

~~5/2/74~~
GRASSI-KASSISSE



INSTITUTO DE BIOLOGIA

" A CANATOXINA INDUZ SECREÇÃO DE HISTAMINA DE MASTÓCITOS
PERITONEAIS DE RATOS "

Orientadora: Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

DORA MARIA GRASSI-KASSISSE

CAMPINAS SP

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela candidata
Dora Maria Grassi-Kassisse e apro-
vada pela comissão julgadora.

DORA MARIA GRASSI-KASSISSE

[Handwritten signature]
27/11/90

"A CANATOXINA INDUZ SECREÇÃO DE HISTAMINA DE MASTÓCITOS
PERITONEAIS DE RATOS"

Orientadora: Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva

Tese de Mestrado, apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas-
UNICAMP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.

2019100347

Campinas

1990

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Esta tese foi preparada no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, durante o curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Fisiologia e apresentada ao Instituto de Biologia desta Universidade, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

UNICAMP - Campinas - São Paulo

1990

"O sucesso não é fruto do acaso e
sim resultado de trabalho
organizado, persistente e às
vezes árduo."

Antônio Cirilo Gomes

Da defesa de tese na Universidade

Dedico esta Tese ao meu marido
Abdo, exemplo de determinação e
objetividade.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, pelo estímulo constante à carreira científica.
- À Profa. Dra. Glaci Ribeiro da Silva, pela orientação científica sempre sensata e objetiva.
- Ao Joaquim Francisco do Prado, pela colaboração técnica e incentivo contínuo.
- À Aldete Zappellini, grande amiga, em todas as horas.
- Às amigas Cláudia Regina Cavaglieri, Carla Beatriz Collares e Márcia Siste Campos, pelo companherismo indispensável ao longo desta Tese.
- À TODOS do Departamento de Farmacologia, pela ajuda, atenção e sobretudo pela grande amizade que nos uniu ao longo destes anos.
- Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Biofísica pela indispensável colaboração.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro concedido no período de julho de 1987 à julho de 1990.

- À Universidade Estadual de Campinas, pela Bolsa de Incentivo à Pesquisa, à mim fornecida, no período de agosto de 1989 à agosto de 1990.

I N D I C E

I-	Introdução.....	1
II-	Objetivo.....	13
III-	Materiais e Métodos.....	14
	1- Animais de experimentação.....	14
	2- Preparação da Canatoxina.....	14
	3- Coleta de mastócitos.....	16
	4- Indução da liberação de histamina.....	17
	5- Dosagem de histamina.....	18
	6- Determinação das condições ótimas de liberação de histamina por canatoxina.....	19
	7- Drogas e reagentes.....	19
	8- Análise estatística.....	20
IV-	Resultados.....	21
V-	Discussão.....	30
VI-	Conclusões.....	39
VII-	Resumo.....	40
VIII-	Abstract.....	42
IX-	Bibliografia.....	44

INTRODUÇÃO

Proteínas vegetais que possuem a capacidade de aglutinar células estão amplamente difundidas na natureza e foram inicialmente chamadas aglutininas. Este assunto vem sendo estudado desde o século passado quando Stillmark, em 1888, relatou que extratos de mamona (*Ricinus communis*) produziam hemaglutinação ou seja aglutinavam eritrócitos (cf. Sharon e Lis, 1972; Lis e Sharon, 1973; Goldstein e Hayes, 1978).

As aglutininas são glicoproteínas e são também chamadas de hemaglutininas, fitohemaglutininas e mais recentemente de lectinas. O termo lectina (do latim, *legere* que significa escolher) foi proposto por Boyd em 1963, como uma denominação mais geral para estas proteínas, visto que as mesmas não só estavam presentes em plantas, como também em vários tecidos animais.

As lectinas caracterizam-se pela capacidade de ligar-se não covalentemente a grupos específicos de carboidratos da membrana celular, sem modificá-los quimicamente. Cada lectina tem em sua molécula protéica pelo menos dois sítios de ligação com carboidratos, fato este que explica sua propriedade em aglutinar células (Brown e Hunt, 1978).

Uma das descobertas que mais estimulou o interesse pelo isolamento e caracterização das lectinas, foi feita por Boyd e Shapleigh (1954a,b). Estes autores observaram que extratos de várias sementes eram capazes de distinguir os grupos sanguíneos humanos, tanto o ABO como o MN. Este fato deu início a um interminável número de aplicações destas fascinantes proteínas vegetais em estudos biológicos (Goldstein e Hayes, 1978; Brown e Hunt, 1978).

As lectinas também tiveram um importante papel no desenvolvimento da imunologia. Em 1891, Ehrlich demonstrou que duas lectinas, a Ricina (*Ricinus communis*) e a Abrina (*Abrus precatorius*), produziam imunidade específica quando injetadas em camundongos (cf. Sharon e Lis, 1972; Goldstein e Hayes, 1978). A reversibilidade da reação antígeno-anticorpo, outro estudo clássico em imunologia, foi também realizado com o auxílio destas proteínas (Makela, 1957).

No fim da década de 60, as lectinas se tornaram objeto de estudo em um grande número de laboratórios pois, foi

demonstrado que elas eram capazes de identificar células cancerígenas. Este fato foi descrito para a Aglutinina do germe de trigo (Aub et al., 1963; Burger, 1969), para a Concanavalina A (Inbar e Sachs, 1969) e para a Aglutinina da soja (Lis et al., 1970).

Os estudos iniciais e ainda rudimentares sobre lectinas foram realizados com o extrato bruto da planta e por isto os pesquisadores afirmavam que estas substâncias eram letais. Por exemplo, Stillmark em 1889, também atribuiu a letalidade dos extratos de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis*, as suas respectivas lectinas Abrina e Ricina (cf. Sharon e Lis, 1972). Somente, em 1962, Takahashi et al., demonstraram que a Ricina era na realidade constituída por uma mistura de duas proteínas; uma das proteínas, a Ricina propriamente dita, era extremamente tóxica porém não hemaglutinante; a outra proteína, era atóxica e hemaglutinante passando a ser denominada então, Aglutinina do *Ricinus communis* (Ishiguro et al., 1964; Nicolson et al., 1974; Olsnes e Pihl, 1973a,b; Olsnes et al., 1974b). O mesmo fato foi demonstrado para o extrato da semente do *Abrus precatorius* que contém uma proteína tóxica, a Abrina (Olsnes e Pihl, 1973a) e uma Aglutinina não tóxica (Olsnes et al., 1974a; Wei et al., 1975).

Portanto, as toxinas Abrina e Ricina, abriram um capítulo a parte no estudo das lectinas. Foi proposto para

essas proteínas tóxicas uma estrutura de hemilectina. As hemilectinas são monovalentes, reconhecem glicoproteínas ou glicolipídeos na superfície celular mas não causam hemaglutinação, o principal efeito de uma lectina típica, que é bivalente (Olsnes e Pihl, 1973a,b; Olsnes et al., 1974a).

As hemilectinas são constituídas de duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto. Uma cadeia é designada "haptômero" e possui um sítio único para ligação com resíduos de carboidratos e a outra, o "efetômero", é o agente tóxico propriamente dito. O "haptômero" reconhece e se liga a resíduos de carboidratos na superfície externa da membrana da célula alvo; a isto se segue uma segunda fase onde, por endocitose, há interiorização de toda a molécula protéica e a cadeia "efetômera" exerce a sua atividade tóxica (Refnes et al., 1974; Nicolson, 1974; Olsnes e Pihl, 1973a,b; Olsnes et al., 1974a).

Sumner e Howell (1936), estudando o extrato da leguminosa *Canavalia ensiformis*, vulgarmente conhecida no Brasil como feijão de porco e nos países de língua inglesa como "jack bean", identificaram uma lectina que, segundo estes pesquisadores, era o agente responsável pelas atividades tóxica e hemaglutinante do extrato desta leguminosa. Esta lectina foi denominada Concanavalina A (Con A). Como no caso da Abrina e da Ricina, que relatamos

anteriormente, a toxicidade da *Canavalia ensiformis* foi também atribuída inicialmente a proteína hemaglutinante Con A (Sharon e Lis, 1972).

Em 1972, Sharon e Lis questionaram o fato da lectina Con A ou seja, uma única molécula, ser responsável pela produção de uma variedade de efeitos tais como hemaglutinação, mitogenicidade e letalidade de animais de laboratório.

