



**ESTUDOS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE
DE RATO POR AÇÃO DO PIRIDOXAL 5'-FOSFATO**

Nélida Lucia del Mastro de Garcia Agudo

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 137
IEA - DT - 137**

JUNHO/1979

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

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

PARTICIPANTES

Regina Elisabete Azevedo Beretta
Flávio Gori

SUPERINTENDENTE

Rômulo Ribeiro Pieroni

**ESTUDOS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE
DE RATO POR AÇÃO DO PIRIDOXAL 5'-FOSFATO**

Nélida Lucia del Mastro de Garcia Agudo

**Dissertação para obtenção do Título de "Mestre em
Bioquímica" – Orientador Prof. Dr. José Moura Gonçalves.
Apresentada e defendida em 18 de agosto de 1977, no
Instituto de Química da Universidade de São Paulo.**

**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA
SÃO PAULO – BRASIL**

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

INIS Categories and Descriptors

C31

Capillaries

Permeability

Rats

Skin

← **Isotope applications**

Iodine 125

Iodine 131

Evans blue

Labelled compounds

NOTA: A redacção, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos autores.

SUMÁRIO

| | Pag. |
|--|------|
| 1 – INTRODUÇÃO E PROPÓSITO | 1 |
| 2 – MATERIAL E MÉTODOS. | 6 |
| 2.1 – Marcação, Purificação e Controle do Azul de Evans | 9 |
| 2.1.1 – Método de Marcação de Azul de Evans com Iôdo Radioativo (Iôdo 125 ou 131). . . | 9 |
| 2.1.2 – Purificação | 9 |
| 2.1.3 – Controle. | 9 |
| 2.2 – Medida do Aumento da Permeabilidade Capilar com Azul de Evans Radioativo | 9 |
| 2.2.1 – Medida da Atividade do PLP, Análogos e Histamina Exógena na Permeabilidade Capilar | 10 |
| 2.2.2 – Teste com Anti-Histamínicos: Mepiramina e Triprolidina | 10 |
| 2.2.3 – Teste com Dissodiodicromoglicato (DSCG) | 11 |
| 2.2.3.1 – Administração Simultânea com o PLP | 11 |
| 2.2.3.2 – Administração Intraperitoneal | 11 |
| 2.2.4 – Teste com Cálcio e Magnésio. | 11 |
| 2.2.5 – Teste com Teofilina | 11 |
| 2.3 – Preparação de Células Peritoneais de Rato | 11 |
| 2.3.1 – Técnica de Incubação | 12 |
| 2.4 – Ensaio Biológico da Histamina. | 12 |
| 2.5 – Reação entre PLP e Histamina | 13 |
| 2.5.1 – Separação do Complexo PLP-Histamina do Excesso de Histamina | 13 |
| 3 – RESULTADOS | 13 |
| 4 – DISCUSSÃO. | 27 |
| 5 – CONCLUSÕES | 31 |
| APÊNDICE | 32 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |

ESTUDOS SOBRE O AUMENTO DA PERMEABILIDADE CAPILAR NA PELE DE RATO POR AÇÃO DO PIRIDOXAL 5'-FOSFATO

Nélida Lucia del Mastro de Garcia Agudo

RESUMO

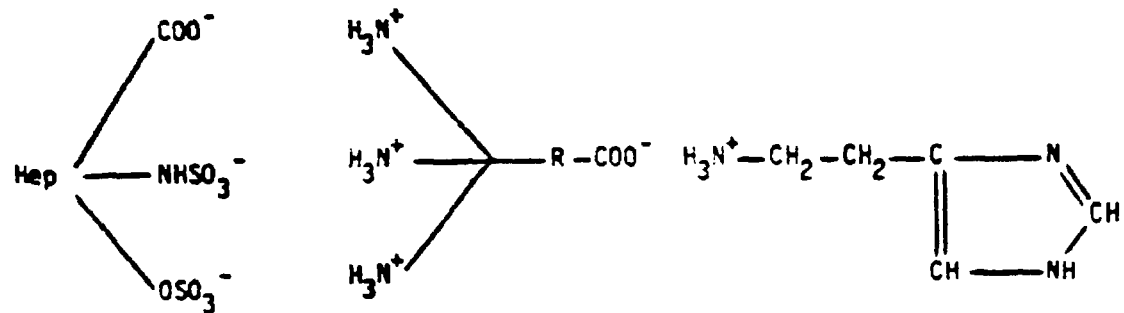
Este trabalho descreve a atividade do piridoxal 5'-fosfato (PLP) em aumentar a permeabilidade capilar, medida na pele de rato pelo extravasamento do azul de Evans marcado com o iodo radioativo (^{125}I ou ^{131}I). O efeito do PLP decorre essencialmente da liberação de histamina dada a inibição do fenômeno com o uso de anti-histamínicos. Entre vários análogos de PLP experimentados com a intenção de se estabelecer relação entre estrutura e atividade biológica, permanece a molécula intacta de PLP como aquela que preenche os requisitos de substância ativa. Discute-se o papel crítico de cálcio na liberação de histamina em relação com as nossas observações. A adição de altas concentrações de cálcio e lantânio provoca o bloqueio do efeito do PLP; magnésio, entretanto, não tem influência. A mobilização de cálcio produzida por teofilina resulta também na inibição da manifestação da resposta. O curso da reação entre PLP e histamina que leva a formação de um produto cíclico foi seguido in vitro. Esse complexo, destituído de atividade sobre o aumento da permeabilidade capilar, não provoca efeitos inibitórios das atividades intrínsecas de PLP e histamina.

1 - INTRODUÇÃO E PROPÓSITO

A parede capilar é uma barreira geralmente considerada permeável a água e eletrólitos mas muito pouco permeável a proteínas. O termo "aumento de permeabilidade capilar" refere-se normalmente a uma alteração na parede capilar que produz um aumento da velocidade da passagem de proteínas plasmáticas nos tecidos⁽⁵³⁾. São consideradas substâncias que aumentam a permeabilidade capilar aquelas que exercem sua ação em concentrações razoavelmente baixas e sem causar destruição aparente dos tecidos, e fundamentalmente são:

- a) histamina e substâncias capazes de promover sua liberação;
- b) serotonina e substâncias capazes de promover sua liberação;
- c) certos peptídeos e misturas de peptídeos (Ex: bradicinina);
- d) certas proteínas (Ex: globulinas séricas);
- e) estrógenos e relaxina.

Os grânulos secretórios dos mastócitos são os sítios principais de armazenagem de histamina em tecido conectivo dos mamíferos⁽³⁰⁾. Os principais constituintes dos grânulos são: histamina (10%); heparina (25%); heparina (25%); serotonina (0,3%); e aproximadamente 65% de proteínas. Segundo UVNAS (1974) e UVNAS et alii (1970)^(67,69) estes componentes, devido a peculiaridades do ambiente iônico do interior dos mastócitos, estariam associados conforme o que se mostra na Figura 1.



hep = HEPARINA

R = PROTEINA

Figura 1 - Modelo Proposto por UVNAS, ABORG e BERGENDORFF⁽⁵⁹⁾ para a Estrutura Provável do Complexo Heparina-Proteína-Histamina dos Grânulos dos Mastócitos a pH 7

Este complexo seria o principal constituinte da matriz dos grânulos secretórios dos mastócitos.

Apesar de conhecermos os efeitos da heparina e da histamina, ainda não sabemos qual o papel exato do mastócito na fisiologia humana. A histamina tem vários efeitos, dentre os quais o de provocar contração da parte da musculatura lisa e provocar dilatação dos capilares sanguíneos, além de aumentar a permeabilidade destes últimos. Os mastócitos desempenham um importante papel nos fenômenos de anafilaxia, não sendo porém as únicas células que participam desse fenômeno⁽²⁵⁾.

Existem evidências, desde longa data (BERALDO, 1950), da ativação de proteases durante a anafilaxia, não estando porém até hoje totalmente definido o papel da proteólise na liberação de histamina.

Os grânulos dos mastócitos contém uma enzima proteolítica que se assemelha a alfa-quimotripsina. LAGUNOFF & PRITZL (1976)⁽³⁰⁾ sugerem que a evidência da degradação das proteínas dos grânulos dos mastócitos leva à possibilidade de que uma enzima do tipo da quimotripsina possa agir durante ou depois da secreção, talvez para liberar fisiologicamente peptídeos ativos, pois é conhecido o fato de que a alfa-quimotripsina destrói grânulos e libera histamina de mastócitos isolados ou de mesentério de rato^(28,48,49).

A liberação de histamina é um processo influenciado por certos fatores, tais como a presença de íons cálcio, pH, temperatura, inibidores metabólicos, oxigênio, glicose, etc.^(32,35,58). Acredita-se ser a liberação de mediadores dos mastócitos e basófilos um processo secretório, similar ao dos hormônios endócrinos, assim, poderia estar controlado pelo sistema de adenosina 3',5'-monofosfato (AMP cíclico, cAMP). Com efeito, existem evidências indicando o cAMP como um agente regulador na liberação de histamina. Estabeleceu-se que agentes beta-adrenérgicos, prostaglandinas, teofilina, papaverina etc., os quais aumentam o nível de cAMP, podem inibir a referida liberação em determinados casos⁽²³⁾. Foi demonstrado também que a habilidade desta série de drogas de estimular nos leucócitos a adenilato-ciclase (enzima que transforma ATC em cAMP) e o incremento dos níveis de cAMP é completamente paralelo à sua capacidade inibitória. KALINER & AUSTEN (1974)⁽²⁷⁾, trabalhando com liberação de histamina em preparações de pulmão humano, sugeriram que estimulação alfa-adrenérgica causava decréscimo na concentração de cAMP e potencializava o processo de liberação de histamina. Perceberam, também, que estimulação colinérgica potencializava o processo de liberação e, por analogia com outros sistemas e utilização direta de derivados de guanosina 5'-fosfato (cGMP), postularam que isso era devido a um incremento no nível de cGMP das células.

Em nenhum desses sistemas, leucócitos e preparações de tecido pulmonar, essas observações puderam ser tomadas como evidências definitivas de que os nucleotídeos cíclicos controlavam o processo secretório, pois, não tinham sido possíveis medidas diretas dos níveis desses compostos nas células envolvidas na resposta alérgica. Isto porque, nas preparações de leucócitos, os basófilos constituem apenas 1% do total das células, sendo também pequeno o número de mastócitos em preparações de tecido pulmonar. O único sistema no qual as células apropriadas puderam ser obtidas com suficiente pureza para permitir medidas diretas e relevantes, foi o dos mastócitos do peritônio de rato⁽³³⁾.

Outra observação interessante surgida nessas e noutras investigações, foi a de que a histamina inibe a sua própria liberação⁽³⁴⁾. As experiências mostraram que essa auto-inibição pode estar correlacionada com a estimulação de adenilato-ciclase e que mudanças nos níveis de nucleotídeos cíclicos causavam mudanças na resposta secretória da célula. GILLESPIE (1975)⁽¹⁷⁾ postulou que esse efeito era o resultado da ação dos nucleotídeos cíclicos sobre o estado de agregação dos microtúbulos, pois tinha sido evidenciado que a colchicina, que causa a desagregação dos microtúbulos em subunidades não funcionais, era um inibidor muito efetivo da liberação de histamina. Em adição, existem evidências de que uma queda no nível de cAMP leva a uma agregação de microtúbulos enquanto que um aumento tem efeito oposto.

O íon cálcio exerce efeitos profundos na função celular e enzimática⁽⁵⁾. O cálcio serve como fator acoplante entre a excitação e a contração em todos os tipos de músculos, entre a excitação e a se-

creção nos terminais nervosos bem como em glândulas exócrinas e endócrinas. O reconhecimento de cálcio como um requisito para a atividade secretora em diversas células, que armazenam seus produtos em grânulos limitados por membranas, levou ao conceito de que um mecanismo secretor comum seria a "exocitose" ativada por cálcio⁽²⁶⁾. Segundo essa hipótese os estímulos fisiológicos da secreção agiram promovendo a elevação da concentração de íons cálcio livres em algum sítio intracelular crítico, seja por aumento da permeabilidade da membrana permitindo a entrada de cálcio extracelular, seja por mobilização do cálcio celular acumulado em mitocôndria ou microsomas, por exemplo. Considera-se que o cálcio entra na célula por um processo passivo, e sai por um processo ativo de bombeamento⁽⁴³⁾. Além de ser transportado através da membrana, o cálcio é componente chave de membranas⁽⁹⁾.

Experimentos realizados com ionóforos, os quais facilitam o fluxo de cálcio através da membrana, têm mostrado serem estes agentes liberadores de histamina⁽²⁴⁾. Sugeriu-se que a liberação de histamina seria o resultado do influxo de cálcio no mastócito, depois de uma mudança na permeabilidade da membrana celular a esse íon, induzida pelo agente liberador de histamina. Paralelamente, o ionóforo X-537A tem mostrado estimular a liberação de insulina⁽¹⁹⁾ e o ionóforo A-23187 provou estimular a liberação de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas em perfusão na ausência de glicose, produzindo simultaneamente uma elevação dos níveis de cAMP.

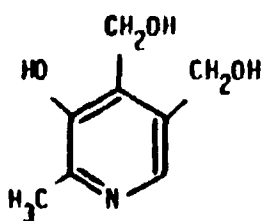
A estimulação da liberação de histamina produzida pelo ionóforo acontece tanto na presença como na ausência de cálcio extracelular. Entretanto, o acúmulo de cAMP requer cálcio extracelular. Assim, o cálcio intracelular estaria diretamente envolvido no mecanismo de liberação, enquanto o sistema cAMP teria efeito modulatório no processo.

As metilxantinas são conhecidas inibidoras de fosfodiesterases, enzimas que convertem cAMP em AMP⁽⁶⁾. Elas são capazes, em diversos sistemas, de interferir nos níveis de cálcio intracelular. Na interpretação de certos autores (HERZ & WEBER, 1965; NAYLER & HASKER, 1966; MAC NEILL et alii, 1969) elas agiriam liberando o cálcio intracelular de túbulos sarcoplasmáticos e/ou mitocôndria^(20,37,39). Noutros casos, metilxantinas seriam consideradas como capazes de interferir na remoção de cálcio da célula, inibindo assim a terminação da resposta secretória⁽³¹⁾. Como na liberação de histamina dos mastócitos, tanto o cálcio como o cAMP parecem estar envolvidos, seria de interesse fazer testes com teofilina, uma metilxantina, para a obtenção de informações sobre a participação de cálcio nos diversos sistemas.

