

ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA POR LECTINA DE Dioclea gran-
diflora Mart. - PARTICIPAÇÃO DA ENERGIA METABÓLICA.

MANOEL CID OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1983

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Manoel Cid Oliveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _____

Maria da Guia Silva Lima
Orientador da Dissertação

Renato de Azevedo Moreira, D.Sc.

José Xavier Filho, D.Sc.

A meus pais

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa de Pós-Graduação (PICD) concedida ao autor e através de auxílios do curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executada esta pesquisa.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (Projeto de Pesquisa em sementes).

AGRADECIMENTOS

À professora Maria da Guia Silva Lima, pela orientação permanente, segura e objetiva, dedicação e constante disposição durante a execução deste trabalho.

Aos professores Renato de Azevedo Moreira, Tracema Lima Ainouz e José Xavier Filho, pela cooperação e sugestões apresentadas durante o desenvolvimento desta dissertação.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho Científico.

À Universidade Federal do Pará pela licença de afastamento para fazer o curso de Mestrado, e aos colegas, em especial ao Dr. José Maria Dias Mescouto do Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas desta Universidade pela confiança em mim depositada e pelo estímulo que me proporcionaram.

Finalmente a minha esposa e filhos que com compreensão e desprendimento contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	viii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	x
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xi
<u>RESUMO</u>	xii
<u>ABSTRACT</u>	xiv
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
2 - <u>MATERIAIS</u>	13
2.1 - <u>Animais</u>	13
2.2 - <u>Lectinas</u>	13
2.3 - <u>Reagentes</u>	13
3 - <u>MÉTODOS</u>	15
3.1 - <u>Obtenção de mastócitos</u>	15
3.2 - <u>Sensibilização ativa de mastócitos peritoneais</u>	16
3.3 - <u>Preparação do adjuvante</u>	17
3.4 - <u>Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro</u>	17
3.4.1 - <u>Termoequilíbrio</u>	17
3.4.2 - <u>Tempo de incubação da lectina</u>	18
3.4.3 - <u>Parada da reação</u>	20
3.4.4 - <u>Coloração</u>	20
3.4.5 - <u>Contagem de mastócitos</u>	20

3.5	- <u>Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro em presença de inibidores metabólicos</u> ..	25
3.5.1	- Inibidores da via anaeróbica	25
3.5.2	- Inibidores da via aeróbica	25
3.5.3	- Inibidores das vias anaeróbica e aeróbica simultaneamente	26
3.6	- <u>Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro: reversão da inibição</u>	26
4	- <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	28
4.1	- <u>Mecanismo da ativação</u>	30
4.2	- <u>Participação da energia metabólica</u>	33
5	- <u>CONCLUSÕES</u>	53
6	- <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	55
7	- <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u>	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Diagrama representativo da fixação do antígeno à IgE na membrana dos mastócitos e outros mecanismos de ligação cruzada entre os receptores de IgE da membrana dos mastócitos	7
2	Diagrama do sumário dos eventos de membrana admitidos como envolvidos na ativação dos mastócitos com secreção de histamina	9
3	Cadeia respiratória: substratos, sítios de acoplamento e inibidores	10
4	Cinética de degranulação de mastócitos de camundongo induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	19
5	Retículo de Fuchs-Rosenthal	22
6	Microfotografia de mastócitos intactos aumentado 400 vezes	23
7	Microfotografia de mastócitos degranulados (aumento 400 vezes): parcialmente (A) e completamente (B)	24
8	Efeito comparativo da indução da exocitose de grânulos de mastócitos por três diferentes lectinas: PIII, GLG3B e Con A	29
9	Influência do título de IgE inespecífica sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lec	

	tina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	34
10	Ação inibidora do 2,4-dinitro fenol sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	37
11	Influência inibidora do fluoreto de sódio e do 2,4-dinitro fenol simultaneamente sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	39
12	Ação inibidora da oligomicina sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	40
13	Ação inibidora da rotenona sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	42
14	Ação inibidora da antimicina A sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	43
15	Ação inibidora do cianeto de potássio sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	45
16	Correlação entre os efeitos da glicose inibindo a lectina e revertendo a ação inibidora do 2,4-dinitro fenol sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	47

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1 Influência da idade sobre a degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss" induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	32
2 Influência do fluoreto de sódio na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss" induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	36
3 Reversão por intermédio da glicose do efeito inibidor causado pelo 2,4-dinitro fenol na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss", induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	48
4 Reversão por intermédio do succinato do efeito inibidor causado pela rotenona na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss", induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	50
5 Reversão por intermédio do ascorbato do efeito inibidor causado pela antimicina A na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss", induzida pela lectina de <u>Dioclea grandiflora</u> Mart.	51

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Con A	Concavanalina A
PIII	Lectina pura de <u>D. grandiflora</u> Mart., preparada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50.
GLG3B	Lectina pura de <u>Phaseolus vulgaris</u> cv. "Processor" obtida por cromatografia de afinidade em coluna de Fetuina-Sepharose-4B.
48/80	Produto da condensação do do p-metóxi-fenil-metilamina com o aldeído fórmico.
Ionóforo A23187	Antibiótico (ácido carboxílico) - ionóforo de cálcio.
Co Q	Coenzima Q (ubiquinona).
I _{50%}	Concentração de inibidor necessária para provocar 50% de inibição da degranulação de mastócitos.
2,4-DNP	2,4-dinitro fenol.

RESUMO

A ativação de mastócitos induzida pela lectina de mucunã de caroço (Dioclea grandiflora Mart.) mostrou-se dependente da concentração. A concentração usada para provocar uma degranulação máxima foi 50 µg/ml. Comparadas as atividades da concavina A e da lectina de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" com a da lectina de Dioclea grandiflora Mart., esta última, em idênticas concentrações, foi a menos ativa.

Para explicar a ativação dos mastócitos pela lectina de Dioclea grandiflora admitiu-se que a lectina se ligaria aos resíduos de carboidratos da porção Fc da molécula de IgE fixada à membrana do mastócito. Esta hipótese teve o suporte experimental dos resultados mais intensos da exocitose de grânulos de mastócitos de animais mais velhos provocada pela lectina, como também naqueles que tinham sido previamente imunizados com antígeno não relacionado à lectina.

A participação da energia metabólica no processo de ativação dos mastócitos induzido pela lectina de D. grandiflora foi verificada com o uso de inibidores metabólicos em analogia com o que acontece na ativação induzida nas mesmas células pela reação do antígeno com o anticorpo. Os resultados mostram que o fornecimento de energia metabólica (vias anaeróbica ou aeróbica) ao ser inibido impedia a exocitose de grânulos de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora. Foram usados os seguintes inibidores com as respectivas concentrações que induziram 50% de inibição ($I_{50\%}$): 2,4-dinitro fenol ($I_{50\%} = 11 \mu\text{M}$); oligomicina ($I_{50\%} = 0,12 \mu\text{M}$); rotenona ($I_{50\%} = 0,11 \mu\text{M}$); antimicina A ($I_{50\%} = 0,02 \mu\text{M}$); cianeto de potássio ($I_{50\%} = 16 \mu\text{M}$).

A inibição da degranulação dos mastócitos pode ser revertida por glicose em presença de 2,4-dinitro fenol e por su

ccinato em presença de rotenona. No caso da glicose faz-se claro que a energia metabólica, necessária à modulação do processo de degranulação de mastócitos induzida por lectina foi fornecida pela via glicolítica. No caso do succinato, a energia metabólica foi oriunda da via aeróbica uma vez que o succinato forneceu equivalente de óxido redução à cadeia respiratória em local posterior ao da inibição provocada pela rotenona. Isto possibilitou o funcionamento da mesma cadeia com um rendimento de 2 ATPs, que foi suficiente para liberar a quantidade de energia indispensável à degranulação dos mastócitos induzida pela lectina, mesmo em presença da rotenona.

ABSTRACT

The induction of mast cell activation by mucunã lectin was studied. Mast cell activation induced by the lectin from "mucunã de caroço" (Dioclea grandiflora Mart.) depends on the lectin concentration - the dose-response was always induced by 50 µg/ml. Comparing mast cell activation promoted by equal concentrations of lectin of Phaseolus vulgaris cv. Processor and concanavalin A, Dioclea grandiflora lectin induced activation was lower.

To explain the lectin induced mast cell activation, the IgE mediation hypothesis was assumed to operate through the binding of the lectin to the carbohydrate portion in the Fc region of the IgE molecule. This hypothesis is supported by the results correlating mast cell activation to the animal age and to the high levels of IgE induced by antigens not related to the lectins.

The participation of metabolic energy during the process of cellular activation induced by the lectin of Dioclea grandiflora was studied using metabolic inhibitors. The results were compared to those obtained with antigen antibody induced mast cell activation. The inhibition of the aerobic or anaerobic pathway is accompanied by the loss of ability of the lectin to induce mast cell activation. The following inhibitors with their respective concentrations that induced 50% inhibition ($I_{50\%}$) were used: 2,4-dinitrophenol, $I_{50\%}$: 11µM; oligomycin, $I_{50\%}$: 0,12µM; rotenone, $I_{50\%}$: 0,11µM; antimycin A, $I_{50\%}$: 0,12 µM; potassium cyanide, $I_{50\%}$: 16µM.

The inhibition of the mast cell activation by 2,4-DNP was reversed by glucose and that by rotenone was reversed by succinate. The former result indicates that the source of

metabolic energy is the glycolytic pathway and the latter is the electron transport chain coupled to ATP synthesis. After the blockage point of rotenone, when the oxidation/reduction equivalents from succinate are transferred to the electron transport chain there is a net gain of 2 ATP. It seems that this quantity of energy is sufficient to promote the mast cell activation induced by the lectin.

1 - INTRODUÇÃO

Os mastócitos são células secretoras que liberam aminas vasopressoras com prévia degranulação em resposta a numerosos estímulos específicos, fato que lhes tem valido a utilização como modelo interessante no estudo dos fenômenos de secreção.

Um sem número de compostos de estruturas químicas variadas têm sido utilizado para induzir a expulsão de grânulos e liberação de aminas vasopressoras dos mastócitos. Estes agentes degranuladores dos mastócitos comumente empregados incluem a concanavalina A (Con A); dextranas; composto 48/80; as anafilatoxinas (C_{3a} , C_{4a} e C_{5a}); adenosina trifosfato; proteínas de grânulos lisossomiais; polimixina B e ionóforo de cálcio A23187. Além destas, outras substâncias conduzindo à degranulação de mastócitos têm sido examinadas incluindo proteínas cationicas de leucócitos, succinilcolina, D-tubocurare, narcóticos, anfotericina B e algumas enzimas, particularmente as encontradas em veneno de cobra e abelha (ver PATON, 1957; SELYE, 1965; ROTHSCHILD, 1966 e MORRISON e HENSON, 1978).

O emprego de lectinas, principalmente da Con A, no estudo de fenômenos ligados à ativação de mastócitos tem merecido particular atenção. Isto porque as lectinas têm se mostrado um versátil instrumento no estudo de vários processos biológicos. Evitando uma longa discussão sobre a adequação do termo lectina citamos a bibliografia pertinente (BOYD e SHARPLEIGH, 1954; JAFFÉ, 1969; GOLD e BALDING, 1975; LIENER, 1976a) e apresentamos a definição que, sobre as mesmas, foi dada por GOLDSTEIN et al. (1980): lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que fixam açúcar e aglutinam ou precipitam glicoconjugados. Estas substâncias ainda devem possuir dois sítios de ligação para açúcar, aglutinar células vegetais e ani

mais e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídios.

Há uma dificuldade suplementar para uma definição precisa do que seja lectina, em consequência de um número crescente de estudos feitos com as mesmas, os quais levam constantemente a descobertas de novas propriedades. Entre essas propriedades, podemos destacar: aglutinação de eritrócitos; aglutinação de células malignas; indução de mitose em linfócitos; interação com sacarídeos constituintes de membranas celulares; ligação de açúcares; toxicidade em animais; inibição da síntese de proteínas; indução de secreção de aminas vasopressoras de mastócitos e basófilos e indução de degranulação de mastócitos (BOYD, 1963; JAFFÉ, 1969; BIDDLE et al., 1970; SELA et al., 1970; TOMS e WESTERN, 1971; SHARON e LIS, 1972; LIS e SHARON, 1973; OLSNES et al., 1974; SIRAGANIAN e SIRAGANIAN, 1974; SHARON et al., 1974; JAFFÉ e GOMEZ, 1975; MANEN, 1975; SULLIVAN et al., 1975; LIENER, 1976a; LIENER, 1976b; GASPERI-CAMPANI et al., 1977; OLSNES e PIHL, 1978; PUSZTAI et al., 1979; SILVA-LIMA et al., 1980; ENNIS et al., 1981; LIS e SHARON, 1981; PUSZTAI, 1981; SILVA-LIMA et al., 1981).

A lectina concanavalina A de feijão de porco (Canavalia ensiformis) tem sido bastante estudada no que diz respeito à ativação dos mastócitos, iniciando a mesma sequência de eventos decorrentes da reação do antígeno com o anticorpo. Foi evidenciado que a concanavalina A iniciava a degranulação de mastócitos em animais com níveis aumentados de IgE, mas não naqueles com níveis normais ou baixos (KELLER, 1973). Esta observação levou à sugestão de que a Con A agiria por ligação cruzada sobre os resíduos de açúcar das moléculas de IgE. A sugestão de que a Con A age através de IgE tem sido confirmado com a demonstração de que a ação da Con A é inibida por anticorpos dirigidos contra a porção Fc da IgE (MAGRO, 1974). Além disso, a reação de liberação de histamina pela Con A requer a presença de cálcio e a utilização de energia celular e é inibida por au

mento de AMP cíclico (SULLIVAN et al., 1975).

O efeito da concanavalina A sobre mastócitos de rato tem sido um outro objeto de numerosas referências conflitantes na literatura. Numerosos autores têm afirmado que a lectina é ineficiente, a menos que células sejam obtidas de animais sensibilizados ativamente (KELLER, 1973) ou o meio de incubação seja suplementado com fosfatidil serina (PS) exógeno (SULLIVAN et al., 1975; BAXTER e ADAMIK, 1978; LANSMAN e COCHRANE, 1980). Outros pesquisadores têm obtido pronunciadas respostas de células não sensibilizadas na ausência de PS (BACH e BRASHER, 1975; SUGIYAMA et al., 1975; LAWSON et al., 1978; SHORES e MONGAR, 1980).

Por outro lado, SIRAGANIAN e SIRAGANIAN (1974) observaram que o efeito da concanavalina A sobre mastócitos de camundongo é diferente quando comparado ao efeito provocado pela mesma sobre outros tipos de células de diferentes espécies animais como também de mastócitos de rato.

Além da Con A BACH e BRASHER (1975), estudando o efeito das lectinas de germe de trigo (Triticum vulgare), de mamona (Ricinus communis) e de soja (Glycine max) sobre células peritoneais de rato observaram que as mesmas produziram liberação de histamina dependente de dose.

LANSMAN e COCHRANE (1980) também demonstraram em mastócitos de rato, que a lectina de germe de trigo (Triticum vulgare) foi ativa tanto na presença quanto na ausência de cálcio extracelular. Entretanto, isto foi contraditório com as observações de LAWSON et al., (1978) os quais tinham observado que a lectina era totalmente ineficiente em ambas as condições. Além disso, ENNIS et al., (1981), estudando o efeito de lectinas extraídas de Triticum vulgare, Lens culinaris e Canavalia ensiformis sobre mastócitos de diferentes origens tissulares como também de diferentes espécies animais observaram que as células responderam de modo diferente diante dos indutores uti

lizados.

Encontramos ainda numerosas conclusões conflitantes na literatura, no que tange à ativação dos mastócitos advindas talvez dos diferentes métodos de estudos utilizados, da linhagem dos animais usados bem como de seu estado de sensibilização natural e do grau de pureza da preparação de cada lectina (KELLER, 1973 e SHORES e MONGAR, 1980).

Atualmente, apesar do conhecimento que se tem sobre a Con A e do interesse despertado nos últimos anos pelas lectinas, visando uma compreensão dos grandes problemas da biologia moderna (imunologia, câncer, papel e estrutura superficial da membrana citoplasmática, regulação de gens de células eucarióticas), o efeito de outras lectinas como indutoras da degranulação e liberação de histamina de células, tem sido menos amplamente explorado.

Recentemente, estudos preliminares com frações proteicas contendo lectinas e lectinas obtidas por cromatografia de afinidade de sementes de Artocarpus integrifolia var. mole, Canavalia brasiliensis, Dioclea grandiflora e Dioclea sclerocarpa foram feitos por SILVA-LIMA et al. (1980) no que tange à capacidade das mesmas de induzir a degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos. SILVA-LIMA et al. (1981), utilizando a lectina de Dioclea grandiflora já isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 comprovaram que a lectina foi capaz de induzir a degranulação de mastócitos peritoneais de camundongo e que o 2,4-dinitro fenol, agente desacoplador da fosforilação oxidativa, inibiu a degranulação de mastócitos induzida pela mesma lectina.

A lectina de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" foi outra lectina utilizada por SILVA-LIMA et al. (1981). Estudando a alergenicidade e degranulação de mastócitos produzidas pela lectina os autores chegaram a resultados que sugeriram similaridade entre o mecanismo da ativação e secreção de grânulos de mastócitos induzido tanto por antígeno quanto pela lectina.