Diante deste fato, Carlini e Guimarães (1981) resolveram investigar a propriedade letal presente no extrato de *Canavalia ensiformis* livre de Con A. Estes pesquisadores detectaram então, a presença de uma proteína convulsivante que denominaram Canatoxina (CNTX). Portanto, no extrato de *Canavalia ensiformis* existem duas proteínas distintas: uma lectina atóxica e hemaglutinante, a Con A e uma hemilectina, tóxica porém não hemaglutinante, a CNTX.

A CNTX é uma proteína que na sua forma dimérica apresenta um peso molecular de 115.000 (Guimarães et al., 1985). A administração de CNTX a ratos e camundongos por diferentes vias (intramuscular, intraperitoneal, endovenosa ou subcutânea) promove convulsões tônico-clônicas precedidas por distúrbios respiratórios intensos, ataxia e hipotermia. A convulsão é do tipo "tudo ou nada" e quando

deflagrada tem como efeito final a morte (Carlini e Guimarães, 1981).

A partir de 1984, vários trabalhos têm sido publicados descrevendo as propriedades farmacológicas da CNTX. Abaixo procuramos elaborar um resumo destes trabalhos, relacionando-os de maneira cronológica:

- A CNTX produz, em animais de laboratório, vários efeitos farmacológicos, como por exemplo bradicardia, hipotermia e convulsões os quais são modulados por drogas de ação central. Demonstrou-se ainda que tais convulsões originam-se na medula espinhal (Carlini et al., 1984);

- A CNTX ativa plaquetas produzindo tanto agregação como secreção. Esta ativação se mostrou dependente da fosfolipase A₂ e da lipoxigenação do ácido araquidônico (Carlini et al., 1985);

- A CNTX administrada a ratos machos induz alterações bifásicas nos níveis de glicose sanguínea, com hiperglicemia inicial e efêmera seguida de uma longa fase de hipoglicemia. Estas alterações são provavelmente mediadas pelo sistema nervoso central (Ribeiro-DaSilva et al., 1986);

- A CNTX induz, de uma maneira dose e tempo-dependentes, secreção de serotonina e dopamina em

sinaptosomas de cérebro de rato, fenômenos estes que são dependentes da lipoxigenação do ácido araquidônico (Barja-Fidalgo et al., 1988);

- A CNTX produz hipóxia e alcalose metabólica em ratos. A hipóxia está relacionada às vias lipoxigenase e ciclooxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, enquanto que a alcalose metabólica relaciona-se somente à via da ciclooxigenase (Collares e Ribeiro-DaSilva, 1988);

- Ratos tratados com CNTX apresentam alterações do metabolismo de hidratos de carbono. Tais alterações, sexo-dependentes, decorem provavelmente da hipóxia que a toxina produz (Ribeiro-DaSilva et al., 1989a);

- A CNTX administrada a ratos fêmeas induz hipoglicemia e hiperinsulinemia. Ambos os fenômenos são dependentes da lipoxigenação e ciclooxigenação do ácido araquidônico (Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989);

- A CNTX produz em ratos fêmeas estressados, alterações nos níveis circulantes de prolactina e gonadotrofinas, sem alterar porém, os níveis plasmáticos de progesterona. Os pesquisadores sugerem que a toxina tem um efeito anti-estresse, provavelmente modulado por opióides endógenos e atua a nível hipotalâmico e/ou hipofisário (Ribeiro-DaSilva et al., 1989b);

- A convulsão induzida pela CNTX é provavelmente consequência da hipóxia que a toxina produz. A convulsão, a hipóxia e as alterações no metabolismo de hidratos de carbono são lipoxigenase-dependentes (Ribeiro-DaSilva et al., 1989c);

- As alterações nos níveis de glicose sanguínea produzida pela CNTX em ratos, estão sob controle hormonal (Pires-Barbosa e Ribeiro-DaSilva, 1989);

- A CNTX induz secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas. Este fenômeno é dependente da lipoxigenação do ácido araquidônico (Barja-Fidalgo et al., 1989).

Trabalhos recentes na literatura mostram que os produtos que se formam pela lipoxigenação do ácido araquidônico são responsáveis por secreções tanto endócrinas como não endócrinas (Bass et al., 1980; Bokoch e Reed, 1981; Naccache et al., 1982; Metz et al., 1982; Metz et al., 1983; Metz et al., 1984; Yamamoto et al., 1983; Vlaskovska e Knepel, 1984; Gerozissis et al., 1985).

A ativação da lipoxigenação do ácido araquidônico que a CNTX produz (Carlini e Guimarães, 1985), parece justificar o fato de a toxina induzir várias secreções de uma maneira

lipoxigenase-dependente como é o caso da serotonina, da dopamina e da insulina (Barja-Fidalgo et al., 1988; Ribeiro-DaSilva e Prado, 1989; Barja-Fidalgo et al., 1989). Por outro lado, existe também um nítido paralelismo entre os vários efeitos classicamente descritos para a histamina (Garrison, 1990; Botting e Vane, 1989) e aqueles produzidos pela CNTX (Carlini e Guimarães, 1981; Collares e Ribeiro-DaSilva, 1988).

A relação de agentes capazes de induzir a liberação de histamina é vasta. O sistema de classificação destes agentes foi proposto por Paton (1957) e modificado por Lagunoff et al., (1983), os quais relacionam as lectinas como agentes liberadores de histamina. No grupo das lectinas, o primeiro autor a descrever a liberação de histamina por Con A foi Keller (1973). Posteriormente, vários pesquisadores demonstraram que a Con A também libera histamina de mastócitos de camundongos, de hamster e de basófilos humanos (Hook et al., 1974a; Hook et al., 1974b; Magro, 1974; Siraganian e Siraganian, 1974; idem, 1975; Barret et al., 1984; Brzezinska-Blaszczyk et al., 1984)

O uso de mastócitos, no estudo da secreção de histamina, tornou-se relevante a partir do trabalho pioneiro de Riley e West (1953) que evidenciaram a primeira correlação farmacológica entre quantidade de mastócitos e teor de histamina presente nos vários tecidos de mamíferos.

Vários métodos para a obtenção de populações homogêneas de mastócitos têm sido desenvolvidos (Padawer e Gordon, 1955; Johnson e Moran, 1966). A fonte principal para estudos detalhados do mecanismo de liberação de histamina são os mastócitos peritoneais de ratos, embora tais estudos sejam também frequentemente realizados com células obtidas da cavidade pleural de humanos, bem como do próprio pulmão humano (Paterson et al., 1976; Ennis, 1982). A razão da utilização de mastócitos peritoneais de ratos como principal fonte de células é a relativa facilidade de obtenção e o isolamento em número necessário para estudos quantitativos, embora este estudo não possa ser generalizado devido a grande variação observada entre as diversas fontes. Sob condições normais, toda a histamina estocada nos mastócitos está localizada nos grânulos secretórios (Riley e West, 1966). No rato, é bem estabelecido que a substância responsável pela ligação da histamina nos grânulos é um complexo heparina-proteína insolúvel em água (Kazimierczac e Diamant, 1978). Em algumas espécies os mastócitos estocam ainda serotonina e dopamina (Benditt et al., 1955; Slorach e Uvnas, 1968; Enerback e Haggendal, 1970; Carraway et al., 1984).

As características da liberação de histamina induzida pela Con A de mastócitos de ratos têm sido detalhadamente investigada (Sullivan et al., 1975b; Baxter e Adamik, 1978;

Lawson et al., 1978; Martin e Lagunoff, 1978; Shores e Mongar, 1980; Lansman e Cochrane, 1980; Ennis et al., 1980; Ennis et al., 1981; West, 1981; White e Pearce, 1982a).

A eficácia da Con A como agente liberador de histamina depende de vários fatores críticos, tais como: a linhagem de rato, a presença ou ausência de cálcio extracelular, o grau de sensibilização celular e a presença ou ausência de fosfatidilserina (PS) exógena. Além disso, o efeito de cada uma destas variáveis sobre a reação de liberação de histamina pela Con A como um todo, ainda não foi esclarecido, porém, sabe-se que o fenômeno não é citotóxico, ocorre por exocitose, é temperatura-dependente, necessita de estoques adequados de cálcio celular e é inibido por monossacarídeos que se ligam especificamente a Con A (Lagunoff et al., 1983).