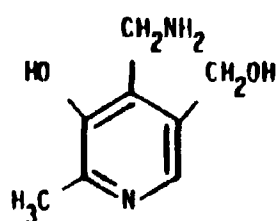
No presente trabalho, apresenta-se o efeito sobre a permeabilidade capilar do piridoxal 5'-fosfato, ou fosfato de piridoxal (PLP), que quimicamente é o 3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil isonicotinaldeído 5'-fosfato. A vitamina B₆ ocorre na natureza em três formas: como piridoxina, piridoxamina e piridoxal (Figura 2). O PLP é a forma coenzimática da vitamina B₆, tendo sido estabelecida a sua grande importância nos caminhos metabólicos.

O PLP constitui uma porção substancial do total dos compostos da vitamina B₆ presentes no plasma e nos tecidos, e sua concentração no plasma é considerada como indicadora relevante do estado nutricional a respeito dessa vitamina⁽⁵¹⁾. Ele age como cofator em sistemas enzimáticos essenciais ao metabolismo de aminoácidos, geralmente em processos que envolvem substituição e remoção de radicais do átomo de carbono alfa, beta ou gama, isto é, nas reações de interconversão e de degradação não oxidativa de aminoácidos. Ex: transaminação, descarboxilação, degradação do triptofano e niacina, desidratação da serina, remoção de grupo tiol da cisteína, racemização, etc. Considera-se a vitamina B₆ essencial para a absorção de aminoácidos no intestino por processos ativos, tais como o da metionina e tirosina.

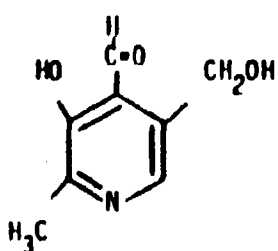
Tem sido estudada a relação funcional entre a vitamina B₆ e o metabolismo de gorduras e, aparentemente, a vitamina intervém especificamente na síntese de ácidos graxos de alto grau de insaturação, como por exemplo os ácidos araquidônico e hexenóico a partir dos ácidos linoleico e linolênico, respectivamente. O PLP toma parte no metabolismo de carboidratos: atua como cofator estrutural das fosforilases, enzimas que catalizam a degradação de glicogênio à glicose-1-fosfato. Também, em forma direta ou indireta, participa na síntese de compostos de grande significação biológica, tais como aminas biogênicas e o grupo heme.



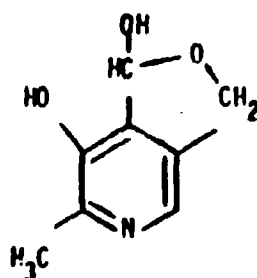
Piridoxina ou Piridoxol



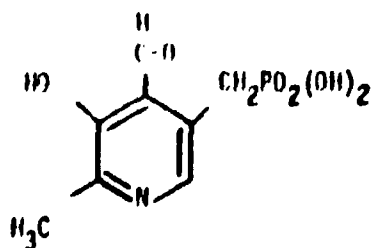
Piridoxamina



Piridoxal (forma aldeídica)



Piridoxal (hemiacetal interno)



Piridoxal 5'-fosfato

Figura 2 - Formas da Vitamina B₆

Tanto o piridoxal como o PLP são catalizadores de reações não enzimáticas, sendo PLP mais eficiente. Atuam de modo similar ou idêntico ao das reações enzimáticas, sendo por esse motivo empregados nos estudos que implicam na compreensão dos mecanismos enzimáticos envolvidos. O PLP exerce na reação enzimática papel chave, mas a proteína enzimática confere ao sistema afinidade específica pela localização de grupos funcionais catalíticos adequados, permitindo enorme incremento da capacidade catalizadora.

O PLP forma base de Schiff com grupos aminos livres, combinação que se estabiliza por redução branda da dupla ligação com borohidreto de sódio ou potássio. Assim, utiliza-se o PLP como modificador de proteínas e polipeptídeos, no estudo do centro ativo de várias enzimas, de sítios alostéricos, na determinação de alfa-amino grupo de lisinas envolvidas na estrutura terciária de certas proteínas, etc. (7).

O PLP tem mostrado ser particularmente efetivo na inibição de peptídeos vasoativos: bradicinina, calidina e metionilcalidina (54).

O PLP pode reagir tanto com aminoácidos como com certas aminas biogênicas formando produtos de condensação cíclicos (22,52). Algumas evidências sugerem que a formação de complexos de PLP durante as reações enzimáticas "in vitro" poderiam inibir certos processos metabólicos. Esses compostos cíclicos podem ser formados não só entre a coenzima e o substrato, mas também entre a coenzima e os produtos de reação enzimática.

Tenta-se descrever no presente trabalho a ação do PLP sobre a permeabilidade capilar na pele de rato, efeito este verificado por nós pela primeira vez (56), relacionando o fenômeno com a liberação de histamina dos mastócitos da pele, mediante o estudo do efeito de antihistamínicos no sistema.

Para tanto, foram testados antihistamínicos usuais tais como mepiramina: 2-{(2-dimetil-amino etil) (p-metoxibenzil)amino} piridina e triprolidina: trans-2-[3-(1-pirrolidinil)-1-p-tolilpropenil] piridina; assim como cromoglicato dissódico (DSCG) que é o sal dissódico do 1,3-bis-(2-carboxicromona-5-iloxi)-2-hidroxi-propano, substância empregada com êxito no tratamento da asma bronquial. O DSCG tem mostrado inibir a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato in vitro (24).

A influência da presença de íons cálcio e magnésio no meio, pela adição direta destes íons ou pela possível movimentação de cálcio por ação da teofilina, é abordada, assim como a diferença de comportamento entre PLP e análogos. Com relação à possível liberação de histamina como resultado da ação do PLP, é estudado também o efeito da histamina exógena no sistema e a influência do complexo PLP-histamina (Figura 3). A esse respeito é de nosso interesse estabelecer:

- 1) as condições de formação do complexo entre PLP e histamina;
- 2) testar no nosso sistema, isto é, na pele de rato, o efeito do complexo; e
- 3) sua influência na ação do PLP sobre a permeabilidade capilar.

O aumento da permeabilidade capilar na pele é freqüentemente demonstrado pelo método do extravasamento de corante ligado a proteínas séricas. Sua quantificação, no presente trabalho, realiza-se por método desenvolvido em nosso laboratório que se estende na aplicação de radioisótopos com emprego de azul de Evans (Figura 4) marcado com ^{131}I ou ^{125}I .

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados em ratos adultos machos, da raça Wistar, pesando aproximadamente 200-300 g, dos quais foram removidos previamente os pelos da região abdominal.

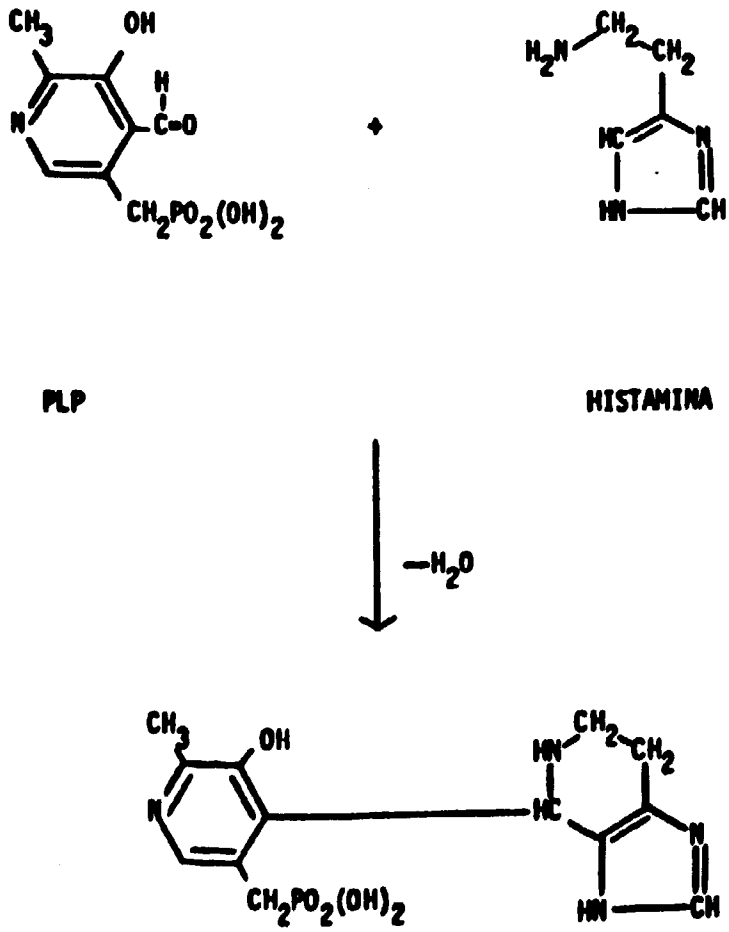


Figura 3 - Reação entre PLP e Histamina

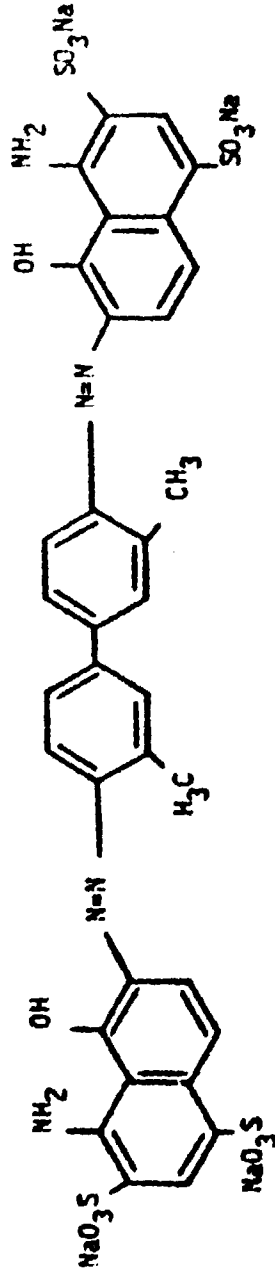


Figura 4 -- Azul de Evans

2.1 – Marcação, Purificação e Controle do Azul de Evans

2.1.1 – Método de Marcação de Azul de Evans com Iôdo Radioativo (Iôdo 125 ou 131)

A solução de Na^{131}I , isenta de carregador e redutor, foi preparada no Centro de Produção de Radioisótopos do IEA. As soluções de Na^{125}I foram fornecidas pela "Farbwerke Hoechst AG", Frankfurt, ou pela "New England Nuclear", Boston, Mass.

O método de marcação de azul de Evans (6,6'-[(3,3'-dimetil-4,4'-bifenileno)bis(azo)]bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftalenodisulfonatotetrassódico] } (Figura 4) com iodeto radioativo foi o de MANI & KULKARNI (1966)⁽³⁶⁾ com algumas modificações. Em linhas gerais, o método de marcação do azul de Evans compreende duas fases: diazotação do corante e iodação do corante já diazotado.

A fase inicial de diazotação do corante foi feita em meio ácido a 0°C (banho de gelo) sob agitação constante, conforme a seguinte técnica: num tubo de marcação, tomou-se 5 ml de solução aquosa de azul de Evans a 0,6%, acidificou-se com 0,5 ml de H_2SO_4 1M e juntou-se 0,5 ml de nitrito de sódio a 9,2 mg/ml, esperou-se trinta minutos. Após a reação, tomou-se uma alíquota e verificou-se o excesso de nitrito com o teste de amido iodetado (cor azul). Procedeu-se, então, a destruição do nitrito acrescentando 0,5 ml de solução de sulfamato de amônio a 20 mg/ml, esperando-se quinze minutos.

A iodação do corante diazotado foi realizada adicionando-se o volume necessário de solução de iodeto radioativo, até completar 20-30 mCi de iôdo 131 ou 5-10 mCi de iôdo 125, e 0,1 ml de solução de iodeto de potássio 10 mg/ml. Fechou-se bem o tubo, retirou-se do banho de gelo e, ainda sob agitação constante, foi mantido por seis horas em banho termostaticado a 55°C e depois por mais uma hora em banho de água fervente.

2.1.2 – Purificação

A purificação foi feita por diálise contra solução fisiológica durante vinte horas, no mínimo.

A radioatividade do produto marcado e purificado foi determinada no calibrador de dose Mediac.

2.1.3 – Controle

A pureza radioquímica do corante foi confirmada por eletroforese em papel Whatman nº 1 (30 x 2,5 cm), usando carregador de iodeto de sódio, tampão acetato 0,1 M, pH 5,5, tempo de migração = 45 minutos e amperagem = 1,5 mA/fita (300 V).

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

2.2 – Medida do Aumento da Permeabilidade Capilar com Azul de Evans Radioativo

O método de medida do aumento da permeabilidade capilar na pele de rato com auxílio de azul de Evans radioativo foi desenvolvido por SUGAVARA & MOURA GONÇALVES (1978)⁽⁵⁵⁾, e baseia-se no método convencional de medida do extravasamento do corante ligado a proteínas séricas nos locais de permeabilidade vascular aumentada⁽¹⁶⁾.

Os ratos foram anestesiados pela técnica de máscara aberta, por meio de algodão molhado com éter etílico, e depilados mecanicamente, evitando-se irritação local. O corante radioativo foi administrado aos animais por via endovenosa, em salina (NaCl 0,85%) contendo 0,3% de azul de Evans com ativi-

dade 10 μCi , na proporção de 30 mg/kg de peso animal. O corante liga-se a albumina plasmática circulante formando um complexo estável corante-proteína. Depois de dez minutos, 0,1 ml da solução da substância a ser testada foi injetada intradermicamente na parede ventral previamente depilada. Se a substância aumentar a permeabilidade, a ampola formada no local tornar-se-á rapidamente colorida com o extravasamento do corante ligado à proteína. Os ratos geralmente foram sacrificados e exanguinados depois de quinze minutos da injeção intradérmica, sendo os resultados conferidos na face interna da pele ventral. Discos de pele foram cortados com perfurador circular de 16 mm de diâmetro nos locais das injeções assim como uma amostra de atividade básica da pele, para contagem externa no contador gamma de "poço" (series 1185, Automatic Counting System, Nuclear Chicago Corporation). As condições de calibração para contagem de radiação gamma foram:

| | Energia do fotopico (kev) | Alta tensão (volts) | Atenuador (ajuste fino 0) | Base | Janela |
|------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------------|------|--------|
| ¹³¹ I | 0,364 | 739,5 | 8 (x1) | 3,64 | 5 |
| ¹²⁵ I | 0,035 | 739,5 | 1 (x8) | 2,80 | 5 |

A resposta sobre a permeabilidade vascular aumentada para cada dose foi calculada pelo seguinte cociente:

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

onde:

C_a = contagens/minuto, da pele no local de administração da droga

C_{sf} = contagens/minuto, da pele no local de administração de solução fisiológica

C_p = contagens/minuto, básicas da pele.

