

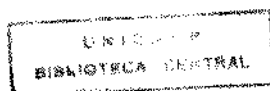
Iramaia Mendes Binhara

**LIBERAÇÃO DE SEROTONINA DE
MASTÓCITOS DE RATO INDUZIDA POR
POLIAMINOÁCIDOS CATIÔNICOS**

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na área de
Farmacologia.**

**Orientador:
Prof. Dr. Edson Antunes**

Campinas/1996



UNIDADE BC
 Nº CHAMADA: T/UNICAMP
B513L
 V. 1
 F. UNICAMP 28509
 P. 667/96

 VALOR R\$ 11,00
 DATA 11/09/96
 Nº OPD
 07100092052-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

B513L Binhara, Iramaia Mendes
 Liberação de serotonina de mastócitos de rato induzida
 por poliaminoácidos catiônicos / Iramaia Mendes Binhara.
 -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Edson Antunes.
 Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mastócitos. 2. Polilisina. 3. Serotonina. 4. Inflamação.
 I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

IRAMAIA MENDES BINHARA

**LIBERAÇÃO DE SEROTONINA DE
MASTÓCITOS DE RATO INDUZIDA POR
POLIAMINOÁCIDOS CATIÔNICOS**

**Este exemplar corresponde à versão final da
tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, na Área de
Farmacologia da Farmacêutica Bioquímica
Iramaia Mendes Binhara**

Campinas, 18 de julho de 1996


Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -

Campinas / 1996

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antônio

Membros:

1. Prof. Dr. Edson Antônio



2. Prof. Dr. Jairo Aury



3. Prof. Dra. Jairo Maria Silva de Souza Jaraus, Botucatu

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/07/96

Seguir o conhecimento como uma estrela que desaparece /
Além dos últimos limites do pensamento humano! (Dante)

À minha mãe

por ter introduzido em minha formação
o valor da aquisição de conhecimentos,
como sendo o maior bem que o ser humano
deva possuir e, por todos os sacrifícios para
que eu chegasse até aqui.

À meu pai
que em toda a sua simplicidade entendeu
e apoiou minha opção por este caminho,
depositando-me total confiança e respeito.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, por ter-me aceito como aluna no departamento e, pela feliz indicação do orientador.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, orientador e amigo, que melhor do que nenhum outro, soube conduzir o trabalho com clareza e objetividade demonstrando a competência que lhe é tão característica; assim como sua paciência, educação e compreensão em todos os momentos.

À Prof^a Dra. Helena B. Nader, Prof. Dr. Carl P. Dietrich e M. D. Nogueira, do departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, pelo fornecimento das enzimas: Condroitinase AC, Heparitinase I, Heparitinase II e Heparinase.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Marcos Garcia Costa, pelo incentivo à pesquisa e, pelos conselhos que sempre foram colocados de maneira tão atenciosa.

Aos professores da FATEC que permitiram o afastamento, e que submeteram-se a ausência do auxílio às aulas, para que este trabalho fosse realizado.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Sérgio, Dora, Solange, Gislaíne, Airton, Agnaldo, Anderson) pela atenção prestada sempre que necessário.

À Marta, que tanto auxiliou e alertou.

À todos os colegas (Soraia, Sissi, Heloísa, "Lucianas", "Renatas", Toninho, Donato, Aldete, Marcelo, Elen, Leonardo, Rogério, Kleber, Ronilson, Herick, Renato, Flávio) pela simpatia e amizade que tornam a vivência neste laboratório tão agradável.

Obrigada a todos.

ÍNDICE

Lista de Materiais	ii
Lista de Figuras	iv
Resumo	vi
1. INTRODUÇÃO	02
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Animais	21
2.2. Liberação de [¹⁴ C]5-HT de mastócitos peritoneais de rato	21
2.2.1. Obtenção do lavado peritoneal	21
2.2.2. Tratamento do lavado peritoneal	21
2.2.3. Degranulação dos mastócitos	22
2.3. Purificação das hidrolases de glicosaminoglicanos	24
2.4. Análise estatística	25
3. RESULTADOS	26
3.1. Efeito do composto 48/80, polilisina e poliarginina sobre a liberação de [¹⁴ C]5-HT de mastócitos peritoneais de rato	27
3.2. Efeito de glicosaminoglicanos sulfatados sobre a liberação de [¹⁴ C]5-HT induzida por poliarginina	32
3.3. Efeito do nitroprussiato de sódio e iloprost sobre a liberação de [¹⁴ C]5-HT induzida pela poliarginina	35
3.4. Efeito de hidrolases de glicosaminoglicanos sobre a liberação de [¹⁴ C]5-HT induzida pela poliarginina e polilisina	38
3.5. Efeito da temperatura de incubação sobre a liberação de [¹⁴ C]5-HT induzida pela poliarginina	43
4. DISCUSSÃO	44
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
7. ABSTRACT	65

Lista de Materiais

SUBSTÂNCIA

PROCEDÊNCIA

[¹⁴ C]5-HT	Amersham (Inglaterra)
ÁCIDO ACÉTICO	Merck (Alemanha)
ÁCIDO CLORÍDRICO	Merck S. A. (RJ)
AZUL DE TOLUIDINA	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
CLORETO DE CÁLCIO	Merck S. A. (RJ)
CLORETO DE POTÁSSIO	Merck S. A. (RJ)
CLORETO DE SÓDIO DIHIDRATADO	Merck S. A. (RJ)
COMPOSTO 48/80	Sigma Chem. Co (St. Louis, MO, EUA)
ÉTER ETÍLICO	Reagen Quimibrás Ind. Quím. S.A. (RJ)
FOSFATO DIÁCIDO DE SÓDIO	Reagen Quimibrás Ind. Quím. S. A. (RJ)
FOSFATO MONOÁCIDO DISSÓDICO	Reagen Quimibrás Ind. Quím. S. A. (RJ)
GLUCOSE ANIDRA	Merck S. A. (RJ)
HEPARINA	Roche (RJ)
HIDRÓXIDO DE SÓDIO	Aldrich Indústrias Químicas Ltda (Cps)
ILOPROST	Schering (Alemanha)
NITROPRUSSIATO DE SÓDIO	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
POLILISINA	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
POLIARGININA	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
POPOP	Koch Leight Laboratories Ltd (Inglaterra)
PPO	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
SULFATO DE DERMATAN	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
SULFATO DE MAGNÉSIO	Merck S. A. (RJ)
TOLUENO	Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EUA)
TRITON	Sigma Chem.I Co. (St. Louis, MO, EUA)

COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO Krebs-Ringer Fosfato (mM):

NaCl	154
KCl	6.2
CaCl ₂ H ₂ O	2.8
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5
Glicose	5.0
Tampão Fosfato pH 7.4	0.01M

COMPOSIÇÃO DO LÍQUIDO DE CINTILAÇÃO

POPOP [Dimetil-POPOP; 1,4-Di(2-(4-metil-5-feniloxazolil)-benzeno)]	0.04 g
PPO [2,5-difenil-oxazol]	4 g
TRITON x 100	333 ml
TOLUENO qsp	1000 ml

Lista de Figuras

- Figura 1:** Liberação de [^{14}C]5-HT induzida pelo composto 48/80.
- Figura 2:** Liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina.
- Figura 3:** Liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-D-lisina.
- Figura 4:** Liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-lisina.
- Figura 5:** Liberação de [^{14}C]5-HT induzida por poli-L-arginina (0.1 μM) com diferentes pesos moleculares.
- Figura 6:** Efeito inibitório da heparina sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina.
- Figura 7:** Efeito inibitório do sulfato de dermatan sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina.
- Figura 8:** Efeito do nitroprussiato de sódio (1 mM) sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina.
- Figura 9:** Efeito do iloprost (50 μM) sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina.
- Figura 10:** Efeito da heparitinase I sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, 0.1 μM) e poli-L-lisina (94.9 kD, 0.1 μM).
- Figura 11:** Efeito da heparitinase II sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, 0.1 μM) e poli-L-lisina (94.9 kD, 0.1 μM).
- Figura 12:** Efeito da heparinase sobre a liberação da [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, 0.1 μM) e poli-L-lisina (94.9, 0.1 μM)

Figura 13: Efeito da condroitinase AC sobre a liberação de [14 C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, 0.1 μ M) e poli-L-lisina (94.9 kD, 0.1 μ M).

Figura 14: Liberação de [14 C]5-HT induzida por poli-L-arginina (139 kD) em diferentes temperaturas.

RESUMO

Poli aminoácidos básicos tais como a polilisina e poliarginina produzem uma variedade de efeitos biológicos incluindo aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, inflamação pulmonar, agregação de plaquetas e ativação de mastócitos. Neste estudo, investigamos os mecanismos envolvidos na desgranulação de mastócitos induzida por poliarginina e polilisina usando-se mastócitos peritoneais isolados de ratos.

Mastócitos de 10 ratos machos Wistar (200 a 300 g) foram obtidos por injeção de solução Krebs Ringer Fosfato (KRF) na cavidade peritoneal. O lavado peritoneal foi removido e centrifugado a 300 g por 5 minutos à temperatura ambiente. A suspensão de células foi lavada com KRF e incubada com [¹⁴C]serotonina ([¹⁴C]5-HT; 40 nCi/ml) por 60 minutos. As células foram então lavadas 3 vezes em KRF. Alíquotas da suspensão celular foram aquecidas a 37°C por 20 minutos. Os agentes desgranuladores foram adicionados à suspensão. As células foram então centrifugadas (300 g, 10 minutos) e o sobrenadante removido para determinação da [¹⁴C]5-HT. A concentração de [¹⁴C]5-HT (%) foi determinada medindo-se a cintilação em contador β.

A poli-L-arginina (139.2 kD) causou liberação de [¹⁴C]5-HT dependente da dose (11 ± 5 , 67 ± 4.4 e $70.4 \pm 0.6\%$ para 0.01, 0.1 e 1 μ M, respectivamente). Respostas similares foram observadas para poli-D-lisina (94.9 kD; 4 ± 0.6 , 28 ± 6 e 41 ± 14 para 0.01, 0.1 e 1 μ M, respectivamente) e poli-L-lisina (80.4 kD; 30 ± 1 e $61 \pm 3.3\%$ para 0.1 e 1 μ M, respectivamente). A liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina foi também dependente do peso molecular do polícatión. A heparina (50 UI/ml) e o sulfato de dermatan (0.1 mg/ml) aboliram a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina. Ao contrário, as enzimas condroitinase AC, heparitinase I, heparitinase II e heparinase não modificaram a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida por este polícatión. A incubação do mastócitos em banho de gelo (0°C) também não inibiu a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina.

O mecanismo de ativação dos mastócitos por proteínas catiónicas é "inespecífico", citotóxico, provavelmente irreversível, sendo que a magnitude dos efeitos dependem da densidade de resíduos catiónicos dos compostos que interagem com os mastócitos. O desenvolvimento de análogos de heparina desprovidos de atividade anti-coagulante seria de grande utilidade como potenciais drogas antiinflamatórias.

1. INTRODUÇÃO

A migração dos leucócitos do sangue para os tecidos representa um dos aspectos mais importantes da resposta inflamatória, sendo que tais células participam ativamente dos processos de endocitose e exocitose (secreção) que ocorrem durante a fagocitose. Das células envolvidas na inflamação, algumas tais como células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais estão normalmente presentes nos tecidos enquanto outras (leucócitos) têm acesso pelo sangue (HENSON & JOHNSTON, 1987; EATON, 1995).

