

# Enzima inativadora de bradicinina liberada de fígado preservado *ex-vivo*

F.V. MORAIS, H.M. MOLINA, D.R. BORGES, M. KOUYOUMDJIAN

Laboratório de Hepatologia Experimental – Departamentos de Bioquímica e Medicina da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

**RESUMO - OBJETIVO** - O fígado inativa quantidades consideráveis de bradicinina; a principal enzima hepática cinino-inativadora (BIE, *bradykinin inactivating endopeptidase*) hidrolisa especificamente a ligação Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> do nonapeptídeo e foi caracterizada como sendo a oligoendopeptidase EC 3.4. 24.15. No transplante ortotópico de fígado existe correlação entre aumento da concentração de aminoácidos no líquido de preservação (conseqüência de proteólise) e falência do enxerto. O objetivo deste trabalho é verificar se ocorre liberação da BIE de fígados preservados *ex-vivo* no líquido Braun-Collins ou em solução de Krebs-Henseleit bicarbonato (Krebs).

**MÉTODO.** Fígados de ratos Wistar (180-220g) foram exsangüinados e após remoção foram preservados em líquido Braun Collins ou em solução Krebs, a 4°C. Foram retiradas alíquotas do líquido de preservação nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas, para dosagem de ALT, AST, DHL e BIE. A atividade

de fluorimétrica da BIE foi ensaiada com o substrato Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp (análogo sintético da bradicinina) e sua presença confirmada por *immunoblotting*, revelado com anticorpo específico anti-EC 3.4.24.15.

**RESULTADOS.** A liberação de ALT, AST, DHL e BIE é significativa no período 8-24hs. Nas alíquotas de 24 hs, em relação ao tempo zero, a concentração das quatro enzimas aumentou, respectivamente, no líquido Braun Collins, 8, 7, 19 e 10 vezes e, na solução de Krebs, 21, 17, 27 e 21 vezes; a relação ALT/DHL foi sempre inferior a um.

**CONCLUSÃO.** Ocorre liberação de BIE durante a preservação *ex-vivo* do fígado, o que poderá servir como indicação da condição de preservação do enxerto; diminuição da capacidade cinino-inativadora do fígado poderá afetar sua reatividade vascular.

**UNITERMOS:** Bradicinin. Endopeptidase. Fígado. Cini-nase. Transplante hepático.

## INTRODUÇÃO

O sistema calicreína-cinina é composto de procalicreínas, calicreínas (tecidual e plasmática), cininogênios, cininas, cininases e enzimas conversoras de cininas. Procalicreínas dão origem às calicreínas que, agindo sobre cininogênios, liberam cininas; aminopeptidases convertem precursores de bradicinina em bradicinina; cininases degradam tanto a bradicinina quanto seus precursores. A bradicinina<sup>1</sup> é nonapeptídeo que exerce suas ações, em concentração nanomolar, após interagir com receptores específicos da membrana plasmática de células-alvo. Sua meia-vida no plasma é inferior a um minuto<sup>2</sup>, sendo rapidamente inativada por cininases teciduais. A inativação fisiológica da bradicinina (BK) foi, durante algum tempo, atribuída quase exclusivamente à ação da cininase II (enzima conversora de angiotensina, ACE) encontrada no endotélio vascular, principalmente na circulação pulmonar. Entretanto, o fígado também apresenta importante atividade cininásica<sup>3,4</sup>. Recentemente, demonstramos<sup>5</sup> a semelhança entre a endopeptidase hepática inativadora de bradicinina (principal cininase hepática) e a metaloendopeptidase etiol-dependente EC 3.4.24.15.

As ações biológicas e efeitos farmacológicos das cininas são mediados por dois tipos diferentes de receptor, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub><sup>6</sup>. Entre as principais ações fisiológicas da bradicinina está sua participação nos mecanismos de controle do tônus vascular. A ação vasodilatadora arterial da bradicinina deve-se principalmente à ativação de receptores B<sub>2</sub> na superfície de células endoteliais, seguida pela liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina. Bradicinin promove mudança bifásica do pH intracelular, que pode também modular a liberação de NO pela célula<sup>7</sup>. No sistema venoso portal, a bradicinin tem ação hipertensora<sup>4</sup>.