Olsnes et al. (1974b) relatam a possibilidade de algumas proteínas tóxicas e lectinas que são encontradas na mesma semente possuírem propriedades bioquímicas comuns. Tal observação parece ser verdadeira para a Con A e a CNTX, que, embora sejam substâncias distintas (Carlini e Guimarães, 1981) possuem propriedades comuns; um exemplo disto são as alterações no metabolismo de hidratos de carbono produzidas tanto pela Con A (Cuatrecasas, 1973; Cuatrecasas e Tell, 1973) como pela CNTX (Ribeiro-DaSilva et al., 1989a).

Considerando os dados de literatura apresentados, parece-nos de grande importância estudar a possibilidade da CNTX ser, como a Con A, um agente liberador de histamina.

II- OBJETIVO

Esta Tese tem como objetivo verificar se a CNTX libera histamina de mastócitos peritoneais de ratos, estudando a natureza e a cinética desta reação.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

1- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos albinos variedade Wistar, machos (250 a 350 g), provenientes do Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos sob ciclo de luz de 12 h, temperatura constante e fornecido água e alimentação ad libitum.

Foram utilizadas para o bioensaio de histamina, cobaias de ambos os sexos (250 a 380 g) que foram adquiridas de fornecedor particular. Estes animais eram mantidos nas mesmas condições acima mencionadas porém, antes do bioensaio foram isolados e mantidos em jejum por 24 h.

2- PREPARAÇÃO DA CANATOXINA

Canatoxina (CNTX) foi gentilmente cedida pela Prof^a Dr^a Célia Regina Carlini, do Depto de Bioquímica do I.C.B. da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. A toxina foi obtida e purificada das sementes maduras de *Canavalia*

ensiformis, de acordo com o método descrito por Carlini e Guimarães (1981). Este método envolve inicialmente uma passagem do extrato bruto destas sementes em Sephadex G-100 para retirar a Con A. O extrato livre de Con A é então submetido à purificação através de:

- a- remoção de polissacarídeos com etanol 30% v/v;
- b- precipitação com sulfato de amônio (0,35 - 0,55% de saturação);
- c- cromatografia em DEAE-celulose.

Para obtenção de concentrações adequadas de CNTX, para nossos experimentos, esta foi concentrada por precipitação com sulfato de amônio 60%, a 4°C, sob agitação constante. Este material foi centrifugado na temperatura de 2 - 3°C, na velocidade de 18.000 g durante 30 min. O precipitado foi ressuspendido em volume adequado do veículo da CNTX e o sulfato de amônio, retirado através de diálise (fita para diálise Sigma, St.Louis, U.S.A.) contra o veículo da CNTX, usando-se o Reativo de Nessler como indicador de resíduos de sulfato de amônio. Este indicador produz uma coloração marrom quando em contato com o sulfato de amônio.

O veículo da toxina, constituído por 25 mM de Tris.HCl (pH 7,5) e 150 mM de NaCl foi preparado usando-se água deionizada como diluente.

As soluções utilizadas continham entre 4 e 200 uM de proteína ativa.

Para se ter certeza de que a toxina permanecia ativa após concentração e diálise, as soluções foram administradas

em ratos (via endovenosa), observando-se o aparecimento do efeito convulsivo.

3- COLETA DE CÉLULAS PERITONEAIS DE RATOS

Os mastócitos foram coletados da cavidade peritoneal de ratos, usando-se 10,0 ml de Krebs-Ringer fosfato pH 7,4 (tampão de incubação).

A composição do tampão de incubação (mM) foi a seguinte: NaCl 154; KCl 6,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5; Na_2HPO_4 10; NaH_2PO_4 10 e glicose 5,0.

Em cada experimento foram utilizados cerca de 6 a 8 ratos. Estes animais foram sacrificados por secção dos vasos cervicais, após anestesia com éter; retirou-se então, com auxílio de instrumental cirúrgico, uma tira longitudinal da pele da parede abdominal.

O tampão de incubação foi injetado intraperitonealmente, o abdome, massageado suavemente por cerca de 90 seg para que o líquido se espalhasse uniformemente; aberta a cavidade peritoneal, o líquido foi coletado usando-se pipeta semi-automática. O total de líquido retirado (cerca de 8,0 ml) foi então centrifugado a 180 g por 5 min em tubos de polietileno.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1,0 ml do tampão de incubação. Desta suspensão de mastócitos, retirava-se 0,1 ml para teste de viabilidade pelo Trypan Blue (Boyse et al., 1964). A

contagem dos mastócitos foi feita em câmara de Neubauer modificada. Pelo menos 98% dos mastócitos utilizados foram viáveis.

4- INDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE HISTAMINA

O volume final de incubação foi de 1,0 ml, sendo constituído por:

- suspensão de células peritoneais (1×10^5 mastócitos - 0,5 ml);
- CNTX ou seu veículo (0,1 ml);
- tampão de incubação (0,4 ml).

Os tubos contendo suspensão de células peritoneais e o tampão de incubação foram pré-incubados a 37°C por 5 min sendo que, só então foi acrescentado CNTX ou seu veículo e o tempo de incubação medido.

A liberação espontânea de histamina foi avaliada incubando-se apenas a suspensão de células peritoneais com 0,5 ml do tampão de incubação. Estes tubos foram denominados tubos Branco (B). Os tubos que continham a CNTX foram denominados tubos Tratado (T) e aqueles que continham o veículo da toxina, tubos Controle (C).

Cada experimento foi realizado em duplicata. Um terceiro tubo foi acrescentado para o teste de viabilidade.

Após a incubação, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo; em seguida estes foram centrifugados a 180 g por 10 min, para separar as células

peritoneais e fragmentos do mesentério do sobrenadante que continha a substância liberada. Acrescentou-se então 1,0 ml de HCl 0,1 N ao resíduo (R) e 0,2 ml de HCl 1 N ao sobrenadante (S). Os tubos foram então colocados em banho-maria fervente por 10 min.

O material resultante foi mantido a -20°C para posterior dosagem de histamina (Rothschild, 1965; Antunes et al., 1989).

No final de cada condição experimental realizou-se invariavelmente o teste de viabilidade.

5- DOSAGEM DE HISTAMINA

O conteúdo dos tubos de incubação foi neutralizado com NaOH 0,1 N e o volume completado para 3,0 ml com o tampão de incubação. Utilizamos papel reativo indicador universal (pH 1 - 10, Geel).

A dosagem de histamina foi realizada separadamente, tanto no R quanto no S dos tubos usando-se íleo atropinizado de cobaia (atropina - 1×10^{-4} M). As contrações produzidas no íleo foram caracterizadas repetindo-se os ensaios na presença de um anti-histamínico (difenidramina- 5×10^{-7} M) e comparadas àquelas produzidas por uma solução padrão de histamina (Rothschild, 1965; idem, 1966; idem, 1970).

A percentagem de liberação de histamina foi calculada da seguinte maneira:

$$X \text{ de liberaç\~{a}o} = \frac{S - B}{(S+R) - B} \times 100$$

S = sobrenadante dos tubos

R = resíduo dos tubos

B = liberaç\~{a}o espont\~{a}nea

6- DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE LIBERAÇÃO DE HISTAMINA POR CNTX

Para isto, os seguintes parâmetros foram estudados:

6.1- Influência da concentração de CNTX

6.2- Influência do tempo de incubação

6.3- Influência da temperatura do meio de incubação

6.4- Influência do pH do meio de incubação

6.5- Influência da presença dos íons cálcio e magnésio no meio de incubação

6.6- Influência da presença de glicose no meio de incubação

7- DROGAS E REAGENTES

Baker, São Paulo, Brasil

Fosfato dibásico de sódio; fosfato monobásico de sódio; sulfato de amônio.

Merck, Darmstadt, Germany

Ácido clorídrico; cloreto de cálcio; Cloreto de potássio; cloreto de sódio; glicose; hidróxido de sódio; sulfato de magnésio; tris (trihidroxi-metil-amino-metano).

Geel, São Paulo, Brasil

Reativo de Nessler.

Riedel-De Haen AG, Hannover, Germany

Trypan Blue.

Sigma, St.Louis, U.S.A.

Difenidramina e dihidrocloridrato de histamina.

8- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados usando-se o teste t Student (Sidney e Siegel, 1979), considerando-se a significância ao nível de 5%. Os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (SEM). Os números, no topo das colunas e nos pontos, indicam a quantidade de experimentos realizados.

IV- RESULTADOS

Nossos resultados mostram que a incubação de mastócitos peritoneais de ratos com CNTX, a 37°C e durante 25 min, produziu liberação significativa de histamina. Além disto o fenômeno foi concentração-dependente. Assim, usando-se CNTX na concentração de 0,16 uM houve uma liberação de 4,13% de histamina, enquanto que concentrações de CNTX da ordem de 0,5 e 2,0 uM liberaram respectivamente 8,98% e 22,04% de histamina. (Figura 1).

Procuramos, em seguida, estudar a influência do tempo de incubação sobre o efeito liberador de histamina induzido por CNTX. Para isso fixamos os padrões de concentração da toxina (2,0 uM) e temperatura de incubação (37°C) e variamos os tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 25, 35 e 45 min). Conforme mostra a Figura 2, a liberação se iniciou no tempo de 1 min (6,64%) e se manteve crescente até o tempo de 15 min, onde o percentual de liberação atingiu um "plateau" que se manteve até os 45 min.

Para verificarmos se a liberação de histamina dos mastócitos peritoneais de ratos por CNTX, é um fenômeno

dependente de energia, foram feitas incubações de mastócitos com CNTX, na concentração de 2,0 uM durante 15 min, nas temperaturas de 4, 17, 27, 37 e 45°C. Comparando-se as várias temperaturas usadas e tomando-se como referência a liberação de histamina que a toxina produziu a 37°C (24,08%), houve uma inibição significativa do fenômeno quando as incubações foram feitas nas temperaturas de 4°C (0,00%), 17°C (0,00%), 27°C (4,25%) e 45°C (4,91%) (ver Figura 3).

A liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos por CNTX, se mostrou também sensível a variações de pH do meio de incubação. A Figura 4 ilustra este fato, mostrando que o pH ótimo para a liberação de histamina foi o fisiológico, padronizamos para nossos estudos o 7,0 (30,04% de liberação; significativa em relação ao seu Controle). No pH 6,0, a liberação observada foi de 1,61% (não significativa em relação ao seu Controle) e no pH 8,0 não houve liberação.

Na Figura 5 mostramos que houve inibição da liberação de histamina produzida por CNTX, quando no meio de incubação estavam ausentes os íons cálcio e magnésio. A liberação de histamina nestas condições, foi de 1,60% (significante em relação aos resultados obtidos quando estes íons estavam presentes).

Quando somente o cálcio estava ausente no meio de incubação, não ocorreu liberação significativa de histamina por CNTX. Nestas condições a liberação de histamina foi de

4,63%, ou seja, houve uma inibição significativa em relação àquela apresentada pela CNTX quando este íon estava presente.

O fenômeno de liberação de histamina por CNTX também demonstrou ser dependente de magnésio. A liberação de histamina produzida na ausência deste íon foi de somente 3,61%. Portanto, houve uma inibição significativa da liberação de histamina em relação àquela apresentada pela CNTX quando este íon estava presente.

A glicose foi essencial para que a CNTX produzisse liberação de histamina de mastócitos de ratos. Como mostram os dados na Figura 6, a liberação de histamina produzida pela CNTX na ausência de glicose, foi de 4,02%. Verificou-se assim uma inibição significativa da liberação de histamina em relação àquela apresentada pela CNTX quando a glicose estava presente no meio de incubação.

Em resumo, padronizamos as condições para que a CNTX, na concentração de 2,0 μ M, produzisse liberação de cerca de 30% de histamina de mastócitos peritoneais de ratos: tempo de incubação de 15 min, temperatura de 37°C, pH 7,0 e meio de incubação contendo CaCl_2 , MgSO_4 e glicose.

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CNTX SOBRE A LIBERAÇÃO
DE HISTAMINA DE MASTÓCITOS PERITONEAIS DE RATOS

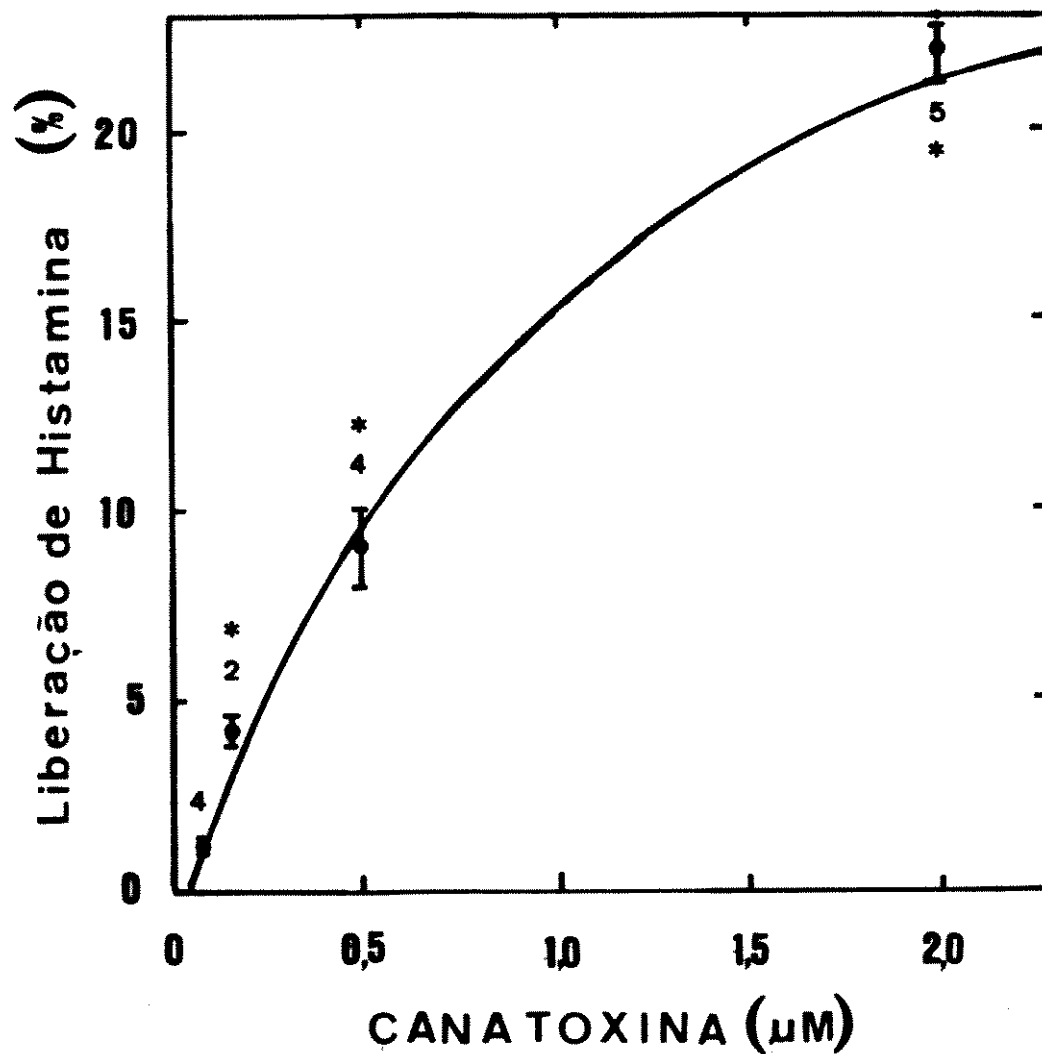


Figura 1- Mastócitos foram incubados em pH 7,4 a 37°C durante 25 min com CNTX nas concentrações de 0,04, 0,16, 0,5 ou 2,0 µM. Os dados são expressos em média \pm SEM do percentual de histamina liberada e os números nos pontos indicam a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com seus respectivos Controles.