2.2.1 - Medida da Atividade do PLP, Análogos e Histamina Exógena na Permeabilidade Capilar

As medidas foram realizadas empregando-se a técnica acima descrita. Histamina (free base, crystalline), piridoxal 5'-fosfato, piridoxal e piridoxamine 5'-fosfato usados, foram da "Sigma Chemical Co". Piridoxol 5'-fosfato foi preparado por redução direta do PLP em solução salina com borohidreto de sódio sólido (Merck AG Darmstadt) e posterior ajuste a pH 7,0. As dissoluções foram feitas em solução salina (NaCl 0,85%) e ajustado o pH 7,0 com NaHCO_3 . As soluções foram preparadas pouco tempo antes das experiências e mantidas em banho de gelo até o momento de serem usadas. Cinco a dez minutos após a injeção endovenosa da solução radioativa, foram injetadas pela via intracutânea, no abdômem dos animais, 0,1 ml de cada uma das soluções contendo quantidades estabelecidas das drogas. Em todos os casos, foram aplicados controles de 0,1 ml de salina.

O aumento da permeabilidade capilar, revelado pelo aparecimento de zonas coradas de azul na superfície da pele, foi quantificado mediante a determinação da radioatividade das mesmas, segundo técnica descrita acima.

2.2.2 - Teste com Anti-Histamínicos: Mepiramina e Triprolidina

Os ratos receberam, por via endovenosa, azul de Evans ^{131}I ou ^{125}I , e após dez minutos, de um lado da pele abdominal, injeções intradérmicas de solução salina contendo 4, 8 ou 16 μg de PLP, seguindo a técnica descrita. Com intervalo de dez minutos foi injetado via endovenosa, mepiramina (Mepiramine maleate, Merck Sharpe & Dohwe, Rarway, New Jersey, USA) ou triplidina (Triplidina hydrochloride, Burroughs Wellcome Co.) nas quantidades de 500 μg e 50 μg por 100 g de peso animal, respectivamente. Cinco minutos após, foi repetido o tratamento com PLP de forma simétrica do outro lado da pele abdominal. Os discos de pele foram cortados trinta minutos após a última injeção de PLP.

2.2.3 – Teste com Dissodiocromoglicato (DSCG)

2.2.3.1 – Administração Simultânea com o PLP

Os ensaios foram realizados da maneira usual, sendo administrado o azul de Evans por via endovenosa e após 5-10 minutos, injeções intradérmicas de 0,1 ml contendo: a) 20 μg PLP ($8 \times 10^{-4}\text{M}$) + 20 μg de DSCG^{*}; e b) 20 μg PLP + 50 μg de DSCG^{**}, além dos correspondentes brancos. Os discos de pele foram cortados 25 minutos após a última injeção de PLP.

2.2.3.2 – Administração Intraperitoneal

Os ratos receberam doses de 5 e 10 mg de DSCG dissolvidos em salina, via intraperitoneal. Após vinte minutos foi injetado o azul de Evans via endovenosa e o teste com PLP prosseguido de forma usual. As quantidades de PLP administradas intradérmicamente foram de 10 e 20 μg para cada dose de DSCG.

2.2.4 – Teste com Cálcio e Magnésio

Foi realizada a medida da atividade do PLP na permeabilidade capilar, na presença de íons cálcio e magnésio. Para isso, realizou-se o teste de PLP ($4 \times 10^{-4}\text{M}$), o qual foi administrado dissolvido no meio usual acrescido de 0, 2 mM e 4 mM de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ da Merck AG Darmstadt). A resposta à possível influência dos íons na ausência de PLP foi também estabelecida para mesmas quantidades de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Similarmente, foi ensaiado o íon La^{3+} (LaCl_3 , $19,7 \pm 0,1$ mM).

2.2.5 – Teste com Teofilina

O teste da ação do PLP na pele de rato foi realizado da maneira usual, sendo o PLP administrado em solução salina neutralizada, a qual tinha sido acrescida de quantidades crescentes de teofilina (Theophylline: 1,3 Dimethyl xantine, Sigma Chemical Co): $4 \times 10^{-5}\text{M}$, $4 \times 10^{-4}\text{M}$ e $4 \times 10^{-3}\text{M}$. As respostas foram calculadas em relação aos brancos correspondentes.

2.3 – Preparação de Células Peritoneais de Rato

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e em seguida exanguinados. As células peritoneais, que contém de 4 a 6% de mastócitos, foram obtidas injetando-se de 6 a 8 ml de salina (ou solução de Locke abaixo descrita) na cavidade peritoneal de cada animal; após ligeira massagem para assegurar a distribuição do fluido injetado, fez-se pequena incisão lateral na parede abdominal e, com o animal deitado sobre o flanco correspondente, aspirou-se o líquido abdominal. Em geral, 80% do fluido

* $4 \times 10^{-4}\text{M}$

** 10^{-3}M

injetado foi recuperado. As células deste fluido foram colhidas por centrifugação durante cinco minutos a 400 x g e ressuspensas no mesmo meio. Após homogeneização por meio de repetidas e suaves aspirações, alíquotas iguais da suspensão foram distribuídas entre os tubos de incubação, cada um dos quais contendo o material colhido de três ratos. Procurou-se evitar a conservação das células por mais de trinta minutos à temperatura ambiente, antes do ensaio. A manutenção dos tubos contendo as suspensões celulares à baixa temperatura num período de espera de até quatro horas, não levou a excessiva liberação espontânea da histamina intracelular nem induziu a perda da capacidade de responder à ação de agentes liberadores de histamina.

2.3.1 – Técnica de Incubação

No estudo da liberação de histamina, as incubações foram sempre realizadas após um período de pré-incubação de quinze a vinte minutos. Em cada experiência foram incubados os tubos contendo as células peritoneais suspensas em:

- a) solução salina pH 7,0
- b) PLP 10^{-3} M em salina pH 7,0
- c) solução de Locke sem cálcio
- d) PLP 10^{-3} M em solução de Locke sem cálcio.

A solução de Locke sem cálcio tinha a seguinte composição: NaCl 152 mM, KCl 5 mM em tampão fosfato 3 mM ajustado a pH 7,0.

O volume total por tubo foi de 2,0 ml, sendo realizada a incubação a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com agitação periódica em tubos plásticos adequados para a centrifugação. As reações foram desenvolvidas durante vinte minutos; os tubos pré-esfriados em gelo, foram centrifugados em centrífuga "Sorvall" a $2-4^{\circ}\text{C}$ durante dez minutos a 300 x g. De cada um dos quatro tubos de incubação foram separadas células a sobrenadante e dosada a histamina das oito frações resultantes. Quando não dosados imediatamente os líquidos de incubação foram acidulados (pH 2,0) e conservados em geladeira para evitar a oxidação da histamina ou a contaminação com bactérias. Antes do ensaio biológico, as amostras foram neutralizadas com NaOH 0,2 N. A histamina residual das células foi liberada totalmente por aquecimento a 100°C durante dez minutos em meio ácido.

2.4 – Ensaio Biológico da Histamina

A dosagem biológica da histamina foi feita pela medida de sua atividade espasmogénica sobre o fêo de cobaia.

As experiências foram realizadas mediante o emprego de cobaias adultas de ambos os sexos, pesando de 350 a 500 g. O animal foi decapitado e exanguinado. Aberto o abdome, um fragmento de fêo de aproximadamente 15 cm de comprimento foi retirado e lavado cuidadosamente, por meio de uma corrente de solução de Tyrode aquecido a 37°C , através da luz do intestino. O líquido de Tyrode empregado tinha a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 3,0; CaCl_2 1,8; MgCl_2 1,1; NaH_2PO_4 0,4; NaHCO_3 12; e pH 7,9 – 8,2 ao qual foi adicionado no momento do uso 1 g de glicose e 1 μg de sulfato de atropina por litro de solução.

O fêo assim lavado foi cortado em fragmentos de 3 a 4 cm. Antes da montagem do fragmento de intestino na câmara de vidro de 6 cm^3 , foram feitas incisões nas extremidades de maneira a permitir a livre circulação do líquido nutritivo através da preparação. Após um período de aproximadamen-

te duas horas, o preparado foi suspenso na solução acima, em banho termostático a 37°C, preso a uma alavanca inscritora de 1,3 g, a qual fazia contato sobre um quimógrafo coberto com papel esfumado. Os ensaios foram realizados de três em três minutos, estando ligado o quimógrafo a uma velocidade de 0,5 cm/min.

Foram estabelecidas as relações dose efeito com histamina padrão, concentração 100 µg/ml ou menos, segundo a sensibilidade do preparado.

2.5 – Reação entre PLP e Histamina

A reação entre PLP e histamina (base livre, Sigma Chemical Co.) foi realizada em solução aquosa levada a neutralidade com mínima quantidade de NaOH. A concentração usada de PLP foi 10^{-2} M e de histamina 10^{-2} M, juntando na hora volumes iguais de ambas soluções. O tubo contendo a mistura de PLP e histamina foi mantido à temperatura ambiente com agitação esporádica. A evolução da reação foi acompanhada espectrofotometricamente, retirando amostras a intervalos regulares. Essas amostras foram submetidas a uma diluição 1/30 e seu espectro de absorção lido no espectrofotômetro Zeiss (PMQ II) na região de 250 a 450 nm. A reação foi considerada completa pelo desaparecimento da absorção característica do PLP na região de 390 nm (FISCHER & KREBS, 1958).

2.5.1 – Separação do Complexo PLP-Histamina do Excesso de Histamina

A reação de formação do complexo PLP – histamina efetuou-se na presença de excesso de histamina, utilizando-se soluções 10^{-2} M na proporção 1:5.

O complexo formado entre PLP e histamina foi separado do excesso de histamina que não reagiu mediante a passagem por uma coluna de resina (SP-Sephadex C-25) de troca iônica, de 0,9 cm de diâmetro e altura aproximada de 20 cm. A reação de formação do complexo foi feita em água destilada neutralizada com NaOH em quantidade mínima requerida, sendo esse mesmo solvente usado como eluente da coluna e para equilibrar a resina. O fluxo da mesma foi fixado em 3-4 gotas/minuto, sendo recolhidas 64 gotas/tubo (aproximadamente 4 ml) num coletor de frações LKB.

A passagem de ambas substâncias pela coluna foi acompanhada continuamente pela absorção a 280 nm.

3 – RESULTADOS

As relações entre a dose de PLP injetada e a resposta sobre a permeabilidade capilar medida pela relação R (ver Materiais e Métodos) estão indicadas na Tabela I e Figura 5. O tipo de curva apresentado foi sempre o mesmo em diferentes experiências, existindo, porém, variações na sensibilidade dos diversos lotes de animais. Portanto, a Figura 5, assim como as seguintes curvas apresentadas, representam comportamentos padrões de várias séries de experiências. A Figura 5 estabelece a correlação entre o logaritmo da dose de PLP administrado intradermicamente e a resposta. A curva apresentada foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados (ver Apêndice) usando uma calculadora Hewlett Packard modelo 9810. O exame da curva em seu aspecto geral revela que a mudança de R por unidade de dose administrada é mínima no início e no fim da curva, enquanto que a máxima variação de resposta por unidade de dose é obtida na região central, que corresponde a doses da ordem de 10^{-4} M.

Se o efeito da alteração da permeabilidade capilar cutânea estivesse relacionado com liberação de histamina, testes com anti-histamínicos revelariam informação a esse respeito. As Tabelas II e III, especificamente mostram os resultados de experiências feitas com dois diferentes anti-histamínicos conhe-

Tabela I

Atividade de PLP sobre a Permeabilidade Capilar na Pele de Rato
(injeções intradérmicas de 0,1 ml em salina pH 7,0)

| Rato n.º | Dose | PLP (μg) | | | | | |
|-------------|------|-----------------------|-----|-----|-----|------|------|
| | | 1 | 2 | 4 | 8 | 20 | 50 |
| 1 | | 2,5 | 3,2 | 6,4 | 8,4 | 8,9 | 8,2 |
| 2 | | 2,8 | 2,9 | 6,2 | 8,2 | 9,4 | 9,0 |
| 3 | | 1,9 | 2,4 | 4,4 | 6,4 | 8,7 | 6,1 |
| 4 | | 2,2 | 2,3 | 4,4 | 6,0 | 11,0 | 7,7 |
| 5 | | 1,7 | 1,0 | 6,9 | 9,1 | 12,2 | 11,6 |
| 6 | | 1,0 | 3,0 | 7,0 | 7,4 | 12,1 | 11,3 |
| \bar{M} | | 2,0 | 2,5 | 5,9 | 7,6 | 10,4 | 9,0 |
| $\pm s$ | | 0,6 | 0,8 | 1,2 | 1,2 | 1,6 | 2,1 |

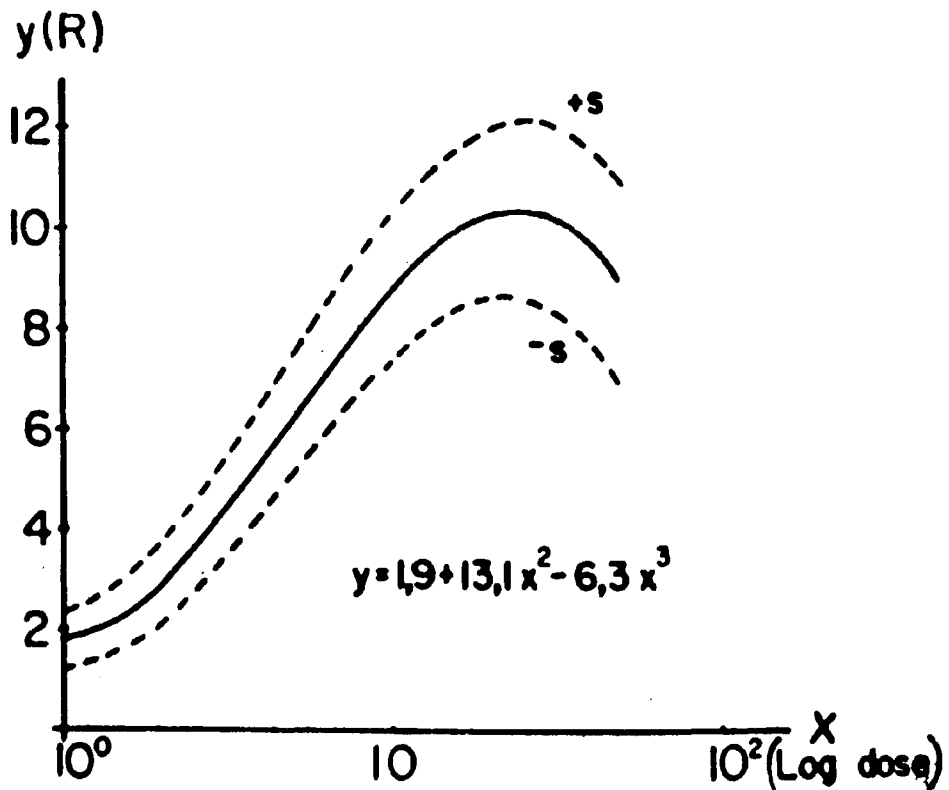


Figura 5 - AÇÃO DO PLP NA PELE DE RATO.

