

* A tabela mostra os índices de aumento da permeabilidade capilar (R) obtidos pela administração subcutânea de 4 µg de histamina e 3,0 µg de fosfopiridoxil-metionilcalidina em pele de ratos, usando como traçador azul de Evans ¹²⁵I, antes e após a administração endovenosa de 0,5 mg de mepiramina por 100 g de peso animal.

Tabela XXI

Potência Relativa dos Derivados das Cininas*

COMPOSTO	ATIVIDADE (%)
Bk	100
PP-Bk	16
Ac-Bk	31
Kd	100
PP-Kd	17
Met-Kd	100
PP-Met-Kd	12

* A tabela mostra as potências relativas dos fosfopiridoxil derivados das cininas e da acetil-bradicinina calculadas a partir das equações das retas obtidas pela recíproca dos dados.

4 – DISCUSSÃO

A análise dos resultados apresentados na Tabela II sobre distribuição de radioatividade na pele mostra que há homogeneidade, dentro dos limites satisfatórios, na pele abdominal de ratos que receberam por via endovenosa 0,1 ml de uma solução contendo 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de azul de Evans ^{131}I a 0,3% por 100 g de peso animal.

Pode-se dizer, pela Tabela III, que uma mesma dose de histamina administrada subcutaneamente na pele de ratos produz a mesma resposta. Assim, a distribuição da radioatividade basal e respostas adequadas à mesma dose de histamina, condicionaram a aplicação da técnica à apreciação quantitativa dos efeitos das drogas que aumentam a permeabilidade vascular, usando como traçador radioativo, azul de Evans marcado com iodo radioativo.

A aplicação dessa técnica no ensaio quantitativo do aumento da permeabilidade capilar com histamina (Figura 1), permitiu a determinação quantitativa com outras drogas vasoativas.

Os métodos de medida do aumento da permeabilidade capilar pelo uso de corantes, são muito imprecisos ou trabalhosos. Imprecisos, por se basearem na medida do diâmetro do extravasamento do corante ou intensidade da coloração local^(1,33,42) e trabalhosos, pela determinação quantitativa do mesmo após a extração do tecido^(27,31,45).

O emprego de azul de Evans ^{125}I ou ^{131}I veio simplificar sobremaneira a quantificação do aumento da permeabilidade capilar pela medida da radioatividade no local de seu extravasamento. Por outro lado, o uso do corante a 0,3% de 0,1 ml por 100 g de peso animal, permite visualizar perfeitamente as manchas de extravasamento do referido corante para localizar os discos a serem cortados.

Sendo consideravelmente reduzida a dose de azul de Evans injetada em relação às doses empregadas nos métodos usuais⁽⁴⁵⁾, pode-se dizer que a técnica desenvolvida torna-se mais fisiológica no sentido de medir o extravasamento do corante ligado à albumina do plasma, pois os ratos não se apresentam com coloração azul forte.

A facilidade para quantificar o aumento da permeabilidade capilar provocado por drogas vasoativas através dessa metodologia, levou-nos a escolha desse ensaio para o estudo da interferência das variações estruturais na atividade biológica de três cininas (bradicinina, calidina e metionilcalidina) modificadas com piridoxil 5'-fosfato.

A análise dos resultados obtidos no item 3.2., Figuras 2, 3 e 4, mostrou que o PLP forma base de Schiff com o grupo α -amino livre das moléculas de cininas produzindo um derivado estável, fosfopiridoxil-cinina, após a redução branda com borohidreto de sódio.

A reação de PLP com o grupo α -amino das cininas não interfere no grupo guanidínico conforme os resultados descritos em 3.2. e 3.3. É de interesse assinalar aqui, que o grupo α -amino da arginina exerce ação de reforço no desenvolvimento do complexo colorido com o reagente de Sakaguchi.

As análises eletroforéticas (item 3.4.) mostraram uma única banda de substância que migrou para o polo negativo numa velocidade menor que a cinina de origem. Essa banda só foi possível ser revelada pelo reativo de Sakaguchi, para grupo guanidínico. Este fato leva-nos a concluir que, o tratamento das cininas com excesso de PLP causa um bloqueio total dos α -amino grupo livres das moléculas pelo PLP formando fosfopiridoxil-derivado; isto foi comprovado pela análise de aminoácidos dos fosfopiridoxil-derivados após a sua hidrólise ácida (Tabela VII).