* $P < 0,05$

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A LIBERAÇÃO DE
HISTAMINA INDUZIDA POR CNTX

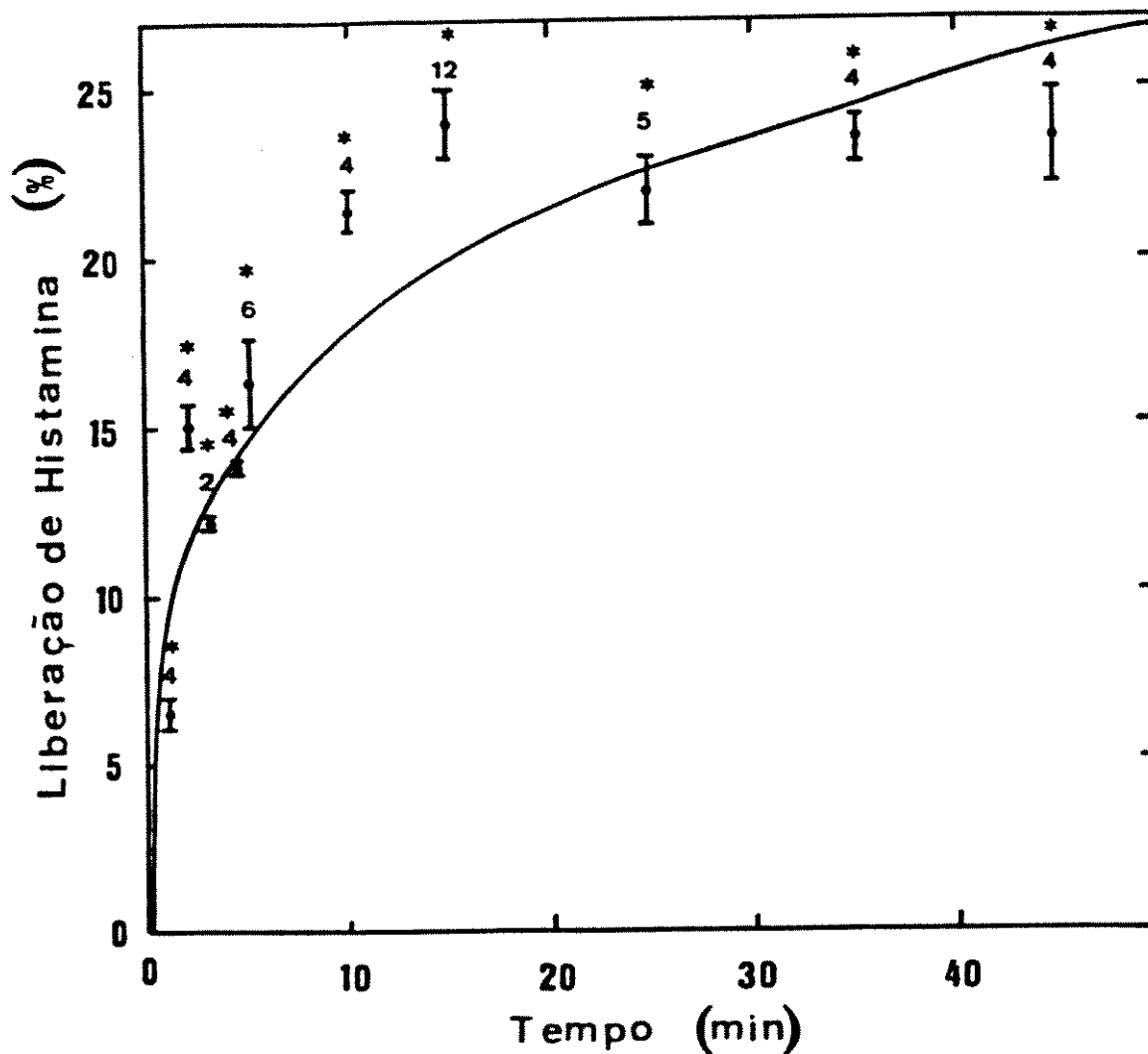


Figura 2- Mastócitos foram incubados a 37°C em pH 7,4 com 2,0 μ M de CNTX. Os tempos de incubação utilizados foram de 1, 2, 3, 4, 5, 15, 25, 35 ou 45 min. Os dados são expressos em média \pm SEM do percentual de histamina liberada e os números nos pontos indicam a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com seus respectivos Controles.

* $P < 0,05$

EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMINA

INDUZIDA POR CNTX

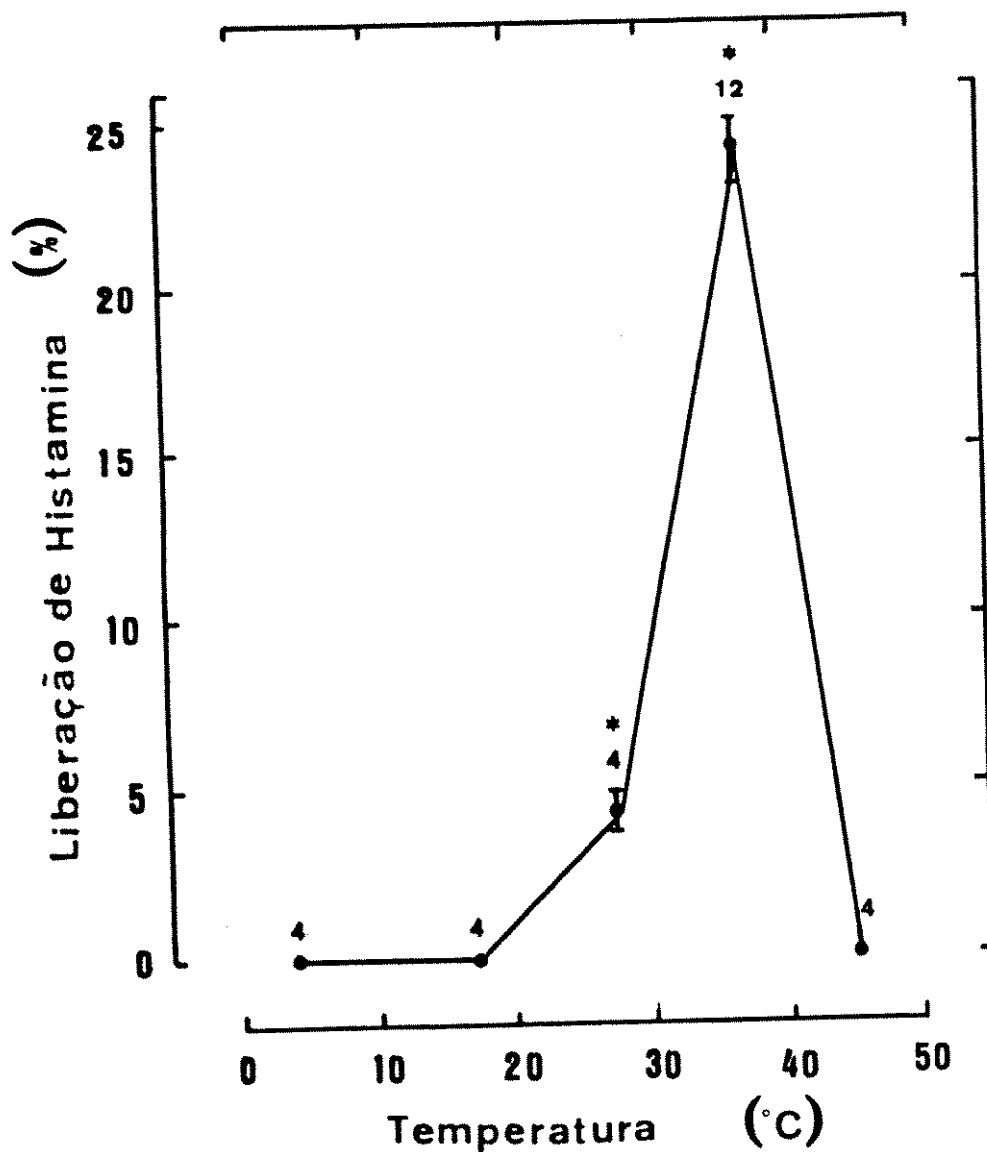


Figura 3- Mastócitos foram incubados em pH 7,4 durante 15 min com 2,0 μ M de CNTX nas temperaturas de 4, 17, 27, 37 ou 45°C. Os dados são expressos em média \pm SEM do percentual de histamina liberada e os números em cada ponto indicam a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos a 37°C.

