

## HISTAMINA E TOXINAS PROTÉICAS NO VENENO DE ABELHA

K. SLOTTA & P. BORCHERT

(*Dep. Científico da Ind. Farm. Endochimica S/A, com a colaboração do Inst. Butantan*).

Os sintomas de um choque histamínico compõem um quadro clínico tão semelhante aos do choque provocado por peptona, tripsina, venenos ofídicos ou choque anafilático, que se pensou às vezes ser a histamina a única causa de choques. Sua forte ação nos epitélios e capilares, na contração do músculo liso e na secreção glandular endócrina, principalmente na hipófise e suprarenal com todas as suas conseqüências, parece falar em favor desta hipótese (1). Mas o choque é um fenômeno muito mais complexo; e sabe-se que neste estado não só a histamina mas também a heparina é liberada em quantidade proporcional (2). Muitos fatos levam a crer que a histamina como a heparina têm a mesma origem, isto é, nas mastócitos, as quais contêm quantidades variáveis de heparina e histamina mas com uma certa relação entre si (3). Principalmente ricos em histamina são os mitocôndrios das células hepáticas que perdem durante o choque cerca de metade do seu teor em histamina (4). Pode-se supôr que a histamina se forma durante o choque da histidina pela histidina-decarboxilase e que por outro lado também pode-se dar uma destruição da histamina pela histaminase. Porém, provavelmente nenhuma destas suposições representa, em grau apreciável, a realidade. Visto como aminas próprias ou estranhas ao organismo podem ser ligadas muito facilmente às proteínas (5), é bem provável que a histamina mesma já exista dentro das mastócitos ligada à proteína. Quando as mastócitos são destruídas por certas substâncias, a histamina e a heparina são liberadas, produzindo o choque.

Portanto, para a produção de um choque é sempre necessária a presença de histamina ou de uma toxina, que pode entrar no organismo como tal ou pode ser formada, depois de um certo tempo no organismo, de substâncias em si inócuas, porém estranhas ao corpo, como a peptona ou albumina sérica (ana-

---

Recebido, para publicação, em 2.IV.1954.

filatoxina). Existe também a possibilidade da transformação de tecido traumatizado, sem entrada de substâncias alheias, conhecida como choque traumático. Finalmente conhecemos também o fato de toxinas estranhas, agindo como "toxinas de arranque", produzirem, nas células do organismo, "toxinas secundárias" que causam choque pela liberação da histamina, heparina e talvez também da acetilcolina. Estas toxinas secundárias foram descritas como "slow reacting substances" (SRS) (6) e bradicinina (7); trata-se de proteínas de peso molecular e composição variável, caracterizadas pela ação músculo-constritora retardada, duradoura e que agem somente uma única vez intensamente no mesmo músculo.

Bactérias, insetos e serpentes produzem toxinas protéicas que exercem por si próprias uma ação sobre o tonus muscular e pressão arterial, que além disso têm ação tóxica, liberando histamina e heparina de células. Entretanto, sua ação consiste principalmente na liberação de toxinas secundárias como SRS e bradicinina, que posteriormente provocam o choque pela liberação de histamina. Estas "toxinas de arranque" possuem naturalmente um interesse especial devido à sua ação semelhante a uma "avalanche". Todavia, a sua investigação química e farmacológica torna-se difícil, por tres razões: 1) são proteínas assim como as toxinas por elas produzidas, oferecendo todas as dificuldades da química das proteínas; 2) uma mesma secreção venenosa pode conter diferentes "proteínas de arranque" e 3) a verificação de sua ação sobre o intestino é dificultada pela histamina que pode provir de duas fontes: da secreção venenosa própria ou das células do organismo atacado. Hoje, felizmente, temos a possibilidade de distinguir entre o efeito da histamina e o das toxinas, usando substâncias anti-histamínicas que bloqueiam a ação da histamina, sem contudo influenciar a ação das toxinas protéicas.

Nos venenos ofídicos por nós investigados falta a histamina, enquanto certos polens (8), bactérias e insetos a contêm. A toxina de estafilococos contém, além da proteína tóxica que libera a histamina, ainda histamina (9). O mesmo fato foi verificado recentemente no caso de *Streptomyces* onde se conseguiu separar histamina d'uma substância "XX" que contraíu fortemente o intestino delgado, ação essa não influenciada pelo "Neo-Antergan" (10).

Existe histamina, ao lado das toxinas protéicas, também nas secreções venenosas de insetos. A cabeça do mosquito (*Culex pipiens*) contém 6 a 7 vezes mais histamina do que o resto do corpo e depois da picada o conteúdo de histamina na cabeça diminui de 30%, enquanto no corpo fica o mesmo.

Também o veneno da centopéia contém histamina (11). Há muito tempo estudou-se o conteúdo de histamina do veneno de abelha, supondo que uma das ações terapêuticas deste veneno é devido ao seu teor em histamina. Até agora não foi possível determinar exatamente a quantidade de histamina nesta secreção. Achamos somente um trabalho sobre a determinação química quantitativa de histamina no veneno de abelha na literatura: Reinert (12) achou 0,2% de histamina básica por ele isolada em forma de 1,0% de dipicrato de histamina. Outros (13) limitam-se a declarar que eles "caracterizaram o dipicrato de histamina pelo ponto de fusão" ou que "uma insulação química da histamina não era possível ao contrário das indicações da literatura" (14).

Pelo desenvolvimento da electroforese em papel pareceu-nos possível esclarecer este ponto. Usamos veneno cru de abelha que foi conseguido por meio de trituração do aparelho venenoso das abelhas, extração com ácido fórmico N/2 e liofilização. Assim procedemos porque Reinert (12) achou que no veneno cru de abelha se encontra 4 vezes mais histamina do que no assim chamado veneno purificado por precipitação com ácido pícrico. Pela electroforese em papel do veneno, eluição da fração de maior deslocação e determinação colorimétrica, achamos 0,35 até 0,45% de histamina básica. Também por meio da fotometria direta da fração tingida pelo ácido sulfanílico diazotado achou-se o conteúdo entre 0,40 até 0,48% de histamina básica.

Mas também por meio biológico, com determinação de contração do ileo de cobaia conforme o método clássico (15), alcança-se o mesmo resultado. Fluimos a fração histaminica da tira de papel da electroforese e comparamos o aumento de tonus obtido com esta solução, com o produzido por diferentes quantidades de histamina, resultando um conteúdo de 0,34 até 0,45% de histamina básica no veneno de abelha seco.

Como mostraremos mais adiante, o veneno de abelha contém duas outras substâncias constritoras do intestino, pertencentes ao grupo das "toxinas de arranque", tão importantes no mecanismo do choque. Ambas agem somente depois de um tempo determinado de indução de 35 respectivamente 60 segundos, enquanto a histamina age imediatamente. Após a descoberta deste fato tornou-se possível a avaliação exata, por meio de experiência biológica, da quantidade de histamina contida no veneno cru de abelha, sem prévia separação electroforética: também assim achamos um teor de 0,35 até 0,40% de histamina.