O efeito inibidor de diferentes açúcares foi testado sobre a ativação de mastócitos induzida por lectinas. BENEVIDES et al. (1980), usando a fração albumínica de mucunã e con canavalina A bem como SILVA-LIMA et al. (1981), utilizando lectina isolada de sementes de mucunã, verificaram que a ativação de mastócitos induzida pela fração proteica contendo lectina e pelas lectinas acima mencionadas era inibida desde que determinadas concentrações de diferentes açúcares (alfa-metil-D-manosídeo, glicose, frutose e manose) estivessem presentes no meio de incubação. Dentro do mesmo contexto, HORTA-BARROS (1982), mostrou que a atividade hemaglutinante da lectina de D. grandiflora também foi inibida por glicose, manose e frutose. Contrariamente, inibição não significativa da degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Phaseolus vulgaris cv. "Processor", foi verificada por SILVA-LIMA et al. (1981) quando a glicose estava presente no meio de incubação. No entanto, a fetuina que é uma glicoproteína foi utilizada pelos mesmos autores e mostrou-se capaz de inibir a degranulação de mastócitos, concordando com os resultados de inibição da hemaglutinação (PUSZTAI e WATT, 1974).

Das diferentes vias pelas quais mastócitos e seus análogos circulantes, os leucócitos basófilos, podem ser estimulados a secretar grânulos contendo histamina, como já visto, pelo menos um dos mecanismos importantes fisiologicamente (ou fisiopatologicamente) é o mediado por IgE. Sabe-se que tanto os mastócitos quanto os basófilos, possuem receptores de membrana que se ligam especificamente ao chamado anticorpo homocitotrópico conhecido agora como IgE. Existem cerca de 1 a 5×10^5 receptores de IgE por célula (METZGER e BACH, 1978) e a ligação do anticorpo IgE ao seu receptor celular não parece influenciar a ativação da célula. Realmente os mastócitos têm vários graus de saturação de seus receptores de IgE dependendo do nível de IgE circulante.

O mecanismo inicial da indução de mastócitos ou leucócitos basófilos através de IgE, para secretar grânulos contendo

do histamina também tem sido visto quando da utilização de lectinas e em particular a Con A (KELLER 1973) e tem sido evidenciada uma ação sobre essas células comparável em seus efeitos à da reação Ag/Ab. É comparável e não idêntico porque enquanto o antígeno reage com o anticorpo IgE através de sítios específicos, admite-se que as lectinas agem através de resíduos de carboidratos existentes na porção Fc da molécula de IgE (MAGRO 1974). Contudo, devemos ressaltar a necessidade de uma ponte de ligação entre moléculas de IgE adjacentes para que o processo secretório de mastócitos ou basófilos possa ser desencadeado. A necessidade desta ponte de ligação (FIGURA 1) citadas por FOREMAN (1980) é expressa no resumo a seguir:

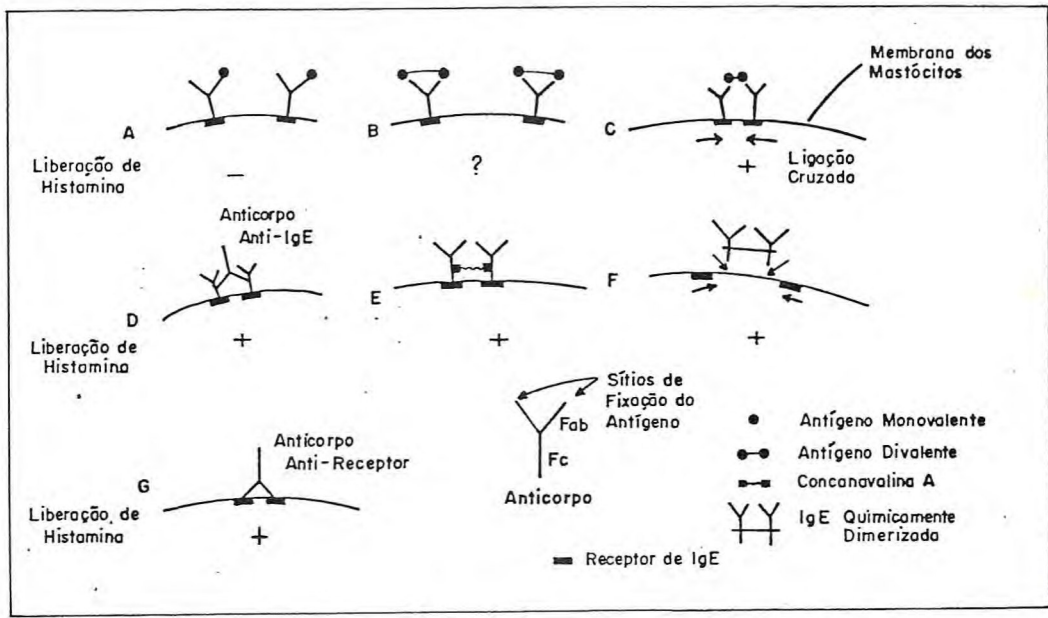
1) Antígenos monovalentes combinam-se com apenas um dos dois sítios de ligação para antígenos que cada molécula de IgE possui (FIGURA 1 A) e isto não deve levar no final à ativação da célula e secreção. Para ser eficaz um antígeno precisa ser divalente ou multivalente, uma observação que pode ser interpretada em termos de ponte de ligação para antígeno entre uma única molécula (FIGURA 1 B) ou moléculas de IgE adjacentes (FIGURA 1 C);

2) Anticorpos (anti-IgE) dirigidos à porção Fc da molécula de IgE fazem ligações cruzadas entre as moléculas de IgE adjacentes e induzem a secreção da célula (FIGURA 1 D);

3) A concanavalina A liga-se a resíduos de carboidratos da região Fc da molécula de IgE fazendo, desse modo, ligações cruzadas entre moléculas de IgE adjacentes e induzindo a secreção da célula (FIGURA 1 E);

4) Moléculas de IgE quimicamente dimerizadas adicionadas ao fluido extracelular ligam-se aos receptores de IgE desocupados na superfície da célula, induzindo ligações cruzadas entre receptores de IgE e consequente secreção da célula (FIGURA 1 F);

5) O receptor de IgE, obtido de basófilo de rato leucêmico, foi isolado e purificado. É uma glicoproteína com um pe



so molecular de cerca de 80.000 e um anticorpo foi preparado contra a mesma. O anticorpo antireceptor (uma IgE) é divalente e pode fazer ligações cruzadas de receptores adjacentes para IgE na membrana celular. O antireceptor estimula a secreção da célula (FIGURA 1 G).

A FIGURA 2 mostra um sumário diagramático dos eventos que ocorrem na membrana, considerados como estando envolvidos na ativação de mastócitos para liberação de histamina, proposto por AXELROD et al. e citado por FOREMAN (1980). Estes autores propuseram que a ligação cruzada de receptores de IgE em mastócitos inicia uma sequência de metabolismo fosfolipídico da membrana e ativação enzimática que resulta na formação de canais para o cálcio. O evento inicial é a descarboxilação da fosfatidilserina (PS) feita pela fosfatidilserina descarboxilase dando fosfatidiletanolamina (PE) que é então metilada por uma fosfatidiletanolamina metiltransferase I dependente de magnésio para produzir um derivado o fosfatidil-N-monometiletanolamina. Uma segunda metiltransferase II converte o metilderivado da fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina (PC) que serve como um substrato para uma fosfolipase A₂ da membrana. A lisofosfatidilcolina (Lyso PC) produzida é então considerada como sendo responsável pela abertura de um canal para o cálcio. Pouco se conhece a respeito dos eventos que ocorrem após a entrada do cálcio além de que eles requerem uma fonte de ATP.

A evidência para o papel da energia metabólica na liberação de histamina foi apresentada em primeiro lugar por PARROT (1942), o qual descobriu que anoxia inibia a liberação de histamina anafilática em tecidos de cobaia. A energia metabólica podia ser proveniente da via glicolítica ou da síntese de ATP acoplada aos três diferentes sítios da cadeia respiratória (FIGURA 3). Estudos posteriores utilizando-se glicose foram realizados para reverter a ação inibidora da anoxia, do cianeto e 2,4-dinitro fenol na liberação de histamina de tecido de rato induzida pelo composto 48/80 ou reação antígeno anticorpo (DIAMANT e UVNÄS, 1961; PROUVOST-DANON e MOUSSATCHÉ, 1961;

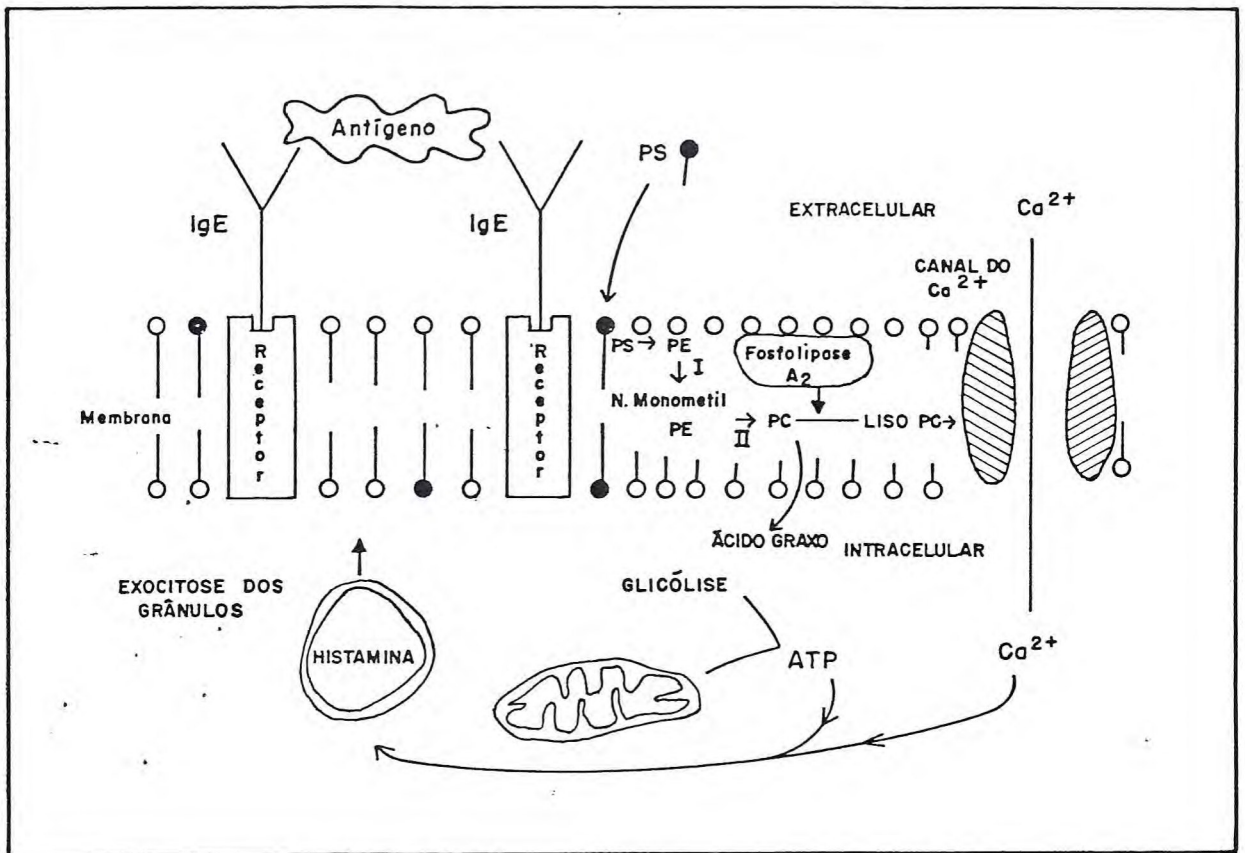
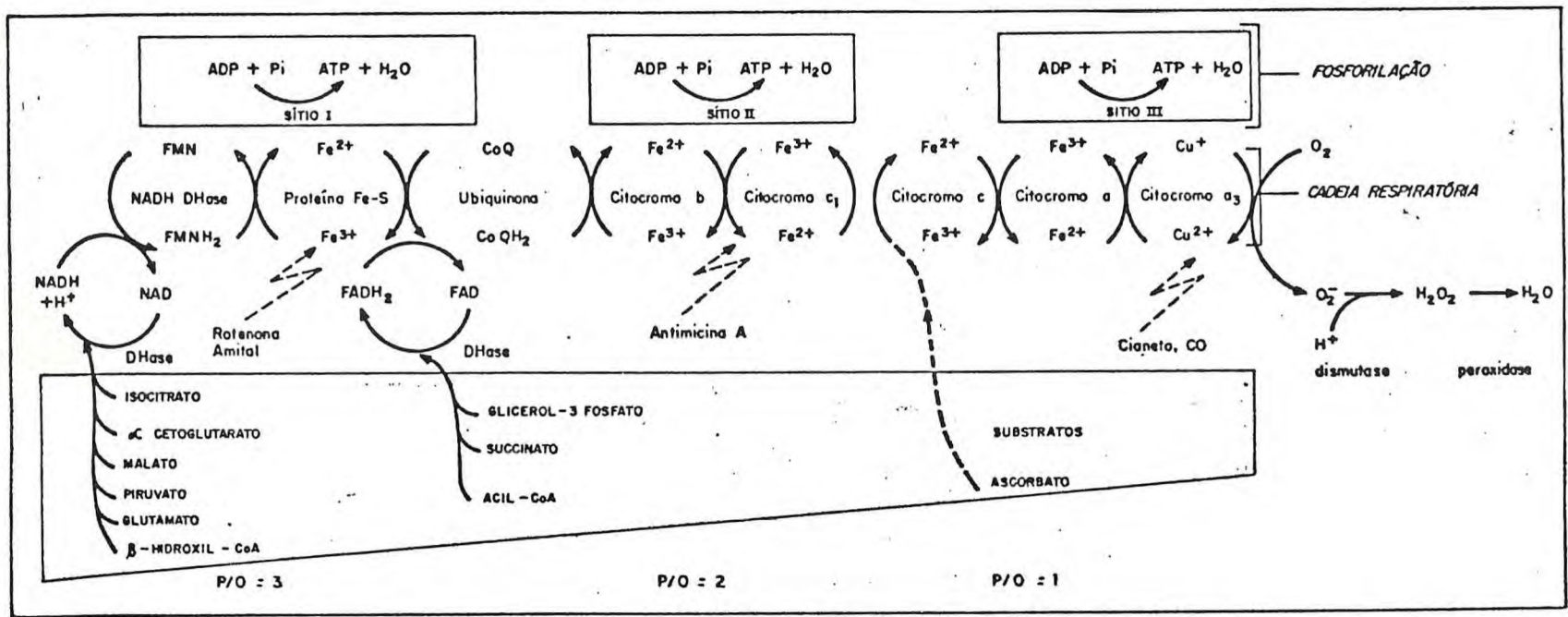


FIGURA 3 - Cadeia respiratória: substratos, sítios de acoplamento e inibidores
(BERKALOFF et al., 1978).



ROTHSCHILD et al., 1961; DIAMANT, 1962b). Este efeito da glicose pode ser anulado por florizina, um inibidor do transporte de glicose (DIAMANT, 1962a). Destes e de outros estudos, concluiu-se que a liberação de histamina não citotóxica de mastócitos é um processo dependente de energia, a qual pode ser mantida por reações fornecedoras de energia glicolítica (anaeróbica) ou oxidativa (aeróbica).

PETERSON (1974), observou que a liberação de histamina de mastócitos de rato incubados em meio livre de glicose é mais susceptível aos inibidores do metabolismo oxidativo, tal como a antimicina A, do que a liberação de células em meio contendo glicose. A glicose (0,5 mM) tem sido demonstrada ser capaz de manter níveis de ATP em mastócitos através da glicólise anaeróbica sob condições de anoxia. O mesmo autor também verificou que a capacidade dos mastócitos de rato de liberar histamina quando expostos ao composto 48/80, produto da condensação do p-metóxi-fenetil-metilamina com o aldeído fórmico (BALTZLY et al., 1949), é correlacionada com seu conteúdo de ATP e que praticamente nenhuma histamina pode ser liberada de células em que o conteúdo de ATP tenha sido reduzido para aproximadamente 25% do valor original. De outro modo, um conteúdo de ATP de aproximadamente 75% do nível original é suficiente para dar o máximo de liberação de histamina.

Outras substâncias inibidoras da síntese de ATP têm sido utilizadas tal como a oligomicina que provocou inibição da liberação de histamina induzida pelo composto 48/80 de mastócitos de rato, após redução no conteúdo de ATP (JOHANSEN e CHAKRAVARTY, 1972) e a 2-desoxiglicose, um inibidor da via glicolítica, reduz o conteúdo de ATP de mastócitos com concomitante supressão da resposta para o antígeno ou composto 48/80 (JOHANSEN e CHAKRAVARTY, 1975). Portanto, a energia metabólica proveniente do ATP é necessária à reação secretora e esta utilização é intrínseca para os eventos bioquímicos da sequência de reações que toma lugar durante a secreção.

O presente trabalho tem como objetivo não somente o estudo da ativação dos mastócitos por lectina de semente de Dio-
clea grandiflora e sua analogia com a reação do antígeno com o anticorpo, como também a participação da energia metabólica no referido processo de ativação (exocitose) celular.

2 - MATERIAIS

2.1 - Animais

As experiências foram efetuadas utilizando-se camundongos albinos "Swiss" trazidos do Connaught Laboratories Limited (Ontário-Canadá) para os Laboratórios Alfa-Connlab do Brasil S.A. (Fortaleza-Ceará) e mantidos em pequena colônia no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC-Fortaleza-Ceará).