* $P < 0,05$

INFLUÊNCIA DO pH SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMINA

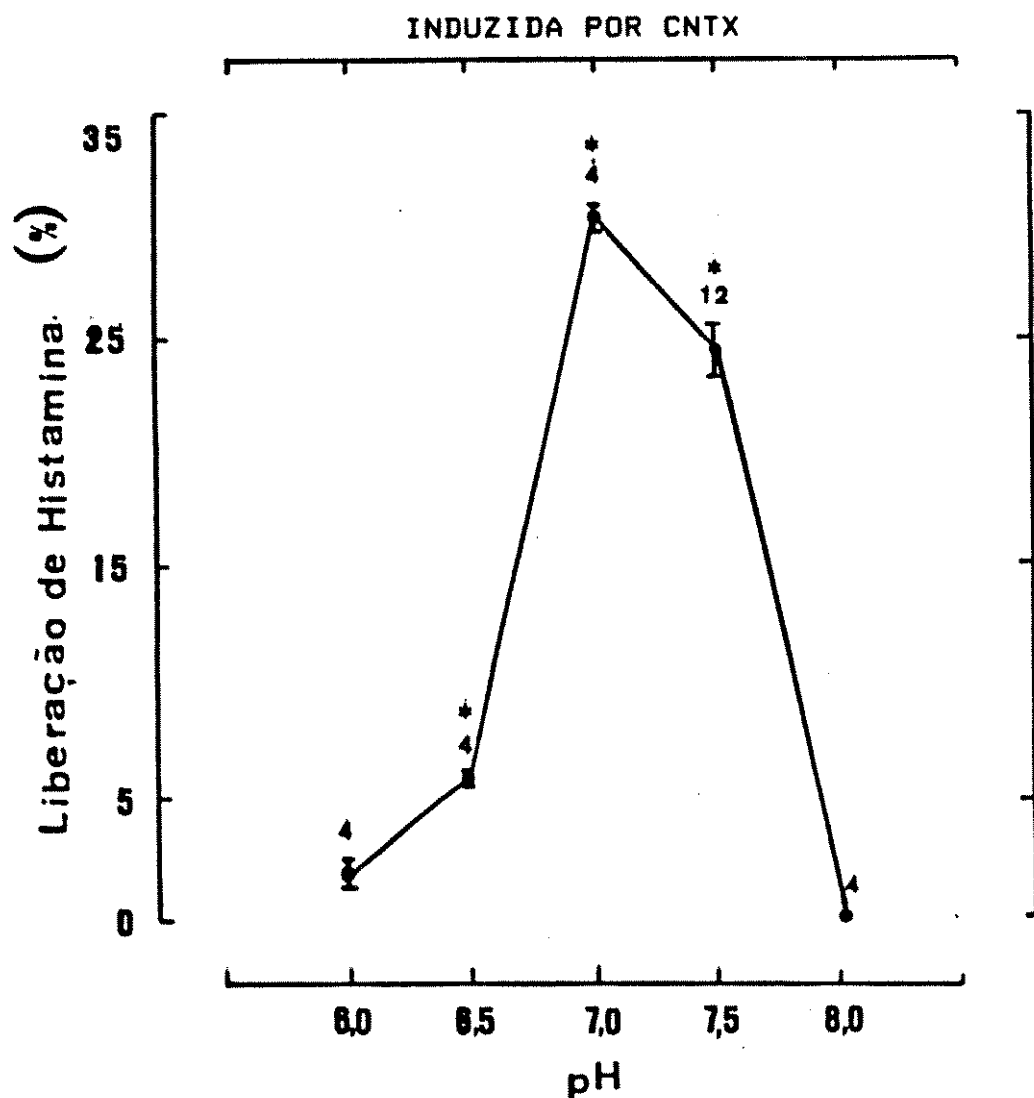


Figura 4- Mastócitos foram incubados com 2,0 μ M de CNTX a 37°C durante 15 min e variando-se o pH do tampão de incubação 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ou 8,0. Os dados são expressos em média \pm SEM do percentual de histamina liberada e os números em cada ponto indicam a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com seus respectivos Controles.

* $P < 0,05$

INFLUÊNCIA DOS ÍONS CÁLCIO E MAGNÉSIO SOBRE A LIBERAÇÃO
DE HISTAMINA INDUZIDA POR CNTX

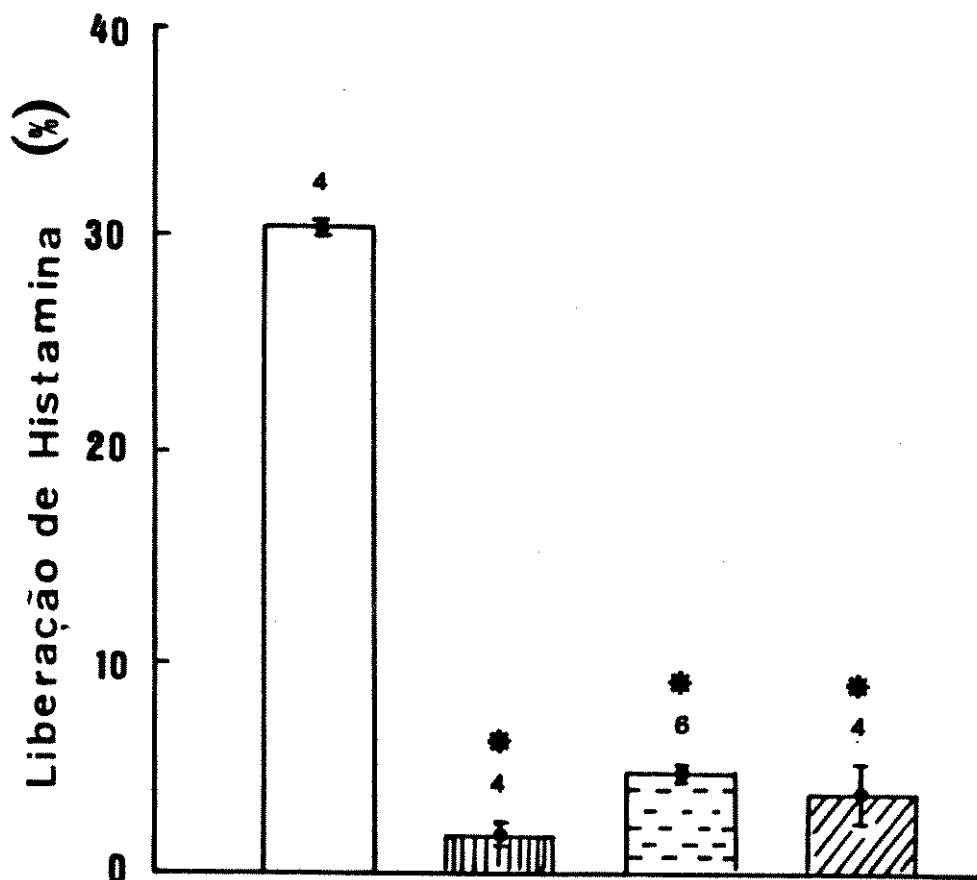


Figura 5- Mastócitos foram incubados com 2,0 uM de CNTX, pH 7,0, durante 15 min, a 37°C. O tampão de incubação variou em cada tratamento: □ íons Ca^{+2} e Mg^{+2} presentes, ▨ íons Ca^{+2} e Mg^{+2} ausentes, ▤ íon Ca^{+2} ausente, ▩ íon Mg^{+2} ausente. Os dados representam a média \pm SEM do percentual de histamina liberada e o número em cada coluna indica a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com aqueles onde os íons Ca^{+2} e Mg^{+2} estavam presentes.