Todavia, não se pode em caso algum exagerar no efeito integral do veneno de abelhas a ação da histamina. Quando dividimos o veneno cru por electroforese em papel durante 63 horas, recebemos os resultados da figura 1.

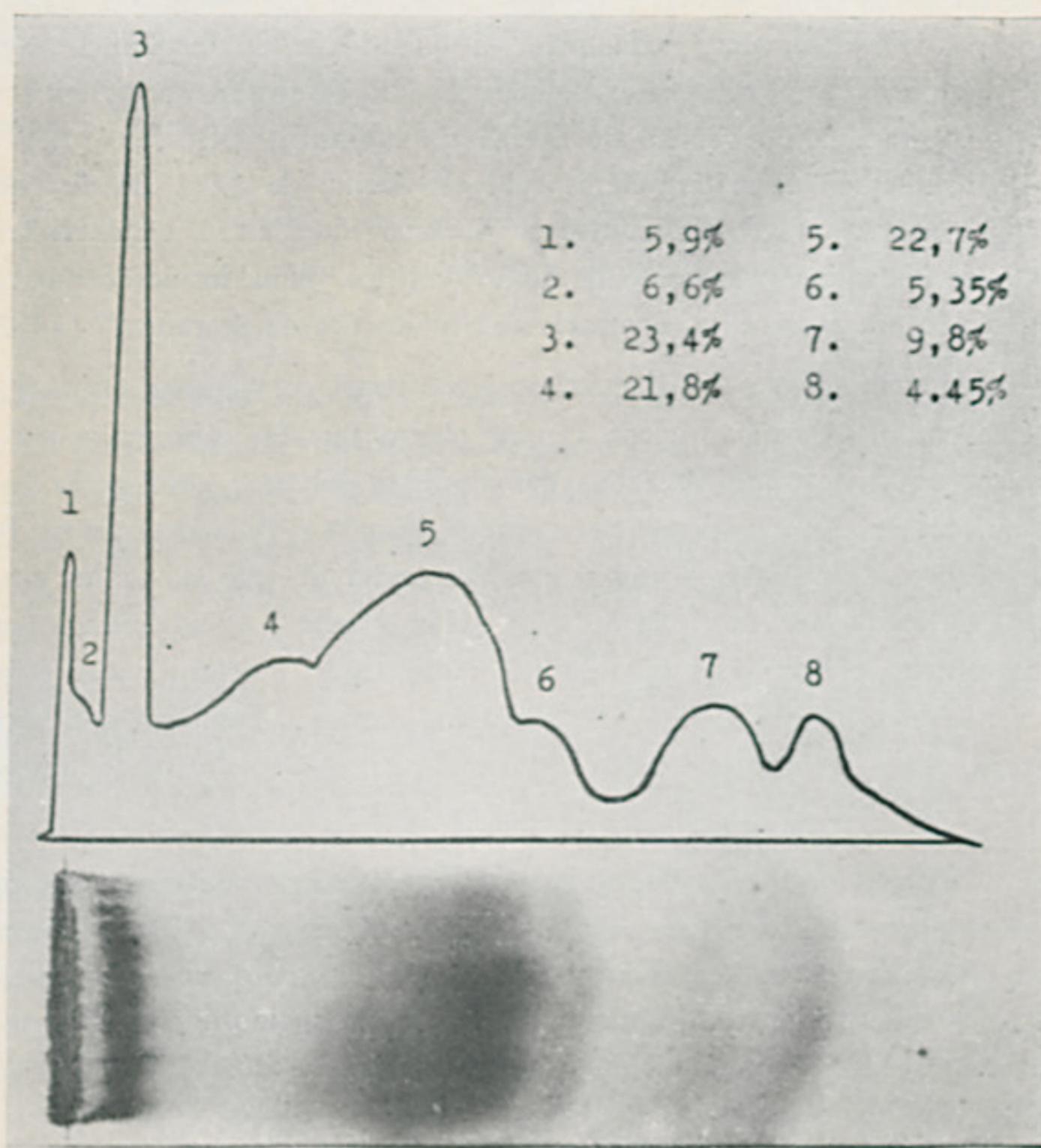


FIGURA 1

*Eletoforese de veneno cru de abelha*

Quantidade aplicada: — 1 mg.

Tampão: — biftalato de potássio/NaOH; pH 4,60

Força iônica calculada: — 0,21

Temperatura: — 18-20°C

Tempo de duração: — 63 hs; 120 V; 0,25 mA/cm

Papel: — Whatman 1

Corante: — "Amidoschwarz 10 B"

Como a fração histamínica neste tempo já saiu da tira, encontram-se somente 8 frações protéicas tingidas por "Amidoschwarz 10 B". Naturalmente supomos que uma destas frações seja a proteína com atividade sobre o intestino. Igualmente como se verificou nas bactérias (9,10) e nos venenos ofídicos (16), alguns cientistas já observaram que o veneno das abelhas provoca uma contração duradoura da musculatura lisa. Uma nova aplicação do veneno no mesmo pedaço de intestino quase não tem efeito, indicando uma dessensibilização (14, 17).

A semelhança da ação sobre o intestino do veneno de abelha com a das serpentes pode-se verificar claramente, comparando as curvas na figura 2.

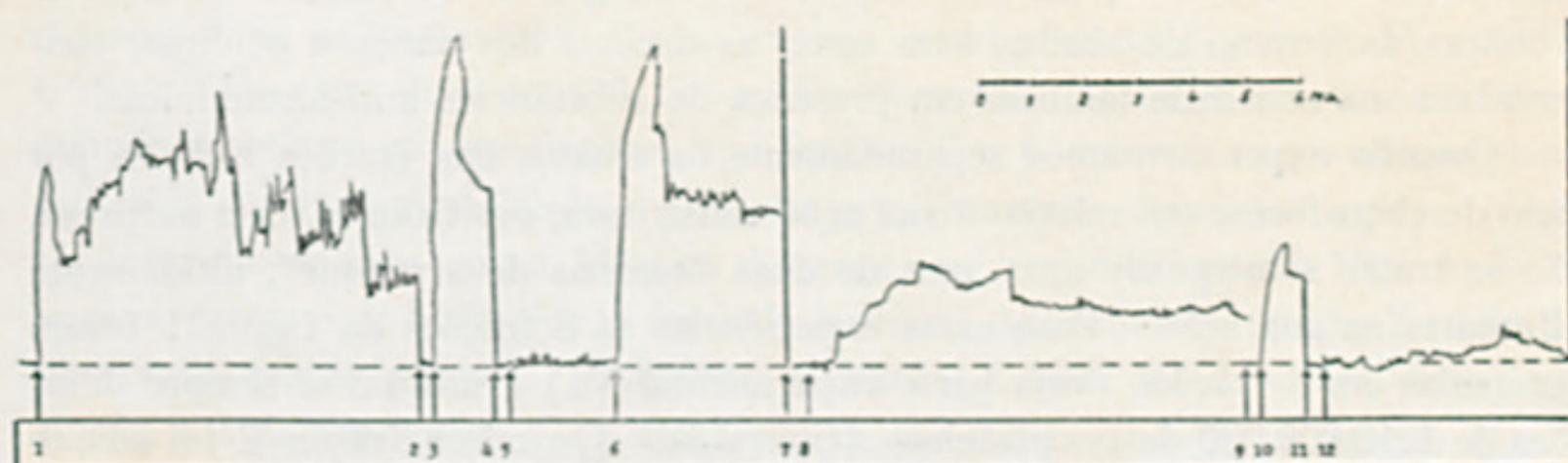


FIGURA 2

- 1) 100 $\gamma$  veneno crú de abelha
- 2) lavagem
- 3) 1 $\gamma$  histamina
- 4) lavagem
- 5) 10 $\gamma$  veneno crú de abelha
- 6) + 1 $\gamma$  histamina
- 7) *Intestino novo*
- 8) 100 $\gamma$  veneno crú de *Crotalus t. t.*
- 9) lavagem
- 10) 4 $\gamma$  histamina
- 11) lavagem
- 12) 100 $\gamma$  veneno crú de *Crotalus t. t.*  
(cuba de 100 cm<sup>3</sup>)