Representação gráfica da equação que relaciona os valores de resposta sobre a permeabilidade capilar $y(R)$ e o logaritmo da dose injetada (x) expressado em μg

Tabela II

Inibição por Mepiramina do Aumento da Permeabilidade Capilar Produzido por PLP
(os ensaios foram realizados antes e depois da injeção endovenosa
de mepiramina { 0,05 mg/100 g peso animal })

| Rato n. ^o | Dose | | P L P (μg) | | | | | |
|---|----------|--------|------------|--------|-----------|--------|------|--|
| | | | 4,0 | | 8,0 | | 16,0 | |
| | antes | depois | antes | depois | antes | depois | | |
| 1 | 4,8 | 2,1 | 6,3 | 1,8 | 12,4 | 2,6 | | |
| 2 | 2,9 | 1,0 | 5,9 | 1,9 | 8,5 | 1,6 | | |
| 3 | 2,7 | 1,7 | 4,4 | 2,8 | 6,4 | 1,9 | | |
| 4 | 4,0 | 1,0 | 6,9 | 2,9 | 5,6 | 3,1 | | |
| 5 | 4,5 | 1,0 | 3,1 | 1,0 | 6,9 | 1,1 | | |
| \bar{M} | 3,8 | 1,4 | 5,3 | 2,1 | 8,0 | 2,1 | | |
| $\pm s$ | 0,9 | 0,5 | 1,6 | 0,8 | 2,7 | 0,8 | | |
| comparação das médias teste t de Student (Youden, 1951) | P < 0,01 | | P < 0,01 | | P < 0,001 | | | |

Tabela III

Inibição por Triprolidina do Aumento da Permeabilidade Capilar Produzido por PLP
(os ensaios foram realizados antes e depois da injeção endovenosa
de triprolidina { 50 μg/100 g peso animal })

| Rato n. ^o | Dose | | P L P (μg) | | | | | |
|--------------------------|----------|--------|------------|--------|-----------|--------|------|--|
| | | | 4,0 | | 8,0 | | 16,0 | |
| | antes | depois | antes | depois | antes | depois | | |
| 1 | 2,5 | 1,0 | 3,2 | 1,0 | 6,2 | 1,6 | | |
| 2 | 3,4 | 1,8 | 7,7 | 2,5 | 11,2 | 4,2 | | |
| 3 | 3,9 | 1,0 | 6,4 | 1,0 | 8,8 | 2,2 | | |
| 4 | 5,2 | 1,5 | 5,0 | 1,0 | 4,7 | 1,3 | | |
| 5 | 4,3 | 1,0 | 5,8 | 2,3 | 10,9 | 3,6 | | |
| 6 | 3,4 | 1,2 | 6,5 | 1,7 | 8,7 | 3,5 | | |
| \bar{M} | 3,8 | 1,3 | 5,8 | 1,6 | 8,4 | 2,4 | | |
| $\pm s$ | 0,9 | 0,3 | 1,5 | 0,7 | 2,6 | 1,2 | | |
| comparação das médias | P < 0,01 | | P < 0,01 | | P < 0,001 | | | |

cidos, considerados entre os mais específicos. Consta-se que em ambos os casos, existe um bloqueio da ação do PLP nas condições da experiência.

Uma outra substância foi testada na sua capacidade anti-histaminica: é o caso do cromoglicato dissódico (DSCG). Nas Tabelas IV e V apresenta-se os resultados da interferência do DSCG no sistema liberador de histamina produzido pelo PLP. Administrado simultaneamente, o DSCG bloqueia completamente a ação do PLP (Tabela IV) e no caso de administração prévia, via intraperitoneal, o efeito é de marcada diminuição da resposta, evidenciando a inibição da ação do PLP (Tabela V).

Conhecido é o fato do envolvimento de cálcio intracelular no controle de processos fisiológicos que incluem secreção (RUBIN⁽⁴⁷⁾, 1970). Com esse intuito, introduzimos experiências com teofilina, reconhecida por seus efeitos na mobilização do cálcio celular. A Tabela VI mostra os resultados dessas experiências na qual comparamos a influência de diferentes doses de teofilina sobre a ação do PLP. Consta-se que somente no caso de concentrações baixas (4×10^{-5} M) a teofilina não bloqueia a ação do PLP, exercendo ainda um efeito de estímulo. A concentrações maiores o efeito de bloqueio é evidente, entretanto não apresenta relação de proporcionalidade. Esse diferente comportamento a altas e baixas concentrações, apresentado pelas metilxantinas, tem sido descrito por numerosos autores^(12,37).

Na Tabela VIII apresenta-se o efeito da adição direta de altas concentrações de cálcio. Vê-se que o íon cálcio administrado isoladamente, não exerce ação alguma sobre a permeabilidade capilar (Tabela VII), interferindo porém na ação do PLP quando injetado conjuntamente (Tabela VIII). Foram realizadas experiências com lantânio (La^{3+}) mas só puderam ser consideradas sob o ponto de vista qualitativo, sendo evidenciado pelos dados colhidos, bloqueio análogo da ação do PLP na pele. O efeito do cálcio assim como do lantânio podem ser comparados, então, ao provocado por altas doses de teofilina.

Foi ensaiado também no sistema, o íon magnésio. Administrado isoladamente, o magnésio não modifica a permeabilidade capilar (Tabela IX). Esse íon, ao contrário do cálcio, e nas mesmas concentrações (2 e 4 mM), não interfere com a ação do PLP. O magnésio não introduz, ainda qualquer modificação sobre o efeito do cálcio quando adicionados conjuntamente (Tabela X).

O estudo da ação de análogos do PLP poderia revelar possíveis relações entre estrutura química e atividade sobre a permeabilidade capilar. Com efeito, foram estudadas as ações de piridoxamina 5'-fosfato (2 metil-3-hidroxi-4-aminometil 5-hidroximetilpiridina 5'-fosfato) piridoxol 5'-fosfato (5 hidroxi-6-metil-3,4-piridina dicarbinol 5'-fosfato) e piridoxal (3-hidroxi-5-(hidroximetil)-2-metil-isonicotinaldeído) comparadas com o PLP. Os resultados obtidos com piridoxamina 5'-fosfato aparecem na Tabela XI. Usou-se três concentrações diferentes e uma concentração de referência de PLP em cada animal ensaiado, sendo o resultado para todas elas negativo, isto é, piridoxamina 5'-fosfato não produz aumento da permeabilidade capilar quando injetado nas mesmas condições do PLP. De forma similar foi testada a ação do piridoxol 5'-fosfato ou piridoxina 5'-fosfato (Tabela XII) e a ação do piridoxal (Tabela XIII), obtendo-se em ambos os casos resultados negativos. O efeito apresentado pelo PLP então, não é verificado por esses análogos.

Uma comparação entre os efeitos de PLP e histamina exógena encontra-se na Tabela XIV. Nessas experiências, o PLP foi administrado em separado e conjuntamente logo após a mistura com a histamina. A igual concentração molar (4×10^{-4} M) PLP e histamina se comportam de forma similar, sendo porém esta última, mais ativa na sua capacidade de produzir aumento da permeabilidade. Administradas ambas as drogas simultaneamente e em diferentes proporções, 1:1, 2:1 e 1:2, não ocorre aparente formação de qualquer complexo capaz de impedir as suas ações em separado. MASLINSKI e colaboradores (1971) descreveram experiências nas quais o PLP ligar-se-ia a histamina in vitro mediante a formação duma base de Schiff, evidenciada pelo estudo do espectro de absorção com posterior e gradual ciclicização do complexo formado.

O fato da mistura histamina-PLP não originar aparentemente complexo em concentrações diluídas como as nossas, está de acordo com KIERSKA et alii (1975)⁽²⁹⁾, os quais estabeleceram que a

Tabela IV

Efeito do DSCG sobre a Ação do PLP na Pele de Rato
(DSCG injetado simultaneamente com o PLP)

| Rato n.º | Dose | PLP 20 µg | PLP + DSCG 20 µg + 60 µg |
|-------------|------|--------------|-----------------------------|
| | 1 | | 8,0 |
| 2 | | 12,1 | 1,2 |
| 3 | | 18,2 | 1,8 |
| 4 | | 14,3 | 1,2 |
| 5 | | 12,5 | 2,0 |
| 6 | | 13,6 | 1,3 |
| \bar{M} | | 13,1 | 1,5 |
| $\pm s$ | | 3,3 | 0,3 |

Tabela V

Efeito do DSCG sobre a Ação do PLP na Pele de Rato
(DSCG injetado previamente via intraperitoneal)

| Rato n.º | 5 mg DSCG | | 10 mg DSCG | |
|-----------|-----------|-----|------------|-----|
| | PLP (µg) | | PLP (µg) | |
| | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 1 | 3,4 | 3,2 | | |
| 2 | 2,1 | 4,3 | | |
| 3 | 1,9 | 2,4 | | |
| 4 | 2,3 | 3,8 | | |
| 5 | | | 3,9 | 1,4 |
| 6 | | | 2,0 | 3,3 |
| 7 | | | 3,3 | 4,3 |
| 8 | | | 1,8 | 4,1 |
| \bar{M} | 2,4 | 3,4 | 2,8 | 3,3 |
| $\pm s$ | 0,7 | 1,0 | 1,0 | 1,3 |

Tabela VI

Influência da Teofilina sobre a Resposta na Permeabilidade Capilar à Ação do PLP ($4 \times 10^{-4}M$)
(drogas administradas conjuntamente)

| Rato n ^o | TEOFILINA (M) | | | |
|---------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 | 4×10^{-5} | 4×10^{-4} | 4×10^{-3} |
| 1 | 5,7 | 6,7 | 2,8 | 1,0 |
| 2 | 6,7 | 8,0 | 1,0 | 1,5 |
| 3 | 6,3 | 9,6 | 2,4 | 1,0 |
| 4 | 8,2 | 11,6 | 1,7 | 1,4 |
| 5 | 10,1 | 12,2 | 1,0 | 1,0 |
| 6 | 5,5 | 7,0 | 2,7 | 1,3 |
| \bar{M} | 7,1 | 9,2 | 1,9 | 1,2 |
| $\pm s$ | 1,8 | 2,3 | 0,8 | 0,2 |

Tabela VII

Efeito do Íon Cálcio sobre a Permeabilidade Capilar na Pele de Rato
($CaCl_2$ em solução salina pH = 7,0)

| Rato n ^o | CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} (mM) | | |
|---------------------|--------------------------------|-----|-----|
| | 0 | 2,0 | 4,0 |
| 1 | 2,5 | 2,4 | 1,9 |
| 2 | 1,4 | 1,4 | 1,7 |
| 3 | 1,7 | 1,6 | 1,5 |
| 4 | 1,4 | 1,6 | 1,3 |
| 5 | 1,9 | 1,0 | 2,1 |
| 6 | 1,0 | 1,5 | 1,8 |
| 7 | 1,4 | 1,2 | 2,1 |
| 8 | 1,9 | 1,4 | 1,4 |
| \bar{M} | 1,7 | 1,5 | 1,7 |
| $\pm s$ | 0,5 | 0,4 | 0,3 |

Tabela VIII

Influência de Cálcio sobre a Ação do PLP (4×10^{-4} M) na Pele de Rato
(Os ensaios foram realizados injetando intradermicamente doses de PLP acrescidas de quantidades de íon cálcio, volume total 0,1 ml)

| Rato n.º | Concentração Final de Ca^{2+} ($\times 10^{-3}$ M) | | |
|-----------|--|-----|-----|
| | 0 | 2 | 4 |
| 1 | 8,8 | 2,6 | 2,5 |
| 2 | 7,4 | 4,8 | 2,6 |
| 3 | 6,4 | 3,3 | 1,7 |
| 4 | 6,9 | 2,5 | 1,8 |
| 5 | 7,3 | 2,2 | 1,0 |
| 6 | 8,0 | 4,0 | 1,5 |
| 7 | 10,2 | 2,6 | 2,3 |
| 8 | 7,8 | 3,0 | 2,0 |
| \bar{M} | 7,9 | 3,1 | 1,9 |
| $\pm s$ | 1,2 | 0,9 | 0,5 |

Tabela IX

Efeito do Íon Magnésio sobre a Permeabilidade Capilar na Pele de Rato
(MgCl_2 em solução salina pH 7,0)

| Rato n.º | Mg^{2+} ($\times 10^{-3}$ M) | | | |
|-----------|--|-----|-----|--------------------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 4 + (4×10^{-3} M Ca) |
| 1 | 1,9 | 1,4 | 1,6 | 1,8 |
| 2 | 1,3 | 3,2 | 2,0 | 3,0 |
| 3 | 1,2 | 1,3 | 1,5 | 3,4 |
| 4 | 3,6 | 3,0 | 2,4 | 2,6 |
| 5 | 2,1 | 2,1 | 2,6 | 2,7 |
| 6 | 3,1 | 1,5 | 1,9 | 1,7 |
| 7 | 1,7 | 1,2 | 1,7 | 1,8 |
| 8 | 2,6 | 2,9 | 3,2 | 2,3 |
| \bar{M} | 2,2 | 2,1 | 2,1 | 2,4 |
| $\pm s$ | 0,8 | 0,8 | 0,6 | 0,6 |

Tabela X

Efeito do Íon Magnésio sobre a Ação do PLP ($4 \times 10^{-4} \text{M}$)
sobre a Permeabilidade Capilar
(Os ensaios foram realizados injetando intradermicamente doses de PLP acrescidas
de quantidades de íon magnésio, volume total 0,1 ml)

| Rato n ^o | Dose | Mg ²⁺ ($\times 10^{-3} \text{M}$) | | | |
|---------------------|------|--|------|-----|--|
| | | 0 | 2 | 4 | 4 + ($4 \times 10^{-3} \text{M Ca}$) |
| 1 | | 5,1 | 4,7 | 2,3 | 1,0 |
| 2 | | 9,2 | 5,5 | 5,8 | 1,0 |
| 3 | | 5,8 | 10,2 | 8,7 | 2,3 |
| 4 | | 4,3 | 4,6 | 3,0 | 1,5 |
| 5 | | 9,0 | 14,0 | 9,6 | 5,4 |
| 6 | | 11,5 | 13,4 | 6,5 | 4,0 |
| 7 | | 6,8 | 6,8 | 5,9 | 3,1 |
| 8 | | 10,9 | 13,8 | 6,7 | 4,9 |
| \bar{M} | | 7,8 | 9,7 | 6,1 | 2,9 |
| $\pm s$ | | 2,7 | 4,1 | 2,5 | 1,7 |