* $P < 0,05$

INFLUÊNCIA DA GLICOSE SOBRE A LIBERAÇÃO DE HISTAMINA
INDUZIDA POR CNTX

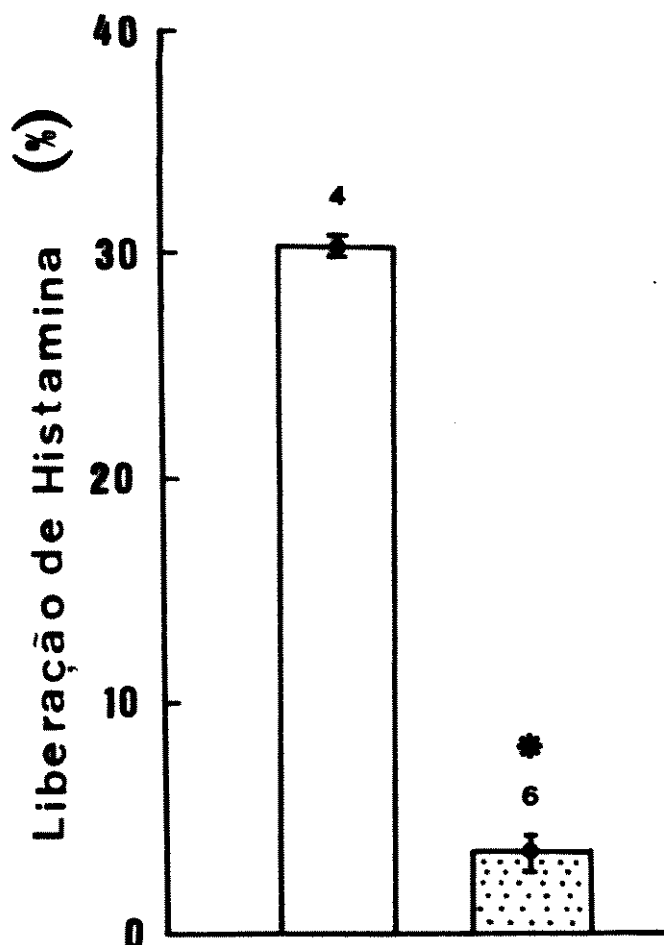


Figura 6- Mastócitos foram incubados com 2,0 μ M de CNTX, em pH 7,0, durante 15 min e na temperatura de 37°C. O tampão de incubação variou em cada tratamento: \square glicose presente, \square glicose ausente. Os dados são expressos em média \pm SEM do percentual de histamina liberada e o número em cada coluna indica a quantidade de experimentos realizados. Os resultados foram comparados com aqueles que continham glicose no meio.

* $P < 0.05$

V- DISCUSSÃO

A liberação de histamina de mastócitos e basófilos é um processo secretório ativo e tem certas semelhanças com secreção em outros sistemas, por exemplo, catecolaminas na glândula adrenal (Rubin, 1969; idem, 1970; Kirshner e Viveros, 1972), vasopressina na neurohipófise (Douglas e Poisner, 1964; Poisner e Douglas, 1968; Russel et al., 1974; Robinson et al., 1976), insulina nas células beta do pâncreas (Williamson et al., 1961; Davis e Lazarus, 1972; Hellman, 1975), etc.

Em todos estes sistemas é possível distinguir três passos básicos (Kirshner e Viveros, 1972):

- 1- ativação das células por estímulo específico;
- 2- liberação de material granular para o espaço extracelular;
- 3- restauração das propriedades morfológicas e funcionais da célula que estará então apta para responder a um novo estímulo.

O termo secreção ou liberação seletiva é reservado somente para os processos ativos de liberação, que possuem as seguintes características:

1- são induzidos por estímulos seletivos e não citotóxicos;

2- exigem energia metabólica;

3- necessitam da presença de certos cátions bivalentes, principalmente o cálcio.

Além da energia metabólica e cátions bivalentes, outros fatores modulam também a secreção de histamina de mastócitos e basófilos, como o pH (ótimo em torno de 7,0) e a temperatura (o fenômeno é inibido tanto a 0°C como a 45°C) (Mongar e Schild, 1957; idem, 1958; Diamant e Uvnas, 1961; Rothschild, 1966, idem, 1970; Lagunoff e Wan, 1974; Baxter e Adamik, 1974; Kruger, 1976; White e Pearce, 1982b).

A secreção ou liberação seletiva é somente um dos mecanismos pelo qual a histamina é liberada da célula e está incluída dentro do termo geral "libertação" ou "liberação", que compreende todos os processos ativos e passivos que levam a liberação de histamina (Kazimierczak e Diamant, 1978).

Nossos dados mostram que a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos por CNTX apresenta as seguintes características:

- não foi citotóxica;
- foi concentração e tempo-dependente;
- a temperatura ótima do meio de incubação foi 37°C;
- o pH ótimo do meio de incubação foi o fisiológico;
- necessitou da presença de glicose e dos íons cálcio e magnésio no meio de incubação.

Considerando portanto estas características, podemos dizer que a CNTX induz secreção de histamina de mastócitos peritoneais de ratos.

O fato de a liberação de histamina ser dependente do pH do meio de incubação, nem sempre é característica exclusiva de um processo secretório, pois muitas vezes estímulos citotóxicos se mostram dependentes da temperatura, do pH e do cálcio (Frisk-Holberg, 1971; Ko e Lagunoff, 1976).

Pode ocorrer também com frequência a inativação de uma substância como consequência da variação de pH. Isto ocorre por exemplo com a secreção de histamina produzida por Con A e foi descrito por Shores e Mongar em 1980. Segundo estes autores, a Con A tem sua atividade alterada em diferentes valores de pH. Esta lectina tem sua atividade ligante na

forma tetrâmera e esta é seu principal componente no pH fisiológico. Em pH 6,0, há uma dissociação desta lectina em dímeros (Lis e Sharon, 1973; Goldstein et al., 1974; Reeke et al., 1974; Goldstein e Hayes, 1978). Portanto, a diminuição da liberação de histamina em pH ácido por Con A parece ser somente resultado da redução na quantidade da forma tetrâmera ativa desta lectina.

A CNTX também apresenta alterações de configuração e atividade em diferentes valores de pH. Em pH ácido esta toxina tem sua atividade diminuída porém, em pH alcalino (8,0) sua atividade se mantém inalterada (Carlini et al., dados não publicados). De acordo com nossos dados, a liberação de histamina pela CNTX em pH 8,0 foi nula, apesar da toxina estar na sua forma ativa; isto sugere que realmente é a alteração do pH que está inibindo a reação.

Outra hipótese a ser considerada, é que muitas vezes a influência do pH sobre a liberação de histamina pode ocorrer através de alterações que a concentração de íons hidrogênio produz sobre a permeabilidade da membrana celular. Este assunto foi descrito por Foreman et al. (1977) ao estudar a captação de cálcio por mastócitos de ratos na reação anafilática; os autores demonstraram que esta reação é dependente do pH do meio, ocorrendo porém, como resultado da variação de permeabilidade da membrana aos íons cálcio em diferentes valores de pH.

Grande número de pesquisadores têm demonstrado que a secreção de histamina requer energia sob a forma de ATP; esta energia em condições aeróbicas é fornecida pela fosforilação oxidativa da glicose e anaerobicamente pela glicólise (Diamant, 1960; Diamant e Uvnas, 1961; Kazimierczak e Diamant, 1978).

Nossos dados mostram que a presença de glicose no meio de incubação é essencial para que a CNTX induza liberação de histamina de mastócitos; isto vem reforçar o fato de se tratar realmente de um processo ativo de liberação.

A histamina pode ser seletivamente liberada de mastócitos através de estímulos farmacológicos e imunológicos. Em cada situação, a liberação é precedida por um aumento na concentração de íon cálcio livre no citosol. Este íon pode ser derivado de fontes intra ou extracelulares. Na presença de cálcio exógeno, o estímulo secretório aumenta a permeabilidade da membrana a este íon através da abertura de canais de cálcio existentes na membrana. Este é o caso das reações anafiláticas (Sullivan e Parker, 1976; Foreman et al., 1977). Na ausência de cálcio adicionado exogenamente, o estímulo secretório mobiliza estoques de cálcio isolados ou ligados a membrana, como acontece com o composto 48/80 e o peptídeo 401 (Ennis et

al., 1980; Pearce et al., 1981; White e Pearce, 1982a,b; West, 1985).

Mostramos que a liberação de histamina por CNTX é dependente do cálcio extracelular, o que sugere que a toxina tem um possível papel ligado ao cálcio e poderia agir, por exemplo, estimulando a passagem de cálcio do meio extracelular para o citosol.

O metabolismo de fosfolipídeos, principalmente do fosfatidilinositol, é ativado quando células secretórias são estimuladas (Cockcroft et al., 1981; Homma et al., 1982; Cohen et al., 1983). Este parece ser o evento primário para a mobilização de cálcio e consequente reação de secreção (Michell, 1975).

Ishizuka e Nozawa (1983), estudando o aumento do metabolismo de fosfolipídeos pela estimulação de mastócitos de ratos por antígeno, sugerem que o aumento do metabolismo de fosfatidilinositol possa ser uma etapa importante na sequência de eventos bioquímicos que levam a liberação de histamina. Para estes autores, não somente o cálcio mas também o magnésio parece estar envolvido na resposta de mastócitos de ratos a estímulos secretórios.