Apesar das cininas participarem da regulação de sistemas fisiológicos, são mais conhecidas suas ações na doença: choque, asma, dor e muitas formas de inflamação envolvem a mediação desses peptídeos. Cininas podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor) e estão próximas do topo da cascata de mediadores envolvidos no processo inflamatório. Na doença, a BK é produzida quando lesão vascular expõe polisacarídeos sulfatados carregados negativamente, ativando o sistema de contato da coagulação. A BK é liberada também quando há oxigenação tecidual

inadequada em decorrência de perfusão tecidual deficiente. Na lesão tecidual ou infecção, acúmulo, aderência e ativação de neutrófilos, soma outros mediadores ao local de inflamação, potencializando a ação das cininas. Em muitos tecidos, BK estimula a fosfolipase A<sub>2</sub>, promovendo a liberação de ácido aracdônico; prostaglandinas e leucotrienos produzidos a partir do ácido aracdônico são especialmente importantes na dor e inflamação. Em infecções, várias enzimas bacterianas podem liberar BK diretamente de seu precursor. Esses mecanismos apontam os antagonistas da BK como medicamentos antiinflamatórios potencialmente poderosos e úteis<sup>8</sup>.

O fígado tem papel fundamental na modulação das ações do sistema caliceína-cinina; se por um lado sintetiza proteínas deste sistema, por outro é o responsável pela captação e catabolismo de produtos da cascata proteolítica. Podemos resumir a participação do fígado na modulação do sistema caliceína-cinina da seguinte forma: sintetiza cininogênios<sup>9</sup> e procaliceína plasmática<sup>10</sup>, converte precursores de bradicinina em bradicinina<sup>11</sup>, inativa bradicinina<sup>12,13</sup> e depura as caliceínas teciduais<sup>14</sup> e plasmática, esta livre<sup>15</sup> ou complexada com inibidor<sup>16</sup>. Na fase aguda da inflamação, ocorre aumento da produção de procaliceína pelo fígado<sup>17</sup> e também aumento da capacidade hepática de depurar caliceína plasmática<sup>18</sup>. Assim, modulando o sistema caliceína-cinina, o fígado participa do controle do processo inflamatório e do tônus vascular.

O transplante ortotópico de fígado é terapia estabelecida para pacientes com doença hepática, porém vários problemas do procedimento ainda precisam ser resolvidos. Foi observada correlação entre aumento da concentração, no líquido de preservação ex vivo do órgão a ser transplantado, de algumas enzimas (metalo e aspartatoproteases) e aminoácidos (isoleucina, cisteína, metionina, treonina e, principalmente, valina) com a falência do enxerto, o que sugere que atividade proteolítica deste esteja relacionada com disfunção do enxerto no pós-operatório imediato<sup>19</sup>.

Sendo a oligopeptidase BIE (*bradykinin inactivating endopeptidase*) a principal enzima cinino-inativadora do fígado, o objetivo deste trabalho foi comparar sua liberação, com a de outras enzimas, de fígados exsangüinados e preservados por até 24 horas.

## MATERIAL

Ratos adultos da raça Wistar, criados e fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal

de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), foram manipulados de acordo com o International Guiding Principles for *Biomedical Research Involving Animals*<sup>20</sup>. Líquido de "Braun Collins G 3,57 s/Mg" contendo glicose 3,57% em solução hiperosmolar de eletrólitos foi gentilmente cedido pelo Dr. José Osmar de Abreu Pestana, Disciplina de Nefrologia, UNIFESP. A solução Krebs-Henseleit-bicarbonato pH 7,4-7,6 (Krebs) foi preparada com a seguinte composição: NaCl 115mM, KCl 5,9mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,2mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,2mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2mM e CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5mM.

A enzima EC 3.4.24.15 e o anticorpo anti-EC 3.4.24.15 foram gentilmente cedidos por MJ Glucksman, *Mount Sinai School of Medicine*, NY, EUA; o segundo anticorpo anti-IgG de coelho, gerado em carneiro e conjugado com peroxidase, foi obtido da *Sigma Chemical* (EUA).