No ponto 1 um pedaço de intestino muito sensível foi exposto ao veneno de abelha. Observa-se claramente a ação imediata da histamina contida no veneno crú que se destaca claramente contra as ações retardadas, mas mais duradouras, das outras componentes ativas. Mesmo tendo o intestino agido imediata e fortemente com pequeníssimas quantidades de histamina (ponto 3 e 6), nenhuma ação se deu com nova aplicação de veneno (ponto 5).

A curva seguida ao ponto 8 mostra a contração de um outro pedaço intestinal, por acaso muito menos sensível, sob a influência de veneno crú de *Crotalus*

*terrificus*. Depois de 30 segundos de indução verifica-se também aqui a ação duradoura deste veneno protéico. Após a lavagem o músculo responde à histamina perfeitamente (ponto 10) enquanto que adicionando novamente veneno crotálico (ponto 12) verifica-se pequena ação, indicando uma dessensibilização.

Queremos mencionar ainda que intestino primeiramente tratado com veneno de abelha a 1:1.000.000 mostrou-se dessensibilizado para veneno crotálico a 1:1.000.000 e vice-versa. Mas a ação da histamina pode ser observada mesmo depois de várias aplicações dos venenos mencionados no mesmo pedaço de intestino. Como era de esperar pode-se inibir, por substâncias anti-histamínicas, a ação do eluato da fração histamínica de veneno de abelha da mesma maneira como a da histamina pura. Usamos para este fim Neo-Antergan a 1:10.000. As toxinas protéicas do veneno de abelha, bem como as toxinas dos venenos ofídicos, conservaram sua atividade também em presença de substâncias anti-histamínicas.

Quando experimentamos separadamente os eluatos das frações isoladas por meio de eletroforese em relação à sua ação constritora, verificámos, com surpresa, não se tratar somente de uma, mas de duas "toxinas de arranque", nitidamente diferentes na sua ação. Para essas experiências as 8 frações da figura 1 foram agrupadas em 5 frações (veja parte experimental VI) e usaram-se sempre diluições de 1:10.000.000 destas proteínas (figura 3). Quando a fração E foi adicio-

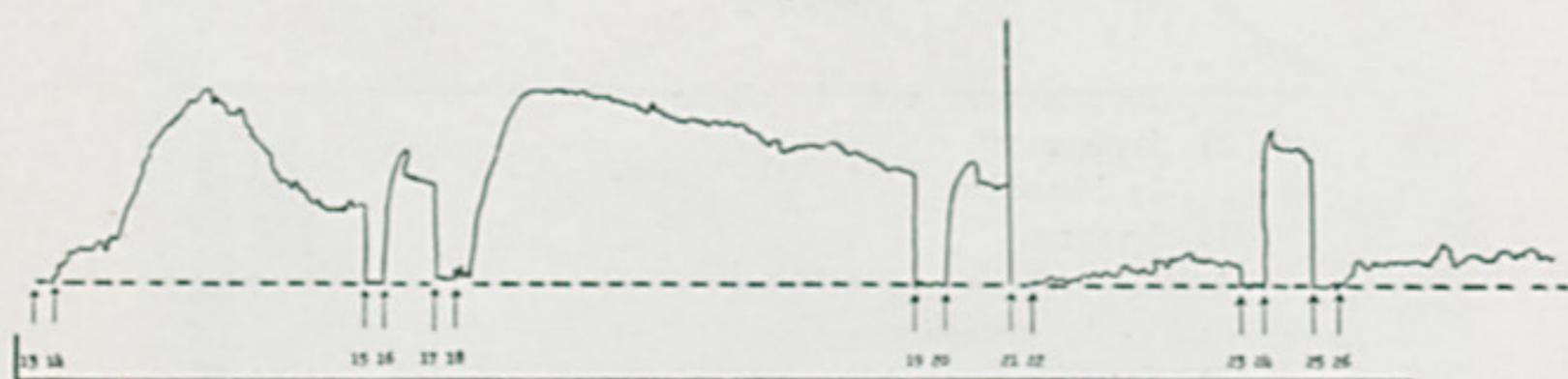


FIGURA 3

- 13) *Intestino novo*
- 14) 10 $\gamma$  do eluato de electroforese E
- 15) lavagem
- 16) 4 $\gamma$  de histamina
- 17) lavagem
- 18) 10 $\gamma$  do eluato de electroforese C.
- 19) lavagem
- 20) 4 $\gamma$  de histamina
- 21) *Intestino novo*
- 22) 10 $\gamma$  do eluato de electroforese A
- 23) lavagem
- 24) 4 $\gamma$  de histamina
- 25) lavagem
- 26) 10 $\gamma$  do eluato de electroforese B  
(cuba de 100 cm<sup>3</sup>)

nada a um novo pedaço de intestino (ponto 14), provocou primeiramente uma contração fraca que depois de 60 segundos aumentou, atingindo o máximo depois de 150 segundos. A caída do tónus se deu com o mesmo gradiente que o da subida. Porém, a fração C agiu no mesmo pedaço de intestino após um curto período de indução de 25 segundos, com subida mais íngreme (ponto 18). Ao contrário da caída brusca das curvas da histamina, mostrou-se, depois de alcançar o máximo aos 90 segundos, uma descida muito lenta. A fração D não tem efeito, enquanto as frações A e B são muito pouco ativas como se vê nos pontos 22 e 26. Atribuimos esta ação mínima a traços remanecentes da fração C, devidos à separação eletroforética incompleta.

Que nas frações ativas C e E se trata de duas toxinas de ação e constituição diferentes, já se podia concluir das curvas características (como nos pontos 14 e 18). Que estas duas frações devem ser duas substâncias diferentes verifica-se quando repetimos as experiências com frações E e C em ordem cronologicamente invertida no mesmo músculo. Quando primeiramente deixámos agir a fração C, consegue-se uma curva idêntica à curva que segue ao ponto 18. Após lavagem, prova com histamina e segunda lavagem, adicionamos fração E: não foi observada reação alguma. Enquanto a fração E não dessensibiliza o músculo contra a ação de fração C, a fração C dessensibiliza-o contra a fração E.