Tabela XI

Comparaçãõ entre a Atividade de PLP e PIRIDOXAMINA 5'-FOSFATO
sobre a Permeabilidade Capilar

| Rato n ^o | Dose | PLP ($4 \times 10^{-4} \text{M}$) | PIRIDOXAMINA 5'-FOSFATO ($\times 10^{-4} \text{M}$) | | |
|---------------------|------|--|--|-----|-----|
| | | | 2 | 4 | 8 |
| 1 | | 8,2 | 1,7 | 3,1 | 1,4 |
| 2 | | 4,8 | 1,8 | 1,0 | 3,3 |
| 3 | | 8,4 | 1,0 | 1,0 | 4,3 |
| 4 | | 9,7 | 1,1 | 1,6 | 1,5 |
| 5 | | 10,7 | 1,6 | 2,1 | 1,4 |
| 6 | | 7,6 | 1,3 | 1,8 | 2,0 |
| 7 | | 8,0 | 1,6 | 1,3 | 1,4 |
| \bar{M} | | 8,1 | 1,4 | 1,7 | 2,2 |
| $\pm s$ | | 1,9 | 0,3 | 0,7 | 1,2 |

Tabela XII

Comparação entre a Atividade de PLP e PIRIDOXOL 5'-FOSFATO
sobre a Permeabilidade Capilar

| Rato n.º | Dose | PLP (4×10^{-4} M) | PIRIDOXOL 5'-FOSFATO ($\times 10^{-4}$ M) | | |
|-----------|------|--------------------------------|---|-----|-----|
| | | | 2 | 4 | 8 |
| 1 | | 8,1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 |
| 2 | | 5,8 | 1,4 | 1,4 | 1,5 |
| 3 | | 9,7 | 1,0 | 1,2 | 1,0 |
| 4 | | 10,7 | 1,5 | 1,5 | 1,9 |
| 5 | | 5,9 | 1,0 | 1,2 | 1,0 |
| 6 | | 7,9 | 1,8 | 1,0 | 1,0 |
| 7 | | 7,5 | 1,9 | 1,6 | 1,8 |
| \bar{M} | | 8,1 | 1,4 | 1,7 | 2,2 |
| $\pm s$ | | 1,9 | 0,3 | 0,7 | 1,2 |

Tabela XIII

Comparação entre a Atividade de PLP e PIRIDOXAL
sobre a Permeabilidade Capilar

| Rato n.º | Dose | PLP (4×10^{-4} M) | PIRIDOXAL ($\times 10^{-4}$ M) | | |
|-----------|------|--------------------------------|------------------------------------|-----|-----|
| | | | 2 | 4 | 8 |
| 1 | | 6,2 | 1,4 | 1,0 | 1,2 |
| 2 | | 9,9 | 1,4 | 1,2 | 1,3 |
| 3 | | 7,3 | 1,6 | 1,1 | 1,0 |
| 4 | | 5,5 | 1,0 | 1,0 | 1,1 |
| 5 | | 6,9 | 1,1 | 1,2 | 1,1 |
| 6 | | 6,5 | 1,3 | 1,2 | 1,2 |
| 7 | | 7,0 | 1,9 | 1,5 | 1,8 |
| \bar{M} | | 6,9 | 1,4 | 1,2 | 1,2 |
| $\pm s$ | | 1,5 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |

Tabela XIV

Comparação entre a Ação do PLP e Histamina Exógena sobre a Permeabilidade Capilar na Pele de Rato (injetados separado e conjuntamente em diferentes proporções molares via intradérmica)

| Rato n ^o \ Dose | PLP 4×10^{-4} M | H 4×10^{-4} M | PLP : H 1:1 | PLP : H 2:1 | PLP : H 1:2 |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 7,5 | 8,9 | 11,6 | 6,3 | 9,1 |
| 2 | 5,0 | 15,5 | 15,9 | 15,9 | 19,4 |
| 3 | 7,4 | 10,8 | 11,0 | 9,5 | 12,1 |
| 4 | 10,0 | 10,3 | 14,1 | 12,5 | 16,6 |
| 5 | 7,9 | 11,0 | 11,9 | 10,5 | 9,8 |
| 6 | 8,1 | 8,6 | 13,0 | 10,4 | 10,6 |
| M | 7,7 | 10,9 | 13,0 | 10,9 | 12,9 |
| ± s | 1,6 | 2,5 | 7,8 | 3,2 | 4,2 |

concentrações da ordem de 10^{-5} M de histamina e PLP só se formam 6-7% do produto com velocidade de reação dependente do excesso de qualquer um dos componentes.

Para verificar realmente a ação do complexo PLP-histamina sobre a permeabilidade capilar, sintetizamos o produto para ensaios posteriores.

A Figura 6 mostra o espectro inicial de absorção da solução de PLP ao adicionar histamina, e o espectro final após a formação do complexo, fato este evidenciado pelo aparecimento do pico na região de 320 nm e a ausência de absorção a 390 nm, característica da base de Schiff. Na Figura 7 está representada a variação de absorbância em função do tempo de ambos os picos característicos, para uma mistura de PLP (10^{-2} M) e histamina (10^{-2} M), na proporção de 1:1. A reação prossegue até o desaparecimento da absorção a 390 nm. Foi repetida a experiência da reação entre PLP e histamina in vitro na proporção 1:5. Neste caso, a reação completa-se instantaneamente apresentado então, o espectro característico do produto cíclico com máximo de absorção na região de 320 nm.

As Figuras 8 e 9 mostram a separação do complexo obtida por coluna de resina de troca iônica. O complexo, assim separado, foi liofilizado e quantidades definidas do mesmo foram testadas na sua possível ação na pele de rato. A Tabela XV mostra o efeito do complexo sobre a permeabilidade capilar. A ação da histamina e PLP na pele de rato foi novamente testada junto com a ação do complexo, à igual concentração molar. Evidencia-se pelos dados obtidos, que o complexo constitui uma entidade química na qual não persistem os efeitos farmacológicos apresentados pelo PLP ou histamina separadamente. A presença do complexo, entretanto, não influencia por sua vez a ação farmacológica da histamina ou PLP adicionados separadamente, como é evidenciado na Tabela XV. Isto sugere que a falta do grupo carbonila do PLP e do grupo amino da histamina poderia explicar o desaparecimento dos efeitos sobre a permeabilidade capilar de ambos.

Considerando que a ação do PLP sobre o aumento da permeabilidade capilar decorreria da liberação de histamina contida nos mastócitos da pele, fomos levados a pesquisar a existência de resposta ao PLP em mastócitos isolados. Dada a dificuldade de isolá-los da pele, essas células foram extraídas do peritônio de rato. Este estudo parecia-nos de interesse pois poderia permitir estabelecer uma semelhança de comportamento de mastócitos de diversas origens.

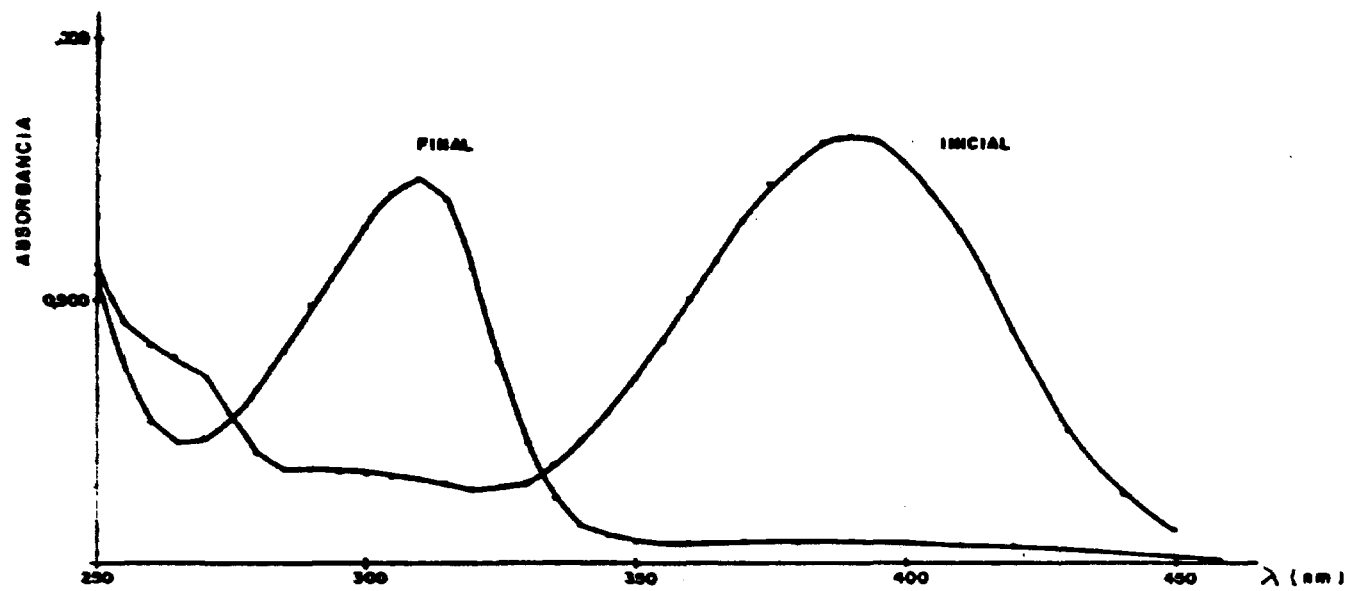


Figura 6 - Reação In Vitro do PLP com Histamina (Concentrações 10^{-2} M na Proporção 1:1)

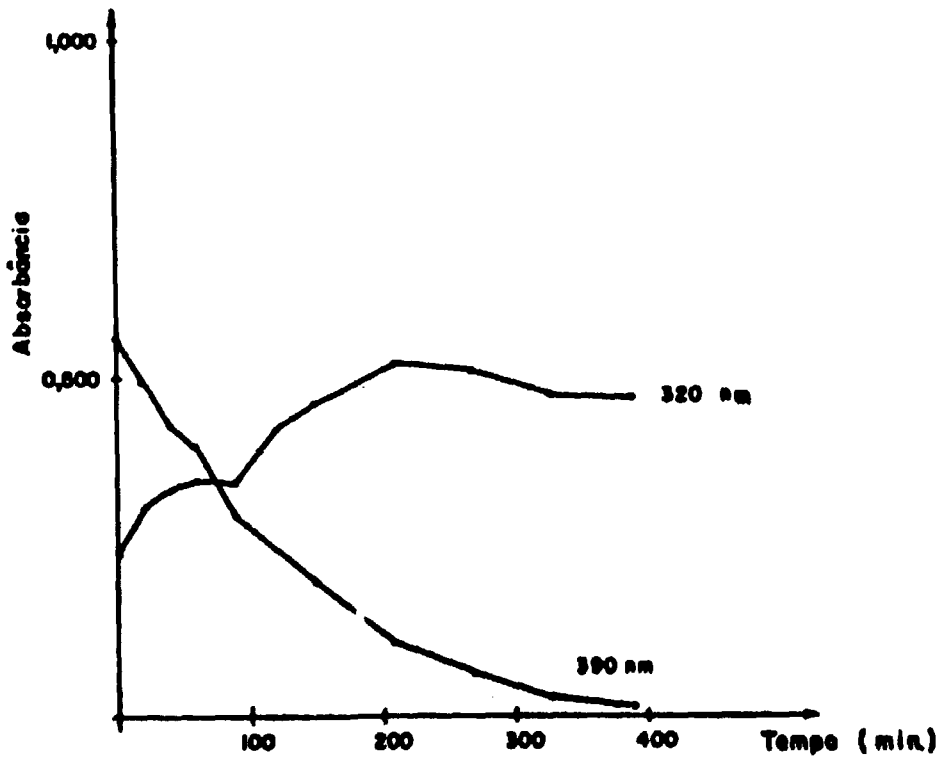


Figura 7 - VARIACÃO DA ABSORBÂNCIA EM FUNÇÃO DO TEMPO NA REAÇÃO PLP E HISTAMINA (Concentrações 10^{-2} M na Proporção 1:1)

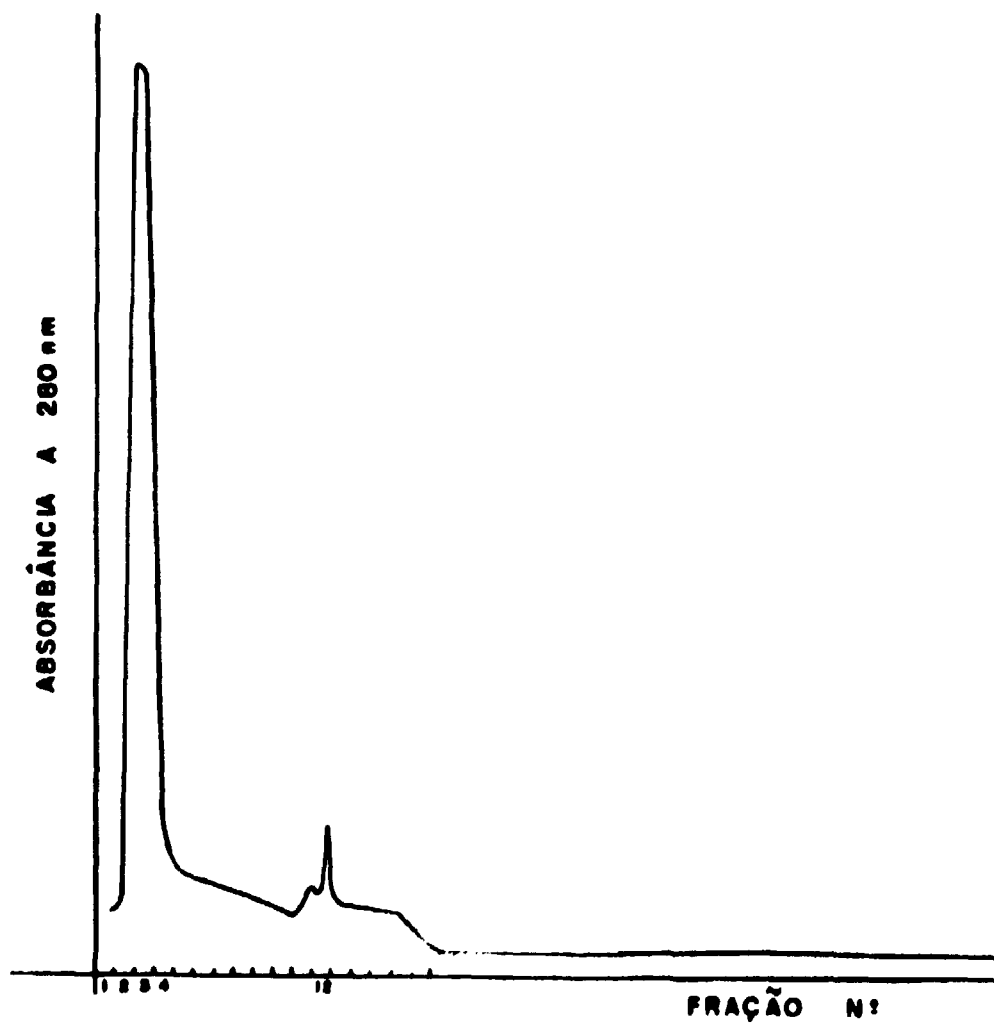


Figura 8 - SEPARAÇÃO DO COMPLEXO PLP-HISTAMINA DO EXCESSO DE HISTAMINA POR CROMATOGRÁFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA SP-SEPHADEX C-25 (Concentrações 10^{-2} M na Proporção 1:5)