2.2 - Lectinas

No presente trabalho foi utilizada a lectina (PIII) de Dioclea grandiflora Mart. (mucunã de caroço) fornecida pelo Dr. Renato Moreira e preparada segundo MOREIRA et al., 1982 e HORTA-BARROS, 1982, de sementes provenientes de Maranguape (Ceará).

Foi também utilizada uma lectina (GLG3B) de sementes de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" procedentes de Hurst Gunson Cooper Taber Ltd, fornecida gentilmente pelo Dr. Arpad Pusztai (The Rowett Research Institute-Aberdeen, Escócia) e preparada segundo PUSZTAI e WATT, 1974 e PUSZTAI e PALMER, 1977.

2.3 - Reagentes

Antimicina A - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Ácido succínico - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Ovalbumina 5 vezes cristalizada (90%), Serva, Heidelberg, Alemanha Ocidental.

Azul de Toluidina O - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Concanavalina A - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

2,4-dinitro fenol - Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y., EUA.

L (-) Ácido málico - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Oligomicina A - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Rotenona - Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Obtenção de mastócitos

Na obtenção de mastócitos, certas precauções devem ser tomadas para evitar o dano celular e para a obtenção de um maior número de células, uma vez que este quando comparado ao de outras células do líquido peritoneal é bastante reduzido (ARGYRIS e ASKONAS, 1968). Sabe-se que os mastócitos contribuem com 2% das células do líquido peritoneal, sendo o resto, composto de 25% de macrófagos típicos, 25% de linfócitos e aproximadamente 50% de macrófagos mononucleares de tamanho médio, difíceis de classificar.

Para obtenção de uma boa percentagem de rendimento dos mastócitos, procedemos da seguinte maneira: após exsanguinamento dos camundongos a pele da região abdominal é retirada tornando mais fácil a injeção intraperitoneal de 2ml do meio de Ringer-Barron (BARRON et al., 1948). Esta solução (C) é preparada a partir de duas soluções estoques (solução A mais solução B):

SOLUÇÃO A:

NaCl	1,4700 M
KCl	0,0436 M
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0120 M
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0084 M

SOLUÇÃO B:

Tampão fosfato 0,5 M (K₂HPO₄ + HCl), pH 7,4.

SOLUÇÃO C:

Solução A	8% V/V
Solução B	4% V/V

A região abdominal dos camundongos deve ser massageada firme mas delicadamente durante 4 minutos para que os mastócitos situados nas pregas mesentéricas se tornem acessíveis dentro do líquido peritoneal. Após a massagem o líquido peritoneal é recolhido com a ajuda de pipeta Pasteur e reunido aos líquidos peritoneais dos diversos camundongos. Este líquido é distribuído em tubos de centrifuga num volume de 2ml e centrifugado em centrifuga clínica (I.E.C.) modelo CL A4487X-7 de 2.000-2.500 r.p.m. durante 2 minutos, repetindo-se as lavagens 4 vezes com 2ml de Ringer-Barron. Após a última lavagem, o sobrenadante é desprezado e ao sedimento é adicionado um novo volume de Ringer-Barron, levando-se em conta o número total de tubos a serem usados na experiência como também o volume a ser utilizado em cada tubo que é constante. O volume da suspensão de mastócitos por tubo variou de 160 a 190 μ l segundo as adições posteriores de outros reagentes.

3.2 - Sensibilização ativa de mastócitos peritoneais

A sensibilização ativa de mastócitos peritoneais de camundongo foi obtida pela imunização de camundongos "Swiss" adultos (6 semanas) com uma injeção subcutânea (0,5 ml/camundongo de 20g) de uma mistura de antígeno e adjuvante. O uso de adjuvante inerte tem sido demonstrado ser importante para a sensibilização de camundongos (MALKIEL e HARGIS, 1959 e VAZ e PEIXOTO, 1963). Em nossos experimentos, a sensibilização de mastócitos peritoneais foi obtida, 14 dias após injeção subcutânea de 10 μ g de ovalbumina (Serva 5X crist.) associadas a 1mg de gel de hidróxido de alumínio (PROUVOST-DANON et al., 1966).

3.3 - Preparação do adjuvante

O adjuvante usado foi o gel de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3) preparado segundo PROUVOST-DANON et al. (1966) e a sua sequência de preparação está descrita a seguir:

15g de sulfato de amônio e alumínio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), são dissolvidas em 180ml de água e em seguida 75ml de NaOH 1N são gotejados nesta solução que é deixada em repouso durante aproximadamente 24hs. para que ocorra a precipitação do Al(OH)_3 ; segue-se uma centrifugação a 4.000 r.p.m. (centrífuga JANETZKI modelo T32c) durante 20 minutos. Ressuspender o precipitado em água para lavar, lentamente a fim de evitar grumos, tendo ainda o cuidado de fazer uma boa homogeneização. Deve-se processar 5 centrifugações para lavar o precipitado que se apresenta finalmente como um gel homogêneo. O último precipitado deve ser ressuspensão em um mínimo de água mas que seja suficiente para ser pipetável, geralmente isto é conseguido com um volume de aproximadamente 15ml. Da suspensão final tomar 1ml e determinar o peso seco, colocando-se na estufa a 100°C durante 24 a 48 horas. Conhecido o peso seco, ajustar a concentração final do gel de Al(OH)_3 a 50 ou 60mg/ml que tem uma consistência ideal para o bom emprêgo como adjuvante.

3.4 - Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro

3.4.1 - Termoequilíbrio

Após termos obtido os mastócitos já numa concentração maior em relação à inicial (ressuspensos em menor volume de Ringer-Barron do que o inicial) 160 a $190\mu\text{l}$ da suspensão foram adicionados por tubo, de acordo com as adições posteriores. A

seguir os mesmos tubos foram levados ao banho-maria a 37°C durante 10 minutos.

Utilizamos este tempo de termoequilíbrio, levando em conta que nas interações de antígeno com anticorpo (tipo IgE) ligados a mastócitos, a reação de degranulação é completa dentro de 1 a 2 minutos a 37°C e que esta reação é dependente de temperatura, sendo inibida em temperaturas abaixo de 12°C e impedida por pretratamentos das células, a 45°C. Dessa forma impunha-se o termoequilíbrio prévio.

3.4.2 - Tempo de incubação da lectina

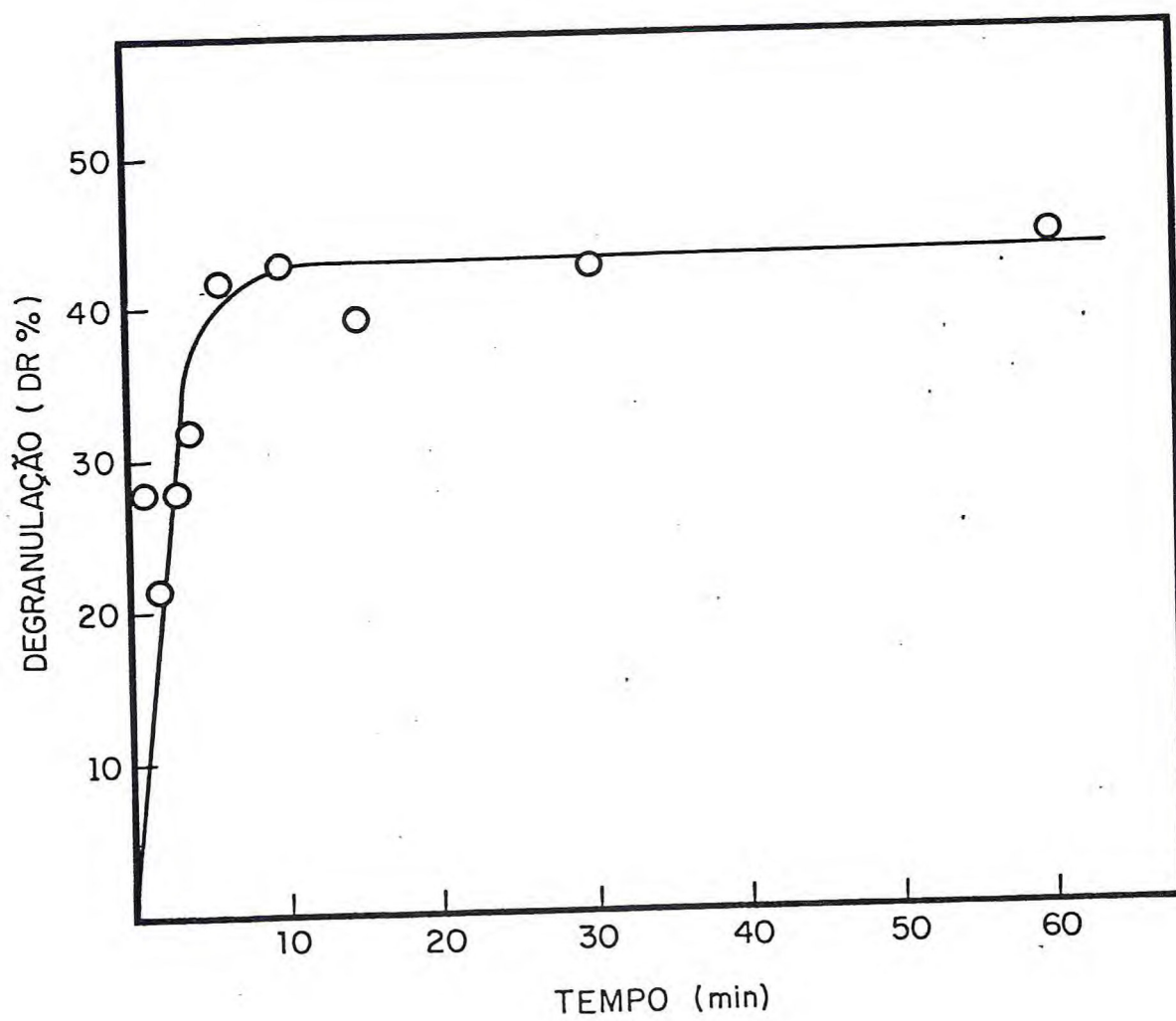
Após os 10 minutos do termoequilíbrio e mantendo-se os tubos no banho-maria a 37°C adicionou-se o antígeno (ovalbumina) ou a lectina deixando-os por mais 6 minutos (tempo de incubação). Este tempo de incubação para a lectina foi fixado após determinação da cinética de degranulação dos mastócitos (os tubos foram retirados do banho-maria e a reação parada pela adição do corante em tempos diferentes) induzida por lectina de Dioclea grandiflora Mart. (FIGURA 4).

Fizemos esta cinética de degranulação, uma vez que substâncias como a concanavalina A e o composto 48/80 por exemplo, induzem degranulação máxima em tempos diferentes, isto é 6 minutos para a Con A e 1 minuto para o composto 48/80. Concluimos que o tempo máximo requerido para a reação de degranulação induzida pela lectina de Dioclea grandiflora é semelhante ao da concanavalina A.

Quando outras substâncias estavam em estudo e por conseguinte presentes no meio de reação, o tempo total de incubação foi também de 6 minutos.

FIGURA 4 - Cinética de degranulação de mastócitos de camundongo induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

A suspensão contendo mastócitos foi obtida conforme o descrito em MÉTODOS. Após as três centrifugações para lavagem, o precipitado final dos mastócitos foi suspenso em 2ml de Ringer-Barron e 190 μ l desta suspensão foram adicionados à 10 tubos. Ao tubo controle foi adicionado salina e aos demais lectina de D. grandiflora na concentração de 50 μ g/ml. A seguir os tubos foram retirados individualmente nos tempos indicados e a eles foram adicionados a solução corante de azul toluidina. O tubo controle foi retirado após 60 minutos, admitindo-se que este representaria a degranulação espontânea máxima, que foi de 5%. As demais operações, isto é, contagem e cálculo de percentagem de degranulação estão indicadas em MÉTODOS.



3.4.3 - Parada da reação

A reação de degranulação dos mastócitos foi parada após o tempo máximo necessário para que a lectina completasse a reação de degranulação, seguida da retirada dos tubos do banho-maria e da adição de 50 μ l de uma solução corante de azul de toluidina 0,1%.

3.4.4 - Coloração

Os mastócitos peritoneais de camundongo apresentam-se geralmente arredondados e com extrema abundância de grânulos, os quais preenchem totalmente o citoplasma a ponto de frequentemente impedirem a visibilidade do núcleo. Estes grânulos são constituídos principalmente por glicoproteínas e coram-se metacromaticamente devido ao seu conteúdo em mucopolissacarídeos sulfatados. Dessa maneira, a coloração dos mastócitos é obtida 30 minutos (tempo mínimo) após a adição de 50 μ l de uma solução corante de azul de toluidina 0,1% o que deverá perfazer um volume final de 250 μ l em cada tubo, sendo a solução corante constituída de:

Azul de toluidina	0,1g
Formaldeído	28,0ml
Álcool etílico	50,0ml
Ácido acético glacial	1,0ml
Água destilada q.s.p.	100,0ml

3.4.5 - Contagem de mastócitos

Baseado no que foi descrito por PROUVOST-DANON et al. (1966), observação microscópica (ocular de 16X e objetiva de

16X) e contagem (feita no mínimo 2 vezes) diretas de mastócitos degranulados e não degranulados foram feitas após coloração com uma solução fixadora de azul de toluidina 0,1%, já referida e em câmara de Fuchs-Rosental. Esta possui uma área reticulada (FIGURA 5) de 16 mm^2 e profundidade de $0,2 \text{ mm}$. Sua capacidade é, portanto, de $3,2 \text{ mm}^3$ e seu uso traz a vantagem de comportar um volume adequado à contagem significativa das células. Os mastócitos não degranulados (FIGURA 6) e os degranulados (FIGURA 7 A e B) foram sempre contados após repouso da câmara cheia, por aproximadamente 5 minutos (tempo necessário para que as células sedimentem), nos 256 quadrados que compõem o retículo da câmara.

Para evitar a contagem de um mastócito mais de uma vez, foi adotada a seguinte regra: os mastócitos que tocam as linhas limítrofes de determinado quadrado à esquerda e acima, conta-mo-los neste quadrado; os que tocam à direita e abaixo conta-mo-los nos quadrados vizinhos.

Os resultados das contagens dos mastócitos foram analisados de acordo com as seguintes expressões:

$$T = D + ND$$

$$D\% = \frac{D \times 100}{T}$$

$$DR\% = D\% - DE\%$$

$$I\% = \frac{DR\%_{s/I} - DR\%_{c/I}}{DR\%_{s/I}} \times 100,$$

onde

T = número total de mastócitos;

D = número de mastócitos degranulados;

ND = número de mastócitos não degranulados;

D% = percentagem de mastócitos degranulados;

FIGURA 5 - Retículo de Fuchs-Rosenthal.

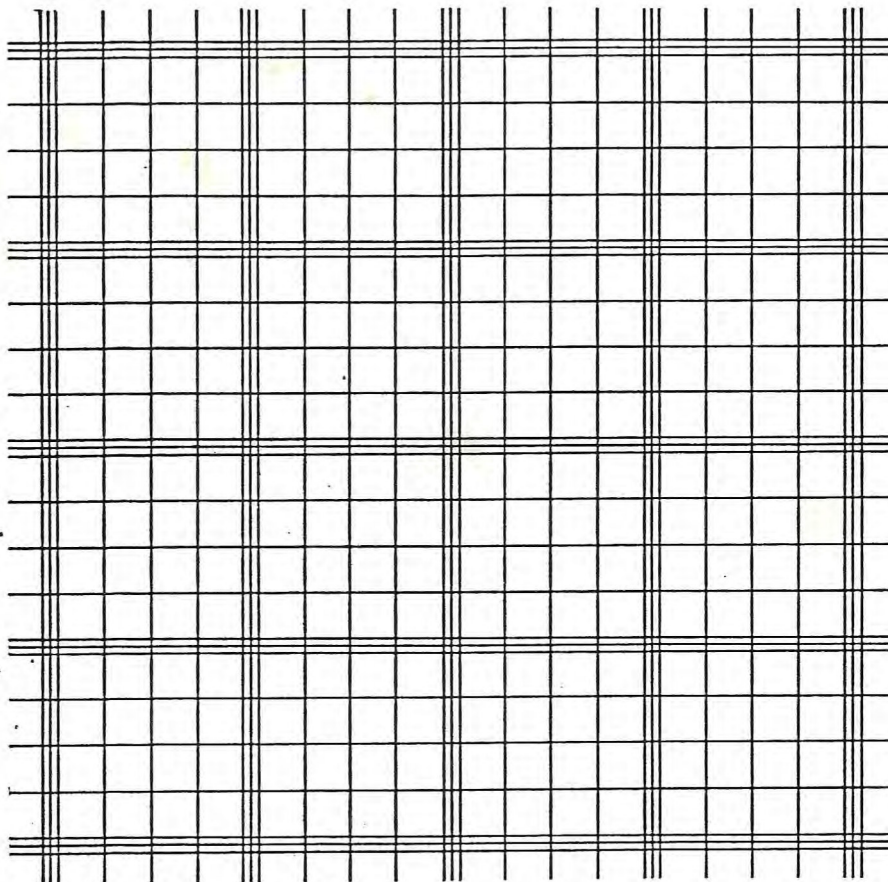
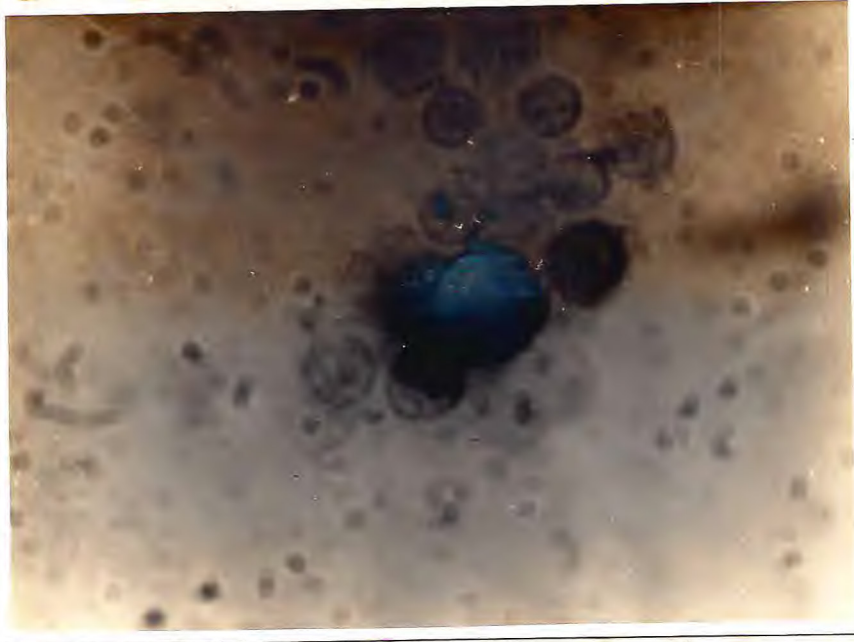