Um dos eventos centrais na inflamação é a ativação de leucócitos circulantes que leva ao acúmulo dessas células na área tecidual inflamada. Antes da migração, os leucócitos interagem com o endotélio vascular em vários passos sequenciais. A migração dos leucócitos inicia-se através da interação entre os leucócitos circulantes e as células endoteliais das vênulas pós-capilares dos tecidos inflamados. A interação mais visível entre tais células envolve o rolamento dos leucócitos ao longo da parede das vênulas pós-capilares, o que tem sido amplamente estudado através de técnicas de microscopia intravital (RAUD & LINDBOM, 1993). O rolamento é um evento reversível que pode ser seguido pela liberação do leucócito para a corrente sanguínea ou pela firme adesão do mesmo ao endotélio, com consequente diapedese. Assim, acredita-se que o fenômeno de rolamento possua a função de promover um contato prolongado do leucócito com o endotélio venular, evento este fundamental para o segundo passo da interação, a ativação irreversível dos leucócitos que leva à emigração dos mesmos (VON ADRIAN et

al., 1991). A adesão leucócito-endotélio é fundamental também para outros eventos da resposta inflamatória, incluindo-se a desgranulação do leucócito e sua citotoxicidade. As glicoproteínas da superfície celular que medeiam a adesão regulam tanto a resistência do contato intracelular, quanto a transdução de um sinal que controla a ativação intracelular, a desgranulação e, provavelmente, a motilidade celular. Assim, as moléculas de adesão representam um dos principais reguladores das reações inflamatórias (WEGNER et al., 1992; KUBES & KANWAR, 1994).

A ativação das células endoteliais ocorre através da expressão de vários agentes ligantes com propriedades de adesão incluindo: GMP-140 (proteína da membrana do granulócito de 140 kd), ELAM-1 (molécula de adesão leucócito-endotélio 1), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular 1). A ativação dos leucócitos ocorre principalmente através da expressão da L-selectina nestas células, que atua como um mediador primário na interação do rolamento. Embora a P-selectina seja considerada como a responsável pela fase inicial do rolamento dos leucócitos, não se sabe até o momento quem é o ligante molecular nas células endoteliais (KUBES & KANWAR, 1994).

Leucócitos polimorfonucleares

Durante o processo inflamatório, após as alterações do fluxo sanguíneo e início da exsudação, os neutrófilos começam a aderir ao revestimento endotelial

das vênulas, situação esta denominada marginação. Os neutrófilos migram para os locais onde estejam presentes os agentes inflamatórios e os fagocitam. Assim, os neutrófilos são elementos móveis de defesa do hospedeiro e representam a primeira linha de resistência contra a invasão microbiana e infecções contra agentes bacterianos. A função do neutrófilo depende de sua habilidade em perceber os fatores quimiotáticos no microambiente local, aderindo-se ao endotélio, sofrendo diapedese e destruindo os patógenos. Os neutrófilos infiltrados são coletados de sítios inflamatórios diversos, tais como ferimentos de superfície, cavidades alveolares, superfícies peritoneais e, em todos os casos, há evidência de ativação destas células. Estudos *in vitro* têm demonstrado que lipopolissacárides bacterianos, TNF (fator de necrose tumoral), interleucinas, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação de plaquetas, fatores de estimulação de colônias e o próprio processo de adesão devam ser potentes agentes capazes de promover a ativação. Há hipóteses que relacionam a adesão, exsudação e a ativação do neutrófilo às citocinas locais (YEE & CHRISTOU, 1994).

Os grânulos dos neutrófilos possuem hidrolases lisossômicas que destroem os agentes inflamatórios (bactérias fagocitadas, por exemplo) e, dessa forma, podem aumentar a intensidade da reação inflamatória. Alguns produtos da degradação dos neutrófilos são conhecidos como pirogênicos. Os pirogênicos, após serem distribuídos pelo organismo e levados ao centro de regulação da

temperatura situado no hipotálamo, atuam de forma a elevar a temperatura corporal gerando portanto, a febre.

Os eosinófilos estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata, pois mostram-se aumentados, em número, naquelas regiões em que essas reações ocorrem, assim como no sangue de indivíduos alérgicos (TEIXEIRA et al., 1995). Seus grânulos contém diversas enzimas capazes de degradar os mediadores químicos da reação inflamatória aguda. As lesões tissulares próprias das alergias, induzidas pelos eosinófilos ocorrem por intermédio da produção de mediadores citotóxicos tais como MBP (proteína básica principal), ECP (proteína catiônica eosinofílica) e EPO (peroxidase eosinofílica; GLEICH & ADOLPHSON, 1986). Todas essas proteínas catiônicas podem ser neutralizadas pela heparina que é fortemente aniônica. A proteína catiônica eosinofílica melhor caracterizada é a MBP, um polipeptídeo rico em arginina/lisina que constitui mais de 50% da proteína granular e 100% da cadeia principal de proteína do eosinófilo. A MBP é de considerável interesse na patogênese da asma brônquica, pois é altamente citotóxica para as células epiteliais aéreas, e induz alterações patológicas similares àquelas encontradas em indivíduos asmáticos (COYLE et al., 1995). A MBP aumenta a responsividade aérea *in vivo*, um efeito mimetizado pelas proteínas catiônicas sintéticas tais como poli-L-arginina e poli-L-lisina, sugerindo que a alta carga catiônica de MBP deva ser a responsável por tal efeito (COYLE et al., 1993, 1994a,b). Após a injeção de MBP na pele, a mesma é incorporada pelos

mastócitos que, por sua vez, neutralizam sua carga e limitam sua atividade (HALPERN, 1992). As proteínas catiônicas de grânulos de eosinófilos incluindo EPO, ECP e MBP modulam, ainda, a via alternativa do complemento e devem ter um papel importante na sua regulação (YOUNG, 1986;). As enzimas dos grânulos de eosinófilos são representados pela aril-sulfatase e histaminase. Os eosinófilos fagocitam e digerem os grânulos liberados pelos mastócitos sugerindo assim, sua participação local na regulação do controle da intensidade da inflamação alérgica aguda.

Os mastócitos e os basófilos são os dois principais tipos celulares envolvidos no desencadeamento das reações alérgicas humanas, pois possuem receptores de alta afinidade para IgE em suas membranas plasmáticas. Outros elementos sanguíneos tais como monócitos, eosinófilos e plaquetas possuem baixa afinidade a esses receptores, mas provavelmente estão também diretamente envolvidos nessas reações (ENERBÄCK, 1987). Os grânulos dos basófilos são análogos aos dos mastócitos. Durante a desgranulação destas células, há liberação de histamina, leucotrienos e fator quimiotáxico para eosinófilos (ECF-A). Os mastócitos maduros encontram-se nos tecidos, enquanto que os basófilos são detectados na circulação, porém migram para os tecidos nos processos de hipersensibilidade do tipo retardada e também em reações ectoparasitárias (SCHWARTZ, 1987).

A coloração metacromática de basófilos e mastócitos é devida à presença de proteoglicanos em seus grânulos. Existem diferenças nos

proteoglicanos presentes nos diferentes tipos celulares. Os mastócitos do tecido conjuntivo contêm heparina enquanto que os da mucosa possuem sulfato de condroitina. Os basófilos por sua vez, contêm monossulfato de condroitina.

Mastócitos

Os mastócitos estão amplamente distribuídos nos tecidos e contêm grânulos metacromáticos e elétron-densos; são capazes de armazenar e sintetizar histamina e serotonina (5-HT) e, possuem alta afinidade a receptores IgE. Os mastócitos diferem em seu conteúdo de glicosaminoglicanos representado nestas células principalmente pela heparina (BIENENSTOCK et al., 1987).

Os mastócitos dos diferentes tecidos apresentam propriedades funcionais, químicas e histoquímicas diferentes. Através de seus mediadores, os mastócitos estão envolvidos em diversos tipos de processos inflamatórios agudos e crônicos (ZUCKER-FRANKLIN, 1981). Podem influenciar a fagocitose, a quimiotaxise e a atividade imune em várias vias das células B e T. Estas células atuam na hipersensibilidade retardada, hipersensibilidade imediata e em reações granulomatosas. Estão envolvidos ainda nos processos de reparo influenciando na função dos fibroblastos e portanto, na fibrose. Seu crescimento deve ser influenciado pelos fatores derivados das células T, assim como fatores derivados do epitélio. Parecem estar intimamente relacionados

com os nervos e podem formar comunicações aparentes com os neurônios, especialmente aqueles contendo a substância P, que leva à desgranulação dos mesmos.

Os mastócitos atuam como um controle entre o sistema nervoso central, a migração e os tipos celulares do processo inflamatório (BIENENSTOCK et al., 1987), através de uma comunicação funcional bidirecional. O número anormal de mastócitos assim como o aumento de sua atividade leva à alterações nas interações neuro-imunes com implicações significantes em várias doenças.

Os mastócitos produzem e respondem a uma variedade de citocinas; como estes mediadores afetam a síntese de NGF (fator de crescimento neural), diferenças na citocina tecidual e na expressão de NGF devem levar a um feedback positivo para a regulação parácrina/autócrina das propriedades dos mastócitos (ALOE et al., 1993; LEON, et al., 1994).

Existem basicamente dois tipos de mastócitos: os da mucosa e os do tecido conectivo (BEFUS et al., 1982). Os mastócitos humanos são ricos em heparina e exibem uma baixa concentração de eletrólitos, sugerindo a existência de uma baixa densidade de carga e/ou peso molecular do glicosaminoglicano nos mesmos (ENERBÄCK, 1987).

Nos mastócitos de ratos, existem grânulos contendo glicosaminoglicanos (principalmente sulfato de condroitina) e várias proteínas, as quais formam uma matriz onde ocorre a ligação com componentes de baixo peso molecular como, por exemplo, a histamina (também presente em mastócitos humanos) e a 5-HT.

Essas aminas estão unidas por ligações iônicas fracas a sítios aniônicos, provavelmente carboxilas. As ligações iônicas entre glicosaminoglicanos e proteínas devem ser as responsáveis pela integridade dos grânulos de mastócitos. A ligação das aminas biogênicas aos proteoglicanos é favorecida pelo pH ácido dos grânulos secretores.

A função dos mastócitos está ligada à sua capacidade secretora. Nos mastócitos peritoneais de rato, o *turnover* de heparina e 5-HT é muito baixo, sugerindo que esta atividade secretora é pequena sob condições fisiológicas. Vários compostos que são liberados ou sintetizados como consequência desta atividade secretora são potentes mediadores inflamatórios. Acredita-se que os mastócitos tenham um papel protetor em infecções, mas ainda não existem evidências conclusivas para este fato. Os mediadores derivados dos mastócitos devem aumentar a permeabilidade das mucosas, facilitando o transporte de macromoléculas através da barreira mucosa no lúmen intestinal. Os mastócitos tem um papel ativo na deposição intracelular de ésteres de colesterol, deposição esta que é característica das lesões iniciais ateroscleróticas (KOVANEN, 1993).

A desgranulação de mastócitos pode ser induzida através de secretagogos como, por exemplo, poliaminas (composto 48/80, polimixina B) ou ionóforos de cálcio. O composto 48/80 representa um dos principais agentes desgranuladores empregados em pesquisa, para se entender o mecanismo de extrusão dos grânulos dos mastócitos (LAGUNOFF, 1973; BASHKIN et al., 1990; LLORET & MORENO, 1995). Existe uma correlação entre as mudanças

estruturais nos grânulos de mastócitos e as quantidades deste agente liberador no meio de incubação (BLOOM & HAEGERMARK, 1965). Existe um receptor específico para o composto 48/80, responsável pelo desencadeamento da liberação da histamina (HINO et al., 1977). A liberação de histamina de mastócitos de ratos induzida por este composto, não é dependente de cálcio extracelular, mas sim do ácido siálico ligado às membranas. Esses achados sugerem que os resíduos de ácido siálico da membrana do mastócito constituem o sítio onde os polícatíons exercem suas ações estimulantes de liberação de histamina (ADAMCZYK-ENGELMANN & BADER, 1989).