Para a determinação da atividade fluorimétrica da BIE, foi utilizado o substrato Abz-RPPGFSP FRQ-EDDnp (análogo sintético da bradicinina); para determinação de atividade amidolítica foi usado o substrato Acetil-Phe-Arg-paranitroanilida (Acetil-Phe-Arg-pNA). Ambos substratos foram sintetizados e fornecidos por L. Juliano Neto, Departamento de Biofísica, UNIFESP.

## MÉTODO

A exsangüinação de fígados foi realizada a 37°C, como descrito anteriormente<sup>15</sup>: em rato anestesiado (injeção intraperitoneal de solução aquosa de uretana 200g/L na dose de 1,3mg/g peso) e mantido com respiração artificial, as cavidades abdominal e torácica eram abertas e as veias porta e cava inferior, acima do diafragma, canuladas. A exsangüinação era obtida com 200mL de solução salina (NaCl 0,15M) em circuito aberto, com fluxo constante de 28 mL/minuto. A pressão de perfusão foi continuamente monitorada por manômetro de água colocado no circuito antes da cânula portal e variou de 10 a 16cm de H<sub>2</sub>O. Após a exsangüinação, o fígado era retirado, armazenado em 50mL de solução Krebs ou em líquido Braun Collins e mantido a 4°C. Amostras do líquido de preservação do fígado foram obtidas nos tempos 0, 4, 8 e 24 horas e usadas para dosagens enzimáticas. O líquido de 24 hs, de alguns experimentos, foi concentrado e dialisado sob pressão para caracterização da BIE.

A atividade fluorimétrica da BIE foi medida pela hidrólise de substrato fluorescente Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp incubando-se alíquotas de 50µL a 37°C com 10µL de substrato (1mg/mL) em volume final de 1mL de Tris-HCl 50mM contendo

$\beta$  mercaptoetanol 2,5mM, pH 8,0. A reação era interrompida em banho de gelo e a fluorescência do substrato hidrolisado medida em fluorímetro Hitachi F-2000 ( $\lambda_{EM} = 420\text{nm}$  e  $\lambda_{EX} = 320\text{nm}$ ). Atividade amidolítica para detecção de serinoprotease tripsina-símile foi medida incubando-se alíquotas de 50 $\mu\text{L}$  a 37°C com acetil-Phe-Arg-pNa (concentração final 0,5 $\mu\text{M}$  em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 contendo NaCl 12mM.); a reação era interrompida com 0,8mL de ácido acético 15% e a absorbância da para-nitroanilina formada medida em 405nm.

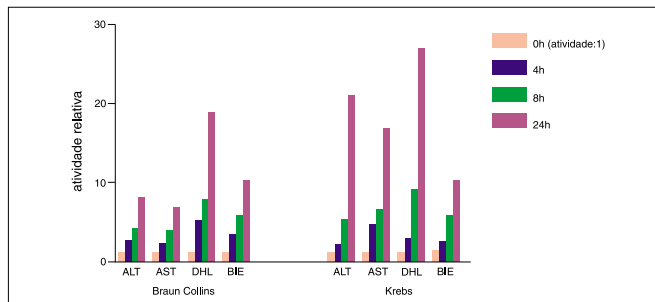
O líquido no qual o fígado foi preservado por 24 hs foi concentrado em sistema de diálise sob pressão (1,2-1,4kg/cm<sup>2</sup> de nitrogênio) a 4°C. A membrana de diálise era introduzida no interior de tubo de vidro contendo o tampão desejado; o tampão era trocado e a pressão checada a cada 10-14 hs, até que o material fosse reduzido ao volume desejado.