O piridoxal também bloqueia o α -amino terminal formando base de Schiff, mas dada a presença de hemiacetal é mais difícil de ser introduzido nas moléculas conforme demonstrou as análises dos hidrolisados de P-Bk preparados com diferentes tempos de reação (Tabela VII).

Os ensaios preliminares realizados no item 3.7., Tabelas XI, XII e XIII, mostraram que o PLP reduzido não provoca aumento da permeabilidade capilar, bem como não interfere na atividade das cininas. A análise das tabelas acima referidas, mostrou ainda que as cininas têm a sua atividade inalterada mesmo após o tratamento com borohidreto de sódio. Portanto, pode-se dizer que os resultados encontrados para fosfopiridoxil derivados, nas referidas tabelas, são devidos somente à atividade destes, uma vez que todos os seus subprodutos não interferem na determinação de sua atividade e, nas análises dos resíduos de aminoácidos N-terminais, foram constatados bloqueios de α -amino grupos de ordem superior a 95% pelo PLP, o que demonstrou a inexistência de cinina livre.

Os fatos acima descritos permitiram a determinação da atividade de PP derivados das cininas sem necessidade de sua prévia separação. Caso os seus subprodutos interferissem na determinação da atividade, introduziríamos um fator de erro difícil de ser determinado, o da perda de potência durante o processo de purificação dos PP derivados, pois as cininas em solução são menos estáveis diminuindo sua ação biológica.

A forma habitual de se representar a relação dose-efeito no ensaio biológico, onde em grande número de casos, a função logarítmica das doses é capaz de retificar a curva dose-efeito, não se mostrou adequada para o estabelecimento das potências relativas dos fosfopiridoxil derivados. O não paralelismo das curvas log dose-resposta, Figuras 7, 9 e 11, fornece resultados diversos de potências relativas, quando se aplica o método de 4 pontos (2 x 2) em diferentes pontos da curva.

A analogia entre a ação das drogas sobre os efetadores biológicos e as interações enzima-substrato, que se mostra tão sugestiva na definição de receptores farmacológicos, foi aplicada para o cálculo de potência relativa. Assim, a representação gráfica de Lineweaver-Burk, utilizada em alguns casos em farmacologia^(11,32,47) foi aplicada para os nossos estudos.

A análise matemática, pelo método dos mínimos quadrados, das Figuras 8, 10 e 12, onde os dados das Tabelas VIII, IX, X, XIV, XV, XVI e XVII são representados usando-se as recíprocas dos dados, ou seja, a representação gráfica de Lineweaver-Burk, revelou-nos que os pontos se alinham segundo uma reta (coeficiente de correlação sempre próximo de 1,0) e que os coeficientes angulares das cininas comparados aos coeficientes angulares dos respectivos derivados são muito próximos, indicando certo paralelismo entre as retas.

A análise da Tabela XXI, onde as potências relativas foram calculadas por meio de equações das recíprocas dos dados, mostra-nos uma grande perda de atividade quando o grupo α -amino N-terminal das moléculas das cininas está bloqueado, sugerindo a participação deste grupamento na interação agonista-receptor.

NICOLAIDES et alii^(38,39) estudando a substituição do Arg¹ da bradicinina por resíduos de Lys (Lys¹Bk), obtiveram a atividade menor para o análogo Lys¹Bk, cerca de 1/10 da atividade de Bk na pressão sanguínea de cobaia e cerca de 1/250 na pressão sanguínea de coelho. Análogo cujo resíduo de Arg⁹ é substituído por Lys, possui atividade consideravelmente maior com 1/10 – 1/30 da atividade da bradicinina na pressão sanguínea⁽⁵²⁾.

Estudos realizados com análogos da Bk, onde os resíduos 1 e 9 são modificados, mostraram que os últimos retêm maior atividade biológica, podendo-se concluir que a Arg¹ é de grande importância⁽⁵²⁾. Segundo a escala de valores dos resíduos da estrutura molecular da bradicinina apresentada por SCHRODER & HEMPEL⁽⁵²⁾, após os resíduos de Pro⁷ e Phe⁸, a Arg¹ seria de maior importância seguida da Arg⁹, ou seja, 7, 8 > 1 > 9 > 5 > 4 > 2 > 3 > 6.