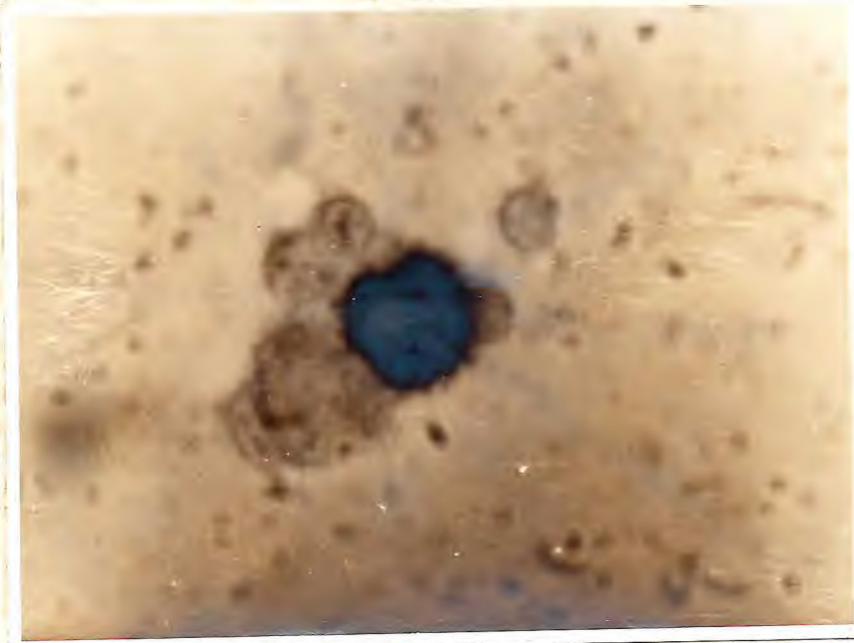
FIGURA 6 - Microfotografia de mastócitos intactos aumentada 400 vezes. As condições de isolamento estão descritas em MÉTODOS. A suspensão dos mastócitos foi submetida ao termoequilíbrio durante 10 minutos adicionais após o que a solução de azul de toluidina foi adicionada. A microfotografia foi feita 30 minutos após a adição do corante.



FIGURA 7 - Microfotografia de mastócitos degranulados (aumento 400 vezes): parcialmente (A) e completamente (B). As condições são idênticas às da FIGURA 6 diferindo apenas em que após o termo e equilíbrio, a lectina de Dioclea grandiflora (50 µg/ml) foi adicionada, seguindo-se um período de incubação de 6 minutos.



A



B

- DR% = degranulação real em percentagem;
 DE% = percentagem de mastócitos degranulados espontaneamente;
 I% = inibição da degranulação em percentagem;
 DR%_{S/I} = degranulação real sem inibidor;
 DR%_{C/I} = degranulação real com o inibidor.

3.5 - Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro em presença de inibidores metabólicos

3.5.1 - Inibidores da via anaeróbica

O poder inibidor do fluoreto de sódio (inibidor da enolase) foi testado sobre a degranulação de mastócitos induzida por lectina de D. grandiflora, nas condições já descritas, diferindo apenas em que após os 10 minutos do termoequilíbrio o NaF foi adicionado em concentrações diferentes nos tubos contendo os mastócitos, salvo o controle que continha NaCl 0,9%. A seguir, estes tubos foram incubados durante 5 minutos ainda a 37°C quando então a lectina de D. grandiflora foi adicionada e deixada atuar nas condições já descritas no item 3.4.2.

3.5.2 - Inibidores da via aeróbica

A influência do 2,4-dinitro fenol (desacoplador da fosforilação oxidativa), da oligomicina (inibidor do transporte de elétrons acoplado à fosforilação) e de inibidores dos três diferentes sítios de formação de ATP acoplada à cadeia mito

condrial de transportadores de elétrons: rotenona (1º sítio); antimicina A (2º sítio); cianeto de potássio (3º sítio), foi verificada sobre a degranulação de mastócitos induzida por D. grandiflora.

As condições foram as mesmas já usadas com o NaF, sendo o mesmo substituído pelos inibidores aqui mencionados.

A degranulação espontânea de mastócitos foi controlada em presença e ausência de cada um dos inibidores.

3.5.3 - Inibidores das vias anaeróbica e aeróbica simultaneamente

A influência do fluoreto de sódio (inibidor da enolase) e do 2,4-dinitro fenol (desacoplador da fosforilação oxidativa) foi testada simultaneamente sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora.

As condições foram as mesmas já usadas para o NaF isoladamente sendo utilizada uma mistura dos dois inibidores acima referidos, onde o 2,4-DNP foi mantido numa concentração fixa (100 μ M) e o fluoreto de sódio em concentrações variadas (0,01 a 5mM).

A degranulação espontânea de mastócitos foi controlada em ausência e presença da mistura dos dois inibidores (NaF 5mM e 2,4-DNP 100 μ M).

3.6 - Degranulação de mastócitos peritoneais in vitro: reversão da inibição

A reversão da inibição da degranulação induzida por

2,4-dinitro fenol, rotenona e antimicina A em concentrações fixas foi testada, utilizando-se certos metabólitos como a glicose, succinato e ascorbato em concentrações fixas ou variadas.

Após o termoequilíbrio, o inibidor em concentração fixa e o metabólito em concentração fixa ou variada foram adicionados, seguindo-se uma incubação a 37°C durante 10 minutos para a glicose e 5 minutos para o succinato e ascorbato e posterior adição da lectina de mucunã (50µg/ml). Decorridos 6 minutos após a adição da lectina, os tubos foram retirados do banho-maria e procedemos a coloração e contagem como já mencionado anteriormente (3.4.4 e 3.4.5).

Foram feitos controles para verificar além da degranulação espontânea, a influência dos inibidores e metabólitos sobre a integridade dos mastócitos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

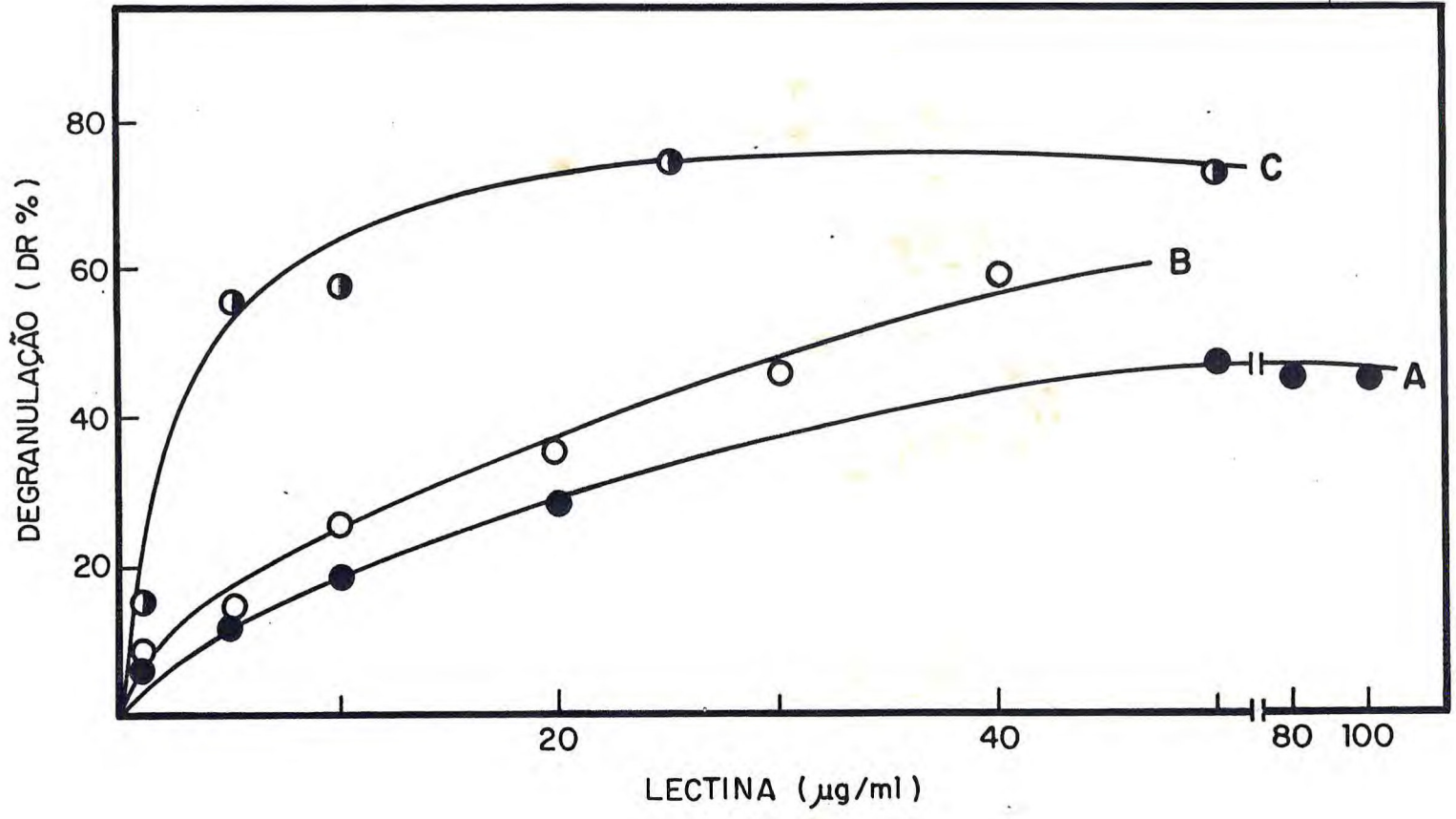
A ativação dos mastócitos pela lectina de Dioclea grandiflora será aqui apresentada e discutida sob 2 aspectos:

- 1 - Mecanismo da ativação;
- 2 - Participação da energia metabólica no mecanismo de ativação.

Os resultados apresentados na FIGURA 8 mostram a ativação (exocitose) dos mastócitos do líquido peritoneal de camundongo pela lectina de Dioclea grandiflora (A) comparada à ativação pela lectina de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" (B) e pela lectina de Canavalia ensiformis (C). A exocitose induzida pela lectina de mucunã (A) é dependente da concentração até 50 µg/ml e a partir daí, não só não é aumentada como provoca discreta inibição. Este resultado sugere que a exocitose dos grânulos dos mastócitos não é devida a uma ação citotóxica inespecífica da lectina sobre os mastócitos que acarretaria uma degranulação crescente com o aumento da concentração.

A indução da exocitose de grânulos de mastócitos peritoneais de camundongo, por lectina de Phaseolus vulgaris, estudada por SILVA-LIMA et al. (1981), no presente trabalho foi utilizada para comparar a sua capacidade de produzir exocitose em relação às das outras duas lectinas (PIII e Con A). Os resultados mostraram dependência de concentração, o que reforça dados semelhantes obtidos por SILVA-LIMA et al. (1981). Quanto a uma possível inibição da exocitose de grânulos de mastócitos provocada por altas concentrações da lectina de P. vulgaris, não foi detectada uma vez que altas concentrações da lectina provocaram aglutinações das células, impossibilitando conclusões precisas. A lectina de P. vulgaris apresentou também uma ativa

FIGURA 8 - Efeito comparativo da indução da exocitose de grânulos de mastócitos por três diferentes lectinas: PIII, GLG3B e Con A. A obtenção dos mastócitos e condições de incubação, coloração e contagem foram as mesmas referidas na legenda da FIGURA 4 e em MÉTODOS, à exceção de que o tempo de incubação dos mastócitos com as lectinas foi fixado em 6 minutos. A (●—●) PIII, B (○—○) GLG3B e C (⊖—⊖) Con A.



ção maior do que a da lectina de mucunã e menor que a da Con A.

A indução da exocitose de grânulos de mastócitos de várias espécies animais pela Con A tem sido objeto de extensas investigações por diversos autores (KELLER, 1973; SIRAGANIAN e SIRAGANIAN, 1974; SUGIYAMA et al., 1975; SULLIVAN et al., 1975; LAWSON et al., 1978). No nosso trabalho a Con A foi utilizada para comparar a sua capacidade de produzir exocitose em mastócitos peritoneais de camundongo em relação a outras duas lectinas (de D. grandiflora e de P. vulgaris). Os resultados indicam também uma dependência de concentração (C). Podemos também notar que a lectina induziu degranulação até uma certa concentração a partir da qual passou a provocar inibição. Estes dados estão em concordância com aqueles encontrados por SIRAGANIAN e SIRAGANIAN (1974), os quais utilizaram a Con A para induzir a liberação de histamina de células de cinco diferentes espécies animais. Vê-se ainda que a Con A exibiu uma ativação maior do que a das outras duas lectinas (D. grandiflora e P. vulgaris).

4.1 - Mecanismo de ativação

A hipótese utilizada para explicar a ativação dos mastócitos pelas lectinas foi a de que elas atuariam ligando-se aos resíduos de carboidratos da porção Fc da molécula de IgE que está fixada à membrana do mastócito (METZGER e BACH, 1978). Como suporte para esta hipótese estão os resultados apresentados por MAGRO (1974) em que a Con A agiria por ligações cruzadas sobre os açúcares das moléculas de IgE e a necessidade de um alto teor de IgE fixados aos mastócitos para que se pudesse pôr em evidência a ação ativadora da lectina (KELLER, 1973). Para abordar o aspecto da mediação da IgE na ativação pela lectina de Dioclea grandiflora dois tipos de experiências foram

realizadas:

a) Ação da lectina em função da idade do animal na su posição de que o sistema imune e suas reações são mais solici tados com o correr do tempo, aumentando assim o título de IgEs inespecíficas.

A TABELA 1 mostra a ação da lectina de mucunã sobre mastócitos peritoneais de camundongo de diferentes idades (45, 90 e 180 dias). Podemos observar que a intensidade da exocitose de mastócitos foi dependente da idade do animal. Este resultado reforça a hipótese da mediação da IgE na indução da exocitose pela lectina. Mais especificamente, acredita-se que a imunoglobulina E facilitaria a ação da lectina por permitir uma fixação da mesma aos carboidratos da fração Fc da IgE. O fato de animais mais velhos apresentarem mastócitos mais sus ceptíveis à ativação induzida pela lectina, faz supor que es tes animais possuiriam um título de IgE inespecífica fixada aos mesmos mais elevado do que o dos animais mais jovens. Isto teria sido motivado por agressões variadas de caráter infec cioso, infestações e etc. Um fato que faz supor a participa ção do sistema imunológico no mecanismo de ação das lectinas foi relatado por PUSZTAI et al. (1979) que trabalhando com animais livres de germe (gnotobióticos) mostraram que estes animais, que apresentavam um sistema imunológico ainda não so licitado, eram menos sensíveis ao efeito tóxico da lectina de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" sobre o trato intestinal.

Vários estudos ainda mostram o crescimento da produção de IgE de acordo com a idade dos animais. Assim é que PROUVOST-DANON e BINAGHI, (1970) estudando anticorpos reagínicos em ca mundongos adultos e jovens verificaram que camundongos jovens produziram anticorpos reagínicos no soro e que o título aumen tou com a idade dos animais. BINAGHI et al. (1966), também ob servaram em ratos que nas primeiras semanas de vida a quanti dade de anticorpos produzida é menor que a do adulto. JOHANSSON (1968), verificou ainda em seres humanos que a produção de

TABELA 1 - Influência da idade sobre a degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss" induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Idade (dias)	Lectina ($\mu\text{g/ml}$)	Degranulação (DR% \pm s) [*]
45	50	41 \pm 2,4 (26)
90	50	50 \pm 1,8 (29)
180	50	69 \pm 6,3 (23)

* Os valores representam uma média acompanhada do desvio padrão e entre parênteses está o número de animais analisados. A diferença entre as médias foi significativa (Teste de t) ao nível de 5%.

reaginas (IgE) aumentou lentamente durante os primeiros 6 a 8 anos de vida.

b) Ação da lectina em mastócitos comprovadamente dotados de alto teor de IgE.