Alíquotas assim concentradas foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS e *immunoblotting*. No *immunoblotting*, a transferência de proteína do gel de poliácridamida para a nitrocelulose foi realizada usando-se o método semi-seco. Feito o sanduíche, era aplicada corrente de 0,8mA/cm<sup>2</sup> de gel por 90min. Após a transferência das proteínas para nitrocelulose, foram realizadas as etapas de lavagem da membrana, bloqueio, incubação com o primeiro anticorpo *overnight* 4°C, incubação com o segundo anticorpo por 15minutos com solução 3,3'-diaminobenzidina (DAB) sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (escuro); incubação com DAB contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> até o aparecimento das bandas; interrupção da reação pela remoção da solução que contém H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e lavagem do blot com tampão.

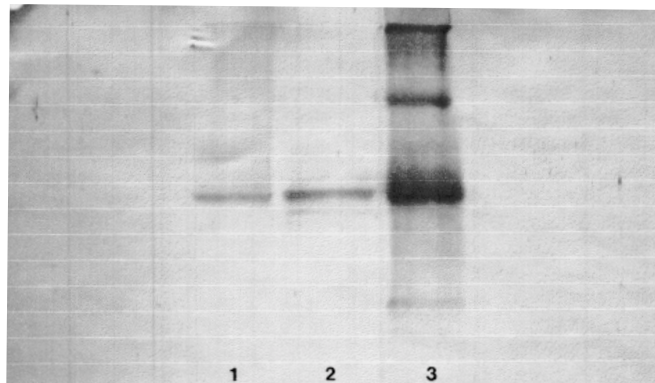
Proteínas foram dosadas pelo método de Coomassie Blue e ALT, AST, DHL por métodos rotineiros a 37° C, segundo a IFCC.

**RESULTADOS**

Foram perfundidos dez fígados de rato, dos quais cinco foram preservados a 4°C em líquido de Braun Collins e os outros cinco em solução de Krebs. Houve aumento na liberação de todas as enzimas dosadas, principalmente no período de 8-24 hs (figura 1). O aumento na alíquota de 24 hs em relação à alíquota zero de fígados preservados em líquido Braun Collins para ALT, AST, DHL e BIE foi, respectivamente, de 8, 7, 19 e 10 vezes, e quando o fígado foi preservado em solução Krebs, de 21, 17, 27 e 21 vezes. A diferença observada com os dois líquidos de preservação não foi estatisticamente significativa (p>0,05). Durante todo o período



**Fig. 1** - Atividade relativa de enzimas no líquido de preservação *ex-vivo* de fígados em relação ao tempo de estocagem



**Fig. 2** - Immunoblot de amostra de líquido de preservação (24 horas) *ex-vivo* de fígado de rato; 1 BIE (13 $\mu\text{g}$  de proteína), 2 BIE (30 $\mu\text{g}$  de proteína), enzima padrão (EC 3.4.24.15), 63 $\mu\text{g}$ .

de observação, a relação ALT/DHL foi sempre inferior a 1. Alíquotas incubadas por 2 hs a 37°C com acetil-Phe-Arg-pNa não liberaram p-nitroanilina, o que sugere não haver liberação de serinoprotease tripsina-símile para o líquido de preservação.

As amostras obtidas após 24 hs de preservação em Braun Collins e Krebs e concentradas continham 0,24 e 0,22mg de proteína/mL, respectivamente. A figura 2 mostra o *immunoblotting* incubado com anticorpo específico para EC 3.4.24.15, que identificou a BIE no líquido de preservação (24hs).

**DISCUSSÃO**

No transplante hepático, a disfunção do enxerto no pós-operatório imediato pode ser resultado de fatores tanto do doador como do receptor, mas aceita-se que na maioria dos casos é decorrente da preservação do órgão. A lesão do fígado transplantado é caracterizada pelos seguintes três componentes: isquemia a frio durante armazenamento e transporte do órgão, isquemia morna durante o

ato operatório e lesão de reperfusão<sup>21</sup>. Os esforços para minimizar a lesão durante a preservação focalizaram-se na composição do líquido usado para banhar o órgão durante o período de isquemia a frio, no sentido de evitar inchaço celular, acido-se, edema intersticial e de fornecer antioxidantes e substratos que evitem a depleção de ATP<sup>22</sup>. Recentemente, foi proposto que outro fator deve ser considerado: inibição da proteólise<sup>19</sup>.