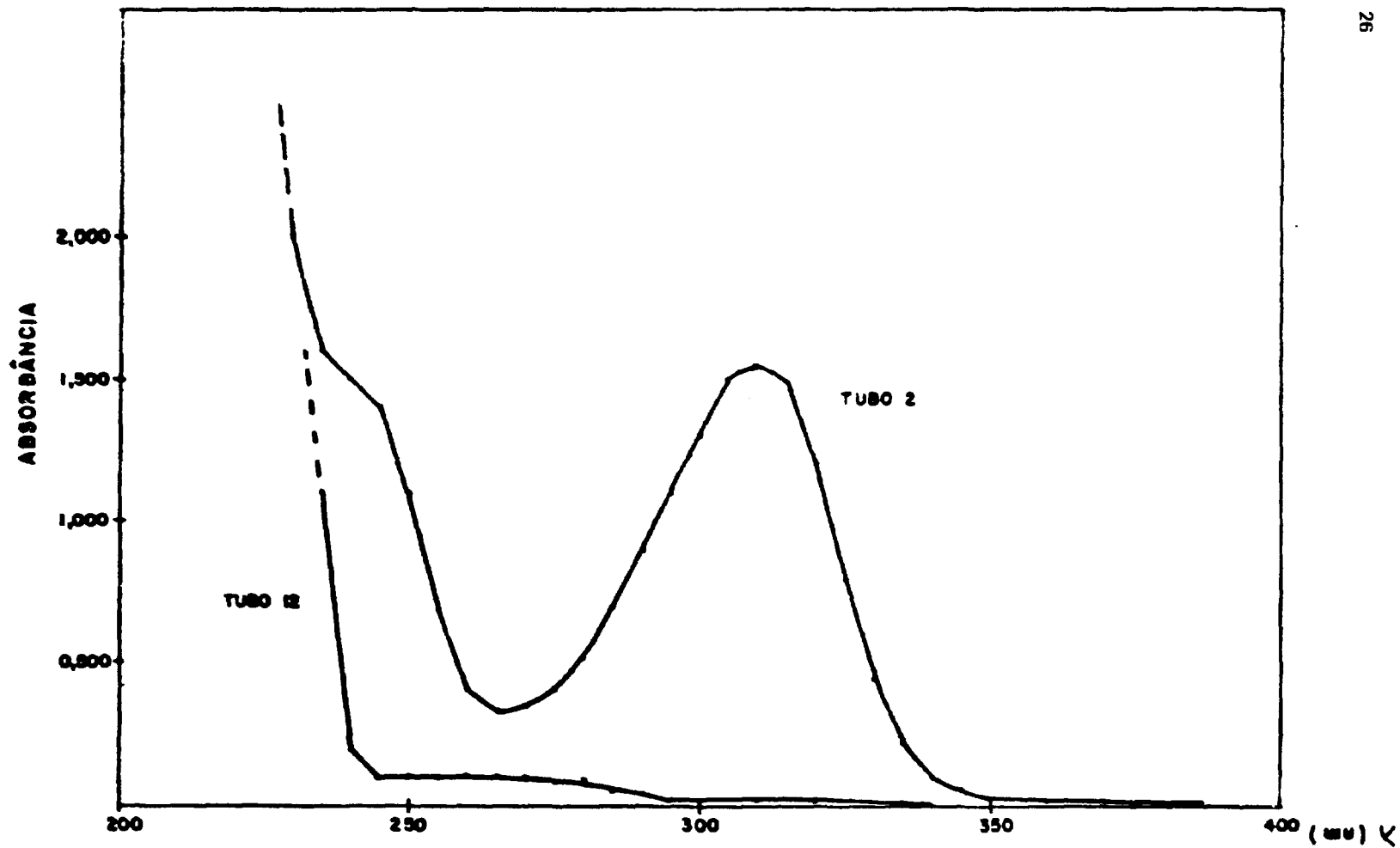


Figura 9 - Espectros de Absorção das Frações Após Separação do Complexo PLP-Histamina (Tubo 2) do Excesso de Histamina (Tubo 12)

Tabela XV

Efeito do Complexo Histamina-PLP sobre a Permeabilidade Capilar

| Rato n ^o | Dose | PLP | HISTAMINA | COMPLEXO | HISTAMINA 5 x 10 ⁻⁴ M + | PLP 5 x 10 ⁻⁴ M + |
|---------------------|------|------------------------|------------------------|------------------------|--|------------------------------------|
| | | 5 x 10 ⁻⁴ M | 5 x 10 ⁻⁴ M | 5 x 10 ⁻⁴ M | COMPLEXO 5 x 10 ⁻⁴ M | COMPLEXO 5 x 10 ⁻⁴ M |
| 1 | | 7,2 | 11,7 | 1,0 | 10,3 | 10,3 |
| 2 | | 10,5 | 8,2 | 1,5 | 12,7 | 13,6 |
| 3 | | 6,3 | 7,5 | 2,6 | 7,2 | 9,4 |
| 4 | | 12,8 | 6,2 | 1,3 | 11,5 | 6,9 |
| 5 | | 6,7 | 9,5 | 2,5 | 8,2 | 6,8 |
| 6 | | 8,9 | 6,8 | 1,0 | 5,9 | 7,4 |
| 7 | | 7,0 | 13,7 | 2,3 | 6,4 | 9,5 |
| \bar{M} | | 8,5 | 9,1 | 1,7 | 8,9 | 9,1 |
| $\pm s$ | | 2,4 | 2,7 | 0,7 | 2,6 | 2,4 |

A observação microscópica por contraste de fase dos mastócitos incubados com PLP não evidencia destruição da integridade da membrana dos mesmos, assim como dos controles. Para reforçar esses achados, utilizamos na dosagem de histamina o método que mede a contração do músculo liso de íleo de cobaia. A Figura 10 demonstra a inexistência de atividade histamino-liberadora do PLP no sistema constituído por concentrado de mastócitos peritoneais. A histamina dosada seria resultante da incubação das células peritoneais com PLP 10⁻³ M, quer em solução salina, quer em solução de Locke sem cálcio e nos correspondentes brancos. Nos sobrenadantes das suspensões incubadas com PLP não foi possível detectar histamina, ao contrário do que ocorreu nos sobrenadantes dos brancos. A histamina contida nas células, ou seja, aquela que não foi liberada no meio, foi possível, dosar, sendo porém de igual magnitude para os tubos que continham ou não PLP. Portanto, não foi possível detectar liberação de histamina de mastócitos peritoneais produzida por ação direta do PLP sobre eles.

4 - DISCUSSÃO

Uma resposta positiva ao teste de permeabilidade capilar cutânea não esclarece a natureza do mediador envolvido, que pode ser a própria substância injetada, como também um agente vasoativo de origem endógena, liberado em consequência da injeção realizada. Tal o caso, por exemplo, da fosfolipase A que aparentemente libera histamina de órgãos, como a pele, após ataque a substratos fosfolipídicos não ligados aos mastócitos, fornecendo produtos citolíticos capazes de provocar a lise destas células com liberação do conteúdo celular⁽⁴⁶⁾. Esta atividade, provavelmente, envolve alterações de permeabilidade entre os componentes do sistema polifásico da membrana celular e deve ser distinguida do mecanismo liberador de histamina de caráter secretório, condicionado ao funcionamento do metabolismo celular. No nosso caso, o PLP age na pele provocando o aumento da permeabilidade capilar, fenômeno que provavelmente ocorre devido a liberação de histamina, como está demonstrado na ação inibitória dos anti-histamínicos no processo. Triprolidina e mepiramina são considerados entre os anti-histamínicos mais específicos⁽³⁾ e têm sido capazes de prevenir o aumento da permeabilidade capilar provocado pelo PLP. Também o DSCG têm sido citado na literatura⁽²⁴⁾ como agente capaz de inibir a liberação de histamina e dos mediadores anafiláticos em geral, não possuindo propriedades anti-inflamatórias intrínsecas e nem ser anti-histamínico nem corticoesteróide (COX, 1967). O DSCG previne a

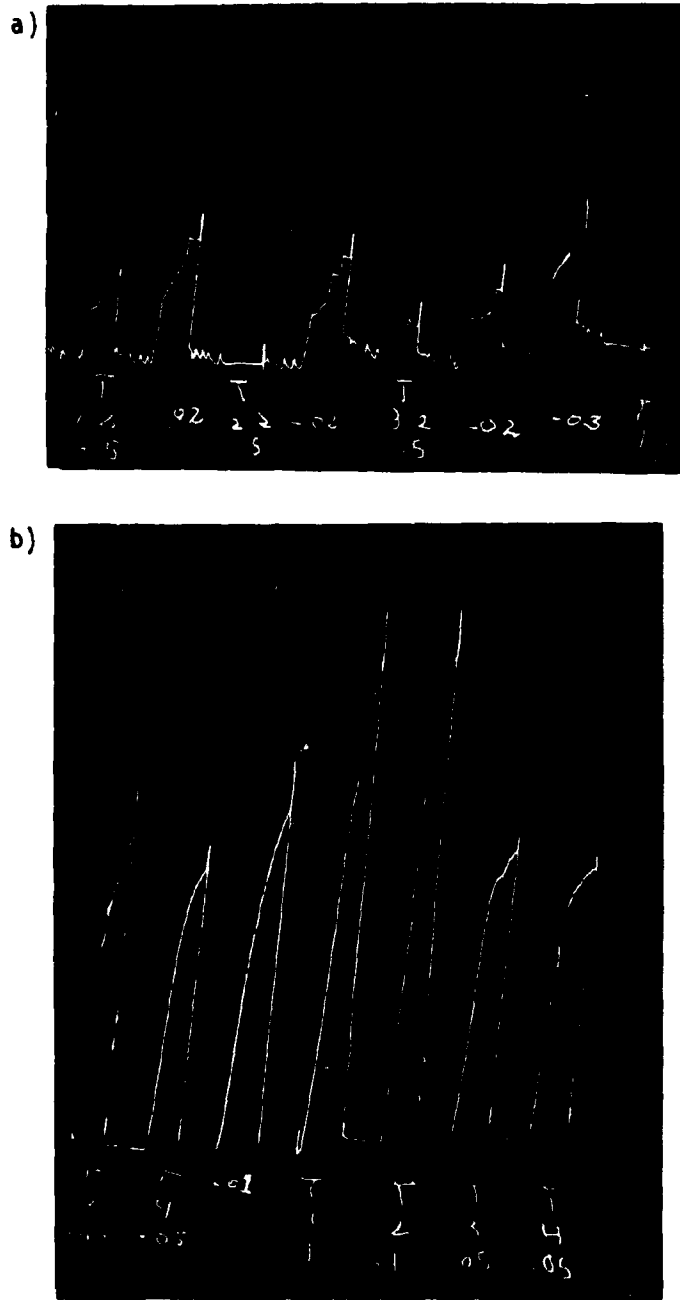


Figura 10 – DOSAGEM BIOLÓGICA DE HISTAMINA.

- a) Histamina liberada no meio, de células peritoneais incubadas em: T1.2) salina; T2.2) salina + PLP (10^{-3} M); T3.2) Locke s/Ca; T4.2) Locke s/Ca + PLP (10^{-3} M). Volumes usados: 0,5 ml. Padrão de histamina: 0,02 ml (100 μ g/ml).
- b) Histamina retida nas células peritoneais após a incubação em: T1) salina; T2) salina + PLP (10^{-3} M); T3) Locke s/Ca; T4) Locke s/Ca + PLP (10^{-3} M). Volumes: 0,05 ml, 0,1 ml e 0,01 ml (padrão de histamina)

destruição dos grânulos dos mastócitos causada tanto pelos fatores antigênicos^(11,1) como pelos não antigênicos⁽⁴²⁾. Em nosso caso, o DSCG mostrou bloquear a ação do PLP. A ligação do DSCG à membrana dos mastócitos, segundo JOHNSON & BACH, 1975⁽²⁴⁾, seria transitória e poderia envolver a formação de um complexo com algum componente, talvez um íon, necessário para a liberação de histamina. Os referidos autores têm demonstrado, em mastócitos de rato, que o DSCG previne a liberação de histamina e o influxo de cálcio induzido por ionóforos.

A existência de sítios de ligação de alta afinidade para o íon cálcio na membrana plasmática⁽⁸⁾ é compatível com o papel regulador deste íon nos mecanismos enzimáticos da membrana ou em ações hormonais. Isso sugere a possibilidade de que a atividade de extrusão por cálcio seja mediada por um mecanismo que não envolva diretamente hidrólise de ATP ao nível de membrana. MORRISEY et alii, 1975⁽³⁸⁾, usando anticorpos marcados, acharam uma proteína capaz de ligar cálcio associada com a membrana plasmática em rins e pâncreas de várias espécies animais.

Em preparações de músculo liso vascular foi observado que o lantânio tem afinidade maior pelos sítios de ligação de cálcio do que o próprio, sendo capaz de deslocar o cálcio ligado extracelularmente ficando o intracelular relativamente inalterado⁽¹⁵⁾. Comportamento análogo de cálcio e lantânio foi também observado em nossas experiências, inibindo o efeito do PLP na permeabilidade vascular. É curioso assinalar nesse contexto que a capacidade de formação de compostos entre bases de Schiff e uma variedade de íons metálicos, dentre os quais o lantânio⁽¹³⁾ poderia ser responsável pela alteração das respostas à atividade do PLP na pele quando da adição de íons Ca^{2+} e La^{3+} .