Estudos mostraram também, que o prolongamento da cadeia peptídica da bradicinina no sentido C-terminal afeta mais a atividade biológica do que o prolongamento no sentido N-terminal^(52,55), evidenciando a importância do resíduo Arg⁹. Analisando os análogos cuja adição de resíduos de aminoácidos ocorre na extremidade N-terminal da molécula, e que possuem atividade

biológica sobre a permeabilidade capilar, como no caso da calidina e metionilcalidina, verifica-se a existência de dois grupos funcionais em comum na extremidade N-terminal, o grupo α -amino livre e grupo guanidínico.

TURK et alii⁽⁵⁸⁾ estudando a atividade do análogo da Bk (Br-Ac-Bk) mostraram que o grupo guanidínico exerce função importante na atividade sobre o útero de rato uma vez que o grupo α -amino está bloqueado. Não obstante, pelos resultados dos itens 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5., onde se verifica que a quase totalidade do α -amino grupo é bloqueada pelo PLP e o grupamento guanidínico permanece livre, o α -amino grupo exerce considerável influência na atividade biológica, quando esta é avaliada por meio do aumento da permeabilidade capilar em pele de rato. Nota-se a mesma importância desse grupamento em experiências paralelas sobre o fêo de cobaia, onde inativações de cerca de 85% para Bk, 95% para Kd e cerca de 90% para Met-Kd foram observadas com o bloqueio do grupo α -amino das cininas com piridoxal 5'-fosfato seguido de redução com borohidreto de sódio^(28,29).

Cálculos das potências relativas mostram-nos maior atividade para Ac-Bk em relação a PP-Bk, respectivamente 31% e 16% da atividade de Bk. Essa potência relativa de Ac-Bk, por nós encontrada, é cerca de 10% acima da potência determinada por STEWART sobre a permeabilidade capilar em cobaia^(55,57). Essa diferença de atividade poderia ser explicada como resultado da utilização de espécie animal diferente. Assim, as atividades do fosfopiridoxil derivados por nós determinadas, cerca de 16% para PP-Bk, 17% para PP-Kd e 12% para PP-Met-Kd, juntamente com os resultados observados sobre o fêo de cobaia^(28,29), mostram-nos a importância do grupo α -amino livre na molécula. Considerando que o radical fosfopiridoxila introduz duas cargas negativas⁽⁹⁾ na molécula, poderíamos supor uma participação sensível dessas cargas negativas modificando a polaridade das moléculas de cininas dadas as atividades residuais encontradas para PP-Bk e Ac-Bk.

Os estudos das relações entre estrutura e atividade das cininas sobre o aumento da permeabilidade capilar em pele de ratos e contratilidade do fêo de cobaia demonstram a participação do grupo α -amino terminal dos peptídeos em pauta nos mecanismos de ação biológica.

As atividades encontradas para os PP-derivados das três cininas poderiam ser consideradas como atividades residuais das moléculas, e segundo as experiências com mepiramina, sem liberação de histamina.

5 – CONCLUSÕES

- 1) O emprego de azul de Evans ¹²⁵I ou ¹³¹I facilita a determinação quantitativa do aumento da permeabilidade capilar provocado pelas drogas vasoativas.
- 2) A reação de piridoxal 5'-fosfato com bradicinina e análogos seguida de redução com borohidreto de sódio demonstrou ser altamente eficiente no bloqueio dos grupos α -amino terminais.
- 3) A fosfopiridoxil-bradicinina possui cerca de 16% da atividade de bradicinina, a fosfopiridoxil-calidina cerca de 17% da atividade de calidina, a fosfopiridoxil-metionilcalidina cerca de 12% da atividade de metionilcalidina e a acetil-bradicinina cerca de 31% da atividade de bradicinina, quando determinadas em pele de ratos.
- 4) O α -amino terminal das moléculas de bradicinina, calidina e metionilcalidina exerce função importante no mecanismo de aumento da permeabilidade vascular.