Deixando reagir a fração C durante tempo suficiente, isto é, 5 até 10 minutos sobre um pedaço de íleo (fig. 4 e 5) (ponto 27), lavagem (ponto 28), prova de histamina (ponto 29), nova lavagem (ponto 30) e aplicação de uma

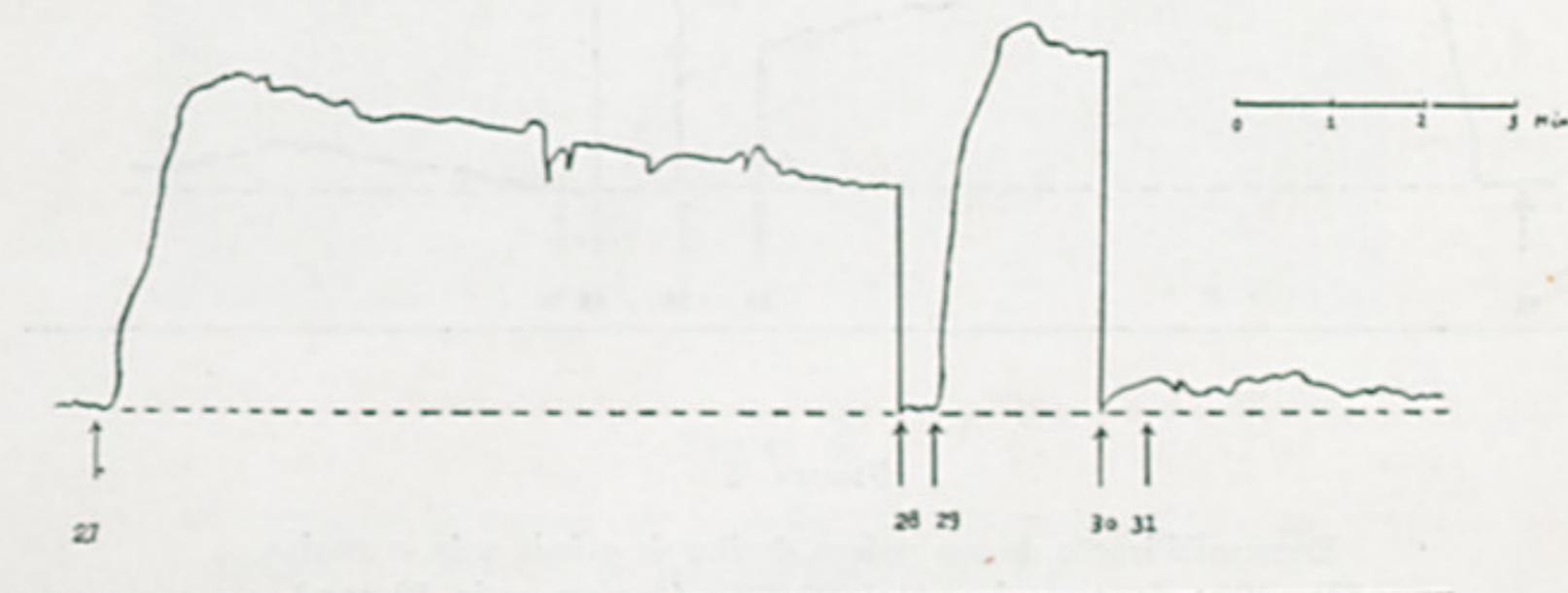


FIGURA 4

Dessensibilização de um pedaço de íleo de cobaia pela componente C.

27) 100 $\gamma$  C (1:1.000.000) (começa após 25 segundos)

28) lavagem

29) 8 $\gamma$  de histamina (1:12.500.000)

30) lavagem

31) 100 $\gamma$  C (1:1.000.000)

outra dose igual de fração C (ponto 31), não há contração. Uma curva quase idêntica resulta da aplicação de crotoxina (ponto 32); entretanto, a subida começa somente depois de 50 segundos. Também neste caso verifica-se a dessensibilização (ponto 35).

Esta comparação do efeito da crotoxina (18) com o das duas frações do veneno de abelha é de interesse especial, porque se trata, no caso de crotoxina, de uma proteína uniforme, cristalizada e pura, o que não se pode dizer das nossas frações do veneno de abelha. Crotoxina é a substância de efeito letal do veneno de *Crotalus t. t.*, que pode ser neutralizado pelo anti-soro correspondente (19). Enquanto crotoxina mostra uma variedade de ações enzimáticas, como por exemplo a transformação de lecitina em lisolecitina (18), o desdobramento do ácido hialurônico e os efeitos inibidores sobre oxidasas e succino-dehidrase (20), não há razão de responsabilizar nem mesmo a soma destas ações enzimáticas pela totalidade da toxicidade desta proteína. Crotoxina age fortemente na musculatura lisa e na pressão arterial. Ela produz toxinas secundárias que, da mesma forma como a própria crotoxina, libertam histamina e heparina das células e tecidos. Esta sequência de reações esclarece perfeitamente a sua toxicidade.

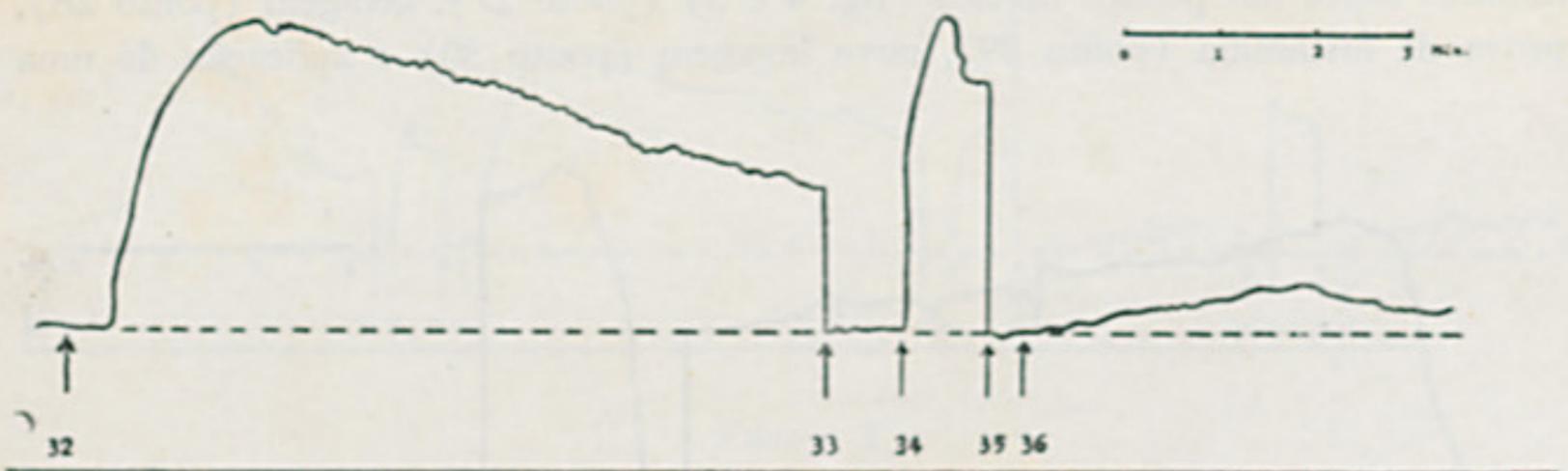


FIGURA 5

- Dessensibilização de um pedaço de íleo de cobaia pela crotoxina
- 32) 100 $\gamma$  de crotoxina (1:1.000.000) (começa após 50 seg.)
  - 33) lavagem
  - 34) 4 $\gamma$  de histamina (1:25.000.000)
  - 35) lavagem
  - 36) 100 $\gamma$  de crotoxina (1:1.000.000)

As nossas frações ativas do veneno de abelha, bem como a crotoxina parecem-nos substâncias tóxicas com propriedades enzimáticas suplementares.