Em nossas experiências com teofilina, observamos um bloqueio da ação do PLP em concentrações de 4×10^{-4} e 4×10^{-3} M. Numa concentração inferior (4×10^{-5} M) entretanto, o efeito é oposto: a teofilina não inibe a ação do PLP apresentando ainda uma certa potencialização da mesma (considerando a distribuição de t para ambas as médias resulta $0,1 < P < 0,2$). SASAKI, 1975⁽⁴⁹⁾, trabalhando com mastócitos de rato, tem observado também que numa concentração de 1×10^{-5} M a teofilina não inibia a liberação de histamina. O efeito da teofilina notado neste estudo é consoante com o referido por outros autores^(21,60), e levou MAC NEILL et alii, 1969⁽³⁷⁾, a concluir que era proveniente da ação das metilxantinas sobre o cálcio intracelular. Esses autores sugerem que as metilxantinas liberam o cálcio intracelular, seja dos túbulos sarcoplasmáticos ou de mitocôndria, além de incrementar o influxo de cálcio. Em nosso caso, aparentemente, o efeito do PLP sobre a permeabilidade capilar seria mediado pela liberação de histamina, portanto, o envolvimento de cálcio intracelular estaria incluído no processo.

A respeito da liberação de histamina, é interessante considerar o modelo proposto por FOREMAN & GOMPERS, 1975⁽¹⁴⁾; eles sugerem que a liberação de histamina estaria controlada por certos "locais" específicos da membrana do mastócito, onde se daria a regulação da passagem de cálcio para dentro da célula. Tanto a reação antígeno-anticorpo como as substâncias liberadoras de histamina poderiam agir nesses locais, facilitando a entrada de íons cálcio para o meio intracelular.

Deve ser considerado também outra alternativa para a liberação de histamina, que é a descrita por HEITZ & BRODY, 1975⁽¹⁸⁾. Eles propõem que o controle local da microcirculação poderia envolver ativação da síntese de histamina, através de uma forma induzível da histidina descarboxilase. As células envolvidas na liberação de histamina poderiam liberá-la em conjunção com uma rápida ativação da síntese e não por liberação de um "pool" preexistente. Algumas ações das catecolaminas são compatíveis com essas hipóteses, porquanto elas inibem a atividade da histidina descarboxilase assim como a liberação de histamina induzida anafilaticamente nos leucócitos sensibilizados, segundo os mesmos autores. Todavia, o possível incremento de histamina, por estímulo da síntese a partir da histidina, não seria no nosso caso imprescindível, já que se encontra na literatura que o PLP é capaz de inibir a histidina descarboxilase. Grupos de autores (KIERSKA et alii, 1975; WOHL & MASLINSKI, 1975)^(29,61) demonstraram que histamina e histidina formam, "in vitro", complexos cíclicos com PLP. Notou-se o efeito inibitório de aminas biogênicas sobre a atividade de enzimas PLP dependentes. O complexo histidina-PLP não influi na atividade enzimática da histidina descarboxilase, mas o excesso de PLP inibe a

atividade de histidina descarboxilase, estimada pela quantidade de histamina formada durante a incubação de homogenados das glândulas de mucosa gástrica de rato. Eles estabeleceram ainda, que histamina e PLP em excesso inibem a atividade de histaminase (diamino oxidase). Também, NEARY et alii (1972)⁽⁴⁰⁾ têm observado inibição da atividade do piridoxal quinase por interação de PLP com aminas biogênicas. Nesse sentido, é possível que a interação de aminas com PLP possa desempenhar um papel importante no mecanismo de regulação da atividade enzimática e do metabolismo das aminas biogênicas, pois as condições ótimas achadas para essas reações "in vitro", indicam que elas poderiam ocorrer também "in vitro".

Nas condições de pH dos tecidos, foi sugerido por NIEMAN & HAYS (1942)⁽⁴¹⁾ que a histamina se comportaria como um cátion univalente, podendo eventualmente formar uma estrutura de tipo quelato com uma ligação por ponte de hidrogênio. Assim sendo, a histamina contribuiria como carregador de um próton para iniciar as mudanças no núcleo imidazol necessárias à interação com o receptor⁽⁴⁵⁾.

Posteriormente, ROCHA E SILVA (1969)⁽⁴⁴⁾, aperfeiçoou o referido modelo. A histamina ligar-se-ia ao sítio do receptor específico por: a) forte interação eletrostática entre o nitrogênio piridínico de uma histidina e a base de nitrogênio quaternária fortemente carregada da molécula de histamina; e b) por ligação de dipolos invertidos na ligação peptídica do receptor e o átomo de carbono (C^α) - nitrogênio piridínico (N) do anel imidazol do agonista. Isso é evidenciado, pelo fato de que compostos de histamina com aminoácidos, inativos farmacologicamente, exercem um efeito inibitório sobre a ação da histamina. No nosso caso, porém, o complexo entre histamina e PLP carrega um grupo fosfato nas vizinhanças do grupo imino, o qual poderia ser responsável pela falta de inibição competitiva do complexo histamina-PLP.

As experiências realizadas com o intuito de dosar a histamina liberada de mastócitos de peritônio, mostram a liberação de histamina espontânea dos brancos e a falta de histamina livre no meio, no caso da adição de PLP. Isso poderia ser interpretado como sendo devido a formação de complexo PLP-histamina, que apresenta-se farmacologicamente inativo. Na carência de resposta ao PLP, a histamina residual das células permanece inalterada, como se evidencia pela igualdade do conteúdo de histamina após incubação das células com e sem PLP.

Estudos realizados em proteínas da membrana de glóbulos vermelhos⁽⁷⁾ indicam que o PLP reage com alto grau de especificidade com amino grupos formando base de Schiff. O PLP é usado nesse caso como sonda de superfície em condições de penetração mínima ou como sonda de proteínas do interior da membrana em condições de permeabilidade aumentada. Virtualmente todas as proteínas principais da membrana interagem com PLP de um ou de outro lado dela, sendo as diferenças de fixação do PLP devido mais a uma distribuição das proteínas na membrana do que uma possível reatividade. Em nosso caso, o PLP poderia estar exercendo sua ação sobre a permeabilidade capilar mediante o envolvimento neste tipo de interações a nível de membrana.

Tem sido descrito em basófilos⁽³⁴⁾ a existência de dois tipos de receptores para histamina: H₁, que mediarão a vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar; e H₂, localizados nas células liberadoras de histamina, que possivelmente mediarão o efeito auto-inibitório, aumentando o nível de cAMP, diminuindo a sua liberação, e conseqüentemente a resposta inflamatória. O PLP, nesse caso, poderia estar agindo sobre o primeiro desses sistemas, o que explicaria a ausência de ação em mastócitos isolados de peritônio. O meio extracelular cutâneo poderia estar fornecendo substratos ou ativadores da possível ação de histamina liberadora do PLP, não estando sua ação restrita exclusivamente a mobilização de histamina confirmada nos mastócitos. O mecanismo resultante poderia interferir, assim, em sistemas enzimáticos celulares.

A informação obtida com os análogos do PLP, piridoxamina 5'-fosfato, piridoxol 5'-fosfato e piridoxal, permite relacionar estrutura com o efeito de aumento da permeabilidade capilar. Mudanças no grupo 4 carbonila: piridoxol 5'-fosfato e piridoxamina 5'-fosfato, isto é, a substituição do aldeí-

do da posição 4 pelo hidroximetil e aminometil, respectivamente, resulta em derivados que são inativos. A existência de piridoxal em forma de hemiacetal interno (ANDERSON et alii, 1966) poderia explicar a sua incapacidade em produzir o efeito apresentado pelo PLP.

5 – CONCLUSÕES

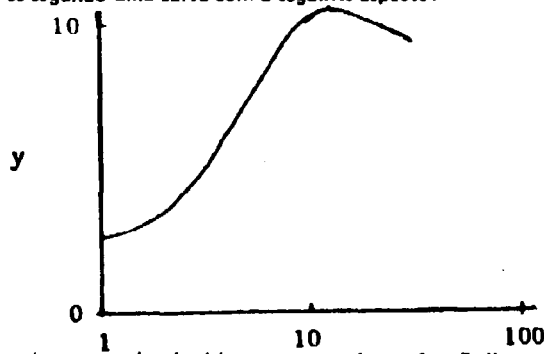
- 1) O PLP, agindo na pele de rato, provoca o aumento da permeabilidade capilar.
- 2) Esse fenômeno é devido, provavelmente, à liberação de histamina como mostra a ação ~~a~~ ação inibitória dos anti-histamínicos no processo.
- 3) Os íons divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} estariam envolvidos no processo, exercendo entretanto ações dissímeis, como é demonstrado pela sua adição ao sistema ou na mobilização do Cálcio celular por ação da teofilina.
- 4) A ação exercida pelo PLP na pele de rato não é apresentada pelos análogos do PLP: piridoxamina 5'-fosfato, piridoxol 5'-fosfato e piridoxal, constituindo o grupo aldeído um elemento fundamental nessa ação.
- 5) A administração de PLP e histamina simultaneamente pela via intracutânea não produz efeito notório além do apresentado por cada uma das drogas em separado.
- 6) A administração de PLP na forma do composto complexo histamina-PLP, ao contrário, inibe a capacidade de ação do PLP e histamina nele contidas, sendo o complexo totalmente inativo sobre a permeabilidade capilar.
- 7) A presença do complexo, todavia, não interfere na ação da histamina ou PLP livres na pele de rato.

APÊNDICE

AJUSTE DE UMA FUNÇÃO AOS DADOS EXPERIMENTAIS

1.0.0 – Escolha da Função

Lançando-se os pares de valores experimentais (n,y) num diagrama monologarítmico, observa-se que os pontos orientam-se segundo uma curva com o seguinte aspecto:



A função mais simples que pode adquirir este aspecto é uma função linear de terceiro grau do tipo

$$y = a_0 + a_1 (x - x_0) + a_2 (x - x_0)^2 + a_3 (x - x_0)^3, \quad (1)$$

onde:

a_0, a_1, a_2, a_3 : coeficientes, constantes;

$x = \log n$: variável independente;

x_0 : parâmetro que depende da origem das abcissas;

y : variável dependente.

Considerando-se ainda a orientação dos pontos, observa-se que a derivada, para $n = 1$, da função que irá representar estes pontos será ligeiramente negativa ou igual a zero.

Considerando-se que a dispersão dos pontos experimentais, próximos a $n = 1$, não permite uma definição, admite-se, por simplicidade, que a derivada desta função, para $n = 1$, seja igual a zero; esta condição resulta da admissão de que y seja não decrescente com n crescente a partir de $n = 1$.

Derivando-se (1), tem-se

$$\frac{dy}{dx} = a_1 + 2a_2 (x - x_0) + 3a_3 (x - x_0)^2 \quad (2)$$

Impondo-se a condição de que (2) seja igual a zero para $n = 1$ ($x = 0$), tem-se

$$a_1 - 2a_2 x_0 + 3a_3 x_0^2 = 0 \quad (3)$$

e, fazendo-se $x_0 = 0$, obtém-se que a_1 deve ser igual a zero.

Conseqüentemente, a função que irá representar os pontos experimentais torna-se mais simples e do tipo

$$y = a_0 + a_2 x^2 + a_3 x^3. \quad (4)$$

2.0.0 – Determinação dos Coeficientes

O desvio $(\Delta y)_i$, ao quadrado, entre a ordenada experimental y_i e àquela fornecida pela função (4), para uma dada abscissa experimental x_i , é dado por:

$$(\Delta y)_i^2 = (y_i - y)^2 \quad (5)$$

ou, substituindo-se (4) e elevando ao quadrado,

$$\begin{aligned} (\Delta y)_i^2 = & y_i^2 - 2a_0 y_i - 2a_2 x_i^2 y_i - 2a_3 x_i^3 y_i + a_0^2 + 2a_0 a_2 x_i^2 + \\ & 2a_0 a_3 x_i^3 + a_2^2 x_i^4 + 2a_2 a_3 x_i^5 + a_3^2 x_i^6 \end{aligned}$$

Efetuada-se a somatória dos desvios dos m pontos experimentais, obtém-se

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^m (\Delta y)_i^2 = & \sum_{i=1}^m y_i^2 - 2a_0 \sum_{i=1}^m y_i - 2a_2 \sum_{i=1}^m x_i^2 y_i - 2a_3 \sum_{i=1}^m x_i^3 y_i + m a_0^2 + \\ & 2a_0 a_2 \sum_{i=1}^m x_i^2 + 2a_0 a_3 \sum_{i=1}^m x_i^3 + a_2^2 \sum_{i=1}^m x_i^4 + 2a_2 a_3 \sum_{i=1}^m x_i^5 + \\ & a_3^2 \sum_{i=1}^m x_i^6 \end{aligned} \quad (6)$$

Esta somatória depende, conhecidos os valores experimentais, dos coeficientes a_0 , a_2 e a_3 . A função que melhor se ajusta aos pontos experimentais é aquela cujos coeficientes tornam mínima esta somatória, ou seja, quando for satisfeita a seguinte condição:

$$\frac{d}{da_0} \left[\sum_{i=1}^m (\Delta y)_i^2 \right] = \frac{d}{da_0} \left[\sum_{i=1}^m (\Delta y)_i^2 \right] = \frac{d}{da_0} \left[\sum_{i=1}^m (\Delta y)_i^2 \right] = 0 \quad (7)$$

Derivando-se (6) parcialmente em relação a a_0 e impondo-se (7), tem-se

$$- 2 \sum_{i=1}^m y_i + 2m a_0 + 2a_2 \sum_{i=1}^m x_i^2 + 2a_3 \sum_{i=1}^m x_i^3 = 0$$

ou

$$m a_0 + a_2 \sum_{i=1}^m x_i^2 + a_3 \sum_{i=1}^m x_i^3 = \sum_{i=1}^m y_i \quad (8a)$$

Derivando-se (6) parcialmente em relação a a_2 e impondo-se (7), tem-se

$$- 2 \sum_{i=1}^m x_i^2 y_i + 2a_0 \sum_{i=1}^m x_i^2 + 2a_2 \sum_{i=1}^m x_i^4 + 2a_3 \sum_{i=1}^m x_i^5 = 0$$

ou

$$a_0 \sum_{i=1}^m x_i^2 + a_2 \sum_{i=1}^m x_i^4 + a_3 \sum_{i=1}^m x_i^5 = \sum_{i=1}^m x_i^2 y_i \quad (8b)$$

Derivando-se (6) parcialmente em relação a a_2 e impondo-se (7), tem-se

$$- 2 \sum_{i=1}^m x_i^3 y_i + 2a_0 \sum_{i=1}^m x_i^3 + 2a_2 \sum_{i=1}^m x_i^5 + 2a_3 \sum_{i=1}^m x_i^6 = 0$$

ou

$$a_0 \sum_{i=1}^m x_i^3 + a_2 \sum_{i=1}^m x_i^5 + a_3 \sum_{i=1}^m x_i^6 = \sum_{i=1}^m x_i^3 y_i \quad (8c)$$

As equações (8a), (8b) e (8c) permitem calcular os coeficientes da função (4) a partir dos valores experimentais.