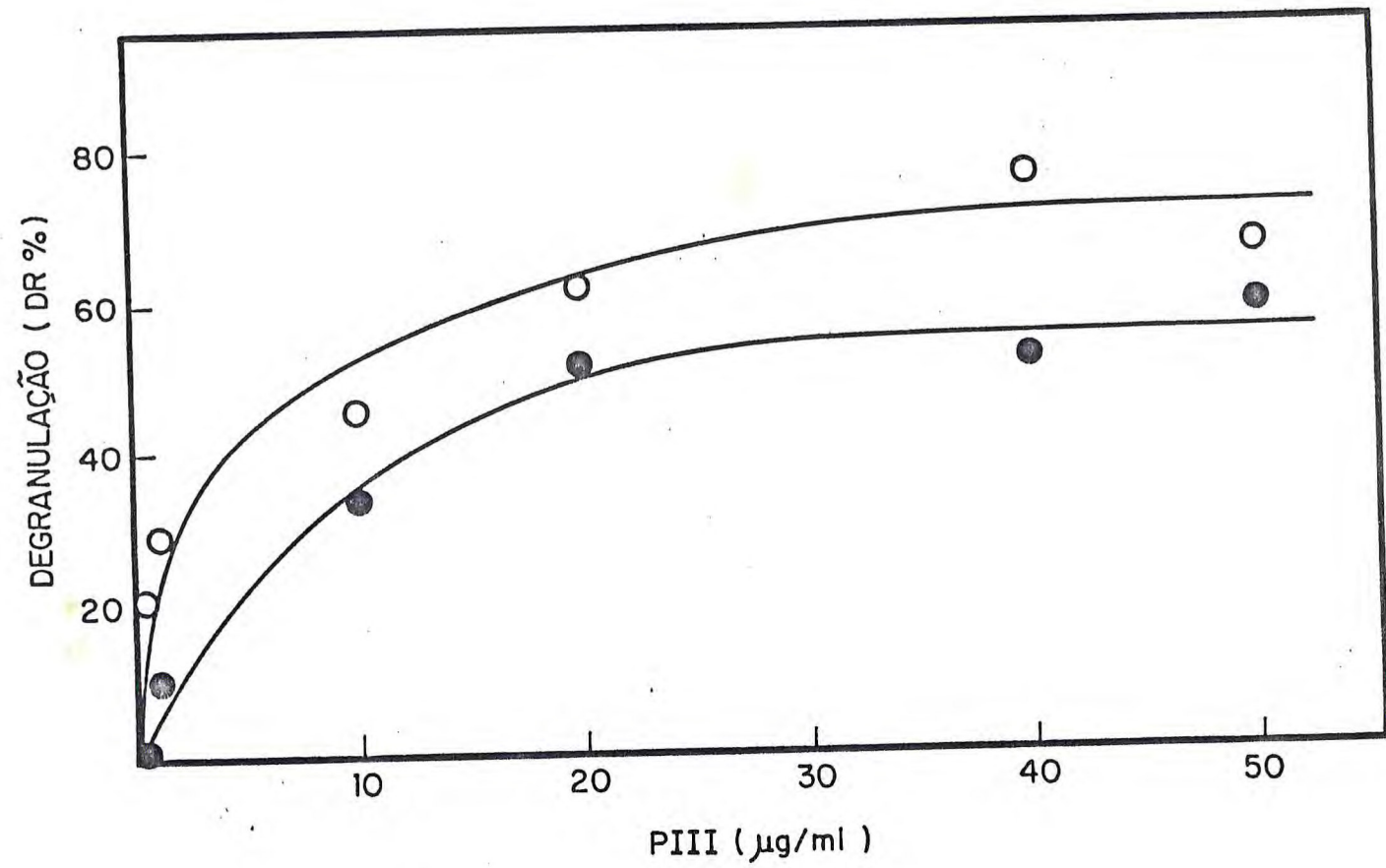
A indução da exocitose de grânulos de mastócitos pela lectina de mucunã foi testada em mastócitos isolados de dois grupos de camundongos, sendo o primeiro grupo de animais previamente imunizados por um antígeno (ovalbumina) não relacionado à lectina e um segundo grupo (controle) de animais não imunizados. A indução da exocitose pela lectina de mucunã foi relativamente mais alta (FIGURA 9) no grupo de camundongos que tinham sido previamente imunizados contra ovalbumina e cujo título de IgE fora previamente testado por degranulação anafilática in vitro de mastócitos. Este é pois, mais um argumento em favor da participação da IgE no mecanismo de ativação celular induzida pela lectina.

KELLER (1973) também observou que a concanavalina A era capaz de iniciar a degranulação de mastócitos em animais com níveis aumentado de IgE, mas não naqueles com níveis normais ou baixos. Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA-LIMA et al. (1981), os quais verificaram que a indução da degranulação por lectina de P. vulgaris foi aumentada quando camundongos foram também previamente imunizados por antígeno não relacionado.

4.2 - Participação da energia metabólica

O mecanismo da reação anafilática ainda é em nossos dias objeto de especulações e uma tentativa de explicação dos eventos no nível da membrana dos mastócitos foi mostrado na FIGURA 2. Nela observamos que a energia metabólica desempenha um

FIGURA 9 - Influência do título de IgE inespecífica sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart. A obtenção dos mastócitos em animais não sensibilizados (●—●) e animais sensibilizados (○—○) está descrita em MÉTODOS. As demais condições: incubação, coloração, contagem e cálculo estão descritos nas legendas das FIGURAS 4 e 5 e em MÉTODOS.



papel neste mecanismo. Uma vez que admitimos a ação da lectina por intermédio da IgE (FIGURA 1), como consequência desta suposição está a afirmação de que a ativação celular pela lectina é um processo comparável ao da reação anafilática. A participação da energia na ativação dos mastócitos pela lectina foi estudada com o uso dos inibidores metabólicos. Assim é que o fluoreto de sódio (0,1 a 10 mM), um inibidor da via glicolítica através da enolase, não foi capaz de provocar inibição da exocitose (TABELA 2) de grânulos de mastócitos induzida pela lectina de mucunã. Neste caso, uma vez que a experiência não foi realizada em anaerobiose, possivelmente os substratos endógenos da via aeróbica continuaram sendo metabolizados e as necessidades energéticas através da cadeia de transportadores de elétrons foram suficientes para satisfazer as exigências energéticas adequadas à exocitose induzida pela lectina. Os mastócitos efetivamente parecem ter um bom suprimento de substratos endógenos pois, durante incubação a 37°C num meio livre de glicose, o consumo de oxigênio permanece inalterado pelo menos por 4 horas (CHAKRAVARTY e ZEUTHEN, 1965) e o conteúdo de ATP não é reduzido dentro de uma hora (DIAMANTI, 1967). Estes resultados estão de acordo com os de PETERSON (1974), o qual encontrou um acúmulo de lactato proveniente de substratos endógenos quando utilizou a antimicina A para inibir o transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.

Usamos também o 2,4-dinitro fenol, um desacoplador, para eliminar qualquer fornecimento energético vindo através da via aeróbica. Vários experimentos foram realizados com o 2,4-dinitro fenol (5 a 100 μ M) com a finalidade de testar a influência do mesmo na exocitose de grânulos de mastócitos peritoneais de camundongo induzida pela lectina de mucunã. Os resultados (FIGURA 10) demonstram que o 2,4-dinitro fenol 11 μ M já foi capaz de inibir 50% da exocitose induzida por 50 μ g/ml da lectina de mucunã. Contudo, 50 μ M de 2,4-dinitro fenol não foi capaz de inibir completamente a exocitose conforme encon

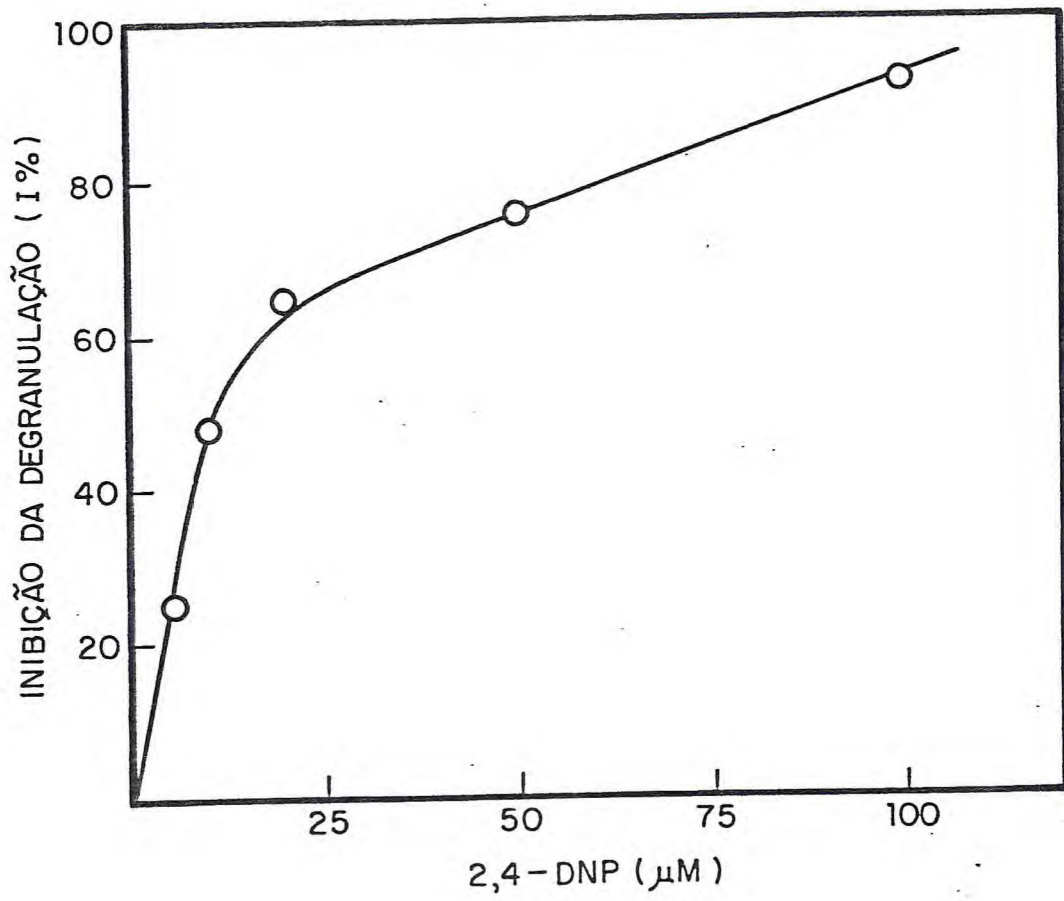
TABELA 2 - Influência do fluoreto de sódio na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongo "Swiss", induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Lectina ($\mu\text{g/ml}$)	Fluoreto de sódio (mM)	Degranulação (%)*
50	—	100
50	10,0	93
50	5,0	96
50	2,5	88
50	1,0	97
50	0,5	97
50	0,1	98

* Valores obtidos considerando-se como 100% a degranulação obtida em presença da lectina e em ausência de NaF.

FIGURA 10 - Ação inibidora do 2,4-dinitro fenol sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Condições idênticas às descritas em MÉTODOS e nas legendas das FIGURAS 4 e 5. Após o termoe quilibrio de 10 minutos, o 2,4-dinitro fenol nas diferentes concentrações foi adicionado e incubado a 37°C por mais 5 minutos, seguido da lectina de D. grandiflora (50 µg/ml). A determinação da percentagem de inibição da degranulação está indicada em MÉTODOS.



trou PROUVOST-DANON et al. (1967), estudando a influência da energia metabólica sobre a reação anafilática em mastócitos peritoneais de camundongo. Esta discrepância é justificada com as diferenças metodológicas dos dois trabalhos. A maior duração das experiências com a reação anafilática pode ter sido responsável pela exaustão de substratos endógenos dos mastócitos ocorrida na experiência comparada, o que se admite não ter ocorrido no nosso experimento.

A FIGURA 11 mostra os resultados de tentativa feita para obter a inibição total da degranulação induzida pela lectina, na presença dos inibidores da via aeróbica e anaeróbica simultaneamente. Por aí observamos que 2,4-dinitro fenol $10^{-4}M$ e fluoreto de sódio 5mM efetivamente causam 100% de inibição.

Além do uso de desacopladores da fosforilação oxidativa, uma vez que estaria em jogo a participação da energia metabólica, utilizamos a oligomicina (0,00125 a 0,5 μM), inibidor do transporte de elétrons acoplado à fosforilação, com o intuito de testar a influência da mesma na exocitose de grânulos de mastócitos peritoneais de camundongo induzida pela lectina de mucunã. Os resultados (FIGURA 12) mostram que a percentagem de inibição foi dependente da concentração do inibidor e que 0,12 μM de oligomicina foi capaz de inibir 50% da exocitose induzida por 50 $\mu g/ml$ da lectina de mucunã.

Vale salientar que JOHANSEN (1979), estudando os efeitos de inibidores das vias glicolítica e respiratória na liberação anafilática de histamina de mastócitos de rato in vitro, verificou também que a oligomicina (1 $\mu M/ml$) inibe a liberação de histamina, assim como a produção de ATP oxidativo.

JOHANSEN e CHAKRAVARTY (1972), também observaram que a oligomicina provocou inibição da liberação de histamina de mastócitos de rato induzida pelo composto 48/80, após redução no conteúdo de ATP. Estes fatos permitem uma comparação entre a degranulação dos mastócitos induzida pela reação anafilática

FIGURA 11 - Influência inibidora do fluoreto de sódio e do 2,4-dinitro fenol simultaneamente sobre a de granulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Condições idênticas às da FIGURA 10 à exceção de que o fluoreto de sódio nas concentrações indicadas e o 2,4-dinitro fenol ($100\mu\text{M}$) foram incubados juntos nos 5 minutos que se seguiram ao termoequilíbrio.

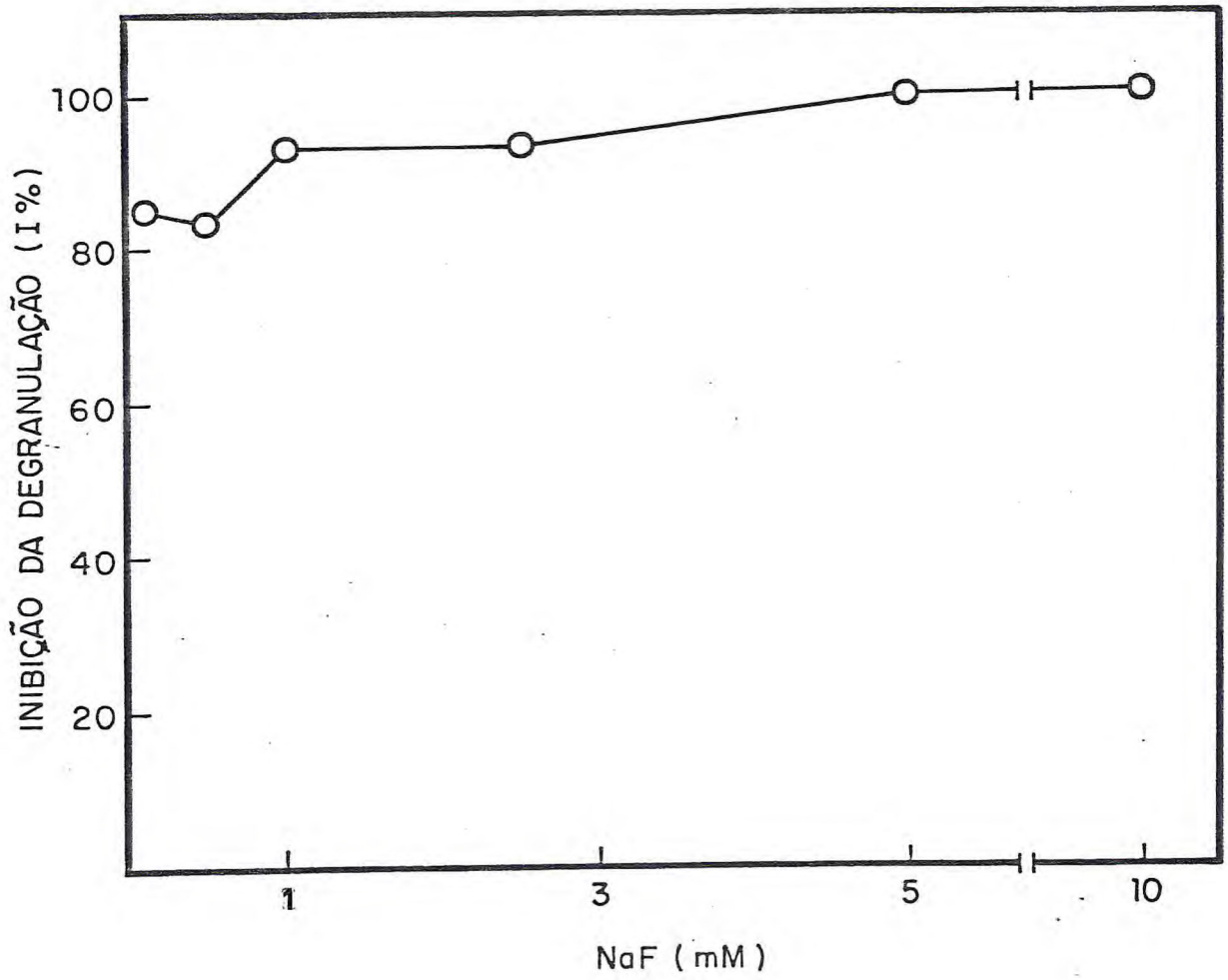
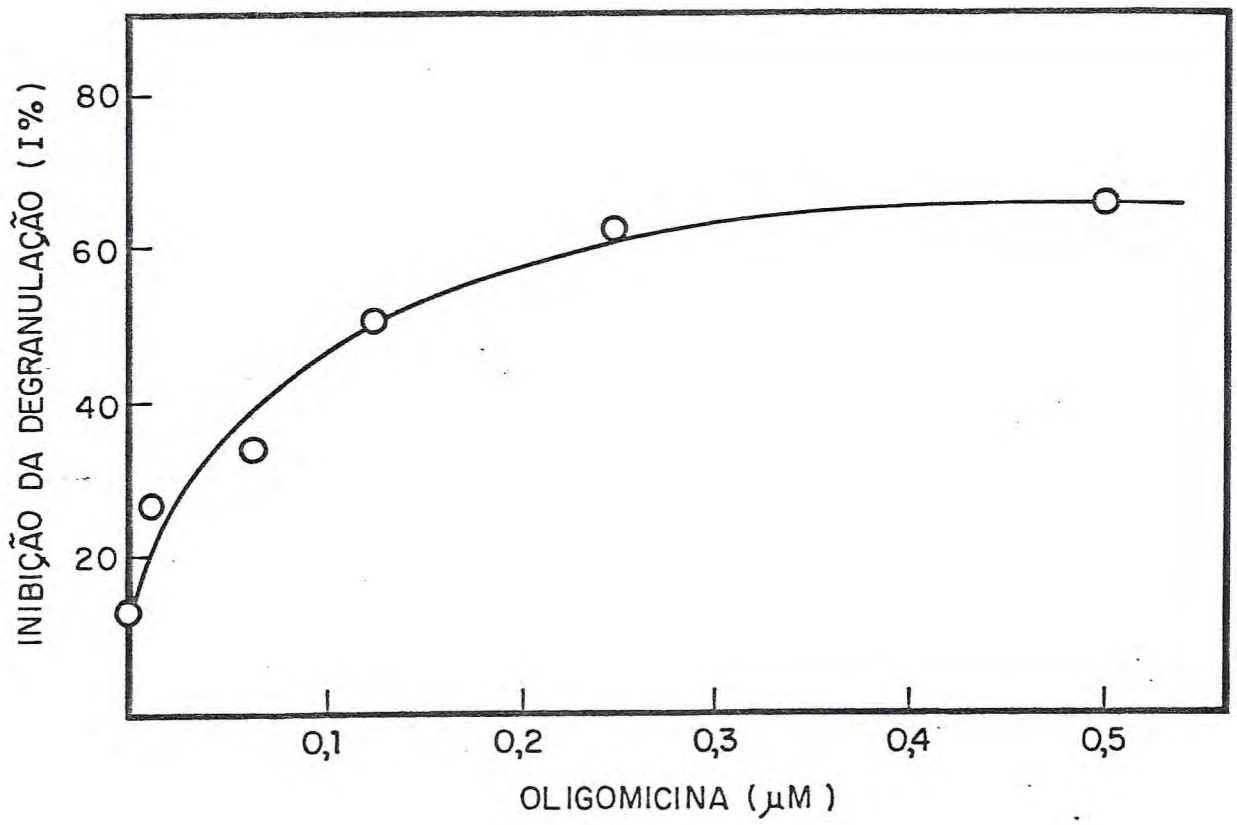