### PARTE EXPERIMENTAL

I. *Extração do veneno crú de abelha.* — As glândulas peçonhentas e os ferrões de 1800 abelhas vivas foram arrancados com pinça e colocados em álcool a 96%. Após evaporação do álcool e secagem no vácuo à temperatura ambiente, restaram 976 mg de resíduo que foram pulverizados no gral, dando um pó cinzento, o qual foi extraído três vezes com 200 cc cada vez de ácido fórmico 0,5 N durante 3 horas à temperatura ambiente. Os extratos reunidos

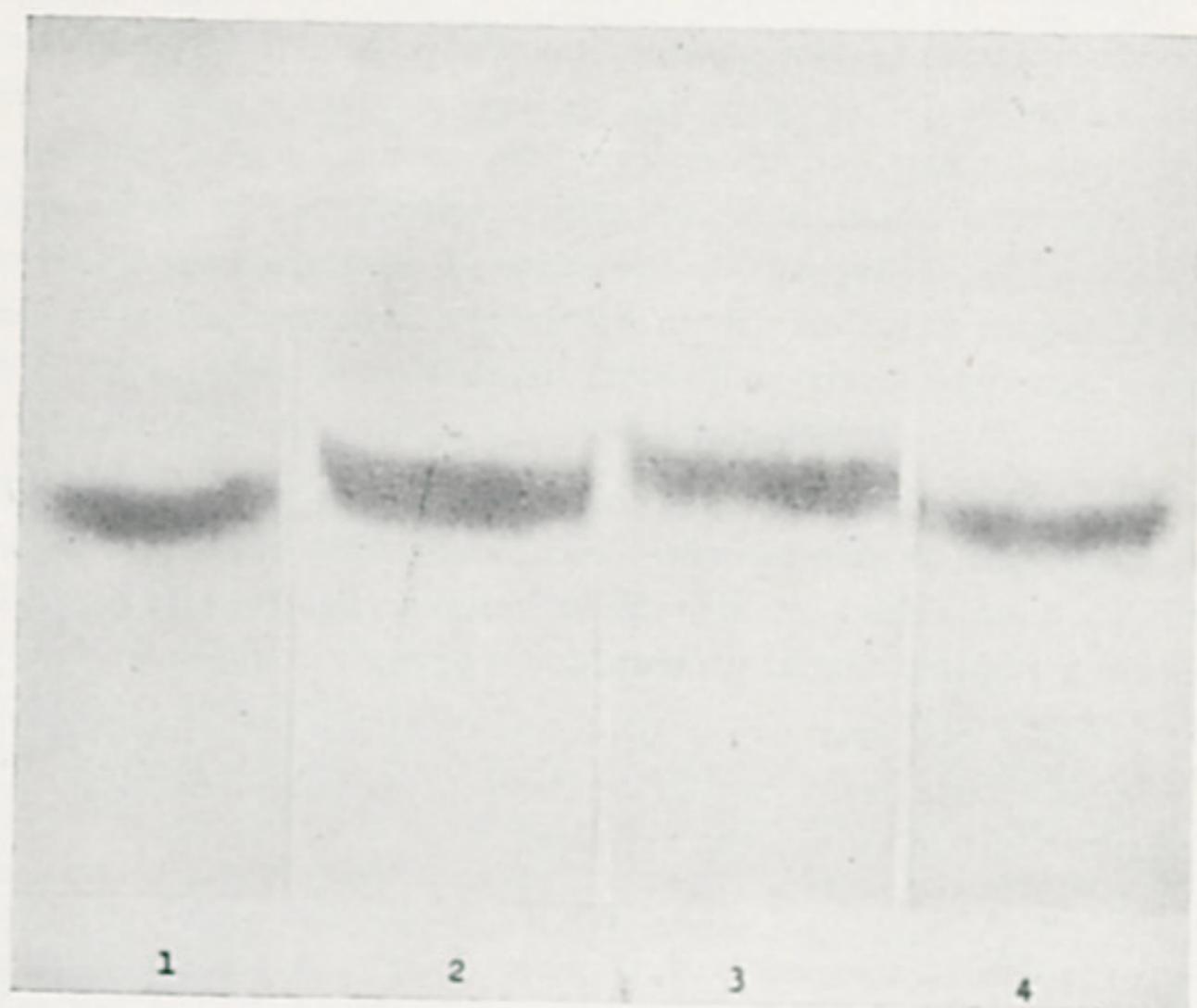


FIGURA 6

Electroforese de veneno crú de abelha (1) e histamina (2, 3 e 4)  
Tampão: — biftalato de potássio/NaOH pH 4,40  
Força iônica calculada: — 0,21  
Temperatura: — 18-20°C  
Tempo de duração: — 5 horas; 120 V; 0,25 mA/cm  
Papel: — Whatman 1  
Corante: — ácido sulfanílico diazotado  
Tira n.º 1 2,5 mg. veneno crú de abelha  
Tira n.º 2 30  $\gamma$  histamina  
Tira n.º 3 20  $\gamma$  histamina  
Tira n.º 4 10  $\gamma$  histamina

foram centrifugados, filtrados e liofilizados, resultando 610 mg de uma massa amarelada, cerosa e higroscópica, usada em todas as experiências subsequentes e denominada "veneno cru de abelha".

II. *Electroforese do veneno cru de abelha.* — A electroforese foi feita numa câmara construída de "Plexiglas" com capacidade para 8 tiras de 4 x 28 cm (electroforese pequena) ou para uma só folha de 24 x 38 cm (electroforese grande). A aplicação da solução do veneno para a electroforese grande foi feita com um dispositivo mecânico (21), permitindo a aplicação de 10 a 100 mg de veneno de uma só vez.

1) *Separação da histamina do veneno cru de abelha.* A separação da histamina pode ser efetuada com qualquer tampão ácido. A histamina desloca-se, junto com as outras frações protéicas do veneno, para o cátodo e, sendo sua velocidade muito maior, separa-se quantitativamente destas. Junto com ela acha-se somente uma fração muito pequena, tingível com "Amidoschwarz 10 B". Identificou-se a fração histamínica fazendo-se a electroforese paralelamente em tiras com histamina pura. A figura 6, tira n.º 1, mostra a fração histamínica do veneno tingida por ácido sulfanílico diazotado e as tiras n.º 2, 3 e 4 com diferentes quantidades de histamina pura.