Indivíduos alérgicos podem degranular os mastócitos liberando conseqüentemente histamina e outras substâncias espasmógenas envolvidas na broncoconstrição. Aparentemente, isto representa um mecanismo de defesa inicial, visando impedir que o antígeno penetre nas vias respiratórias inferiores. A heparina liberada pelos mastócitos pode limitar a reação inflamatória frente ao antígeno (HALPERN, 1992). Foi proposto recentemente que o óxido nítrico e, conseqüentemente, o acúmulo de GMP cíclico, modulam a desgranulação de mastócitos, levando a uma diminuição da liberação de histamina (SALVEMINI et al., 1994).

Além de histamina e 5-HT, os mastócitos sintetizam e secretam outros mediadores tais como endorfinas, cininas, leucotrienos, prostaglandinas, peptídeo intestinal vasoativo, enzimas proteolíticas (triptase, quimase, carboxipeptidase e proteinases (catepsina G) e fosfolipases os quais possuem

efeitos fisiopatológicos nos tecidos neurais e vasculares (DIMITRIADOU et al., 1990; HARVIMA et al., 1994). Além disso, os mastócitos sintetizam diversas citocinas (BROID, 1994) incluindo interleucina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, interferon gama, GM-CSF (fator de estimulação de colônia de macrófago granulócito), MIP-1 (família de proteína inflamatória de macrófago-1), TGF- β (fator β de crescimento e transformação), TNF α (fator de necrose tumoral α ; (HARVIMA et al., 1994; WASSERMAN, 1994; PLYTYCZ, 1995).

Os mediadores liberados de mastócitos humanos dividem-se em duas categorias distintas: os pré-formados (ou primários) e os neoformados (ou mediadores secundários). Os pré-formados são armazenados e liberados dos grânulos secretores. Consistem principalmente da histamina (ou 5-HT), proteoglicanos (heparina ou sulfato de condroitina) e várias enzimas (triptases, quimases e hidrolases ácidas). Destas enzimas, a triptase é um bom marcador para mastócitos e, pode ser encontrada em fluidos biológicos após a ativação destas células. Em sua forma ativa tetramérica, esta enzima é estabilizada pela associação com a heparina (e, possivelmente, também com outros proteoglicanos). Quando livre em solução, as subunidades da triptase dissociam-se rapidamente em monômeros inativos (SCHWARTZ, 1987). Mastócitos cutâneos sintetizam também a quimase. Ao contrário da triptase, a quimase não está presente em todos os mastócitos, mas somente naqueles presentes na mucosa do intestino delgado. Como a triptase, a quimase é armazenada nos grânulos secretores de mastócitos na forma ativa e se

encontra ligada à proteoglicanos carregados negativamente. A quimase também tem a capacidade de degradar os componentes da membrana na junção derme/epiderme e facilitar a separação dessas regiões cutâneas (SCHWARTZ, 1987). Existem ainda outros mediadores pré-formados (mediadores primários), associados a grânulos como o fator quimiotático para eosinófilo de anafilaxia (ECF-A), o fator quimiotático para neutrófilo (NCF), algumas hidrolases lisossomais e, uma variedade de outras enzimas.

Os mediadores neoformados não estão normalmente presentes nos mastócitos mas são sintetizados *de novo* e secretados imediatamente após a ativação das células por mecanismos independentes da exocitose de grânulos secretores. Estes mediadores incluem metabólitos do ácido araquidônico (LTC_4 , PGD_2), o fator ativador de plaquetas (PAF) e adenosina (SCHWARTZ, 1987).

A histamina, 5-HT, LTC_4 (leucotrieno C_4), PAF (fator de ativação plaquetária) e, possivelmente, a triptase aumentam a permeabilidade vascular promovendo, conseqüentemente edema inflamatório. Os mediadores com atividades anticoagulantes como a heparina e a triptase parecem facilitar a dispersão de ultrafiltrados plasmáticos nos tecidos. Ao contrário, o PAF causa agregação de plaquetas, e a quimase promove vasoconstrição arteriolar pela geração de angiotensina II (SCHWARTZ, 1987; AMON et al., 1994).

PROTEOGLICANOS DE MASTÓCITOS

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos encontrados em tecidos animais em associação covalente com proteínas. Esses polissacarídeos diferenciam-se de acordo com a composição do monômero, a posição e configuração das ligações glicosídicas e pela localização de seus grupamentos sulfato. O hialuronato e o sulfato de condroitina (STEVENS et al., 1988; SUGUMARAN & SILBERT, 1989) têm estruturas mais simples, enquanto outros tais como o sulfato de dermatan e a heparina (SCULLY & ELLIS, 1986) contêm diferentes unidades de dissacarídeos arranjados em blocos ou em sequências complexas menos ordenadas (DAVIDSON et al., 1990). Os glicosaminoglicanos são essenciais na manutenção da integridade estrutural de muitos tecidos conjuntivos e têm sido associados à funções físico-químicas como, por exemplo, ligação de água e microíons e regulação e distribuição de várias moléculas por exclusão estérica. Várias macromoléculas ligam-se aos glicosaminoglicanos, sendo a maioria delas de natureza proteica.

Existem vários tipos de ligação pelas quais os glicosaminoglicanos estão ligados à superfícies celulares:

- 1) Ligação eletrostática cooperativa, que é facilitada pelo aumento da densidade de carga dos polissacarídeos e por fatores estereoquímicos.

- 2) Ligação altamente específica do tipo chave-fechadura, onde o polissacarídeo não pode ser substituído por outro glicosaminoglicano.
- 3) Interação entre heparina e antitrombina, que envolve um sítio de ligação na molécula de heparina composta por 6 unidades de dissacarídeos arranjados em uma ou mais sequências específicas.
- 4) Formação de agregados de proteoglicanos na cartilagem, por ligação específica da proteína do proteoglicano ao hialuronato.

O estudo dessas ligações deve revelar importantes interações e prever sua especificidade e definir os mecanismos de regulação e elaboração dessas estruturas durante a biossíntese dos glicosaminoglicanos.

Os mastócitos contém principalmente a heparina e o sulfato de condroitina (NADER et al., 1987). Acredita-se que a maior função dos proteoglicanos mastocitários seja a de interagir com proteases contidas nos grânulos secretores as quais são carregadas positivamente (ATKINS et al., 1985; ENERBÄCK et al., 1985). Todos os mastócitos de mamíferos apresentam grandes quantidades de serino-proteases que são enzimaticamente ativas em pH neutro (STEVENS, 1989).

Os proteoglicanos liberados pelos mastócitos são moléculas muito aniônicas que fixam-se à histamina nos grânulos dos mastócitos. Acredita-se que essas moléculas ajam como moléculas antiinflamatórias naturais. A heparina é capaz, por exemplo, de inibir a anafilaxia. Além disso, alguns casos

clínicos mostram que a heparina pode modificar as respostas alérgicas da pele e do sistema respiratório (HANAHOE & JONES, 1988).

POLICÁTIIONS

Os policátions são polímeros que ocorrem naturalmente no organismo e são liberados de leucócitos ativados e plaquetas. A interação de policátions com superfícies carregadas negativamente (SKUTELSKY & DANON, 1976; GAD et al., 1982) de diversos tipos celulares (leucócitos, endotélio, mastócitos e macrófagos) leva a respostas biológicas variadas que incluem edema de pata de rato (ANTUNES et al., 1990), edema em pele de coelho (NEEDHAM et al., 1988), liberação de histamina *in vitro* (ENNIS et al., 1980), migração de leucócitos *in vivo* (SANTANA et al., 1993), ativação plaquetária (MARCONDES et al., 1993; Donato et al., 1996) e liberação de prostaglandinas (SHIER et al., 1984; SHIER & DUBOURDIEU, 1986).

Proteínas catiônicas sintéticas tais como poliarginina, polilisina e MPB promovem broncoconstrição por interagirem com os sítios aniônicos do epitélio das vias aéreas o que resulta em disfunção do músculo liso (COYLE et al., 1993, 1994; SPINA & GOLDIE, 1994; SAUMON et al., 1995). Os efeitos dessas proteínas parecem ser devidos à sua natureza catiônica visto que os mesmos são inibidos por moléculas polianiónicas (COYLE et al., 1993).

As proteínas catiônicas podem também ativar as fibras sensoriais do tipo C nas vias aéreas, um efeito importante para o desenvolvimento subsequente da hiperresponsividade aérea e extravasamento de proteína plasmática. Nesse caso, as proteínas catiônicas parecem funcionar através de uma ligação entre as células inflamatórias acumuladas e os nervos sensoriais ativados (COYLE et al., 1994).

Alguns polipeptídios catiônicos tais como sulfato de protamina, histona, MBP, proteínas antimicrobianas catiônicas de neutrófilos, polilisina e poliarginina possuem efeitos tóxicos nas células procarióticas e/ou eucarióticas (VEHASKARI et al., 1984; CHANG et al., 1987; UCHIDA et al., 1992, 1993).

Os estudos feitos com os polipeptídios catiônicos sintéticos na permeabilidade da membrana do epitélio da bexiga urinária demonstram que, a natureza catiônica (peso molecular elevado, alta densidade de carga) das proteínas é o fator decisivo para o aumento da condutância da membrana (TZAN, 1993).

A injeção intrapleural de poli-L-arginina evoca a formação de exsudato inflamatório e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (SANTANA et al., 1993). Estes efeitos foram marcadamente reduzidos em animais pré-tratados com ciproheptadine (antagonistas de histamina e serotonina) ou em animais depletados de seus estoques de histamina e serotonina. Isto indica que tais alterações são dependentes da ativação de mastócitos *in vivo* (SANTANA et al., 1993). A heparina e o sulfato de dermatan também reduziram significativamente

o edema inflamatório indicando que tal fenômeno é dependente do conteúdo catiônico do polícatión. Quando administrada pela via intratraqueal, a poli-L-arginina produz edema pulmonar, migração de leucócitos, insuficiência respiratória e morte em 60% dos animais (SANTANA et al., 1993). A depleção dos estoques de histamina e 5-HT ou dos leucócitos circulantes causa a diminuição dos leucócitos no lavado broncoalveolar, mas não aumenta a sobrevivência dos animais. Entretanto, o sulfato de dermatan preveniu completamente a mortalidade, sugerindo que tais alterações são dependentes de interações eletrostáticas do polícatión com superfícies aniônicas presentes no epitélio pulmonar.

OBJETIVOS

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- 1) Investigar os efeitos da poliarginina e polilisina sobre a desgranulação *in vitro* de mastócitos peritoneais de rato, avaliando-se, para tanto, a liberação de [¹⁴C]5-HT de tais células.

- 2) Investigar a importância do conteúdo catiônico dos policátions sobre a desgranulação de mastócitos. Com este fim, foram examinados os efeitos de poliânions (heparina e sulfato de dermatan) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT.

- 3) Investigar se os glicosaminoglicanos de mastócitos atuam como "receptores" para policátions. Para tanto, foram avaliados os efeitos de algumas hidrolases de glicosaminoglicanos (condroitinase AC, heparitinase I, heparitinase II e heparinase) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar (250-300 g), procedentes do Biotério Central da Unicamp.

2.2. LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT DE MASTÓCITOS PERITONEAIS DE RATO

2.2.1. OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL

Ratos machos Wistar, mantidos com água e ração *ad libitum*, foram anestesiados com éter etílico. Em seguida, foram exsanguinados e injetados com 10 ml de solução Krebs-Ringer-Fosfato (KRF) na cavidade peritoneal, massageando o abdômen do animal por 5 minutos. Coletou-se de 8 a 10 ml de lavado peritoneal por rato, os quais foram adicionados a tubos de ensaio plásticos. Em cada experimento, utilizou-se de 5 a 7 ratos.

2.2.2. TRATAMENTO DO LAVADO PERITONEAL

O lavado peritoneal recolhido foi submetido a centrifugação (1000 rpm, 5 minutos) após a qual, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 ml do tampão a cada precipitado obtido. Após suave homogeneização, todas as suspensões celulares obtidas foram reunidas em um único tubo de ensaio.