3.0.0 – Programa para Cálculo dos Coeficientes

Para o cálculo dos coeficientes a_0 , a_2 e a_3 , elaborou-se um programa para ser utilizado na calculadora programável Hewlett-Packard, modelo 9810, que inclui 400 mudanças de comando.

Executado o programa para os dados experimentais, foram obtidos os seguintes valores para os coeficientes:

$$\begin{aligned} a_0 &= 1,885586267 \\ a_2 &= 13,13556478 \\ a_3 &= -6,282073906 \end{aligned}$$

Aproximando-se os coeficientes para a terceira casa decimal, a função representativa dos pontos experimentais resulta:

$$y = 1,886 + 13,136x^2 - 6,282x^3 \quad (9)$$

ou

$$y = 1,886 + 13,136 (\log n)^2 - 6,282 (\log n)^3$$

Esta função encontra-se representada na Figura 5.

4.0.0 – Cálculo do Desvio Padrão

O conjunto de pontos experimentais pode ser separado em diversos subconjuntos caracterizados pela abscissa $x = \log n$. Cada um destes subconjuntos fornece a dispersão dos valores da ordenada y para a abscissa $x = \log n$ característica.

Conseqüentemente, é possível calcular o desvio padrão da ordenada y para cada valor da abscissa experimental.

Na Tabela a seguir, indicam-se os valores de $x = \log n$, $y_{aj.}$ e $\sigma_{exp.}(y)$ em função da variável n .

| n | x = log n | Y _{aj.} | $\sigma(y)$ |
|----|-----------|------------------|-------------|
| | | | exp |
| 1 | 0 | 1,886 | 0,64 |
| 2 | 0,301 | 2,905 | 0,80 |
| 4 | 0,602 | 5,277 | 1,19 |
| 8 | 0,903 | 7,972 | 1,21 |
| 20 | 1,301 | 10,287 | 1,59 |
| 50 | 1,699 | 8,996 | 2,13 |

Representando-se os valores de $\sigma_{exp.}(y)$ em função de $x = \log n$, observa-se que a orientação dos pontos é praticamente linear. Isto sugere o ajuste de uma reta representativa do desvio padrão $\sigma(y)$ em função da variável n .

O ajuste de uma tal reta pelo método dos mínimos quadrados resulta na seguinte função:

$$\sigma(y) = 0,5868 + 0,8417 \log n \quad (11)$$

Na Figura 5, representam-se também as curvas $y \pm \sigma(y)$.

ABSTRACT

~~This work describes~~ The activity of pyridoxal 5'-phosphate (PLP) on the vascular permeability response, measured in the abdominal wall of rats from the amount of extravasated Evans blue labelled with radioactive iodine 125 or 131. The PLP effect is related to histamine release as it has been showed by the use of antihistaminics. An attempt has been made in order to correlate structure and biological activity by using PLP analogs. The intact molecule of PLP seems to be the proper active substance. The critical role of calcium in histamine release ^{is} discussed in relation to our observations. In the presence of high concentrations of calcium and lanthanum, PLP ~~fails~~ ^{was} to increase the vascular permeability; magnesium does not show any influence. The calcium mobilization produced by theophylline results in inhibition of the response. The course of the reaction between PLP and histamine in vitro ^{was} followed; the synthetic cyclic product is deprived of activity and does not interfere with the intrinsic effects of PLP and histamine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTOUNYAN, R. E. C.; ORR, T. S. C.; COX, J. S. G. Biological and pharmacological basis of disodium cromoglycate therapy. *Folia allergol.*, 17:442-7, 1970.
2. ANDERSON, B. B. Plasma binding of vitamin B₆ compounds. *Nature, (London)*, 250(5466):502-4, 1974.
3. BECKER, E. L.; MOTA, I.; WONG, D. Inhibition by antihistamines of the vascular permeability increase induced by bradykinin. *Br. J. Pharmac.*, 34:330-6, 1968.
4. BERALDO, W. T. Formation of bradykinin in anaphylactic and peptone shock. *Am. J. Physiol.*, 163:283-9, 1950.
5. BIANCHI, C. P. *Cell calcium*. London, Butterworths, 1968.
6. BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. E. Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials. *J. biol. Chem.*, 237:1244-50, 1962.
7. CABANTCHIK, I.; BALSIN, M.; BREUER, W.; ROTHSTEIN, A. Pyridoxal phosphate: an anionic probe for protein amino groups exposed on the outer and inner surfaces of intact human red blood cells. *J. biol. Chem.*, 250(13):5130-6, 1975.
8. CHAMBAUT, A. Calcium binding properties and ATPase activity of rat liver plasma membranes. *J. gen. Physiol.*, 64(1):104-26, 1974.
9. CHANGEUX, J. P.; THIERY, J.; TUNG, I.; KITTEL, C. The cooperativity of biological membranes. *Proc. natn. Acad. Sci. US*, 57:335-41, 1967.
10. COX, J. S. G. Disodium cromoglycate (FPL 670) ("Intal"): a specific inhibitor of reaginic antibody-antigen mechanisms. *Nature (London)*, 216:1328-9, 1967.
11. COX, J. S. G. Disodium cromoglycate: mode of action and its possible relevance to the clinical use of the drug. *Br. J. Dis. Chest.*, 65:189-96, 1971.
12. DE GUBAREFF, T. & SLEATOR, W. Effects of caffeine on mammalian atrial muscle and its interaction with adenosine and calcium. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 148:202-14, 1965.
13. DE SÁ, G. F.; GIESBRECHT, E. & THOMPSON, L. C. Schiff base complexes with the lanthanide ions. *An. Acad. bras. Cienc.*, 47(1):77-82, 1975.

14. FOREMAN, J. C. & GOMPERTS, B. D. The relation ship between anaphylactic histamine secretion and the permeability of the mast cell membrane to calcium. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, 49:179-82, 1975.
15. FREEMAN, D. T. & DANIEL, E. E. Calcium movement in vascular smooth muscle and its detection using lanthanum as a tool. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, 51:900-13, 1973.
16. FRIMMER, M. & MULLER, F. W. Branchbarkeit und Farbstoffmethoden zur Bestimmung vermehrter Durchlässigkeit der Haut-Capillaren. *Med. Exp.*, 6:327-30, 1962.
17. GILLESPIE, E. Microtubules, cyclic AMP, calcium and secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 253:771-9, 1975.
18. HEITZ, D. & BRODY, M. Possible mechanism of histamine release during active vasodilatation. *Am. J. Physiol.*, 228(5):1351, 1975.
19. HELLMAN, B. Effects of calcium and divalent ionophores on the stability of isolated insulin secretory granules. *FEBS Lett.*, 54(3):343-6, 1975.
20. HERZ, R. & WEBER, A. Caffeine inhibition of calcium uptake by muscle reticulum. *Fedn. Proc.*, 24:208, 1965.
21. HESS, M. E.; HOTTENSTEIN, D.; SHANFELD, J.; HANGAARD, N. Metabolic effects of theophylline in cardiac and skeletal muscle. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 141:274-9, 1963.
22. HEYL, D.; LUZ, E.; HARRIS, S. A.; FOLKERS, K. Chemistry of vitamin B₆ VIII. Additional pyridoxylideneamines and pyridoxylamines. *J. Am. chem. Soc.*, 74:414-6, 1952.
23. JOHNSON, A. R.; MORAN, N. C.; MAYER, S. E. Cyclic AMP content and histamine release in rat mast cells. *J. Immun.*, 112:511-9, 1974.
24. JOHNSON, H. G. & BACH, M. K. Prevention of calcium ionophore induced release of histamine in rat mast cells by disodium cromoglycate. *J. Immun.*, 114(1):514-6, 1975.
25. JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1974. Cap. 1.
26. KAGAYAMA, M. & DOUGLAS, W. W. Electron microscope evidence of calcium-induced exocytosis in mast cells treated with 48/80 or the ionophores A-23187 and X-537A. *J. Cell Biol.*, 82:519-26, 1974.
27. KALINER, M. & AUSTEN, K. F. Cyclic AMP, ATP and reversed anaphylactic histamine release. *J. Immun.*, 112:664, 1974.
28. KELLER, R. Effect of enzymes on isolated rat mast cells. *Bio-chem. Pharmac.*, 8:152, 1961.
29. KIERSKA, D.; BOGUSLAWSKI, M.; MASLINSKI, C. Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine. 1. The kinetics of complex formation between pyridoxal 5'-phosphate and histamine. *Agents Actions*, 5(1):15-9, 1975.
30. LAGUNOFF, D. & PRITZL, P. Characterization of rat mast cell granule proteins. *Archs Biochem. Biophys.*, 173:554-63, 1976.

31. LESLIE, S. & BOROWTZ, J. L. Inhibition of the adrenal chromaffin cell membrane calcium pump by caffeine and various divalent cations. *Res. Commun. chem. Path. Pharmac.*, 11(3):413-24, 1975.
32. LICHTENSTEIN, L. M. Characteristics of leukocytic histamine release by antigen and by antiimmunoglobulin and anticellular antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 185:403, 1971.
33. LICHTENSTEIN, L. M. Sequential analysis of the allergic response: cyclic AMP, calcium and histamine. *Int. Archs Allergy appl. Immun.*, 49:143-54, 1975.
34. LICHTENSTEIN, L. M. & GILLESPIE, E. Inhibition of histamine release by histamine controlled by H₂ receptor. *Nature (London)*, 244(5914):287-8, 1973.
35. LICHTENSTEIN, L. M. & MARGOLIS, S. Histamine release in vitro: inhibition by catecholamines and methylxanthines. *Science (New York)*, 161:902-3, 1968.
36. MANI, R. S. & KULKARNI, P. V. Preparation of radioiodinated Evans blue for medical use. *Indian J. Chem.*, 4:498-9, 1966.
37. Mc NEILL, J. H.; NASSAR, M. & BRODY, T. M. The effect of theophylline on amine-induced cardiac phosphorylase activation and cardiac contractility. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 165:234-41, 1969.
38. MORRISEY, R. L.; BOCCI, T. J.; EMPSON, R. N.; LUFKIN, E. Calcium binding protein. Its cellular localization in jejunal kidney and pancreas. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 149(1):56-60, 1975.
39. NAYLER, W. G. & HASHER, J. R. Effect of caffeine on calcium in subcellular fractions of cardiac muscle. *Am. J. Physiol.*, 211:950-4, 1966.
40. NEARY, J. T.; MENEELY, R. L.; GREVER, M. R.; DRIVEN, W. F. The interaction between biogenic amines and pyridoxal, pyridoxal phosphate and pyridoxal kinase. *Archs Biochem. Biophys.*, 151:42-7, 1972.
41. NIEMAN, C. & HAYS, J. T. Relation between structure and histamine like activity. *J. Am. chem. Soc.*, 64:2288-9, 1942.
42. ORR, T. S. C. & J. S. G. Disodium cromoglycate, an inhibitor of mast cell degranulation and histamine release induced by phospholipase A. *Nature (London)*, 223:197, 1969.
43. RASMUSSEN, H. Cell communication, calcium ion and adenosine monophosphate. *Science (New York)*, 170(3956):404-12, 1970.
44. ROCHA E SILVA, M. Concerning the histamine receptor (H₁). *J. Pharm. Pharmac.*, 21:778-20, 1969.
45. ROCHA E SILVA, M. On the nature of the receptors for histamine. *Chemotherapy*, 3:544-9, 1961.
46. ROTHSCHILD, A. M. *Mecanismos de liberação de histamina*. Ribeirão Preto, 1965. (Tese de licenciatura, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).
47. RUBIN, R. P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmac. Rev.*, 22:389-428, 1970.
48. SAEKI, K. *Jap. J. Pharmac.*, 14:375, 1964 apud ORR, T. S. C.; HALL, D. E.; ALLISON, A. C. Role of contractile microfilaments in the release of histamine from mast cells. *Nature (London)*, 236:350-1, 1972.

49. SASAKI, J. Mechanism of histamine release by alpha-chymotrypsin from rat mast cells. *Jap. J. Pharmac.*, 25:311-24, 1975.
50. SASIAK, K. KIERSKA, D., BUGUSLAWSKI, M.; MASLINSKI, Cz. Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine. 3. The influence of presumed complex on activity of rat intestinal histaminase. *Agents Actions*, 5(1):25-30, 1975.
51. SAUBERLICH, H. E.; CANHAM, J. E.; BAKER, E. M.; RAICA JR., N.; HERMAN, Y. F. Biochemical assessment of the nutritional status of vitamin B₆ in the human. *Am. J. clin. Nutr.*, 25:629, 1972.
52. SCHOTT, H. F. & CLARK, W. G. Dopa decarboxylase inhibition through the interaction of coenzyme and substrate. *J. biol. chem.*, 196:449-52, 1952.
53. SPECTOR, W. G. Substances which affect capillary permeability. *Pharmac. Rev.*, 10:475-505, 1958.
54. SUGAVARA, S. *Importância do grupo -amino terminal da bradicinina e cininas relacionadas sobre o aumento da permeabilidade capilar*. São Paulo, 1977. (Tese de doutoramento, Instituto de Química, Universidade de São Paulo).
55. SUGAVARA, S. & GONÇALVES, J. M. *Medida do aumento da permeabilidade capilar na pele com auxílio de azul de Evans marcado com iodo 125 ou 131*. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, jul. 1976. (IEA-Pub-424).
56. SUGAVARA, S.; GARCIA AGUDO, N. L. M.; GONÇALVES, J. M. Local increase of vascular permeability induced by pyridoxal 5'-phosphate in the rat skin. *An. Acad. bras. Cienc.*, 47:387-91, 1975.
57. UVNAS, B. Histamine storage and release. *Fedn. Proc.*, 33:2172-3, 1974.
58. UVNAS, B. & ANTONSSON, J. Triggering action of phosphatidase A and chymotrypsins on degradation of rat mesentery mast cells. *Biochem. Pharmac.*, 12:867, 1963.
59. UVNAS, B.; ABORG, C. H.; BERGENDORFF, A. Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin protein complex. *Acta physiol. scand.*, 336(Suppl.):3-26, 1970.
60. VINCENT, N. H. & ELLIS, S. Inhibitory effect of acetyl choline on glycogenolysis in the isolated guinea pig heart. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 139:60-8, 1963.
61. WOHL, K. & MASLINSKI, Cz. Phosphopyridoxal complexes with histamine and histidine. 2. The influence of presumed complex on histidine decarboxylase activity in rat gastric mucosa. *Agents Actions*, 5(1):20-4, 1975.
62. YODEN, W. J. The comparison of averages. In: YODEN, W. J. *Statistical methods for chemists*, New York, N. Y., Wiley, 1951. cap. 3.



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

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