2) *Separação do veneno cru de abelha em 8 frações.* Para este fim tampões de citrato (22) e especialmente de biftalato (23) são muito satisfatórios, permitindo o último o desdobramento em 8 frações (fig. 1), sem contar a fração histamínica e a pequena fração protéica que a segue.

III. *Reações coloridas para a identificação da histamina no papel.* Alguns autores (24) dão variantes da reação de Pauly (com ácido sulfanílico diazotado) para identificar histamina também no papel.

Ao lado do método mais usual, isto é, nebulização duma solução alcalina de ácido sulfanílico diazotado, parece digna de nota a técnica (25) que seca a tira de papel e banha-a rapidamente numa solução alcalina de p-bromoanilina diazotada que tingem de vermelho o lugar da histamina.

Estávamos interessados em achar uma reação colorida específica da histamina que diferenciase esta da histidina e da tirosina. Procuramos então uma reação com outros compostos diazotados, pois estes possuem grande sensibilidade e dão colorações muito vivas. Acharmos que as anilinas substituídas diazotadas, p-toluidina, p-cloro-o-metoxi-anilina e p-bromo-anilina formam, somente com o anel imidazólico, colorações vermelhas mais ou menos vivas, enquanto que tirosina dá coloração fraca amarela. Entretanto, p-nitro-anilina diazotada reage com o anel imidazólico bem como com tirosina, produzindo uma cor roxa. Orto-dianisidina diazotada dá coloração marrom com imidazolina. Não conseguimos achar uma reação que diferenciase histidina da histamina.

Para a técnica de tingimento no papel com compostos diazo, achamos vantajosos dois métodos:

a) Prepara-se o cloridrato do composto diazotado. A tira seca de papel é nebulizada com solução aquosa a 10% de  $\text{NaCO}_3$  e imediatamente depois com uma solução gelada do sal diazônico (1 a 2%) em  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10%. A copulação se dá com ácido sulfanílico diazotado instantaneamente ou dentro de 1 minuto com p-toluidina diazotada até a intensidade máxima.

b) Preparam-se as seguintes soluções:

- 1)  $\text{NaNCl}_2$ , 0,5%, em HCl N/10, gelado.
- 2) Amina, p-toluidina, p-bromo-anilina, etc., 1%, em HCl N/10, gelado.
- 3) Solução aquosa de  $\text{NaCO}_3$  a 10%.

A tira de papel é primeiramente nebulizada com solução 3). Misturam-se então partes iguais de 1) e 2), deixa-se no gelo por 1 minuto (diazotação) e nebuliza-se a solução gelada sobre a tira ainda molhada com solução 3). Para a melhor conservação da coloração é aconselhável nebulizar mais uma vez levemente com 3, depois de alcançar a intensidade máxima.

IV. *Eluição das frações.* — Em vez de usar uma das muitas técnicas comuns de eluição bastante demoradas (26), procedemos da seguinte maneira: os recortes da tira contendo as diferentes frações protéicas foram postas junto com o meio de eluição (água para histamina, solução aquosa de NaCl a 0,9% para as frações proteicas) em tubos de centrifuga e transformados em polpa com agitador de vidro em alta rotação. Após centrifugação e decantação do eluato, o processo foi repetido 3 a 5 vezes. Os eluatos reunidos, completados para um volume certo, foram guardados na geladeira. Este método tem a vantagem de uma eluição rápida, o que parece importante quando se trata da isolamento de frações sensíveis.

V. *Métodos para determinação quantitativa da histamina no veneno cru de abelha.*

1) *Métodos químicos.* — a) Método colorimétrico com ácido sulfanílico diazotado (27). 10 mg de veneno cru de abelha em 0,1 cc. de uma mistura de partes iguais de soro fisiológico e ácido fórmico N/2 foram usadas numa "electroforese grande" (1 mA/cm; 3,5 hs; tampão: acetato, pH 4,5 (28); papel: Whatman n.º 1 (24 x 38 cm). Após a electroforese o papel foi seco em corrente de ar frio. Uma tira que ficou em paralelo é tingida com ácido sulfanílico diazotado para localização da histamina. A parte correspondente da folha grande foi recortada e eluida pelo método descrito em IV) e os eluatos reunidos ajustados para 100 cc.

## SOLUÇÕES:

- A) Como padrão de histamina usamos duas soluções aquosas de bifosfato de histamina puro com teor em histamina (base livre) de 1 e 10 microgramas por cc. respectivamente.
- B) 0,2 g do hidrocloreto de diazônio do ácido sulfanílico puro cristalizado foram dissolvidos rapidamente em 20 cc. de água em temperatura ambiente e imediatamente resfriados em água gelada.
- C) Solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2,5%, a  $0^\circ\text{C}$ .
- D) Reagente diazo: 1 parte de B) + 2 partes de C).

Diferentes volumes das soluções padrão (A), sempre completados para 9 cc. nos tubos do colorímetro "Lumetron" foram misturadas com 1 cc. do reagente diazo (D) frio e medidas as extinções, usando o filtro verde amarelado (530m $\mu$ ). Os valores obtidos entre 1 e 10 minutos após a copulação deram curvas padrões que permitiram a determinação quantitativa de histamina em solução.

Verificamos com este método que 1 g de veneno cru de abelha contém 3,5 a 4,5 mg de histamina.

b) Método de fotometria direta no papel (método Elphor).

Tiras de papel com quantidades variadas e conhecidas de histamina (neste caso entre 5 e 30 microgramas) foram electroforizadas durante 5 horas em paralelo com tiras contendo 2,5 mg do veneno cru de abelha em tampão de biftalato de potássio — solução de NaOH de pH 4,4 (ou também em outros tampões ácidos) (veja figura 6). Após secagem, todas as tiras foram esticadas entre dois bastões de vidro e sobre os dois lados foi nebulizada a solução alcalina de ácido sulfanílico diazotado a  $0^\circ\text{C}$  (veja III-a) até quase saturação do papel. Estas tiras tingidas, secas entre 60 a  $70^\circ\text{C}$  e tornadas transparentes com mistura bromonaftalina-óleo de parafina (29), foram submetidas à fotometria direta no instrumento "Elphor". Feito o gráfico, as áreas limitadas pelas curvas foram medidas com planímetro. Da comparação das áreas resultantes das curvas padrões com aquelas com veneno, conclui-se que 2,5 mg de veneno cru de abelha contém 10 a 12 microgramas de histamina, o que corresponde a 4,0-4,8 mg por grama do veneno (figura 7).