Desta amostra, retirou-se 0.5 ml para o tubo *COLD* (amostra na qual não se adicionou a [^{14}C]5-HT, i.é., controle negativo do experimento; ver adiante) e 0.1 ml para a contagem de mastócitos em câmara de Neubauer. Em seguida, ao restante da suspensão, foi adicionado [^{14}C]5-HT (40 nCi/ml). A mesma foi homogeneizada suavemente e incubada a 37°C por 60 minutos. Após este tempo, procedeu-se a 3 lavagens com solução tampão KRF, através de centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos (COLEMAN et al., 1981).

2.2.3. DESGRANULAÇÃO DOS MASTÓCITOS PELOS POLICÁTIONS OU COMPOSTO 48/80

Ao tubo denominado 2 foi acrescentado, além de 0.5 ml da suspensão de mastócitos, 0.5 ml de solução tampão KRF.

Ao tubo 3, além de 0.5 ml da suspensão de mastócitos + 0.4 ml da solução tampão KRF, foi acrescentado 0.1 ml do composto 48/80 (controle positivo)

Nos tubos 4 a 10, foi acrescentado, além da suspensão de mastócitos incubada com [^{14}C]5-HT e a solução tampão KRF (0.4 ml); o policátion em estudo (0.1 ml).

O volume final de cada tubo sempre foi de 1.0 ml.

Nos protocolos experimentais onde investigou-se o efeito de poliânions, hidrolases de glicosaminoglicanos, iloprost e nitroprussiato de sódio, os

mesmos foram adicionados à suspensão celular antes dos agentes desgranuladores, em volumes fixos de 0.1 ml e incubados à 37°C por 10 minutos. Todas as amostras foram realizadas em duplicatas. Após a adição do polícatión, os tubos permaneceram em banho-maria (37°C) por mais 20 minutos, sendo colocados imediatamente após em banho de gelo para interrupção da reação. Em seguida, os tubos foram centrifugados (1000 rpm, 5 minutos) e os sobrenadantes separados dos resíduos.

Aos tubos resíduo, acrescentou-se 1 ml de solução tampão KRF e os mesmos foram homogeneizados. Em seguida, a todos os tubos (resíduos e sobrenadantes) foi adicionado 10 ml de líquido de cintilação e colocados em contador β para contagem da radioatividade. Os resultados foram expressos através do cálculo da percentagem de liberação de [¹⁴C]5-HT, da seguinte forma:

$$\% \text{ LIBERAÇÃO DE } [^{14}\text{C}]5\text{-HT} = \frac{\text{CPM Sobrenadante} - \text{CPM 2S}}{\Sigma \text{ CPM} - \text{CPM 2S}}$$

onde:

CPM sobrenadante: contagem por minuto dos tubos contendo os sobrenadantes obtidos.

CPM 2S: contagem por minuto relativa ao tubo 2S

2.3. PURIFICAÇÃO DAS HIDROLASES DE GLICOSAMINOGLICANOS PROVENIENTES DA *Flavobacterium heparinum*

As enzimas utilizadas (condroitinase Ac, heparinase, heparitinase I e heparitinase II) foram gentilmente cedidas pelos professores Helena Nader e Carl P. Dietrich da Escola Paulista de Medicina e foram extraídas da bactéria *Flavobacterium heparinum* (ATCC 13125). Esta bactéria foi cultivada em meio ágar mais tripticase e depois transferida para 50 ml de um meio líquido, contendo glicose e bactopectona, por aproximadamente 15 horas. Em seguida, foi transferida para um líquido de indução contendo 150 mg/ml de heparina por 16 horas. O líquido foi centrifugado a 4000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o resíduo foi ressuspensão em 10 ml de tampão EDA, pH 7.0 a 0.1M. Em seguida, esta solução foi sonicada por 5 minutos em pulsos de 30 seg/minuto. Durante todo o processo, a solução foi mantida em gelo. Após a sonicação, a mistura foi centrifugada a 100.000 g por 60 minutos. Do sobrenadante obtivemos o extrato bruto das enzimas, o qual foi aplicado a uma coluna de DEAE-celulose (2 x 20 cm), previamente equilibrada com acetato de etileno diamida 0.1 M, pH 7.0. Frações de 10 ml foram coletadas com um fluxo de 20 ml/h. Estas frações foram ensaiadas com diferentes substratos (ver abaixo). As frações contendo atividade enzimática foram concentradas sob pressão de diálise e nitrogênio e, em seguida, aplicadas em coluna de Bio-Gel A-0.5m (4 x 135 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Frações de

10 ml coletadas e alíquotas destas frações foram ensaiadas com diferentes substratos. As frações contendo heparinase, heparitinase I, heparitinase II e condroitinase AC foram concentradas sob pressão de diálise e nitrogênio e adicionadas em 2 ml de acetato de etileno diamida, pH 7.0 e aplicadas em coluna de carboximetil celulose (1 x 10 cm). As enzimas foram eluídas da coluna com diferentes molaridades (0.01-0.1 M) de acetato de etileno diamida, pH 7.0. O ensaio das enzimas foi realizado conforme descrito a seguir. Alíquotas de 10 μ l de enzima foram incubadas 24 h com 100 μ g de substrato em tampão de acetato de etileno diamida (pH 7.0) com volume final de 20 μ l. A mistura foi aplicada em papel Whatman n°1 e submetida a corrida cromatográfica por 48 h, utilizando como solvente o ácido isobutírico, 1 M NH_3 (5/3, v/v). Os produtos formados foram detectados em lâmpada de UV e revelados com nitrato de prata ou azul de toluidina. Alternativamente, os produtos insaturados foram quantificados por espectrofotometria a 230 nm em um tampão KCl -HCl 0.1 M, pH 2.0.

2.4. ANÁLISE ESTADÍSTICA

Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias. A análise estatística dos dados foi feita através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* de Student não pareado. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

3.1. EFEITO DO COMPOSTO 48/80, POLILISINA E POLIARGININA SOBRE A LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT DE MASTÓCITOS PERITONEAIS DE RATO

A figura 1 mostra que o composto 48/80 (1-30 µg/ml, n=6) causou liberação de [¹⁴C]5-HT dependente da dose sendo que a resposta máxima (55.9 ± 2.50%) foi atingida com concentrações de 10 µg/ml deste composto.

Resultados semelhantes foram observados com a poliarginina. Nas concentrações de 0.01 a 10 µg/ml, a poli-L-arginina (139.2 kD) causou liberação de [¹⁴C]5-HT dependente da dose sendo que a resposta máxima (67.4 ± 4.50%, n=4-6) foi atingida com concentrações de 0.1 µM deste composto (Figura 2). Os poliaminoácidos poli-D-lisina (80.4 kD; 0.01-10 µM, n=6) e poli-L-lisina (94.9 kD; 0.1 e 1 µM, n=7-8) também causaram liberação de [¹⁴C]5-HT dependente da dose (Figuras 3 e 4). Entretanto, quando testadas no mesmo ensaio, a poli-L-arginina mostrou-se mais potente do que a poli-D-lisina (ED₂₅: 0.02 e 0.08 µM para poli-L-arginina e poli-D-lisina, respectivamente; P<0.05).

A figura 5 mostra que a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina foi também dependente do peso molecular deste polícatión (n=6). Foi observado que, embora utilizados na mesma concentração (0.1µM), a poli-L-arginina de peso molecularr baixo (11.6 kD) causou liberação de [¹⁴C]5-HT significativamente menor do que aqueles de peso molecular maior (45.5 e 139.2 kD).

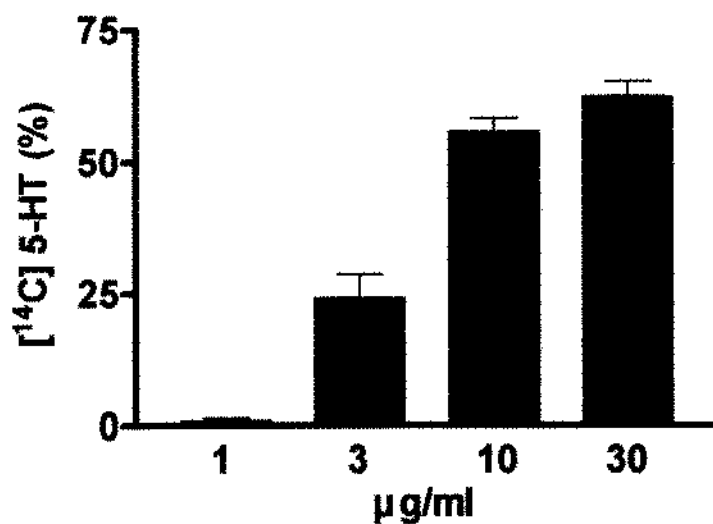


Figura 1: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pelo composto 48/80. O composto 48/80 foi empregado nas doses de 1 a 30 µg/ml. O resultado está expresso como médias (n= 6) ± erro padrão das médias.

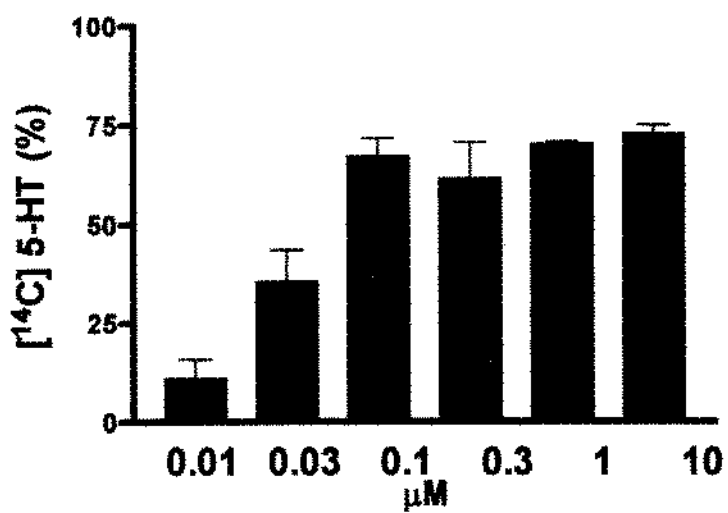


Figura 2: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina. As concentrações utilizadas de poli-L-arginina (139 kD) foram de 0.01 a 10 μM. Cada ponto da curva representa a média de 4 a 6 experimentos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias.

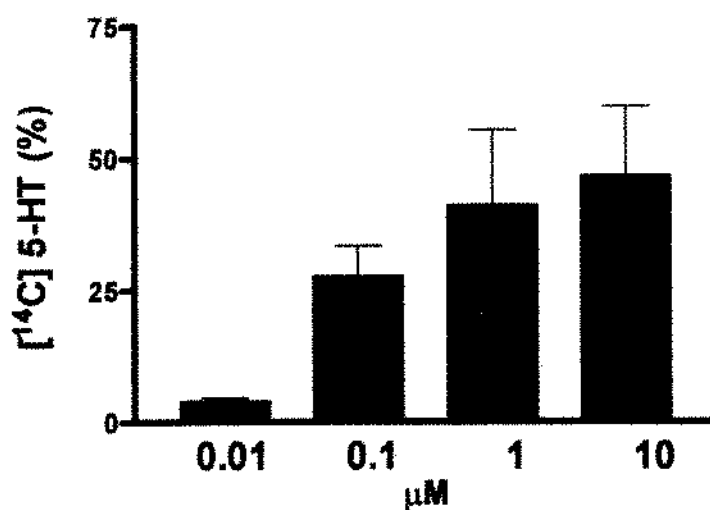


Figura 3: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-D-lisina. A poli-D-lisina (80.4 kD) foi utilizada em concentrações crescentes de 0.01 a 10 μM. Cada ponto da curva representa a média de 5 a 6 experimentos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias.