FIGURA 12 - Ação inibidora da oligomicina sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina da Dioclea grandiflora Mart.

Condições idênticas às da FIGURA 10, sendo a oligomicina nas concentrações indicadas adicionadas nos 5 minutos que se seguiram ao termo equilíbrio.



e a induzida por lectina.

Passamos então a analisar a participação da energia metabólica na degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora com o uso de inibidores da cadeia de transportadores de elétrons ao nível dos três diferentes sítios de síntese de ATP (FIGURA 3). Na FIGURA 13 mostramos o efeito da rotenona que é o princípio tóxico, com propriedades inseticidas (CORBERTT, 1940), isolado de plantas timbões (termo popular brasileiro usado para designar plantas capazes de envenenar peixes) de vários gêneros especialmente de leguminosas dos gêneros Derris e Lonchocarpus nicou Aubl.). Ela bloqueia especificamente o transporte eletrônico da NADH desidrogenase à Co Q (OHNISHI, 1973) no sítio de síntese de ATP e inibe assim, a reoxidação do NADH produzido pelas principais desidrogenases do ciclo de Krebs (ERNSTER et al., 1963). No presente trabalho, vários estudos foram feitos com a finalidade de testar a influência da rotenona (0,025 a 0,5 μ M) sobre a exocitose de grânulos de mastócitos peritoneais de camundongos induzida por 50 μ g/ml de lectina de mucunã. A FIGURA 13 mostra que 0,11 μ M de rotenona foi capaz de inibir 50% da exocitose de grânulos de mastócitos induzida por 50 μ g/ml de lectina de mucunã e que a percentagem de inibição foi dependente da concentração do inibidor.

ERNSTER et al. (1963), também observaram que uma quantidade de rotenona equivalente a aproximadamente 30 nanomoles por grama de proteína é suficiente para inibir a oxidação de substratos dependentes de NAD em mitocôndrias de fígado de rato.

No presente trabalho, usamos também antimicina A (0,00125 a 0,5 μ M), um inibidor do transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do segundo sítio de síntese de ATP, preincubando-a durante 5 minutos com os mastócitos para posterior adição do agente indutor da exocitose (lectina de mucunã). Os resultados (FIGURA 14) mostram que 0,02 μ M de anti

FIGURA 13 - Ação inibidora da rotenona sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Condições idênticas às da FIGURA 10, sendo a rotenona nas concentrações indicadas adicionadas nos 5 minutos que se seguiram ao termoequilíbrio.

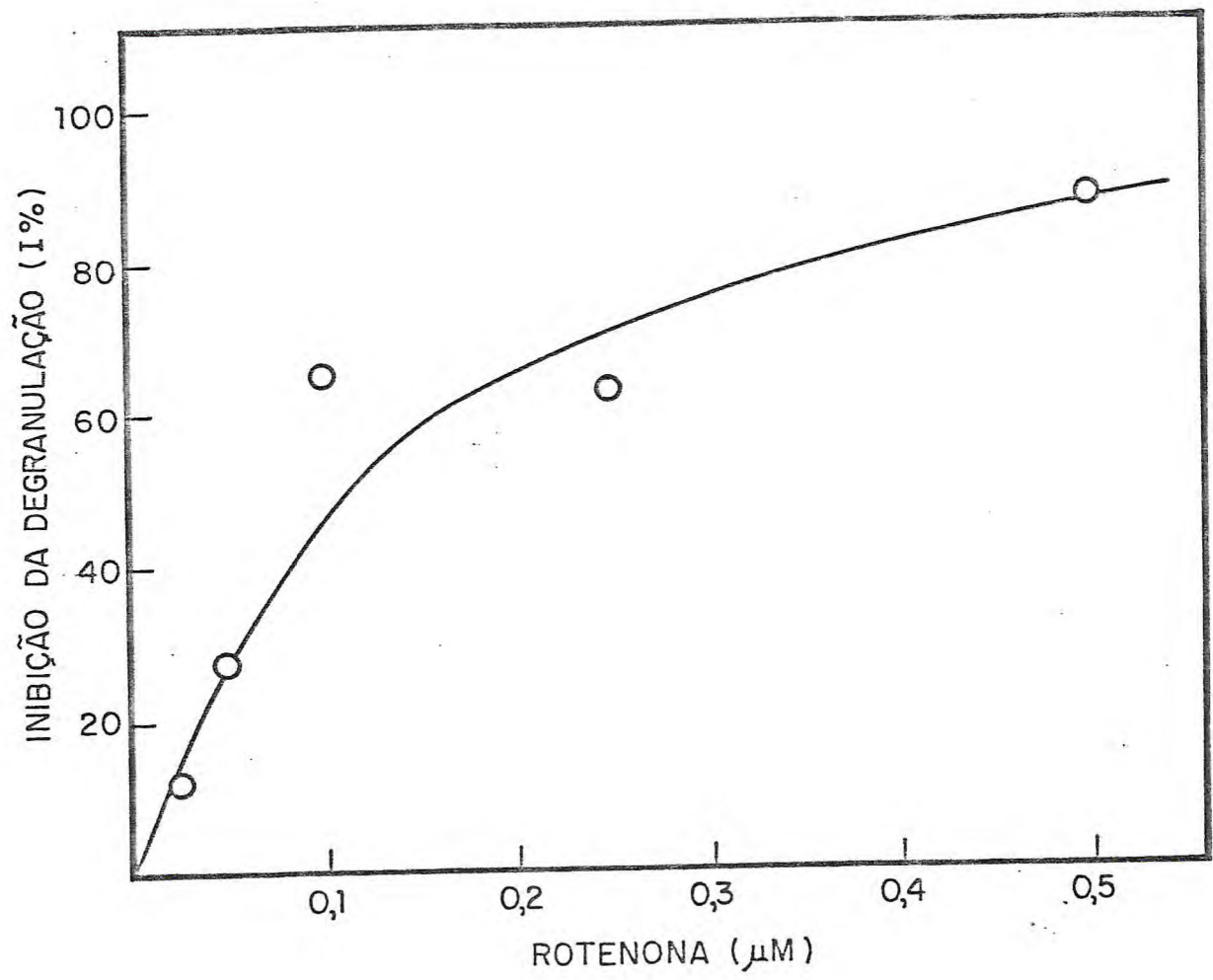
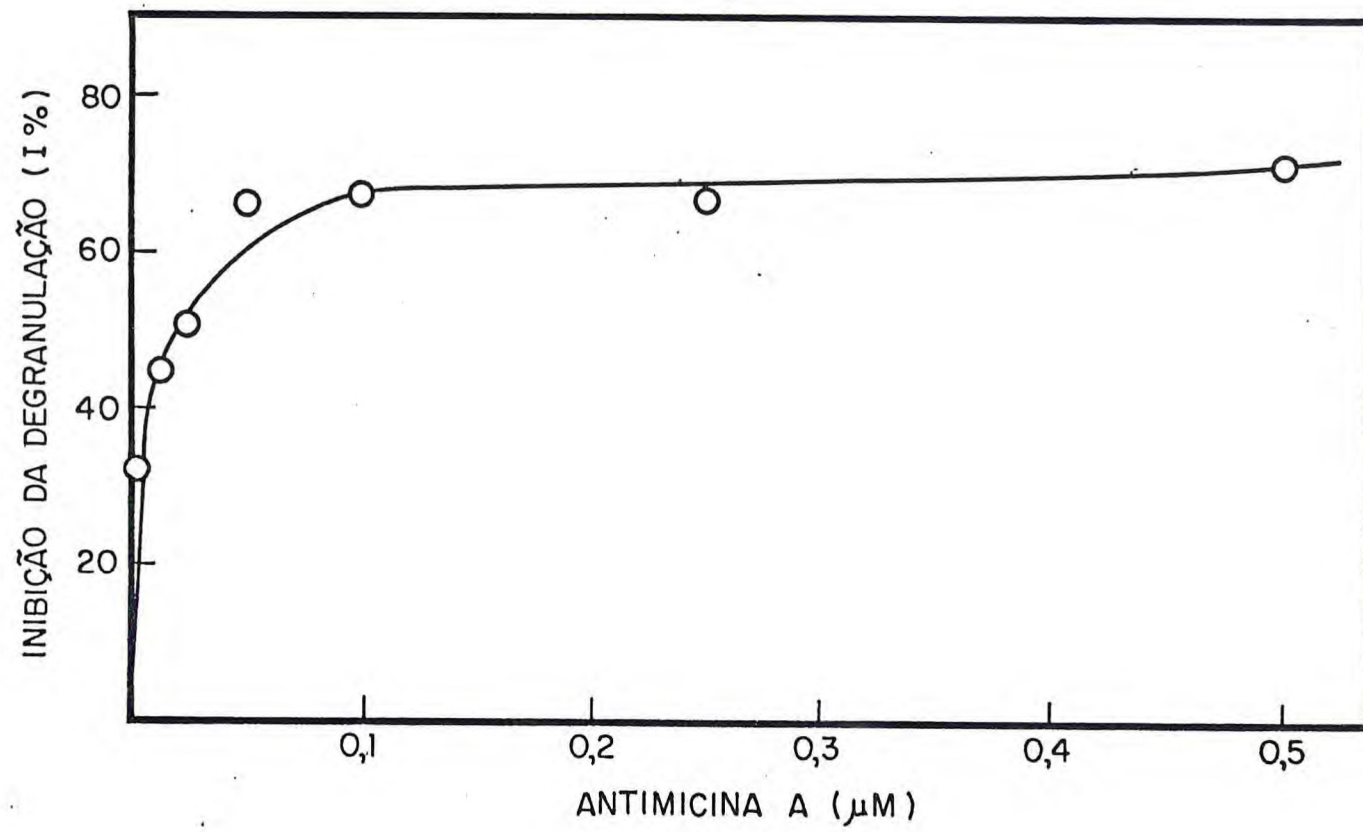


FIGURA 14 - Ação inibidora da antimicina A sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart. Condições idênticas às da FIGURA 10, sendo a antimicina A nas concentrações indicadas adicionada nos 5 minutos que se seguiram ao termoequilíbrio.



micina A foi capaz de inibir 50% da exocitose de grânulos de mastócitos induzida por 50 µg/ml da lectina de mucunã. Contudo, 0,5 µM da antimicina A não foi capaz de inibir completamente a exocitose. Esta inibição parcial da exocitose, provavelmente pode ser atribuída a uma disponibilidade energética residual dos mastócitos, resultante de um período de preincubação menor que o utilizado por outros autores.

DIAMANT (1975), utilizando mastócitos de rato preincubados (5 minutos) com antimicina A (0,5 µM) também não observou inibição total da liberação de histamina induzida por composto 48/80.

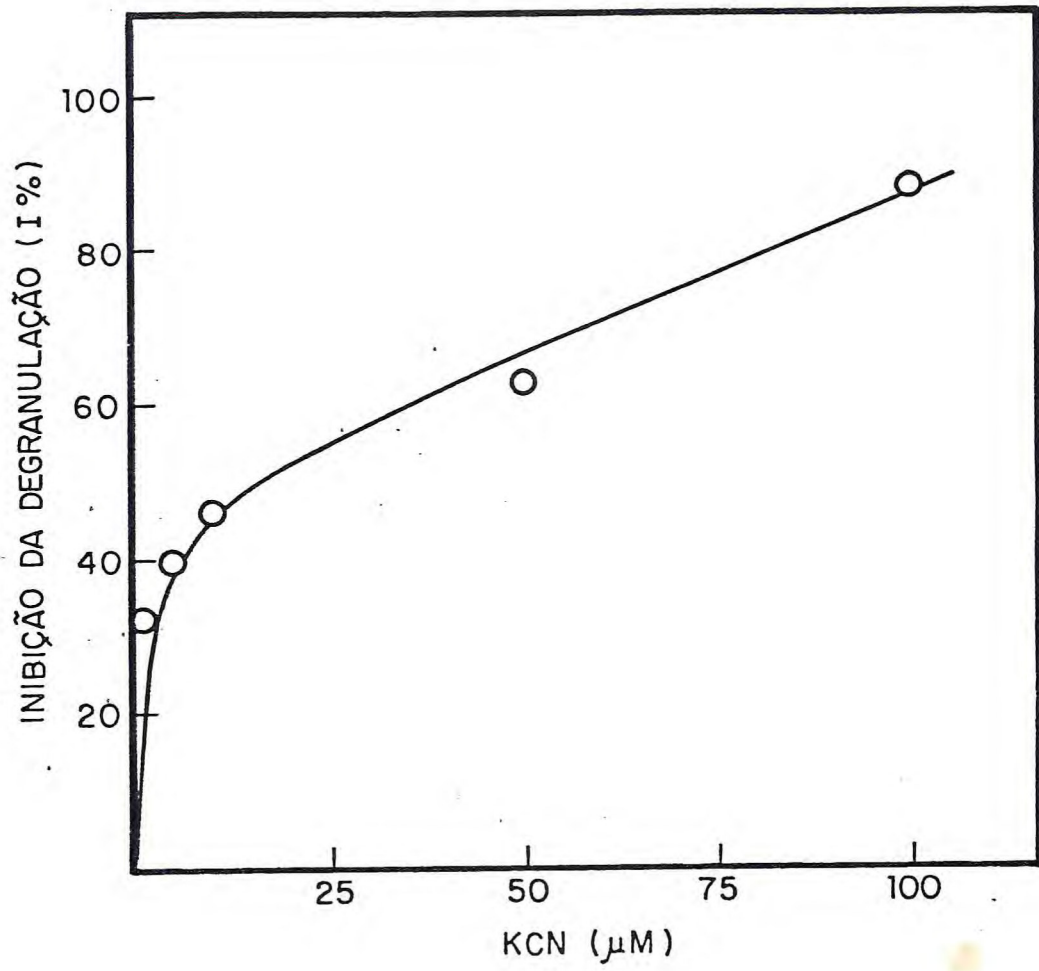
PETERSON (1974) estudando a ação inibidora da antimicina A (0,2 µM) sobre mastócitos de rato também verificou que a liberação de histamina induzida por composto 48/80 foi suprimida, contanto que os mastócitos fossem preincubados (10 minutos) com o inibidor e que nenhuma inibição ocorreu quando mastócitos foram expostos à antimicina A e composto 48/80 simultaneamente.