ABSTRACT

A simple and reliable method is described for the quantitative evaluation of vascular permeability increase induced by vasoactive drugs with Evans blue labelled with iodine-125 or 131. By using this method the importance of α -amino group of bradykinin (Bk), kallidin (Kd) and methionyl-kallidin (Met-Kd) on the biological activity were studied after reacting the kinins with pyridoxal 5'-phosphate followed by reduction with sodium borohydride. Phosphopyridoxyl-kinins were formed leaving free the guanidino groups. Aminoacid analysis of phosphopyridoxyl-kinins showed that the efficiency of the reaction was extremely good in the blockage of α -amino groups { phosphopyridoxyl-bradikinin (PP-Bk) = 98,8%, phosphopyridoxyl-kallidin (PP-Kd) = 95,2%, phosphopyridoxyl-methionyl-kallidin (PP-Met-Kd) = 98,9% }. Log dose-response curves were obtained for Bk, Kd, Met-Kd, acetyl-bradykinin (Ac-Bk), PP-Bk, PP-Kd and PP-Met-Kd and the relative potencies calculated through the Lineweaver-Burk plots. The relative potencies were: PP-Bk about 16% the activity of Bk, Ac-Bk about 31% the activity of Bk, PP-Kd about 17% the activity of Kd, PP-Met-Kd about 12% the activity of Met-Kd. The results show that the terminal α -amino group of kinins is important in the mechanisms biological activity.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BECKER, E. L.; MOTA, I.; WONG, D. Inhibition by antihistamines of vascular permeability increase induced by bradykinin. *Prit. J. Pharmac.*, 34:330-6, 1968.
2. BENESCH, R. E.; BENESCH, R.; RENTHAL, R. D.; MAEDA, N. Affinity labelling of polyphosphate binding sites of hemoglobin. *Biochemistry (New York)*, 11(19):3576-82, 1972.
3. BODANSZKY, M.; ONDETTI, M. A.; SHEEHAN, J. T.; LANDE, S. Synthetic peptides related to bradykinin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 104:24-34, 1963.
4. BODANSZKY, M.; SHEEHAN, J. T.; ONDETTI, M. A.; LANDE, S. Glycine analogs of bradykinin. *J. Am. chem. Soc.*, 85:991-7, 1963.
5. BOISSONNAS, R. A. The synthesis of bradykinin. In: ROCHA E SILVA, M. & EULER, U. S. von *Bradykinin and vaso dilating polypeptides: first international pharmacological meeting. v.9.* New York, N. Y., Pergamon, 1963. p.35-8.
6. BOISSONNAS, R. A.; GUTTMANN, S.; JAQUENOUD, P. A. Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-phénylalanyl-L-arginine, distinction entre cet octapeptide et la bradykinine. *Helv. chim. Acta*, 43:1481-7, 1960.
7. BOISSONNAS, R. A.; GUTTMANN, S.; JAQUENOUD, P. A. Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phénylalanyl-L-séryl-L-prolyl-L-phénylalanyl-L-arginine, un mono-peptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. chim. Acta*, 43:1349-58, 1960.
8. BOISSONNAS, R. A.; GUTTMANN, S.; JAQUENOUD, P. A.; PLESS, J.; SANDRIN, E. The synthesis of bradykinin and of related peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 104:5-14, 1963.
9. BUEL, N. V. & HANSEN, R. E. Reaction of pyridoxal 5'-phosphate with aminothiols. *J. Am. chem. Soc.*, 82:6042-9, 1960.
10. CANN, J. R.; STEWART, J. M.; MATSUDA, G. R. A circular dichroism study of the secondary structure of bradykinin. *Biochemistry (New York)*, 12(19):3780-8, 1973.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-66 da ABNT.