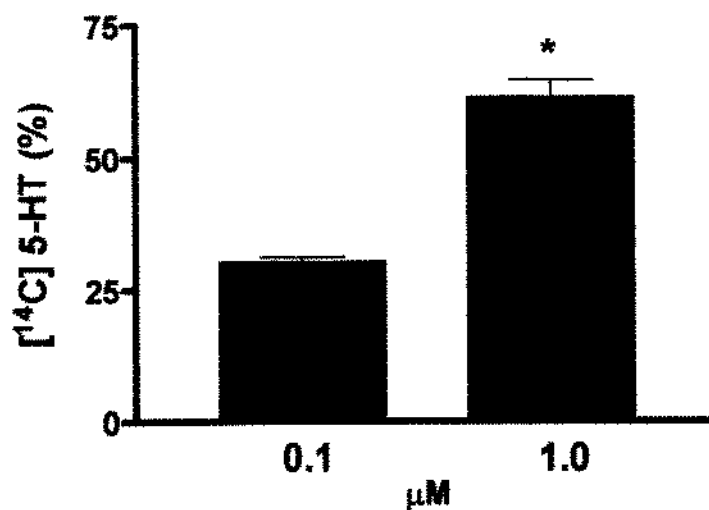


Figura 4: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-lisina. As concentrações utilizadas de poli-L-lisina (94.9 kD) foram de 0.1 e 1 μM. Cada ponto da curva representa a média de 7 a 8 experimentos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias. *P<0.05 em relação à concentração de 0.1 μM de poli-L-lisina.

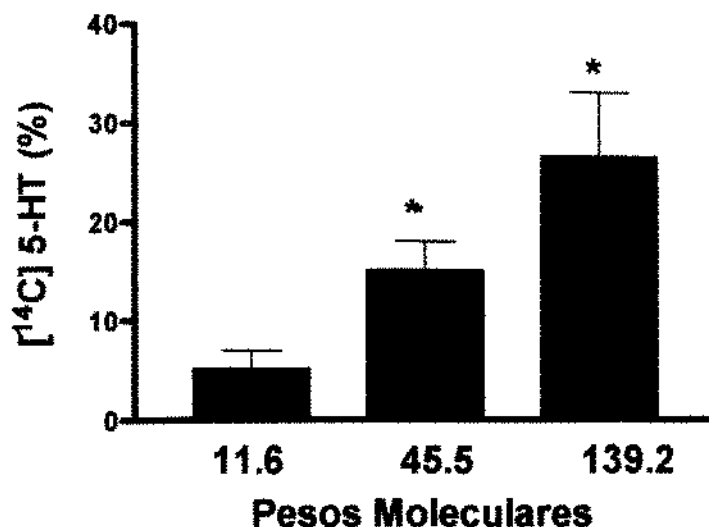


Figura 5: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida por poli-L-arginina (0.1 μM) em diferentes pesos moleculares. Cada ponto da curva representa a média de 6 experimentos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias. *P<0.05 em relação à liberação evocada pela poli-L-arginina de 11.6 kD.

3.2. EFEITO DE GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT INDUZIDA POR POLIARGININA

A importância do conteúdo catiônico dos policátions sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT foi investigada usando-se dois glicosaminoglicanos sulfatados: a heparina e o sulfato de dermatan.

A incubação prévia da suspensão de mastócitos com heparina (50 UI/ml, n=4) por 10 minutos (37°C) praticamente aboliu (P<0.01) a capacidade

liberadora de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina em quaisquer das concentrações estudadas (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados para o sulfato de dermatan (Figura 7). Na concentração de 1 mg/ml, o sulfato de dermatan praticamente aboliu a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (0.1 μM).

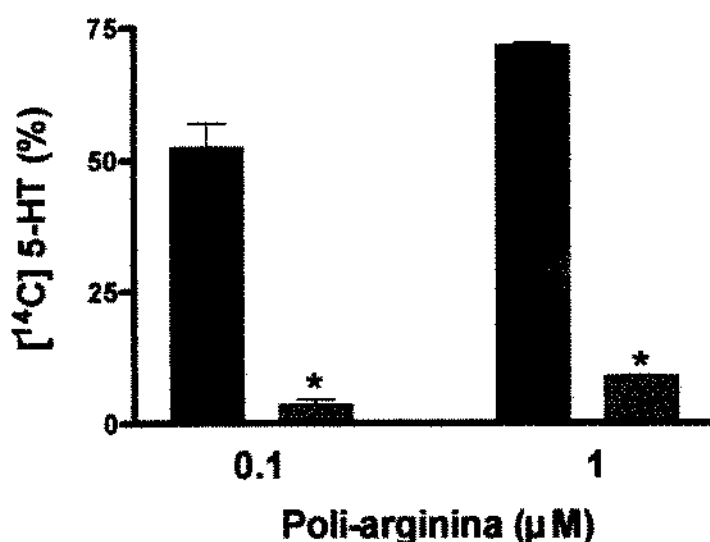


Figura 6: Efeito inibitório da heparina sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD). O polication foi empregado nas concentrações de 0.1 μM e 1.0 μM . A heparina (50 UI/ml) foi incubada (37°C, 10 minutos) com a suspensão de mastócitos antes da adição do polication em estudo. As barras sólidas e hachureadas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de heparina. Cada ponto da curva representa a média de 4 experimentos. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias. * $P < 0.05$ em relação aos controles.

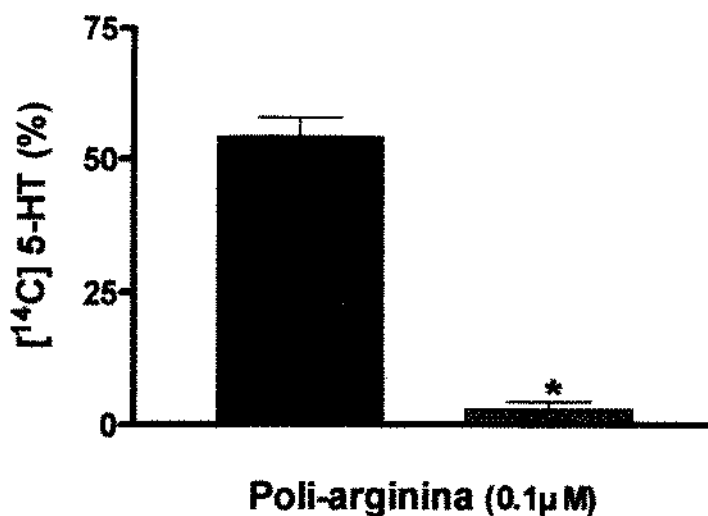


Figura 7: Efeito inibitório do sulfato de dermatan sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD). O polícatión foi empregado na concentração de 0.1 µM. O sulfato de dermatan (1 mg/ml) foi incubado (37°C, 10 minutos) com a suspensão de mastócitos antes da adição do polícatión em estudo. As barras sólidas e hachureadas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de sulfato de heparan. Cada ponto da curva representa a média de 4 experimentos. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão das médias. *P<0.05 em relação ao controle.

3.3. EFEITO DO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E ILOPROST SOBRE A LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT INDUZIDA PELA POLIARGININA

O efeito do nitroprussiato de sódio (ativador da guanil ciclase solúvel) e iloprost (ativador da adenil ciclase) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina foi avaliado incubando-se estas drogas com a suspensão celular por 10 minutos (37°C) antes da adição de poli-L-arginina (92 kD, 0.1 μM). A figura 8 mostra que em concentrações de 1 mM (n=4), o nitroprussiato de sódio não modificou de modo significativo a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina. Igualmente, o iloprost (50 μM, n=4) foi incapaz de interferir com a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (Figura 9).

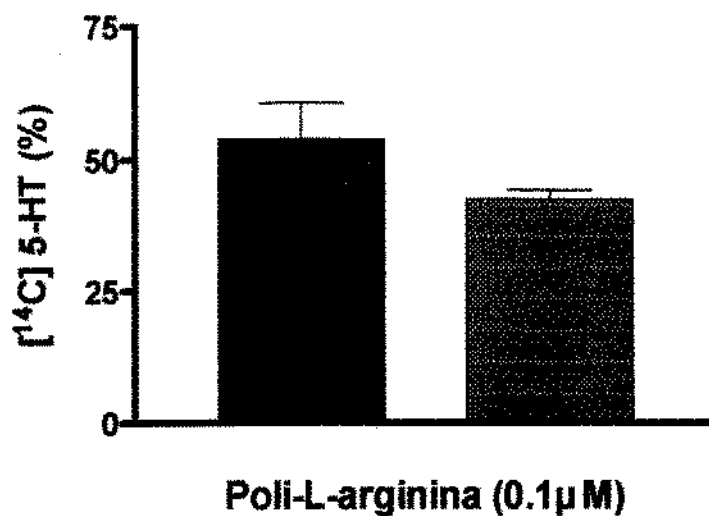


Figura 8: Efeito do nitroprussiato de sódio (1 mM) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (0.1 μM). O nitroprussiato de sódio foi previamente incubado (37°C, 10 minutos) à suspensão de mastócitos antes da adição de poli-L-arginina (139 kD). A barra sólida e hachureada corresponde, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de nitroprussiato de sódio. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n= 6).

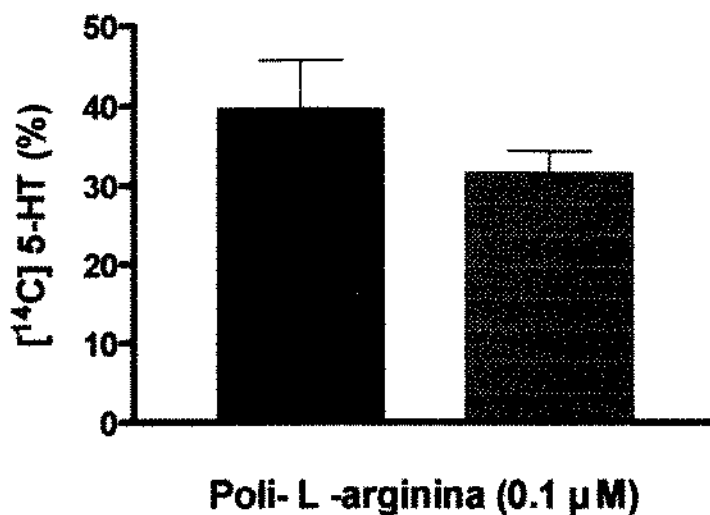


Figura 9: Efeito do iloprost (50 μ M) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (0.1 μ M). O iloprost foi previamente incubado (37°C, 10 minutos) com a suspensão de mastócitos antes da adição de poli-L-arginina (139 kD). A barra sólida e hachureada corresponde, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de iloprost. Os resultados representam a média \pm erro padrão das médias de 4 experimentos.

3.4. EFEITO DE HIDROLASES DE GLICOSAMINOGLICANOS SOBRE A LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT INDUZIDA PELA POLIARGININA E POLILISINA

As seguintes hidrolases de glicosaminoglicanos foram estudadas quanto à sua capacidade de interferir com a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pelos polications acima: heparitinase I (enzima responsável pela degradação do sulfato de heparan e destituída de efeito sobre a heparina), heparitinase II (enzima responsável pela degradação do sulfato de heparan e, parcialmente, da heparina), heparinase (enzima responsável pela degradação da heparina sendo destituída de efeito sobre os sulfatos de heparan) e condroitinase AC (enzima responsável pela degradação do sulfato de condroitina). Estas enzimas foram incubadas com a suspensão celular por 10 minutos (37°C) antes da adição do polication.

As figuras 10, 11 e 12 ilustram, respectivamente, que a heparitinase I, heparitinase II e heparinase, todas na dose de 400 UI/ml, não modificaram de modo significativo a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina e poli-L-lisina. Com relação à condroitinase AC, verificamos que a mesma não interferiu com a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (Figura 13) mas, causou inibição pequena (porém significativa; $P < 0.05$) sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poli-L-lisina (Figura 13).