PROUVOST-DANON et al. (1967), também observaram que a antimicina A inibia a liberação de histamina e a degranulação em reações anafiláticas in vitro de mastócitos peritoneais de camundongo.

A influência do cianeto de potássio (1 a 100 µM), que é conhecido como inibidor (3º sítio) da citocromo oxidase (citocromo aa₃), foi estudada preincubando-se suspensões de mastócitos com diversas concentrações de cianeto durante 5 minutos seguindo-se a adição do agente indutor da exocitose (lectina de mucunã). Como mostra a FIGURA 15, 16 µM de cianeto de potássio foram capazes de inibir 50% da exocitose de grânulos de mastócitos induzida por 50 µg/ml de lectina de mucunã. Podemos também observar que a percentagem de inibição foi dependente da concentração do inibidor e que 100 µM de cianeto de potássio ainda não foi capaz de inibir completamente a exocitose.

FIGURA 15 - Ação inibidora do cianeto de potássio sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Condições idênticas às da FIGURA 10, sendo o cianeto de potássio nas concentrações indicadas adicionado nos 5 minutos que se seguiram ao termoequilíbrio.



Outros estudos têm sido realizados por vários autores examinando o efeito do cianeto na reação anafilática. O cianeto foi capaz de promover inibição da reação anafilática mas em concentrações variáveis. Provavelmente a explicação estaria na diversidade de condições metodológicas. Assim é que MONGAR e SCHILD (1957), obtiveram 46% de inibição da liberação anafilática de histamina de pulmão de cobaia com 2 mM de cianeto. AUSTIN e BROCKLEHURST (1961) encontraram 50% de inibição com 1 mM de cianeto após preincubação por 10 segundos. ROTSCILD e BARRETO (1961) demonstraram que a liberação anafilática de histamina de pulmão de cobaia foi completamente bloqueada por 1 mM de cianeto na ausência de glicose, e que este efeito foi significativamente revertido por 1 mM de glicose. PROUVOST-DANON et al. (1965) demonstraram que a liberação de histamina anafilática de cobaia foi inibida por diversas concentrações de cianeto e que a glicose, adenosina e ribose reverteram o efeito inibidor do pretratamento com cianeto na liberação da histamina.

Várias tentativas foram feitas para reverter a inibição da degranulação induzida pela lectina. Assim, verificamos que preincubando-se suspensões de mastócitos durante 10 minutos com glicose (0,1 a 5 mM) na presença e ausência do inibidor (100 μ M de 2,4-dinitro fenol) a exocitose que era bloqueada por 2,4-dinitro fenol voltou a ser verificada, desde que houvesse glicose presente no meio de reação, em concentrações inferiores às que inibem a lectina de mucunã indicando por conseguinte uma participação da via glicolítica (FIGURA 16 e TABELA 3). Portanto a energia metabólica necessária à modulação do processo da exocitose dos mastócitos induzida por lectina foi fornecida pela via glicolítica e a lectina passou a provocar a exocitose de grânulos de mastócitos mesmo em presença de 2,4-dinitro fenol.

Outros autores também verificaram que a glicose era capaz de reverter a ação inibidora do cianeto ou 2,4-dinitro fenol na liberação de histamina de tecido de rato induzida pelo

FIGURA 16 - Correlação entre os efeitos da glicose inibindo a lectina e revertendo a ação inibidora do 2,4-dinitro fenol sobre a degranulação de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart. Representação semilogarítmica da percentagem de degranulação versus concentração de glicose em presença (●—●) e ausência de 2,4-dinitro fenol (○—○). Após o termoequilíbrio a glicose em diferentes concentrações, isoladamente ou em mistura com o 2,4-dinitro fenol foi adicionada ao meio de reação seguindo-se uma incubação de 10 minutos quando então foi adicionada a lectina (50 µg/ml). As demais condições experimentais estão descritas em MÉTODOS e nas legendas das FIGURAS 4 e 5. Os valores de degranulação foram obtidos conforme o indicado na legenda da TABELA 2.

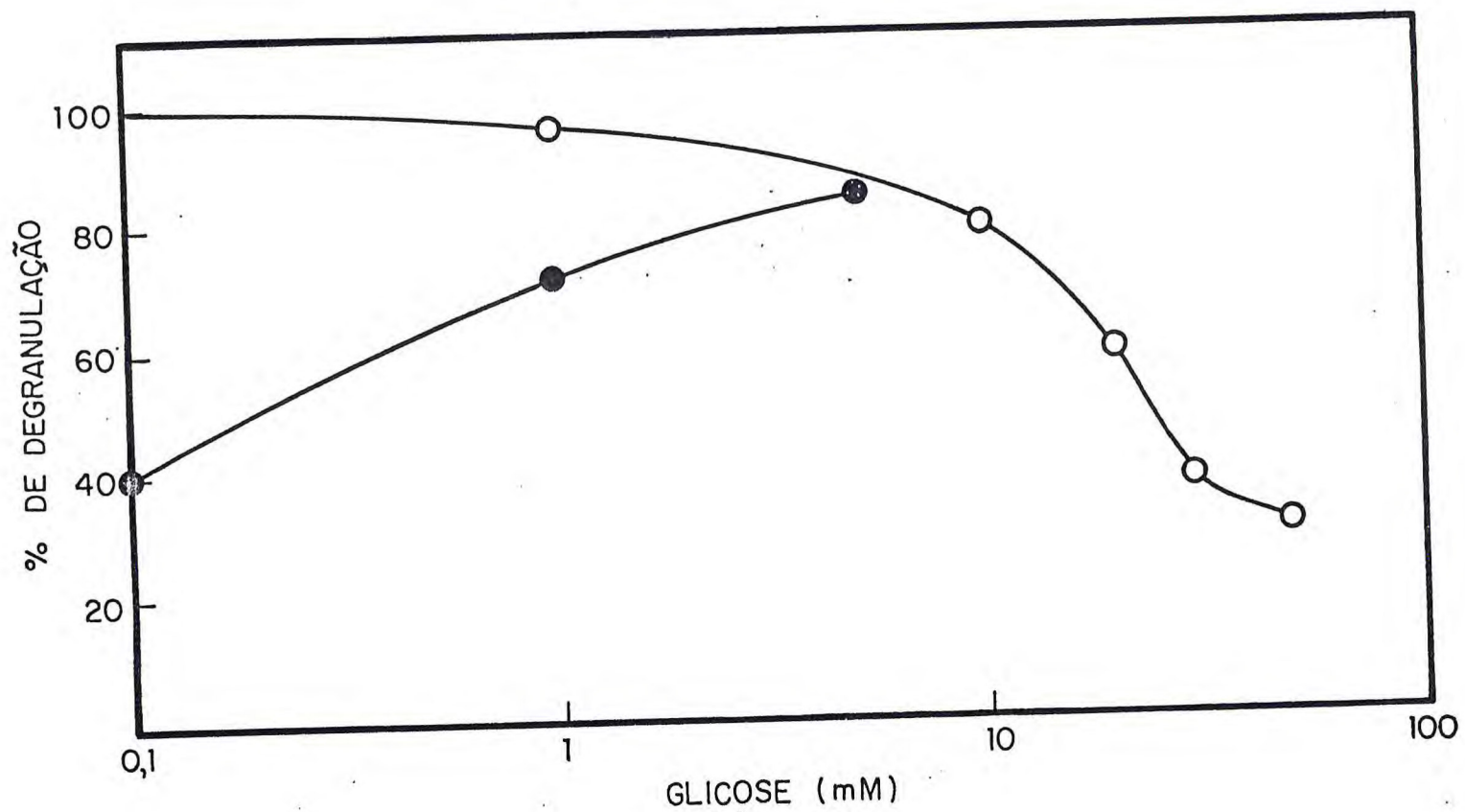


TABELA 3 - Reversão por intermédio da glicose do efeito inibidor causado pelo 2,4-dinitro fenol na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongo "Swiss", induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Lectina ($\mu\text{g/ml}$)	Glicose (mM)	2,4-DNP (μM)	Degranulação (%)*	Inibição (%)
50	-	—	100	—
50	-	100	8	92
50	5	100	84	16

* Calculada segundo o indicado na legenda da TABELA 2.

composto 48/80 ou reação-antígeno anticorpo (DIAMANT e UVNÁS, 1961; PROUVOST-DANON e MOUSSATCHÉ, 1961; ROTHSCHILD et al., 1961; DIAMANT, 1962).

A reversão da inibição da degranulação dos mastócitos provocada pelos inibidores metabólicos foi tentada não só pelo fornecimento de energia através da via glicolítica, como pelo fornecimento de energia através da via aeróbica. Para tal, foram usados metabólitos que permitissem um suprimento de elétrons à cadeia respiratória, em pontos posteriores aos inibidos pelos inibidores específicos dos três diferentes sítios de síntese de ATP (rotenona, antimicina A e cianeto de potássio - ver FIGURA 3). Assim é que usamos o succinato que é desidrogenado pela succinatodesidrogenase (desidrogenase ligada à flavina), a qual cataliza a introdução de elétrons na cadeia respiratória, através da Ubiquinona. Os mastócitos foram preincubados durante 5 minutos com rotenona ($0,5 \mu\text{M}$) na presença e ausência do succinato (5 mM) com a finalidade de testar a reversão de inibição da exocitose de grânulos de mastócitos induzida pela rotenona. Os resultados da TABELA 4 mostram que o succinato que fornece poder redutor à cadeia respiratória em ponto posterior ao do bloqueio da rotenona foi capaz de reverter a inibição da exocitose induzida pela rotenona. Isto sugere que há necessidade de uma certa quantidade de energia a qual pode ser fornecida quando do rendimento de dois ATPs vindos dos sítios 2 e 3 ligados à cadeia respiratória e que foram proporcionados pela oxidação de cada molécula de succinato.

A TABELA 5 mostra que o ascorbato que fornece elétrons à cadeia respiratória ao nível do 3º sítio de síntese de ATP não foi capaz de promover uma reversão da inibição da degranulação dos mastócitos induzida pela lectina de *Dioclea grandiflora*. Este resultado sugere que além da energia ser importante para a ativação celular, uma quantidade ótima de energia parece ser exigida. Isto porque o rendimento de apenas 1 ATP provocado pelo ascorbato não foi suficiente, como no caso do

TABELA 4 - Reversão por intermédio do succinato do efeito inibidor causado pela rotenona na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss", induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Lectina ($\mu\text{g/ml}$)	Succinato (mM)	Rotenona (μM)	Degranulação (%) * ⁺	Inibição (%) *
50	-	—	100	-
50	-	0,5	17 \pm 4,6 (5)	83 \pm 4,6 (5)
50	5	0,5	67 \pm 3,1 (7)	33 \pm 3,1 (7)

* Os valores representam uma média acompanhada do desvio padrão e entre parênteses está o número de experiências realizadas.

+ Calculada segundo o indicado na legenda da TABELA 2.

TABELA 5 - Reversão por intermédio do ascorbato do efeito inibidor causado pela antimicina A na degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos "Swiss", induzida pela lectina de Dioclea grandiflora Mart.

Lectina ($\mu\text{g/ml}$)	Ascorbato (mM)	Antimicina (μM)	Degranulação (%)*	Inibição (%)
50	-	-	100	-
50	-	0,1	25	75
50	10	0,1	30	70
50	8	0,1	27	73
50	5	0,1	26	74

* Calculada segundo o indicado na legenda da TABELA 2.

succinato, para reverter a ação do inibidor do fornecimento energético.

5 - CONCLUSÕES

1. A lectina de Dioclea grandiflora induz exocitose de grânulos de mastócitos dependente da concentração, sendo 50 µg/ml a concentração utilizada para produzir a degranulação máxima.
2. A exocitose de grânulos de mastócitos provocada pela lectina de Dioclea grandiflora foi menor, quando comparada à das lectinas de Phaseolus vulgaris cv. "Processor" e Cana-valia ensiformis, em idênticas concentrações.
3. A intensidade da exocitose de grânulos de mastócitos provocada pela lectina de Dioclea grandiflora é dependente da idade do animal, sendo maior em animais mais velhos.
4. A indução da exocitose de grânulos de mastócitos pela lectina de Dioclea grandiflora foi mais intensa em animais dotados de alto título de IgE.
5. O fluoreto de sódio (0,1 a 10 mM) quando utilizado em aerobiose não é capaz de inibir a exocitose de grânulos de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora.
6. O fornecimento de energia metabólica ao ser inibido, impede a exocitose de grânulos de mastócitos induzida pela lectina de Dioclea grandiflora. Os seguintes, são capazes de provocar 50% de inibição da degranulação nas concentrações ($I_{50\%}$) especificadas: 2,4-dinitro fenol ($I_{50\%} = 11 \mu\text{M}$); oligomicina ($I_{50\%} = 0,12 \mu\text{M}$); rotenona ($I_{50\%} = 0,11 \mu\text{M}$); antimicina A ($I_{50\%} = 0,02 \mu\text{M}$); cianeto de potássio ($I_{50\%} = 16 \mu\text{M}$).

7. A exocitose de grânulos de mastócitos que é inibida por bloqueio da via aeróbica induzida por 2,4-dinitro fenol (100 μ M) pode ser revertida por glicose (ativação da via glicolítica).
8. O succinato que fornece poder redutor à cadeia respiratória em ponto posterior ao do bloqueio da rotenona, com ganho energético de 2 ATPs foi capaz de reverter a inibição da exocitose de grânulos de mastócitos induzida pela rotenona.
9. O ascorbato que fornece poder redutor à cadeia respiratória em ponto posterior ao do bloqueio da antimicina A com ganho energético de 1 ATP não foi capaz de reverter a inibição da exocitose induzida pela antimicina A.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGYRIS, B.F. e ASKONAS, B.A. Mouse peritoneal cells: their ability to elicit or produce antibody after exposure to antigen. Immunology. 14:379-392, 1968.
- AUSTEN, K.F. e BROCKLEHURST, W.E. Anaphylaxis in chopped guinea pig lung. III. Effect of carbon monoxide, cyanide, salicylaldehyde, and ionic strength. J. Exp. Med. 114:29-42, 1961.
- BACH, M.K. e BRASLER, J.R. Inhibition of IgE and compound 48/80-induced histamine release by lectins. Immunology. 29:371-386, 1975.
- BALTZLY, R., BUCK, J.S., DE BEER, E.J. e WEBB, F.J. A family of long-acting depressors. J. Amer. Chem. Soc. 71(4) 1301-1305, 1949.
- BARRON, E.S., MEYER, J. e MILLER, Z.B. The metabolism of skin Effect of vesicant agents. J. Invest. Derm. 11:97-118, 1948.
- BAXTER, J.H. e ADAMIK, R. Differences in requirements and actions of various histamine-releasing agents. Biochem. Pharmacol. 27:497-503, 1978.
- BENEVIDES, R.H.P., SILVA-LIMA, M., PROUVOST-DANON, A., BRITO, F.P., MOREIRA, R.A. e REINALDO, H.M. Aspectos bioquímicos da ativação dos mastócitos por lectinas: Inibição por açúcares. I Reunião Regional da SBBq, Fortaleza-Ce. 1980. Livro de Resumos, pag 17.

- BIDDLE, F., BRONIN, A.P. e SANDERS, F.K. The interaction between Wheat germ agglutinin and receptors on normal and transformed cells and on erythrocytes. Cytobios. 5:9 - 17, 1970.
- BINAGHI, R.A., OETTGEN, H.F. e BENACERRAF, B. Anaphylactic antibody in the young rat. Int. Arch. Allergy. 29:105-111, 1966.
- BOYD, W.C. The lectins: their present status. Vox Sang. 8:1-32, 1963.
- BOYD, W.C. e SHARPLEIGH, E. Science. 119:419, 1954. Citado em LIENER, I.E., 1976(a).
- CHAKARAVARTY, N. e ZEUTHEN, E. Respiration of rat peritoneal mast cells. J. Cell Biol. 25:113-121, 1965.
- CORBETT, C.E. Plantas Ictiotóxicas - Farmacologia da rotenona. Monografia da Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, 157 pp., 1940.
- DIAMANT, B. Effect of phorizin on the in vitro release of histamine from lung tissue. Acta Physiol. Scand. 56:97-102, 1962(a).
- DIAMANT, B. Betydelsen av glykos vid histaminfrisättning och mastcellsdegranulering. En experimentell studie på isolerad lungvavnad och mastceller. Stockholm, 1962(b). Thesis. Cita do em PETERSON, C., 1974.
- DIAMANT, B. The effects of compound 48/80 and distilled water on adenosine triphosphate content of isolated rat mast cells. Acta Physiol. Scand. 71:283-290, 1967.
- DIAMANT, B. Energy production in rat mast cells and its role

for histamine release. Int. Archs Allergy Appl. 49:155-171, 1975.

DIAMANT, B. e UVNÄS, B. Evidence for energy-requiring processes in histamine release and mast cell degranulation in rat tissues induced by compound 48/80. Acta Physiol. Scand. 53: 315-329, 1961.

ENNIS, M., TRUNEH, A. e PEARCE, F.L. Lectin-induced histamine secretion from isolated rat and guinea pig mast cells. Biochem. Pharmacol. 30(15): 2179-2181, 1981.

ERNSTER, L., DALLNER, G. e AZZONE, G.F. Differential effects of rotenone and amytal on mitochondrial electron and energy transfer. J. Biol. Chem. 238(3): 1124-1131, 1963.

FOREMAN, J. Receptor-secretion coupling in mast cells. Trends Pharmacol. Sci. 460-462, 1980.