11. CHEN, G. & RUSSEL, D. A quantitative study of blood pressure response to cardiovascular drugs and their antagonist. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 99:401-8, 1950.
12. CHRISTENSEN, H. N. Three Schiff base types formed by amino acids, peptides and proteins with pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate. *J. Am. chem. Soc.*, 80:99-105, 1958.
13. DEWALD, H. A.; CRAFT, N. K.; NICOLAIDES, E. D. The synthesis of 6-O-carbamyl-L-serine, 6-D-serine and 6-L-threonine bradykinin. *J. med. Chem.*, 6:741-5, 1963.
14. DUTHIE, E. S. & CHAIN, E. A polypeptide responsible for some of the phenomena of acute inflammation. *Brit. J. exp. Path.*, 20:417-29, 1939.
15. ELLIOT, D. F. Structure of bradykinin. In: ROCHA E SILVA, M. & EULER, U. S. von *Bradykinin and vaso-dilating polypeptides: first international pharmacological meeting*, v.9. New York, N. Y., Pergamon, 1963. p.25-8.
16. ELLIOT, D. F. & LEWIS, G. P. Methionyl-lysyl-bradykinin, a new kinin from ox blood. *Biochem. J. (Liverpool)*, 95:437-47, 1965.
17. ELLIOT, D. F.; HORTON, E. W.; LEWIS, G. P. The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood. *Biochem. J. (Liverpool)*, 78:60-5, 1961.
18. ELLIOT, D. F.; LEWIS, G. P.; HORTON, E. W. The structure of bradykinin. *Biochem. J. (Liverpool)*, 74:16, 1960.
19. ELLIOT, D. F.; LEWIS, G. P.; HORTON, E. W. The structure of bradykinin a plasma kinin from ox blood. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 3(1):87-91, 1960.
20. ELLIOT, D. F.; LEWIS, G. P.; SMYTH, D. G. A new kinin from ox blood. *Biochem. J. (Liverpool)*, 87:21P, 1963.
21. EMMES, C. W. *Principles of biological assays*. London, Chapman & Hall, 1948.
22. FELIX, A. M.; JIMENEZ, M. H.; VERJONA, R. Synthesis and biological studies of novel bradykinin analogues. *Intern. J. Pep. Prot. Res.*, 5(4):201-6, 1973.
23. FINLAY, T. H. Modification of pepsinogen with pyridoxal phosphate. *J. biol. Chem.*, 249(23):7476-83, 1974.
24. FINSETH, F. & SIZER, I. W. Complexes of pyridoxal phosphate with amino acids, peptides, polylysine and apotransaminase. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 26(5):625-30, 1967.
25. FISCHER, E. H.; KENT, A. B.; SNYDER, E. R.; KREBS, E. G. The reaction of sodium borohydride with muscle phosphorylase. *J. Am. chem. Soc.*, 80:2906-7, 1958.
26. FRIMMER, M. Beeinflussung der Durchlässigkeit von Blut- Capillaren der Kaninchenhaut für Makromoleküle durch einige biogene, gefabaktive Substanzen. *Naunyn-Schiedaberg's Arch. exp. Path. Pharmak.*, 242:390-402, 1962.
27. FRIMMER, & MULLER, S. W. Branchbarkeit und Grenzen der Farbstoffmethoden zur Bestimmung Vermehrter Durchlässigkeit der Haut-Capillaren. *Med. exp.*, 6:327-30, 1962.
28. GONÇALVES, J. M.; SUGAVARA, S.; PRADO, E. S.; PRADO, J. L. Studies on the inactivation of vasoactive polypeptides by pyridoxal 5'-phosphate. *Anais Acad. bras. Cienc.*, 45(2):330, 1973.