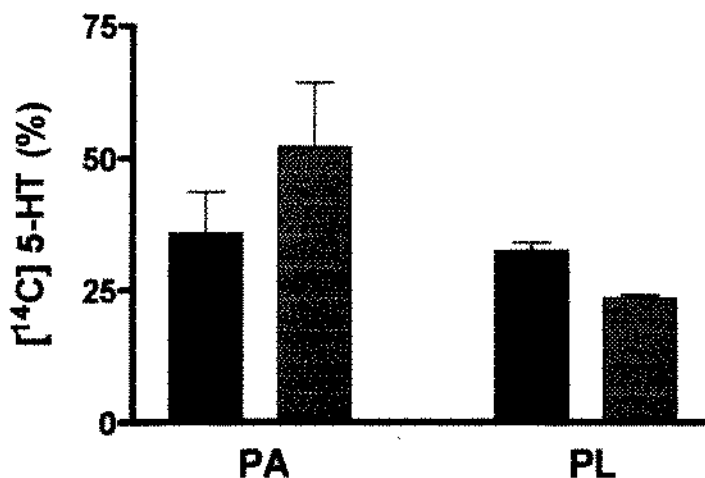


Figura 10: Efeito da heparitinase I sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, $0.1\mu\text{M}$) e poli-L-lisina (94.0 kD, $0.1\mu\text{M}$). A heparitinase I foi previamente incubada (37°C , 10 minutos) à suspensão de mastócitos antes da adição da poli-L-arginina (PA) ou poli-L-lisina (PL). As barras sólidas e hachuradas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de heparitinase I. Os resultados representam a média \pm erro padrão das médias de 4 experimentos.

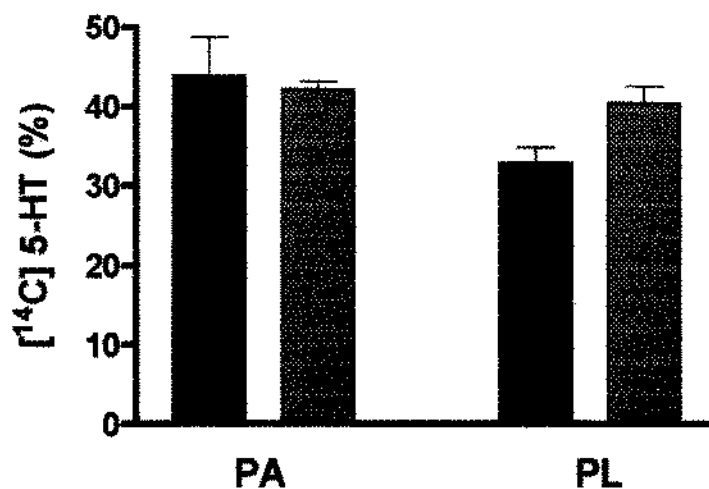


Figura11: Efeito da heparitinase II sobre a liberação de $[^{14}\text{C}]5\text{-HT}$ induzida pela poli-L-arginina (139 kD, $0.1\mu\text{M}$) e poli-L-lisina (94.9 kD, $0.1\mu\text{M}$). A heparitinase II foi previamente incubada (37°C , 10 minutos) à suspensão de mastócitos antes da adição da poli-L-arginina (PA) ou poli-L-lisina (PL). As barras sólidas e hachureadas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de heparitinase II. Os resultados representam a média \pm erro padrão das médias de 4 experimentos.

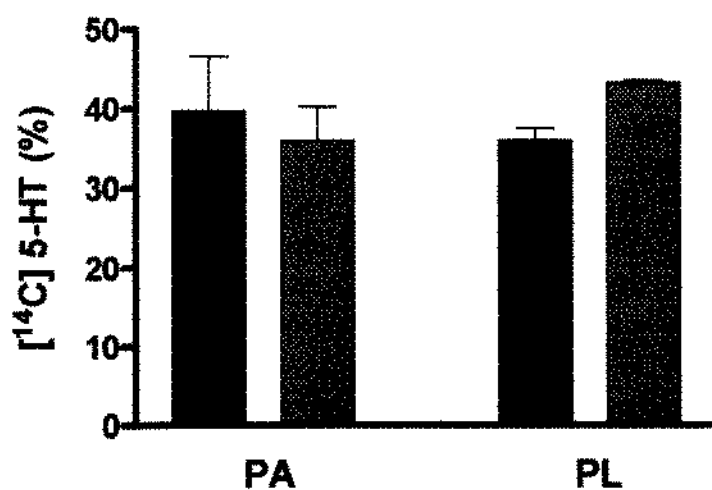


Figura 12: Efeito da heparinase sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, $0.1\mu\text{M}$) e poli-L-lisina (94.9 kD, $0.1\mu\text{M}$). A heparinase foi previamente incubada (37°C , 10 minutos) à suspensão de mastócitos antes da adição da poli-L-arginina (PA) ou poli-L-lisina (PL). As barras sólidas e hachuradas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de heparinase. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 4 experimentos.

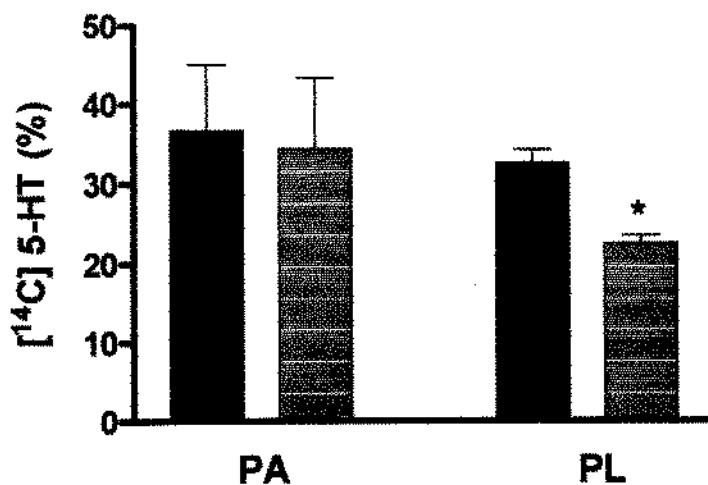


Figura 13: Efeito da condroitinase AC sobre a liberação de [^{14}C]5-HT induzida pela poli-L-arginina (139 kD, $0.1\mu\text{M}$) e poli-L-lisina (94.9 kD, $0.1\mu\text{M}$). A condroitinase AC foi previamente incubada (37°C , 10 minutos) com a suspensão de mastócitos antes da adição da poli-L-arginina (PA) ou poli-L-lisina (PL). As barras sólidas e hachureadas correspondem, respectivamente, aos efeitos na ausência e presença de condroitinase AC. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão das médias de 4. experimentos. * $P < 0.05$ em relação aos respectivos controles na ausência de condroitinase AC.

3.5. EFEITO DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO SOBRE A LIBERAÇÃO DE [¹⁴C]5-HT INDUZIDA PELA POLIARGININA

Para avaliarmos o efeito da temperatura sobre a liberação de [¹⁴C]5-HT, a suspensão de mastócitos foi mantida e incubada com a poli-L-arginina à 37°C (como normalmente empregado anteriormente) ou em banho de gelo (0°C). Conforme mostrado na figura 14, a incubação dos mastócitos com poli-L-arginina (139 kD; 0.1 e 1 µM) em banho de gelo não afetou a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida por este polícatión em relação à liberação observada à 37°C.

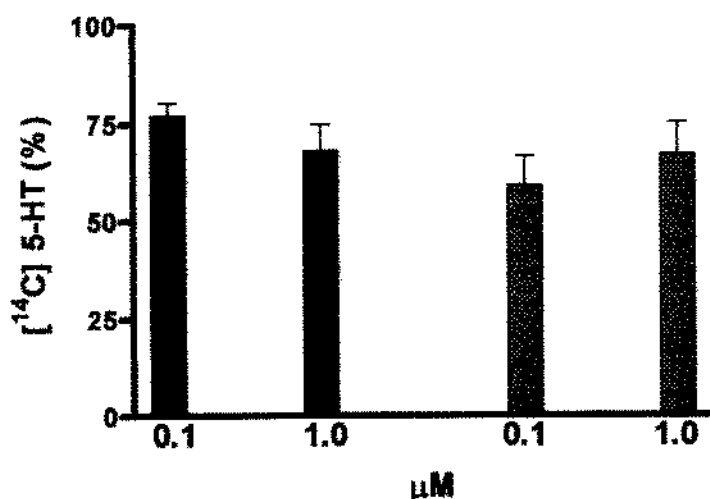


Figura 14: Liberação de [¹⁴C]5-HT induzida por poli-L-arginina em diferentes temperaturas. O gráfico mostra a liberação de 5-HT induzida pelo polícatión poli-L-arginina (139 kD; 0.1µM e 1.0µM) em banho-maria à 37 °C e em banho de gelo (0°C) indicados respectivamente pelas barras lisas e hachuradas. Os resultados representam a média ± erro de 4 experimentos.

4. DISCUSSÃO

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório demonstraram que proteínas catiônicas tais como poliarginina e polilisina induzem edema prolongado de pata de rato por um mecanismo parcialmente dependente de desgranulação de mastócitos *in vivo* (ANTUNES et al., 1990). Visto que esta resposta edematogênica é praticamente abolida pelo tratamento (local ou sistêmico) dos animais com heparina, sugerimos que o conteúdo catiônico destes compostos é fundamental para evocar a resposta biológica em estudo. A administração intra-pleural de poli-L-arginina em ratos também promove formação de exudato inflamatório e infiltração de leucócitos por um mecanismo dependente, em sua maior parte, da ativação *in vivo* de mastócitos presentes na cavidade pleural (SANTANA et al., 1993). Nesse caso, substâncias polianiónicas tais como heparina e sulfato de dermatan reduzem marcadamente a resposta inflamatória induzida pela poliarginina indicando novamente a importância das cargas elétricas positivas destas proteínas. Além disso, aminoácidos básicos tais como a arginina potencializam o edema de pata de rato induzido pela bradicinina e 5-HT por um mecanismo dependente da excitação de mastócitos *in vivo* (GIRALDELO et al., 1994).

No presente trabalho, demonstramos que, de fato, os policátions poliarginina e polilisina causam desgranulação de mastócitos isolados da cavidade peritoneal de rato, resposta esta avaliada em função da liberação de [¹⁴C]5-HT para o sobrenadante do meio nutritivo. A desgranulação dos mastócitos foi dependente da concentração empregada do policátion, mas não

da forma enantiomérica dos mesmos. Além disso, a desgranulação foi dependente do peso molecular indicando, numa primeira abordagem, a importância do conteúdo catiônico destes compostos. De fato, polications de peso molecular elevado possuem grande número de sítios catiônicos que aumentam a sua absorção em superfícies (HESSELINK, 1983). Além disso, nossos resultados mostraram claramente que a pré-incubação da suspensão celular com substâncias polianiónicas (heparina ou sulfato de dermatan) praticamente abolem a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina. Isto confirma estudos prévios *in vivo* (ANTUNES et al., 1990; SANTANA et al., 1993) e reforça a hipótese que o processo de desgranulação dos mastócitos ocorre na superfície dos mesmos por interações eletrostáticas entre as cargas positivas do polication e cargas negativas da membrana plasmática destas células. A neutralização dos grupos carregados positivamente dos polications pelos poliânions pode ser explicado se tais compostos, após ligarem-se ao mastócito, competirem com os polications pelos sítios aniônicos. Nesse caso, assumiríamos que os polications interagem com proteínas aniônicas específicas na membrana dos mastócitos ativando-os e induzindo a desgranulação dos mesmos. Alternativamente, os polications poderiam interagir com sítios aniônicos de outras células presentes no lavado peritoneal (macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, células mononucleares) determinando a liberação de substâncias capazes de, indiretamente, ativar mastócitos.