2) *Determinação biológica de histamina.* a) No eluato da fração histamínica da electroforese (veja V, 1) a). Pelo método usual foi feita comparação com histamina, usando ileo de cobaia recém-isolado e conservado em solução de Ringer-Locke a  $37^\circ\text{C}$ . Comparando as respostas obtidas com 5 cm<sup>3</sup> do eluato com a curva padrão recebemos, numa série de medições, sempre resultados

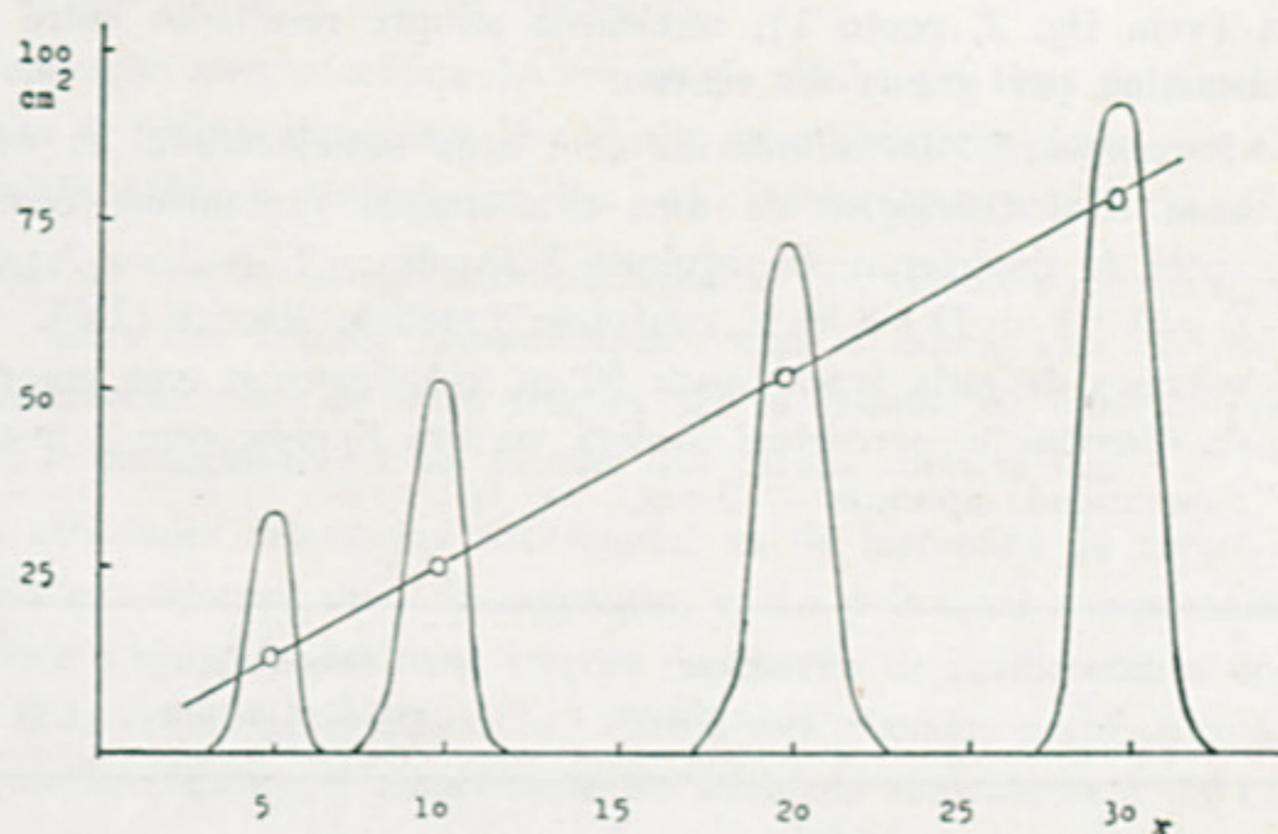


FIGURA 7

Linha padrão para determinação quantitativa de histamina com aparelho "Elphor".

Tampão: — biftalato de potássio/NaOH pH 4,40

Força iônica calculada: — 0,21

Temperatura: — 18-20 °C

Tempo de duração: — 5 hs.; 120 V; 0,25 mA/cm

Papel: — Whatman 1.

entre 1,7 a 2,25 microgramas de histamina, correspondente a 3,4 a 4,5 mg de histamina por grama do veneno.

As soluções padrões de histamina usadas na confecção da curva padrão devem ser recém-preparadas. Soluções aquosas de hidrócloro ou de difosfato de histamina perdem a sua atividade fisiológica totalmente dentro de 6 dias à temperatura ambiente, enquanto soluções em mertiolato 1:1000, ácido monocloro-acético 1:1000, ou água saturada com toluol conservam integralmente a sua atividade fisiológica sobre o intestino da cobaia. Soluções aquosas de histamina, guardadas bem arrolhadas na geladeira, conservam sua atividade durante algumas semanas. Soluções "estragadas" de histamina, sem atividade fisiológica, dão entretanto ainda a coloração vermelha com ácido sulfanílico diazotado, com a mesma intensidade das recém-preparadas.

b) Diretamente no veneno cru de abelha. Qualquer método, utilizando diretamente o veneno cru, pressupõe o conhecimento exato da ação das frações do veneno, que têm atividade semelhante à da histamina. A histamina age imediatamente sobre o intestino isolado, enquanto dois outros componentes têm ação depois de 35 a 60 segundos respectivamente (veja VI). Usando cada vez 0,1 mg de veneno

crú de abelha por cc. na cuba e medindo a contração *imediate*, provocada pela histamina (veja fig. 2, ponto 1), recebemos sempre resultados entre 3,5 e 4 mg de histamina por grama do veneno.

VI. *Determinação de substâncias com ação semelhante à da histamina.* Eluimos, com sôro fisiológico de uma tira tratada exatamente como a da figura 1, antes do tingimento, as seguintes 5 frações:  $1 + 2 = A$ ;  $3 = B$ ;  $4 + 5 + 6 = C$ ;  $7 = D$  e  $8 = E$ , conforme o método descrito (IV). Completados os volumes de cada fração para 50 cc, calculamos o teor em proteínas por cc. pela distribuição percentual medida, na tira tingida, com o instrumento "Elphor": quantidade aplicada — 2 mg.

Fração n.º	Eluato n.º	Proteínas em % no eluato	Proteínas em 1 cc eluato	cc/10γ de proteína	
1 } 2 }	A	5,9% } 6,6% }	12,5%	5γ	2,0
3	B		23,4%	9,4γ	1,06
4 } 5 } 6 }	C	21,8% } 22,7% } 5,35% }	49,85%	20γ	0,5
7	D		9,8%	3,9γ	2,56
8	E		4,45%	1,8γ	5,55

Para determinar a atividade sôbre o intestino isolado, quantidades equivalentes destas frações, contendo sempre 10 microgramas de proteína, foram adicionadas ao banho de Ringer-Locke (100 cc.). As figuras 3 e 4 mostram os resultados obtidos.

Os autores agradecem à Diretoria do Instituto Butantan e particularmente ao Dr. Wolfgang Bücherl pelo fornecimento de venenos e aos Drs. João Jaeger e Ernando Buratti pela colaboração na redação do trabalho.

#### RESUMO

Venenos de serpentes e de insetos mostram, ao lado de muitos outros efeitos farmacológicos, também uns semelhantes ao da histamina. Não foi possível afirmar até agora até que ponto a histamina no veneno de abelha é responsável por esta ação, porquanto faltavam determinações quantitativas seguras.

Determinamos o teor em histamina do veneno crú de abelha por diversos métodos químicos e biológicos e achamo-lo entre 0,34 e 0,48%.