29. GONÇALVES, J. M.; SUGAVARA, S.; PRADO, E. S.; PRADO, J. L. (Trabalho a ser publicado).
30. GREENBAUM, L. M.; YAMAFUJI, K.; HOSODA, T. Studies of the peptic degradation of bovine bradykininogen. *Biochem. Pharmac.*, 14:411-20, 1965.
31. JUDAH, J. D. & WILLOUGHBY, D. A. A quantitative method for the study of capillary permeability: extraction and determination of trypan blue in tissues. *J. Peth. Bact.*, 83:567-72, 1962.
32. KIRCHNER, L. B. & STONE, W. E. Action of inhibitor at the myoneural junction. *J. gen. Physiol.*, 34:821-34, 1951.
33. LOCKETT, N. F. & JARMAN, D. A. Assay of the capillary action of flavanoid compounds in mice. *Brit. J. Pharmac.*, 13:11-6, 1958.
34. MANI, R. S. & KULKARNI, P. V. Preparation of radioiodinated Evans blue for medical use. *Indian J. Chem.*, 4(11):489-9, 1966.
35. MENKIN, V. & MENKIN, M. F. Studies on inflammation II. A measures of the permeability of capillaries an inflamed area. *J. exp. Med.*, 51:285-93, 1930.
36. MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis III. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry (New York)*, 3:1385-90, 1964.
37. MERRIFIELD, R. B. Solid peptide synthesis IV. The synthesis of methionyl-lysis-bradykinin. *J. org. Chem.*, 29:3100-2, 1964.
38. NICOLAIDES, E. D.; DEWALD, H. A.; CRAFT, M. K. The synthesis of kinin analogues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 104:15-23, 1963.
39. NICOLAIDES, E. D.; DEWALD, H. A.; CRAFT, M. K. The synthesis of 1-lysine, 1-ornithine, 1-citrukline, 1-glutamic and 1-desarginine bradykinin. *J. med. Chem.*, 6:739-41, 1963.
40. NICOLAIDES, E. D.; DEWALD, H. A.; McCARTHY, D. A. The synthesis of a biologically active decapeptide having the structure proposed for kallidin II. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 6(3):210-2, 1961.
41. ONDETTI, M. A. & ENGEL, S. L. Bradykinin analogs containing β -homoamino acids. *J. med. Chem.*, 18(7):761-3, 1975.
42. PARRAT, J. R. & WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5'-hydroxy-tryptamine, histamine, dextran, egg white and compound 48/80. *Brit. J. Pharmac.*, 13:65-70, 1958.
43. PIERCE, J. V. & WEBSTER, M. E. Human plasma kallidins: isolation and chemical studies. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 5(5):353-7, 1961.
44. PLESS, J. E.; STURNER, E.; GUTTMANN, S.; BOISSONNAS, R. A. Kallidin, synthese und Eigenschaften. *Helv. chim. Acta.*, 45:394-6, 1962.
45. REIS, M. L.; OKINO, L.; ROCHA E SILVA, M. Comparative pharmacological actions of bradykinin and related kinin of larger molecular weights. *Biochem. Pharmac.*, 20:2935-46, 1971.
46. ROCHA E SILVA, M. *Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica*. São Paulo, Edart, 1969.

47. ROCHA E SILVA, M. On the nature of the receptor for histamine. *Chemotherapia*, 3:544-59, 1961.
48. ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venous and by trypsin. *Am. J. Physiol.*, 156:261, 1949 apud ROCHA E SILVA, M. *Bradicinina – preparação, ensaio biológico, identificação*. São Paulo, 1951. (Tese de livre docência, Faculdade de Medicina, Universidade do Brasil).
49. ROWLEY, D. A. & BENDITT, E. P. 5-hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage most cells in rats. *J. exp. Med.*, 103:399-411, 1956.
50. SAKAGUCHI, S. A new method for colorimetric determination of arginine. *J. Biochem.*, 37(2):231-6, 1950.
51. SCHRODER, E. Über Peptidsynthesen. Synthese von Methionyl-lysil-bradykinin, einen Kinin aus Rinderblut. *Experientia*, 20:39, 1964.
52. SCHRODER, E. & HEMPEL, R. Bradykinin, kallidin and their synthetic analogues. *Experientia*, 20:529-92, 1964.
53. SPECTOR, W. G. & WILLOUGHBY, D. A. Capillary permeability factors, nucleosides and histamine release. *J. Path. Bact.*, 73:133-9, 1957.
54. SPECTOR, W. G. & WILLOUGHBY, D. A. Histamine and 5-hydroxytryptamine in acute experimental pleurisy. *J. Path. Bact.*, 74:57-65, 1957.
55. STEWART, J. M. Structure-activity relationships in bradykinin analogue. *Fedn Proc.*, 27(1):63-6, 1968.
56. STEWART, J. M. & WOOLEY, D. W. Bradykinin analogs. In: ROCHA E SILVA, M. & ROTHSCHILD, H. A. *International symposium on vaso-active polypeptides bradykinin and related kinins*. São Paulo, Edart, 1967. p.7-13.
57. STEWART, J. M. & WOOLEY, D. W. Importance of carboxyl end of bradykinin and other peptides. *Nature (London)*, 207:1160-1, 1965.
58. TURK, J.; NEEDLEMAN, P.; MARSHALL, G. R. Alkylating analog of bradykinin. *J. med. Chem.*, 18(11):1135-9, 1975.
59. WERLE, E.; GOTZE, W.; KEPPLER, A. Über die Wirkung der Kallikreins auf den isolierten Darm und Über Neue Darmkontrahierende Substanz. *Biochem. Zbl.*, 289:217-33, 1937.
60. WERLE, E.; TRAUTSCHOLD, I.; LEYSATH, G. Isolierung und Struktur der Kallidins. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 326:174-6, 1961.



INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo -- SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IEATOMICA
Telex – 011-23592 IENA BR