Através do emprego de hidrolases específicas para cada glicosaminoglicano (heparitinase I, heparitinase II, heparinase e condroitinase AC), investigamos a possibilidade que um (ou mais) tipos de glicosaminoglicanos atuasse como um "receptor" de proteínas catiônicas. Esta hipótese foi aventada baseando-se em estudos realizados em nosso laboratório mostrando que a polilisina causa agregação plaquetária (MARCONDES et al., 1993) por interações eletrostáticas específicas com o sulfato de condrotina que reveste as membranas plaquetárias (DONATO et al., 1994, 1996). Em outras palavras, o sulfato de condroitina representa o "receptor" para substâncias catiônicas em plaquetas. Entretanto, descartamos a possibilidade que a heparina e o sulfato de heparan atuem como sítios de ação da poliarginina (ou polilisina) em mastócitos de rato visto que o pré-tratamento dos mesmos com as respectivas enzimas (heparinase, heparitinase I e heparitinase II) foi ineficaz em reduzir a liberação de [14 C]5-HT. Com relação à condroitinase AC, verificamos que a mesma determinou pequena inibição da liberação de [14 C]5-HT induzida pela polilisina, mas não pela poliarginina. Isto não é, provavelmente, decorrente de utilização de concentrações baixas da condroitinase AC uma vez que concentrações muito menores (aproximadamente 1000 vezes) desta enzima são requeridas para inibir a agregação plaquetária induzida pela polilisina (DONATO et al., 1994, 1996). Em vista disso, acreditamos que a inibição causada pela condroitinase AC sobre a resposta liberadora de [14 C]5-HT da polilisina não tenha caráter relevante. Em face desses resultados, é provável

que resíduos de ácido siálico presentes na superfície dos mastócitos sejam os principais responsáveis pela ligação dos policátions à membrana de tais células. De fato, foi demonstrado que a liberação de histamina induzida pelo composto 48/80, substância de natureza policatiônica, depende do conteúdo de resíduos ácido siálico ligado às membranas dos mastócitos (ADAMCZYK-ENGELMANN & BADER, 1989) visto que o tratamento destas células com neuraminidase tornam as mesmas menos sensíveis a substâncias catiônicas (BAXTER & ADAMIK, 1978).

O acúmulo de AMP cíclico ou GMP cíclico em certos tipos celulares (ou elementos sanguíneos) tais como o endotélio, célula muscular lisa e plaquetas determina inibição da adesão e agregação plaquetária e vasodilatação (MONCADA, 1992). Ambos os mensageiros diminuem a disponibilidade intracelular de cálcio sendo esta uma das principais razões pelas quais evocam os efeitos referidos acima. Na agregação plaquetária induzida pela polilisina, observou-se que tanto o iloprost (análogo estável da prostaciclina; ativador da adenil ciclase; GORMAN et al., 1977; TATESON et al., 1977) como o nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico; ativador da guanil ciclase solúvel; RAPOPORT et al., 1983) inibem este efeito (MARCONDES et al., 1993). Isto sugeriu aos autores que o acúmulo de AMPc e GMPc inibe o efeito da polilisina em plaquetas por (i) diminuição do cálcio intracelular (e nesse caso, assume-se que a ligação do policátion ao sítio aniônico induz liberação intracelular de cálcio) e ii) modulação da expressão de sítios aniônicos na

membrana plaquetária. Entretanto, em concentrações relativamente elevadas, o iloprost (50 μ M) e o nitroprussiato de sódio (1 mM) foram incapazes de inibir a liberação de [14 C]5-HT induzida pela poliarginina. Isto indica provavelmente que o AMPc e GMPc não modulam a ação de proteínas catiônicas em mastócitos, embora sejam mediadores importantes para outros agonistas (HOLGATE et al., 1980; CHURCH et al., 1986; SALVEMINI et al., 1991). Além disso, a incubação dos mastócitos em banho de gelo não modificaram a resposta liberadora de [14 C]5-HT dos policátions. Portanto, podemos sugerir que, ao contrário de plaquetas (MARCONDES et al., 1993), o mecanismo de ativação dos mastócitos por proteínas catiônicas é "inespecífico" (citotóxico), provavelmente irreversível, sendo que a magnitude dos efeitos dependem da densidade de resíduos catiônicos e do tempo que tais compostos interagem com os mastócitos. Conclusões semelhantes foram relatadas sobre o efeito de policátions sintéticos em células endoteliais de veia umbelical humana (MORGAN et al., 1988). Visto que policátions são polímeros encontrados no organismo e liberados principalmente por plaquetas ou leucócitos ativados (PETERSON et al., 1985; TETTA et al., 1985; CAMUSSI et al., 1986), podemos avaliar as consequências deletérias da liberação destas substâncias no organismo como, por exemplo, perda do endotélio cerebral (NAGY et al., 1983), proteinúria aguda (HUNSICKER et al., 1981) e danos vasculares glomerulares (BARNES et al., 1984; BARNES & VENKATACHALAM, 1984). Nesse sentido, o desenvolvimento

de análogos de heparina desprovidos de atividade anti-coagulante seria de grande utilidade como potenciais drogas antiinflamatórias.

5. CONCLUSÕES

- 1) A poliarginina e polilisina causam liberação de [¹⁴C]5-HT dependente da dose e do peso molecular, mas independente da forma enantiomérica.
- 2) A heparina e o sulfato de dermatan inibiram significativamente a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina indicando que tal efeito é dependente do conteúdo catiônico do polícatión empregado.
- 3) O iloprost e o nitroprussiato de sódio não modificaram a liberação de [¹⁴C]5-HT induzida pela poliarginina indicando que o AMPc e GMPc não modulam a desgranulação de mastócitos induzido por polícatións.
- 4) O sulfato de heparan, heparina e sulfato de condroitina não são provavelmente os sítios de ação dos polícatións em mastócitos.
- 5) A liberação de [¹⁴C]5-HT em resposta à poliarginina foi de mesma magnitude quando a suspensão de mastócitos foi incubada à 0°C ou 37°C.
- 6) O mecanismo de liberação de [¹⁴C]5-HT de mastócitos de ratos em resposta a polícatións ocorre de modo inespecífico, citotóxico, sendo que tais efeitos dependem da densidade de resíduos catiônicos e, provavelmente, do tempo que tais compostos interagem com os mastócitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk-Engelmann, P. & Bader, H. The role of membrane bound sialic acid of rat mast cells in histamine release induced by compound 48/80 and derivatives as well as calcium. *Agents Actions*. 28(1/2):34-38, 1989.
- Aloe, L., Leon, A. & Levi-Montalcini, R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions*. 39:C145-C147, 1993.
- Amon, U., Nitschke, M., Dieckmann, D., Gibbs, B. F., Wehrhahn, C. & Wolff, H. H. Activation and inhibition of mediator release from skin mast cells: a review of *in vitro* experiments. *Clinical and Experimental Allergy*. 24:1098-1104, 1994.
- Antunes, E., Mariano, M., Cirino, G., Levi, S. & De Nucci, G. Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. *Br. J. Pharmacol.* 101:986-990, 1990.
- Atkins, F. M., Friedman, M. M., Rao, P. V. S. & Metcalfe, D. D. Interactions between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* 77:96-102, 1985.
- Barnes, J. L. & Venkatachalam, M.A.. Enhancement of glomerular immune complex deposition by a circulating polycation. *J. Exp. Med.*, 160:286-93, 1984.
- Barnes, J. L., Radnik, R. A., Gilchrist, E. P. & Venkatachalam, M. A. Size and charge selective permeability defects induced in glomerular basement membrane by a polycation. *Kidney Int.* 25:11-19, 1984.
- Bashkin, P., Razin, E., Eldor, A. & Vlodaysky, I. Degranulation mast cells secrete an endoglycosidase that degrades heparan sulfate in subendothelial extracellular matrix. *Blood* 75(11):2204-2212, 1990.

- Baxter, J.H. & Adamik, R. Differences in requirement and actions of various histamine-releasing agents. *Biochem. Pharmacol.* 27:497-503, 1978.
- Befus, A. D., Pearce, F. L., Gauldie, J., Horsewood, P. & Bienenstock, J. Mucosal Mast Cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *J. Immunol.* 128(6):2475-2480, 1982.
- Bienenstock, J., Tomioka, M., Stead, R., Ernst, P., Jordana, M., Gauldie, J., Dolovich, J. & Denburg, J. Mast Cell involvement in various inflammatory processes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135:S5-S8, 1987.
- Bloom, G. D. & Haegermark, Ö. A study on morphological changes and histamine release induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells. *Exp. Cell Res.* 40:637-654, 1965.
- Broid, D. H. Cytokines. Orchestrators of human allergic reactions. *AIC News.* 6/1: 12-14, 1994.
- Camussi, G., Tetta, C., Mazzucco, G., Monga, G., Roffinello, C., Alberton, M., Dellabona, P., Malavasi, F. & Vercellone, A. Platelet cationic proteins are present in glomeruli of lupus nephritis patients. *Kidney Int.*, 30:555-65, 1986.
- Chang, S-W., Westcott, J. Y., Henson, J. E. & Voelkel, N. F. Pulmonary vascular injury by polycations in perfused rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 62(5):1932-1943, 1987.
- Church, M. K., Hughes, P. J., Vardey, C. J. Studies on the receptor mediating cyclic AMP-independent enhancement by adenosine of IgE-dependent mediator release from rat mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 87:233-242, 1986.

- Coleman, J. W. , Holgate, S. T., Church, M. K. & Godfrey, R. C. Immunoglobulin and decapeptide-induced 5-hydroxytryptamine release from rat peritoneal mast cells. *Biochem. J.* 198:615-619, 1981.
- Coyle, A. J. , Ackerman, S. J. , Burch, R., Proud, D. & Irvin, C. G. Human eosinophil - granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness In vivo dependent on bradykinin generation. *J. Clin. Invest.* 95: 1735-1740, 1995.
- Coyle, A. J., Mitzner, W. & Irvin, C. G. Cationic proteins alter smooth muscle function by an epithelium -dependent mechanism. *J. Appl. Physiol.* 74(4):1761-1768, 1993.
- Coyle, A. J., Perretti, F., Manzini, S. & Irvin, C. G. Cationic protein-induced sensory nerve activation: role of substance P in airway hyperresponsiveness and plasma protein extravasation. *J. Clin. Invest.* 94:2301-2306, 1994a.
- Coyle, A. J., Uchida, D., Ackerman, S. J., Mitzner, W. & Irvin, C. G. Role of cationic proteins in the airway. hyperresponsiveness due to airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: S63-S71, 1994b.
- Davidson, S., Gilead, L., Amira, M., Ginsburg, H. & Razin, E. Synthesis of chondroitin sulfate D and heparin proteoglycans in murine lymph node-derived mast cells. *J. Biol. Chem.* 265(21):12324-12330, 1990.
- Dimitriadou, V., Lambracht-Hall, M., Reichler, J. & Theoharides, T. C. Histochemical and ultrastructural characteristics of rat brain perivascular mast cells stimulated with compound 48/80 and carbachol. *Neuroscience* 39: 209-224.,1990.