GASPERI-CAMPANI, A., BARBIERI, L., LORENZONI, E. e STIRP, F. Inhibition of protein synthesis by seed-extracts. Febs Lett. 76(2): 173-176, 1977.

GOLD, E. e BALDING, P. Receptor specific proteins: plant and animal lectin. Excerpta medica, Amsterdam, 1975.

GOLDSTEIN, I., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. e SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, 285(5760): 66, 1980.

HORTA-BARROS, A.C.: Isolamento e caracterização parcial da lectina de Dioclea grandiflora, Mart. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1982.

JAFFÉ, W.C. Hemagglutinins, in liener, I.E., ed. Toxic

- constituents of plant foodstuffs, Academic Press, New York, 1969.
- JAFFÉ, W.G. e GOMEZ, M.J. Beans of high or low toxicity. Qual. Plant. Pl. Fds. Hum. Nutr. XXIV, 3/4: 359-365, 1975.
- JOHANSEN, T. Adenosine triphosphate levels during anaphylactic histamine release in rat mast cells in vitro. Effects of glycolytic and respiratory inhibitors. Eur. J. Pharmacol. 58: 107-115, 1979.
- JOHANSEN, T. e CHAKRAVARTY, N. Dependence of histamine release from rat mast cells on adenosine triphosphate. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275: 457-463, 1972.
- JOHANSEN, T. e CHAKRAVARTY, N. The utilization of adenosine triphosphate in rat mast cells during histamine release induced by anaphylactic reaction and compound 48/80. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288: 243-260, 1975.
- JOHANSEN, S.G.O. Serum IgND levels in healthy children and adults. Int. Arch. Allergy 34: 1-8, 1968.
- KELLER, R. Concanavalin A, a model "antigen" for the in vitro detection of cell-bound reaginic antibody in the rat. Clin. Exp. Immunol. 13: 139-147, 1973.
- LANSMAN, J.B. e COCHRANE, D.E. Wheat germ agglutinin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells in the absence of extracellular calcium. Biochem. Pharmacol. 29: 455-458, 1980.
- LAWSON, D., FEWTRELL, C. e RAFF, M. Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. J. Cell Biol. 79: 394-400, 1978.

- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (Phytolectins). Ann. Rev. Plant. Physiol. 27: 291-319, 1976(a).
- LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. J. of Food Sci. 41: 1076-1080, 1976(b).
- LIS, H. e SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem. 42:541-574, 1973.
- LIS, H. e SHARON, N. Lectins in higher plants, in Abraham Mercus, ed. The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise. Vol. 6, Academic Press. London, 1981.
- MAGRO, A.M. Involvement of IgE in Con A-induced histamine release from human basophils in vitro, Nature 249:572-573, 1974.
- MALKIEL, S. e HARGIS, B.J. The use of adjuvants in sensitization of the mouse J. Allergy 30: 387-393, 1959.
- MANEN, J.F. Les phytohémagglutinines. II: activité mitovité et rôle possible dans les plantes, in Miège, J., ed. Les protéines des graines, Georg Editeur, Genève, 1975.
- METCALFE, D.D., KALINER, M. e DONLON, M.A. The mast cell. CRC Crit. Rev. Immunol. 3: 23-74, 1981.
- METZGER, H. e BACH, M.K. The receptor for IgE on mast cells and basophilis: studies on IgE binding and on the structure of the receptor, in Bach, M.K., ed. Immediate hypersensitivity Modern Concepts and developments, Marcel Dekker, New York, 1978, 581. Citado em METCALFE, D.D. et al., 1981.
- MONGAR, J.L. e SCHILD, H.O. Inhibition of the Anaphylactic Reaction. J. Physiol. 135: 301-319, 1957.

- MOREIRA, R.A., HORTA-BARROS, A.C., STEWART, J.C., PUSZTAI, A.
Isolation and characterization of a lectin from the seeds of
Dioclea grandiflora (Mart.) - enviado para publicação, 1982.
- MORRISON, D.C. e HENSON, P.M., Release of mediators from mast
cells and basophils: induced by different stimuli, in Bach,
M.R., ed. Immediate Hypersensitivity-Modern Concepts and
Development, Marcel Dekker, New York, 1978, 431. Citado em
NETCALFE, D.D. et al., 1981.
- OHNISHI, T. Mechanism of electron transport and energy
conservation in the site I region of the respiratory chain.
Biochim. Biophys. Acta. 301:105-128, 1973.
- OLSNES, S. e PIHL, A. Abrin and ricin. Two toxic lectins. Trends
Biochem. Sci. 7-10, 1978.
- OLSNES, S., REFSNES, K. e PIHL, A. Mechanism of action of the
toxic lectins abrin and ricin. Nature, 249 (5448): 627-631,
1974.
- PARROT, J.L. Sur la reaction cellulaire de l'anaphylaxie. Son
caractere aérobie. C.R. Seances Soc. Biol. 136: 361 - 362,
1942.
- PATON, W.D.M. Histamine release by compounds of simple chemical
structure. Pharmacol. Rev. 9: 269-328, 1957.
- PETERSON, C. Role of energy metabolism in histamine release. A
study on isolated rat mast cells. Acta Physiol.Scand.Suppl.,
413: 1-34, 1974.
- PROUVOST-DANON, A. e BINAGHI, R. Reaginic antibody in adult and
young mice. Int. Arch. Allergy. 38: 648-656, 1970.

- PROUVOST-DANON, A., MOUSSATCHÉ, H. Influence of anaerobic glycolysis on release of histamine in the guinea pig and rat anaphylactic reaction in vitro. Nature. 192(4800): 361-362, 1961.
- PROUVOST-DANON, A., SILVA-LIMA, M. e JAVIERRE, M.Q. Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cells in vitro. Life. Sci. 5: 289-297, 1966.
- PROUVOST-DANON, A., SILVA-LIMA, M. PEIXOTO, J.M. e JAVIERRE, M.Q. Influence of metabolic energy upon anaphylactic reactions in mouse peritoneal mast cells in vitro. An. Ac. Bras. Ciênc. 39(3/4): 461-465, 1967.
- PROUVOST-DANON, A., SILVA-LIMA, M., QUEIROZ-CRUZ, M. e MOUSSATCHÉ, H. A slow and progressive action of guinea pig lung slices. Biochem. Pharmacol. 14: 683-692, 1965.
- PUSZTAI, A. Nutritional toxicity of the kidney bean (Phaseolus vulgaris). Report Rowett Inst. 36: 110-118, 1981.
- PUSZTAI, A. e PALMER, R. Nutritional evaluation of Kidney Beans (Phaseolus vulgaris): the toxic principle. J. Sci. Food Agric. 28: 620-623, 1977.
- PUSZTAI, A. e WATT, W.B. Isolectins of Phaseolus vulgaris. A comprehensive study of fractionation. Biochim. Biophys. Acta. 365: 57-71, 1974.
- PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W. e KING, T.P. The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris lectins. Proc. Nutr. Soc. 38: 115-121, 1979.
- ROTHSCHILD, A.M. Histamine release by basic compounds. In Rocha e Silva, M., ed. Handbuch der exptl. Pharmacol. XVIII.

- Springer Verlag. Berlin. 386-430, 1966. Citado em PETERSON, C., 1974.
- ROTHSCHILD, A.M. e BARRETO, J.U. Effect of metabolic inhibitors on the release of histamine by anaphylatoxin and by antigen in vitro Experientia, XVII/12: 555-556, 1961.
- ROTHSCHILD, A.M., VUGMAN, I. e ROCHA-SILVA, M. Metabolic studies on the release of histamine by compound 48/80 in the rat diaphragm Biochem. Pharmacol. 7: 248-255, 1961.
- SELA, B.A., LIS, H., SHARON, N. e SACHS, L. Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. J. Membrane Biol. 3: 267-279, 1970.
- SELYE, H. The mast cell, Butterworths, Washington D.C., 1965. Citado em METCALFE, D.D. et al., 1981.
- SHARON, N. e LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177(3): 949-959, 1972.
- SHARON, N., LIS, H. e LOTAN, R. On the structural diversity of lectins, in Methodologie de la structure et du métabolisme des glicoconjugués. Colloques internationaux du CNRS, 221(1): 20-27, 1973, Edition du CNRS, 1974.
- SHORES, A.J. e MONGAR, J.L. Modulation of histamine secretion from concanavalin A-activated rat mast cells by phosphatidyl serine, calcium, cAMP, pH and metabolic inhibitors. Agents Actions 10: 131-137, 1980.
- SILVA-LIMA, M., PROUVOST-DANON, A., MOREIRA, R.A., BENEVIDES, R. H.P. e BRITO, F.P. Degranulation of mast cells by lectin from mucunã (Dioclea grandiflora Mart.) III Pan American Biochemistry Congress, México (México), 1981. Abstract Book F-X-51.

- SILVA-LIMA, M., PUSZTAI, A., PROUVOST-DANON, A., BENEVIDES, R. H.P. e OLIVEIRA, M.C. Allergenicity and degranulation of mast cells by lectin from kidney bean (Phaseolus vulgaris cv. Processor). International Symposium on seed Proteins Versailles, (França), 1981. Abstract Book, 20.
- SILVA-LIMA, M. MOREIRA, R.A., PONTE, V.A., REINALDO, H.M., BENEVIDES, R.H.P. e PROUVOST-DANON, A. Mast cell degranulation by lectins from brazilian seeds. 4th International Congress of Immunology, Paris, 1980. Abstract Book 13-3-17.
- SIRAGANIAN, P.A. e SIRAGANIAN, R.P. Basophil activation by concanavalin A: characteristics of the reaction. J. Immunol. 112(6): 2117-2125, 1974.
- SUGIYAMA, K., SASAKI, J. e YAMASAKI, H. Potentiation by phosphatidylserine of calcium-dependent histamine release from rat mast cells induced by concanavalin A. Jap. J. Pharmacol. 25: 485-487, 1975.
- SULLIVAN, T.J., GREENE, W.C. e PARKER, C.W. Concanavalin A-induced histamine release from normal rat mast cells, J. Immunol. 115(1): 278-282, 1975.
- TOMS, G.C. e WESTERN, A. Phytochaemagglutinins, in HARBORNE, J.B., BOULTER, D. and TURNER, B.L., ed. Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic Press, London, 611 pp., 1971.
- VAZ, N.M. e PEIXOTO, J.M. Gellified suspensions of tricalcium phosphate as adjuvants in the sensitization of the mouse. An. Ac. Bras. Ciên. 35(1): 139-144, 1963.

7. - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

61

ALERGENICIDADE E ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA POR DIFERENTES FRAÇÕES OBTIDAS NO CURSO DA PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *Dioclea grandiflora* Mart.

Heloiza H. Marinho, M. Silva Lima, Manoel Cid Oliveira & Renato de Azevedo Moreira.
 Depto de Bioquímica e Biologia Molecular. UFC. Caixa Postal, 1065. 60.000 - Fortaleza - Ce.

A indução de degranulação dos mastócitos peritoneais de camundongo, por *Dioclea grandiflora* que já fora referida anteriormente, foi estudada ao longo da purificação da lectina. Na Figura 1 verificamos que as atividades das frações: extrato total (E.T.), albumina (A) e globulina (G) não são muito altas. Contudo, E.T. parece ter menor atividade do que A e G cujas atividades se assemelham. Já na Figura 2 há diferença entre a atividade de F50/70 (fração precipitada por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre 50 e 70% de saturação) e a de F0/50 e F70/90 que parecem ser idênticas. A F50/70 é a que tem maior ação hemaglutinante. Há pois correlação entre maior atividade hemaglutinante e maior indução de degranulação dos mastócitos peritoneais de camundongo. A ação direta da lectina purificada *Dioclea grandiflora* sobre os mastócitos peritoneais de camundongo está mostrada na Figura 3.

A alergenicidade da lectina de *Dioclea grandiflora* foi testada em camundongos imunizados por via subcutânea em presença de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adjuvante. Na Figura 4 é mostrado em PCA de curta latência em camundongo, a formação de anticorpo do tipo IgC, em resposta primária com "challenge" induzido por lectina de *Dioclea grandiflora* e E.T. Na Figura 5 revela-se a presença de anticorpo do tipo IgC, tendo-se usado diferentes doses de antígeno (lectina de *Dioclea grandiflora*: 100 μg , 10 μg e 1 μg) e reforço na sensibilização. A Figura 6 mostra fraco título de anticorpo do tipo IgE, revelado em PCA de longa latência em camundongo.

Embora a formação de anticorpos do tipo IgC seja induzida pela sensibilização com lectina de *Dioclea grandiflora* de camundongos, a formação de anticorpos do tipo IgE ainda necessita estudos mais detalhados.

Auxílio Financeiro: CNPq, CAPES e FINEP.

II Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica -
 Recife, outubro de 1982.

Arq. Biol. Tecnol. 25(3/4), 399, 1982.

A3

COMPROMETIMENTO DO METABOLISMO ENERGÉTICO E MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE MASTÓCITOS INDUZIDA POR LECTINA DE *Dioclea grandiflora* MART.

Manoel Cid Oliveira, Maria da Guia Silva Lima e Renato de Azevedo Moreira.
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular. UFC. Caixa Postal, 1065. 60.000 - Fortaleza, Ce.

A participação da energia metabólica na exocitose de mastócitos peritoneais de camundongo provocada por lectina de *Dioclea grandiflora* já foi por nós anteriormente demonstrada. Contudo, os resultados obtidos permitem a sugestão de que a energia em certa quantidade, faz-se necessária. A tabela 1 mostra que o NaF não foi capaz de provocar inibição da degranulação de mastócitos induzida pela lectina de *Dioclea grandiflora*. Vê-se, por conseguinte, que devido ao fato de a experiência não ter sido realizada em anaerobiose, os substratos endógenos dos próprios mastócitos continuaram sendo metabolizados e o requerimento energético através da cadeia de transportadores de elétrons era suficiente para fornecer as condições adequadas à degranulação induzida pela lectina. Por outro lado, utilizando-se rotenona e dois substratos da cadeia respiratória (Tabela 2 e 3) verificou-se que o succinato promove a reversão da inibição de degranulação induzida pela rotenona enquanto o ascorbato não foi capaz de fazê-lo. Isto sugere que há necessidade de uma quantidade ótima de energia e que o ganho líquido de 1 ATP no sítio 3 provocado pelo ascorbato não é suficiente, como no caso do succinato cujo rendimento é de 2 ATP vindo dos sítios 2 e 3 ligados à cadeia respiratória, para promover a reversão da inibição da degranulação induzida pela rotenona.

A ação da lectina sobre os mastócitos é dependente do tempo (Figura 1) e da idade do animal (Tabela 4). A intensidade da degranulação induzida pela lectina de *Dioclea grandiflora* parece aumentar quando os mastócitos possuem maior quantidade de IgE fixada em suas membranas (Figura 2). Os resultados parecem sugerir um mecanismo de interação da lectina com IgE embora não se possa ainda, do modo categórico, afastar a possibilidade da fixação da lectina a receptores da membrana do mastócito.

Auxílio Financeiro: CNPq, CAPES e FINEP.

II Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica -
Recife, outubro de 1982.

Arq. Biol. Technol. 25(3/4), 376, 1982.

10-G.1.2 PARTICIPAÇÃO DA ENERGIA METABÓLICA NA DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS INDUZIDA POR LECTINA DE *Dioclea grandiflora* Mart. M. Cid Oliveira; M. Silva Lima, A. Prouvost-Danon*, R. Azevedo Moreira e M.V.P. Frederico. Dept° de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC. C.P. 1065. 60.000, Fortaleza, Ce. e *G.R. 31 - CNRS, Instituto Pasteur. Paris, França.

A indução de degranulação de mastócitos peritoneais de camundongos não sensibilizados por lectina de *D. grandiflora* já foi previamente demonstrada. Como na hipersensibilidade imediata este fenômeno é provocado pela reação do antígeno com o anticorpo (IgE) e supõe consumo de energia metabólica, uma abordagem semelhante foi feita usando-se a lectina como agente indutor da degranulação de mastócitos.

A lectina foi isolada de sementes de *D. grandiflora* e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Os mastócitos foram recolhidos do líquido peritoneal de camundongos Swiss. Inicialmente, testamos a influência sobre a degranulação dos mastócitos induzida pela lectina, do 2,4-DNP, do cianeto, da oligomicina, da rotenona e da antimicina A. Foi verificado que todos estes agentes inibiam 50% da degranulação induzida por 50µg/ml de lectina, nas seguintes concentrações: 2,4 DNP, 11µM, cianeto, 16µM, oligomicina 0,12µM, rotenona 0,11µM e antimicina A 0,02µM. Foi mostrado que a degranulação que era bloqueada por 2,4 DNP voltava a ser verificada, desde que houvesse glicose presente no meio de reação, em concentrações inferiores às que inibem a lectina, indicando uma participação da via glicolítica. Por outro lado, em presença de inibidores da cadeia respiratória, como a rotenona, a degranulação dos mastócitos só voltou a se verificar em presença de succinato que fornece poder redutor à cadeia respiratória em ponto posterior ao do bloqueio da rotenona. Estes estudos mostram pontos de contato entre a ativação dos mastócitos por reação Ag/Ab e por lectina e abrem perspectivas para o conhecimento da participação da energia metabólica no mecanismo de exocitose dos grânulos de mastócitos.

Auxílio financeiro: CNPq, FINEP e CAPES.

34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da
Ciência - Campinas (SP), julho de 1982.
Ciência e Cultura. 34:623, 1982.