Não se pode conceber que a forte ação fisiológica deste veneno seja devida somente a este reduzido teor de histamina.

A separação electroforética do veneno de abelha em tiras de papel mostrou no mínimo 5 frações protéicas, das quais duas têm ação forte, semelhante à da histamina, sobre a musculatura lisa, não inibível por anti-histamínicos.

Ambas as frações ativas dessensibilizam o íleo da cobaia contra uma dose repetida. Uma das frações dessensibiliza contra a outra, mas não vice-versa. Outras diferenças entre as duas frações são os tempos de inibição (respectivamente, 35 e 60 segundos) e as formas das curvas cimográficas.

Tais atividades retardadas semelhantes às da histamina já foram também observadas em venenos crus de serpentes, razão pela qual comparamos a atividade sobre o músculo das duas frações do veneno de abelha com a do veneno crotálico e da crotoxina cristalizada. Parece que a maior parte da ação tóxica destas proteínas se deve à componente de atividade semelhante à da histamina.

#### ABSTRACT

Snake and insect venoms have — besides many others — actions similar to histamine. Until now it was impossible to know to what extent the action of bee venom is due to its histamine, since no reliable quantitative determinations had been carried out.

It was necessary, therefore, to determine, by means of different chemical and biological methods, the content in histamine of crude bee venom, the amount of 0,34 to 0,48% being found. This small amount cannot be responsible for the strong physiological action of this venom.

Electrophoretic separation of bee venom on filter paper resulted in at least 5 protein fractions. Two of those have a strong action on the smooth muscle, similar to histamine, which cannot be inhibited by antihistamine substances. Either one of the active fractions desensitizes the guinea pig ileum against a second dose; one of them also against the other one, but not the other way around. The two fractions also differ in their kymographic curves and in their inhibition times (35 against 60 seconds).

This delay in the onset of the histamine-like action has already been observed in the case of crude snake venoms and, therefore, the action on the muscle of the two bee venom fractions was compared with the one of *Crotalus* venom and crystallized crotoxin. It seems that the proteins similar in their action to histamine play the decisive part in the poisonous action of these venoms.

## ZUSAMMENFASSUNG

Schlangen — wie Insektengifte zeigen, neben vielen anderen, auch histaminähnliche Wirkungen. In wieweit die Wirkung des Bienengiftes auf dem darin enthaltenen Histamin beruht, war bisher nicht festzustellen, da zuverlässige quantitative Bestimmungen fehlten.

Es wurde deshalb der Histamingehalt von Rohbienengift auf verschiedenen chemischen und biologischen Wegen zu 0,34 bis 0,48% ermittelt. Daraus ergibt sich, dass diese geringe Menge nicht für die starke physiologische Wirkung dieses Giftes ausschlaggebend sein kann.

Die elektrophoretische Trennung des Bienengiftes auf Papierstreifen ergab eine Aufteilung in mindestens 5 Proteinfractionen, von denen zwei starke histaminähnliche Wirkungen auf die glatte Muskulatur aufweisen, die durch Antihistaminica nicht unterdrückt werden. Beide aktiven Fraktionen desensibilisieren den Meerschweinchen-Dünndarm gegen nochmalige Einwirkung; eine der Fraktionen hat diese Wirkung auch auf die andere Fraktion, aber nicht anders herum. Weitere Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen liegen in den verschieden langen Inhibitionszeiten (35 bzw. 60 Sekunden) und in der Form der sich ergebenden kymographischen Kurven.

Solche verzögert einsetzende histaminähnliche Wirkung ist auch schon an Schlangenrohgiften beobachtet worden, und deshalb wurde die Muskelwirkung der beiden Bienengiftfraktionen mit der von Crotalusgift und krystallisiertem Crotoxin verglichen. Es scheint, dass der überwiegende Teil der Giftwirkung dieser Proteine auf die histaminähnlich wirkende Komponente zurückzuführen ist.

## BIBLIOGRAFIA

1. Gaddum, J. H. — Brit. med. J. 1: 867, 1948.
2. Rocha e Silva, M. — Brit. med. J. 1: 799, 1952.
3. Riley, J. F. & West, G. B. — J. Physiol. 120: 528, 1953.
4. Copenhaver, J. H., Nagler, M. E. & Goth, A. — J. Pharmacol. Exp. Therap. 109: 401, 1953.
5. Block, W. — Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 294: 9, 1953.
6. Feldberg, W., Holden, H. F. & Kellaway, C. H. — J. Physiol. 94 :232, 1938.
7. Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T. & Rosenfeld, G. — Amer. J. Physiol. 156:261, 1949.
8. Marquardt, P. & Vogt, G. — Arzneimittelforschung 2: 267, 1952.
9. Feldberg, W. & Keogh, E. V. — J. Physiol. 90: 280, 1937.

10. Pénan, H., Saias, E. & Andreotti, C. — *Ann. pharmac. franc.* 10: 525, 1952.
11. Haas, H. — *Arzneimittelforschung* 1: 279, 1951.
12. Reinert, M. — *Festschr. f. E. Ch. Barel*, Basel 1936, pg. 414.
13. Tetsch, Ch. & Wolff, H. — *Biochem. Z.* 288: 126, 1936.
14. Ackermann, D. & Maurer, H. — *Pflügers Arch. f. die ges. Physiol. der Menschen u. der Tiere* 247: 630, 1944.
15. Dale, H. H. & Saidlaw, J. — *J. Pharmacol.* 4: 75, 1912.
16. Feldberg, W. & Kellaway, C. H. — *J. Physiol.* 90: 257, 1937. 94: 187, 1938.
17. Feldberg, W. & Kellaway, C. H. — *J. Physiol.* 91: 21, 1937.
18. Slotta, K. & Fraenkel-Conrat, H. L. — *Mem. Inst. Butantan* 12: 505, 1939.
19. Bier, O. G. — *Mem. Inst. Butantan* 18: 172, 1945.
20. Nygaard, A. P. — *J. Biol. Chem.* 200: 723, 1953; 204: 655, 1953.
21. Slotta, K. & Primosigh, J. — *Mem. Inst. Butantan* 24(2): 85-100, 1952.
22. Wolff, A. & Vanderau, E. M. — *Bull. Ayer Clin. Lab. Penna. Hospital* 3: 395-8, 1951.
23. D'Ans, J. & Lax, E. — *Taschenbuch f. Chemiker u. Phys.*, Ed. Springer, pg. 1593, 1943.
24. Klein, G. — *Handbuch der Pflanzenanalyse*, 1933, 4: 67-70.
25. Urbach, K. F. — *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 70: 146, 1949.
26. Cramer, F. — *Papierchromatographie*, 2.<sup>a</sup> Ed. 1953, Verlag Chemie, pg. 42.
27. Havinga, E., Seckles, L. & Strengers, Th. Jr. — *Rev. trav. chim.* 66: 605-10, 1947.
28. Miller, G. L. & Golder, R. H. — *Arch. Biochem.* 29(2): 420, 1950.
29. Grassmann, W. & Hannig, K. — *Z. physiol. Chem.* 290: 1, 1952.