- Donato, J.L., Nogueira, M.D., Marcondes, S., Antunes, E., Nader, H.B., Dietrich, C.P. & de Nucci, G. Kinetic of chondroitin 4-sulfate release from platelets and its relation with TxA_2 formation and granule secretion. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:2163-2167, 1994.
- Donato, J.L., Marcondes, S., Antunes, E., Nogueira, M.D., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Rendu, F. & de Nucci, G. Role of chondroitin 4-sulfate as a receptor for polycation induced human platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, in press, 1996.
- Eaton, J. W. Location, location, location and location: real state and inflammation. *J. Lab. Clin. Med.* 125:10-1, 1995.
- Enerbäck, L. Mucosal mast cells in the rat and in man. *Archs. Allergy Appl. Immun.* 82:249-255, 1987.
- Enerbäck, L., Kolset, S. O., Kusche, M., Hjerpe, A. & Lindahl, U. Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. *Biochem. J.* 227:661-668, 1985.
- Ennis, M., Pearce, F. L. & Weston, P. M. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol.* 70:329-334, 1980.
- Gad, A. E., Silver, B. L. & Eytan, G. D. Polycation-induced fusion of negatively-charged vesicles. *Biochem. Biophysica Acta.* 90:124-132, 1982.

- Giraldelo, C.M.M., Zappellini, A., Muscará, M.N., De Luca, I.M.S., Hyslop, S., Cirino, G., Zatz, R., de Nucci, G. & Antunes, E. Effects of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 257:87-93, 1994.
- Gleich, G.J. & C.R. Adolphson. The eosinophil leukocyte: structure and function, *Adv. Immunol.*, 39:177-187, 1986.
- Gorman, R. R., Bunting, S., Miller, O.V. Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX). *Prostaglandins*, 13:377-88, 1977.
- Halpern, G. M. Réexamen du rôle des mastocytes, des médiateurs de l'inflammation et de l'héparine. *Angéiologie* 4(A71-A74), 1992.
- Hanahoe, T. H. P. & Jones, D. R. Heparin and acute inflammation in the rat. *Int. Arch. Appl. Immunol.* 86:243-244, 1988.
- Harvima, I. T., Horsmanheimo, L., Naukkarinen, A. & Horsmanheimo, M. Mast cell proteinases and cytokines in skin inflammation. *Arch. Dermatol. Res.* 287: 61-67, 1994.
- Henson, P. M. & Johnston, R. B. Tissue injury in inflammation. *J. Clin. Invest.* 79:669-674, 1987.
- Hesselink, F. T. Adsorption of polyelectrolytes from dilute solution. In: ADSORPTION from solution at the solid/liquid interface. Eds. G.D. Parfitt, C.H. Rochester, London, Academic Press, 1983, p.271-412.



- Hino, R. H., Lau, C. K. H. & Read, G. W. The site of action of the histamine releaser compound 48/80 in causing mast cell degranulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200(3):658-663, 1977.
- Holgate, S.T., Lewis, R.A. & Austen, K.F. Role of adenylate cyclase in immunological release of mediators from rat mast cells: agonist and antagonist effects of purine and ribose modified adenosine analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6800-6804, 1980.
- Hunsicker, L. G., Shearer, T. P. & Shaffer, S. J. Acute reversible proteinuria induced by infusion of the polycation hexadimethrine. *Kid. Int.* 20:7-17, 1981.
- Kovanen, P. T. The mast cell - a potential link between inflammation and cellular cholesterol deposition in atherogenesis. *Eur. Heart Journal* 14 (Suppl. K):105-117, 1993.
- Kubes, P. & Kanwar, S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. a P-selectin-mediated event. *J. Immunol.* 152: 3570-3577, 1994.
- Lagunoff, D. Membrane fusion during mast cell secretion. *J. Cell Biol.* 57:252-259, 1973.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3739-3743, 1994.
- Lloret, S. & Moreno, J. J. Ca^{++} Influx, phosphoinositide hydrolysis, and histamine release induced by lysophosphatidylserine in mast cells. *J. Cel. Physiol.* 165: 89-95, 1995.

- Marcondes, S., Grassi-Kassisse, D. M., Hyslop, S. & De Nucci, G. Modulation of polycation-induced human platelet aggregation. *Thrombotic Haemorrhagic Disorders*. 7/2:47-50, 1993.
- Moncada, S. The L-arginine: nitric oxide pathway, *Acta Physiol. Scand.* 145: 201-225, 1992.
- Morgan, D. M. L., Clover, J. & Pearson, J. D. Effects of synthetic polycations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release, and morphology of human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell Science* 91:231-238, 1988.
- Nader, H. B., Dietrich, C. P., Buonassissi, V. & Colburn, P. Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:3565-3569, 1987.
- Nagy, Z., Peters, H. & Hüttner. Charge-related alterations of the cerebral endothelium. *Lab. Investigation*. 49:662-665, 1983.
- Needham, L., Hellewell, P. G. & Williams, T. J. & Gordon, J. L. Endothelial functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. *Lab. Investigation*. 59(4):538, 1988.
- Peterson, M.W., Clark, R., Stone, P. & Shasby, D.M. Neutrophil cationic protein increases endothelial albumin transport. *Ann. Rev. Respir. Dis.*, 131:A421, 1985
- Plytycz, B. Nonself as a stressor-inflammation as a stress reaction. *Immunology Today* 16(2):110-111, 1995.

- Rapoport, R. M. & Murad, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, 52:352-7, 1983.
- Raud, J. & Lindbom, L. Leukocyte rolling and firm adhesion in the microcirculation. *Gastroenterology*. 104:310-323, 1993.
- Salvemini, D., E. Masini, A. Pistelli, P.F. Mannaioni and J.R. Vane. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17, S258.1991.
- Santana, A., Hyslop, S. , Antunes, E., Mariano, M., Bakhle, Y. S. & De Nucci, G. Inflammatory responses induced by poly-L-arginine in rats lungs *in vivo*. *Agents Actions*. 39:104-110, 1993.
- Saumon, G., Soler, P. & Martet, G. Effect of polycations on barrier and transport properties of alveolar epithelium in situ. *Am. J. Physiol.* 269:L185-L194, 1995.
- Schwartz, L. B. Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. *Annals Allergy* 58:226-237, 1987.
- Scully, M. F. & Ellis, V. Localization of heparin in mast cells. *Lancet* 27:718-719, 1986.
- Shier, W. T., Dubourdieu, D. J. & Durkin, J. P. Polycations as prostaglandin synthesis inducers. Stimulation of arachidonic acid release and prostaglandin synthesis in cultured fibroblasts by poly (L-lysine) and other synthetic polycations. *Biochim. Biophys. Acta*. 793:238-250, 1984.

- Shier, W. T. & Dubourdieu, D. J. Polycations as prostaglandin synthesis inducers. Structure-activity relationships. *Prostaglandins* 31(6): 1145-1157, 1986.
- Skutelsky, E. & Danon, D. Redistribution of surface anionic sites on the luminal front of blood vessel endothelium after interaction with polycationic ligand. *J. Cell Biol.* 71:232-241, 1976.
- Spina, D. & Goldie, R. G. Poly-L-arginine mediated release of acetylcholine from parasympathetic nerves in rat and guinea-pig airways. *Br. J. Pharmacol.* 112: 895-900, 1994.
- Stevens, R. L. Mast cell proteoglycans. *Biochem.e Acute Allergic Reactions.* 131-144, 1989.
- Stevens, R. L., Fox, C. C., Lichtenstein, L. M. & Austen, K. F. Identification of chondroitin sulfate proteoglycans and heparin proteoglycans in the secretory granules of human lung mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2284-2287, 1988.
- Sugumaran, G. & Silbert, J. E. Biosynthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* 264(7):3864-3868, 1989.
- Tateson, J.E., Moncada, S., Vane, J.R. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins*, 13:389-97, 1977.
- Teixeira, M.M., Williams, T.J. & P.G. Hellewell. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation *in vivo*. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:418-425, 1995.

- Tetta, C., Coda, R., Camussi, G. Human platelet cationic proteins bind to rat glomeruli, induce loss of anionic charges and increase glomerular permeability. *Agents Actions* 16:24-6, 1985.
- Tzan, C. J., Berg, J. R. & Lewis, S. A. Modification of epithelial permeability by cationic polypeptides. *Am. J. Physiol.* 265(Cell Physiol. 34): C1637-C1647, 1993.
- Uchida, D. A., Ackerman, S. J., Coyle, A. J., Larsen, G. L., Weller, P. F. Freed, J. & Irvin, C. G. The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat *in vivo*. A comparison with polycations. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147:982-988, 1993.
- Uchida, D., Ballowe, C., Larsen, G., Irvin, C. & Cott, G. Polycations decrease the transepithelial resistance of cultured tracheal epithelial cells. *Chest.* 101(3):335, 1992.
- Vehaskari, V. M., Chang, C. T-C, Stevens, J. K. & Robson, A. M. The effects of polycations on vascular permeability in the rat. A proposed role for charge sites. *J. Clin. Invest.* 73:1053-1061, 1984.
- Von Adrian, U. H., Chambers, J. D., McEvoy, L. M., Bargatze, R. F., Arfors, K. E. & Butcher, E. C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for Lcam-1 and the leukocyte beta-2 integrins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7538-7542, 1991.
- Wasserman, S. I. Mast Cells and Airway Inflammation in Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:S39-S41, 1994.

Wegner, C. D., Gundel, R. H. & Rothlein, R. Letts, L. G. Expression and probable roles of cell adhesion molecules in lung inflammation. *Chest*. 101(3):34S-39S, 1992.

Yee, J. & Christou, N. V. The local role of tumor necrosis factor alfa in the modulation of neutrophil function at sites of inflammation. *Arch. Surg.* 129:1249-1255, 1994.

Young, J. D. E., Peterson, C. G. B., Venge, P. & Cohn, Z. A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*, 321: 613-615, 1986.

Zucker-Franklin, D., Hirayama, N. & Schnipper, E. The presence of mast cell precursors in rat peripheral blood. *Blood* 58(3): 544-551, 1981.

7. ABSTRACT

Basic polyaminoacids such as polylysine and polyarginine produce a variety of biological effects including increase in vascular permeability, leucocytic infiltration, lung inflammation, platelet aggregation and mast cell activation. In this study we have further investigated the mechanisms involved in the mast cell degranulation induced by polyarginine and polylysine using isolated rat peritoneal mast cells.

Mast cells of 10 male Wistar rats (200 - 300 g) were obtained by the injection of Krebs-Ringer Phosphate solution (KRP) into peritoneal cavity. The fluid was withdrawn and centrifuged at 300 g for 5 min at room temperature. The cell suspension was washed twice in KRP and incubated with 40 nCi/ml of [¹⁴C]5-HT at 37°C by 60 min. The cells were then washed three times in KRP. Aliquots of the peritoneal cell suspension were warmed at 37°C for 20 min. The stimulus were added to the suspension. The cells were then centrifuged (300 g, 10 min) and the supernatant removed for [¹⁴C]5-HT determination. The [¹⁴C]5-HT concentrations (%) was determined by measuring the radioactivity in a γ counter. Poly-L-arginine caused a dose-dependent [¹⁴C]5-HT release (139.2 kD; 11 ± 5 , 67 ± 4.4 and $70.4 \pm 0.6\%$ for 0.01, 0.1 and 1 μ M, respectively; n = 4). Similar responses were observed for either poly-D-lysine (94.9 kD; 4 ± 0.6 , 28 ± 6 and 41 ± 14 for 0.01, 0.1 and 1 μ M, respectively; n = 4) and poly-L-lysine (80.4 kD; 30 ± 1 and $61 \pm 3.3\%$ for 0.1 and 1 μ M, respectively; n=12). The

polyarginine-induced [^{14}C]5-HT release was also dependent on the molecular weight of the polycation (5 ± 2 and $27 \pm 7\%$ for 11.6 kD and 139.3 kD, respectively; $n = 6$). Heparin (15 - 250 U/ml) and dermatan sulfate (0.1 mg / ml) virtually abolished the [^{14}C] 5-HT release induced by polyarginine. In contrast, the enzymes chondroitinase AC, heparitinase I, heparitinase II and heparinase had no effect on the polyarginine-induced [^{14}C] 5-HT release.

As opposed to platelets (Donato et al., 1994, 1996), the mast cell membrane proteoglycans are not potential receptors for polycation-induced [^{14}C]5-HT release.