A endopeptidase cinino-inativadora é enzima proteolítica que hidrolisa a ligação Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> da bradicinina; difere da ACE (pois não converte angiotensina I em angiotensina II), não hidrolisa angiotensina I nem angiotensina II e não tem atividade aminopeptidásica<sup>12,13</sup>. Esta enzima proteolítica não é removida do fígado isolado e exsanguinado de rato quando perfundido durante curto período de tempo com solução salina<sup>12</sup>. Entretanto, a adição de detergente (Triton X-100, 0,05%) ao líquido de perfusão faz com que quantidade expressiva da BIE seja removida do órgão<sup>12</sup>. Comprovamos agora que a enzima liberada do fígado preservado *ex vivo*, após algumas horas, é a thimet peptidase, ou seja, a metalopeptidase tiol-dependente<sup>5</sup>: hidrolisa substrato sintético análogo à bradicinina e é reconhecida por anticorpo específico (anticorpo anti-EC 3.4.24.15). Esta liberação é até certo ponto específica, pois serinoproteases tripsina-símiles não foram liberadas nas condições experimentais utilizadas.

Estudos feitos em relação a enzimas liberadas durante a estocagem do fígado mostraram que aumento de aspartato e metaloproteases no líquido de preservação está relacionado com a falência do enxerto. Neste trabalho, dosamos algumas destas enzimas; constatamos que o líquido Braun Collins foi mais eficiente na preservação do órgão em relação à solução Krebs, pois a liberação das enzimas foi aritmeticamente menor, embora sem significância estatística ( $p > 0,05$ ).

A BIE pode ser uma das enzimas responsáveis pela proteólise que ocorre no fígado durante sua preservação *ex vivo*, podendo ser, também, usada como marcador dessa proteólise, auxiliando no estudo de melhores condições de preservação do enxerto e no prognóstico de sucesso do transplante.

A relação ALT/DHL encontrada no líquido de preservação foi inferior a um durante todo o tempo de observação, o que é característico de lesão isquêmica, em contraposição à lesão da hepatite viral, quando esta relação é tipicamente superior a quatro<sup>23</sup>.

Caso a perda de BIE durante a preservação *ex vivo* do fígado signifique perda de capacidade cinino-inativadora do enxerto, pode-se especular

que isto possa modificar a modulação da reatividade vascular no órgão transplantado.

## SUMMARY

### Bradykinin-inactivating enzyme is released from the *ex-vivo* stored liver

*BACKGROUND.* The liver inactivates considerable amounts of bradykinin; the main liver kinin-inactivating enzyme (BIE, bradykinin inactivating endopeptidase) hydrolyses specifically the Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup> bond of the nonapeptide and it has been characterized as the oligoendopeptidase E.C. 3.4.24.15. When orthotopic liver transplantation is performed there is a correlation between the increase of amino acid concentration in the preservation fluid (as a consequence of proteolysis) and graft dysfunction.

*AIM.* Verify if BIE is released from livers stored *ex vivo*.

*METHOD.* Wistar rats (180-220g) livers were exsanguinated and after removal were preserved in Braun Collins fluid or Krebs solution at 4° C. Aliquots were collected from the preservation fluid at 0, 4, 8, 24h, for ALT, AST, LDH and BIE assays. The fluorimetric activity of BIE was assayed upon Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp (synthetic BK analogue) and its presence was confirmed by immunoblotting, revealed with specific antibody anti-E.C.3.4.24.15.

*RESULTS.* The release of ALT, AST, LDH and BIE is significant between 8-24h. In the 24h aliquots the four enzymes concentration increased in the Braun Collins fluid 8, 7, 19 and 10 respectively, and in the Krebs solution 21, 17, 27, 21 respectively, when compared to the zero time aliquot activities. The ratio ALT/LDH was always < 1.

*CONCLUSION.* There is BIE release during *ex vivo* liver storage; this information may be useful as an indicator of the graft preservation condition; a decrease of the liver kinin-inactivating capability could affect the graft vascular reactivity. [Rev Ass Med Brasil 1999; 45(1): 19-23.]

**KEY WORDS:** Bradykinin. Endopeptidase. Cinnase. Liver transplantation.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949; 156: 261-73.

2. Ferreira SH, Vane JR. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 30: 417-24.
3. Prado JL, Limões EA, Roblero J *et al*. Recovery and conversion of kinins in exsanguinated rat preparations. *Naunyn-Schiedeberg's Arch Pharmacol* 1975; 290: 191-205.
4. Borges DR, Limões EA, Prado JL, Camargo ACM. Catabolism of vasoactive polypeptides by perfused rat liver. *Naunyn-Schiedeberg's Arch Pharmacol* 1976; 295: 33-40.
5. Molina HM, Carmona A, Kouyoumdjian M, Borges DR, Juliano L. Liver bradykinin-inactivating-endopeptidase is similar to the metalloendopeptidase EC 3.4.24.15. *Immunopharmacology* 1996; 32: 176-9.
6. Regoli D, Gobeil F, Nguyen Q *et al*. Bradykinin receptor types and B<sub>2</sub> subtypes. *Life Sci* 1994; 55: 735-49.
7. Hecker M, Porsti I, Busse R. Mechanisms involved in the angiotensin II-independent hypotensive action of ACE-inhibitors. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 1.917-21.
8. Stewart JM. The present and the future of bradykinin antagonists. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 1.699-1706.
9. Borges DR, Gordon AH. Kininogen and kininogenase synthesis by the liver of normal and injured rats. *J Pharmacol* 1976; 28: 44-8.
10. Borges DR, Webster ME, Guimarães JA, Prado JL. Synthesis of prekallikrein and metabolism of plasma kallikrein by perfused rat liver. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 1.065-9.
11. Borges DR, Prado JL, Guimarães JA. Characterization of a kinin-converting arylaminopeptidase from human liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1974; 281: 403-14.
12. Borges DR, Guimarães JA, Limões EA, Prado JL, Camargo ACM. Bradykinin inactivation by perfused rat liver (Role of a thiol activated endopeptidase). *Naunyn-Schiedeberg's Arch Pharmacol* 1979; 309: 197-201.
13. Kouyoumdjian M, Borges DR, Prado JL. Kinin-inactivating endopeptidase from rat liver. *Int J Biochem* 1984; 16: 733-9.
14. Kouyoumdjian M, Borges DR, Prado ES, Prado JL. Identification of receptors in the liver that mediate endocytosis of circulating tissue kallikrein. *Biochem Biophys Acta* 1989; 980: 299-304.
15. Borges DR, Kouyoumdjian M. The recognition site for hepatic clearance of plasma kallikrein is on its heavy chain and is latent on prokallikrein. *J Hepatol* 1992; 16: 115-21.
16. Ogata H, Kouyoumdjian M, Borges DR. Comparison between clearance rates of plasma kallikrein and of plasma kallikreina-macroglobulin complexes by the liver. *Int J Biochem* 1993; 25: 1.047-51.
17. Limões EA, Borges DR, Souza-Pinto JC, Gordon AH, Prado JL. Acute turpentine inflammation and kinin release in rat-paw thermic oedema. *Br J Exp Path* 1981; 62: 591-4.
18. Martins B, Kouyoumdjian M, Limões EA, Borges DR. The hepatic clearance rate of plasma kallikrein increases during the acute-phase response. *Agents Actions* 1992; 37: 111-3.
19. Calmus Y, Cynober L, Dousset B *et al*. Evidence for detrimental role of proteolysis during liver preservation in humans. *Gastroenterology* 1995; 108: 1.510-6.
20. Council For International Organization of Medical Sciences. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Geneva, 1985.
21. Gores GJ, Krom RAF. Is proteolysis a critical mechanism of hepatic preservation injury? *Gastroenterology* 1995; 108: 1.594-6.
22. Ferguson DM, Gores GJ, Bronk SF, Krom RAF. An increase in cytosolic protease activity during liver preservation. *Transplantation* 1993; 55: 627-33.
23. Cassidy WM, Reynolds TB. Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 118-21.