Nós demonstramos que a liberação de histamina por CNTX ocorreu na ausência de fosfatidilserina mas necessita de magnésio adicionado ao meio de incubação.

Sullivan et al. (1975b) mostram que a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos, na ausência de magnésio, só ocorre quando se adiciona fosfatidilserina no meio de incubação. Complementando este estudo, Hirata et al. (1979) demonstraram que na liberação de histamina de mastócitos pela Con A, o magnésio atua como ativador de fosfolipídeos.

A estimulação de células secretórias produz, a nível de membrana celular, ativação de fosfolipases levando a uma alteração nos fosfolipídeos e liberação de ácido araquidônico (Irvine, 1982; Broekmann et al., 1980; Walsh et al., 1981; Hong e Deykin, 1982; Imai et al., 1984; Siraganian, 1983).

O ácido araquidônico pode ser metabolizado tanto pela via da ciclooxigenase como pela via da lipoxigenase levando a formação de vários mediadores químicos como as prostaglandinas, as tromboxanas e as leucotrienas C₄, D₄ e E₄ (Samuelsson et al., 1978a; Samuelsson et al., 1978b).

A importância da ativação do metabolismo do ácido araquidônico para a secreção de histamina vem sendo estudada

por vários autores nestes últimos anos (Marone et al., 1979; Kennerly et al., 1979; Mc Givney et al., 1981; Martin e Lagunoff, 1982; Siraganian, 1983; Urata e Siraganian, 1985). Assim, foi constatado que bloqueadores não seletivos das duas vias de metabolização deste ácido inibem a liberação de histamina de mastócitos de ratos (Sullivan e Parker, 1979; Yamada et al., 1987) e de basófilos humanos (Marone et al., 1979), sugerindo que os produtos formados pela metabolização do ácido araquidônico são necessários para a secreção de histamina.

Vários pesquisadores utilizando bloqueadores da lipoxigenase, demonstraram que a liberação de histamina em mastócitos e basófilos depende dos produtos formados por esta via de metabolização do ácido araquidônico (Marone et al., 1980; Peters et al., 1981; Dorsh et al., 1984; Yamamoto et al., 1985). Por outro lado, estudos recentes de Gomes e Pearce (1988) demonstraram que drogas bloqueadoras da ciclooxigenase têm também um efeito inibitório sobre a liberação de histamina.

Com todos estes dados de literatura podemos afirmar que os produtos formados na metabolização do ácido araquidônico pelas vias da lipoxigenase e ciclooxigenase, têm um importante papel na secreção de histamina de mastócitos de ratos e basófilos humanos.

Demonstramos nesta Tese que a CNTX induz secreção de histamina de mastócitos peritoneais de ratos na ausência de fosfatidilserina, porém, a presença do íon magnésio é imprescindível para o fenômeno. Como este íon é necessário para o metabolismo de fosfolipídeos de membrana e as secreções induzidas por CNTX são dependentes do metabolismo do ácido araquidônico, nossos dados poderiam sugerir que também a indução da secreção de histamina por CNTX, que estamos descrevendo, esteja na dependência da metabolização do ácido araquidônico.

Concluimos portanto, que a CNTX induz a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato através de um processo secretório ativo que envolve provavelmente a ativação de fosfolipídeos celulares.

VI- CONCLUSÕES

1- A CNTX liberou histamina de mastócitos peritoneais de ratos através de um processo secretório ativo.

2- Esta reação de secreção obedeceu a seguinte cinética:

A- a concentração ótima de CNTX foi de 2,0 uM;

B- o tempo ótimo de incubação está entre 15 e 45 min ;

C- a temperatura ótima de incubação foi de 37°C;

D- o pH ótimo do meio de incubação foi o fisiológico .

VII- RESUMO

Canatoxina (CNTX) é uma proteína tóxica extraída das sementes maduras da *Canavalia ensiformis* e induz secreção em vários sistemas celulares. A Concanavalina A (Con A), lectina que também está presente nas sementes de *Canavalia ensiformis*, induz secreção de histamina de mastócitos de ratos. Embora sendo dois princípios completamente distintos, a CNTX e a Con A têm algumas propriedades farmacológicas em comum. O objetivo desta Tese foi verificar se a CNTX produz liberação de histamina de mastócitos de ratos e desenvolver um estudo detalhado do fenômeno.

Os seguintes resultados foram obtidos:

- 1- A CNTX produziu uma liberação de histamina de mastócitos de ratos;
- 2- O fenômeno foi concentração (uM) e tempo-dependentes;
- 3- As condições ótimas para a reação foram na temperatura de 37°C e em pH fisiológico;

4- A reação foi inibida na ausência de Ca^{++} , Mg^{++} ou glicose;

Concluimos portanto que, a CNTX induz uma secreção de histamina de mastócitos peritoneais de ratos através de um processo secretório ativo que envolve provavelmente a ativação do metabolismo do ácido araquidônico.

VIII- ABSTRACT

Canatoxin (CNTX), a toxic protein extracted from the mature seeds of *Canavalia ensiformis*, induces secretion in several cells systems. Concanavalin A (Con A), the lectin that is also present in *Canavalia ensiformis* seeds, induces histamine secretion from rats mast cells. Although being two completely distinct principles, CNTX and Con A share some pharmacological properties. The purpose of the present work was to verify if CNTX causes histamine release from rat peritoneal mast cells and to perform a detailed study of this phenomenon.

The following results were obtained:

- 1- CNTX induced histamine release from rat peritoneal mast cells;
- 2- The phenomenon was concentration (μM) and time-dependent;
- 3- The best conditions for the reaction to occur were at 37°C and physiological pH;
- 4- The reaction was inhibited in the absence of Ca^{++} , Mg^{++} or glucose;

Thus, we conclude that CNTX triggers histamine secretion from rat mast cells via an enzymatic reaction, probably involving the activation of arachidonic acid metabolism.

IX- BIBLIOGRAFIA

- ANTUNES, E; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.
Cross-neutralization on the histamine-releasing activity
of snake venoms. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamerican*,
32, 431-438, 1989
- AUB, J.C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal
and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase
and associated mucopolysaccharides. *Physiol.*, 50(4): 613-
619, 1963
- BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A.; CARLINI, C.R. The
secretory effect of canatoxin on rat brain synaptosomes
involves a lipoxygenase-mediated pathway. *Braz. J. Med.
Biol. Res.*, 21: 549-552, 1988
- BARJA-FIDALGO, C.; ALVAREZ, M.; GUIMARÃES, J.A.; CARLINI,
C.R. Canatoxina induz secreção de insulina de ilhotas
pancreáticas isoladas de rato. *Resumos FESBE*: 163, 1989
- BARRET, K.E.; PLUZNIK, D.H.; METCALFE, D.D. Histamine
release from the cultured mouse mast cell line PT 18 in

- response to immunologic and non-immunologic stimuli. *Agents Actions*, 14(3/4): 488-493, 1984
- BASS, D.A.; D'FLAHERTY, J.T.; SZEJDA, P.; DeCHATELET, L.R.; McCALL, C.E. Role of arachidonic acid in stimulation of hexose transport by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77(9): 5125-5129, 1980
- BAXTER, J.H.; ADAMIK, R. Temperature dependence of histamine release from rat mast cells by dextran. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146, 71-74, 1974
- BAXTER, J.H.; ADAMIK, R. Differences in requirements and actions of various histamine-releasing agents. *Biochem. Pharmacol.*, 22: 497-503, 1978
- BENDITT, E.P.; WONG, R.L.; ARASE, M.; ROEPER, E. 5-Hydroxytryptamine in mast cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90(1): 303-304, 1955
- BOKOCH, G.M.; REED, P.W. Effect of various lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on degranulation of polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 256(11): 5317-5320, 1981
- BOTTING, R.; VANE, J.R. Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of asthma. In: VANE, J.R.; HIGGS, G.A.; MARSICO, S.A.; NISTICO, G. *Asthma Basic Mechanisms and Therapeutic Perspectives*. 1st ed. Roma, Pythagora Press Roma-Milan, 1989, pp. 52-59
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (Lectins). *Science*, 119: 419, 1954a

- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J. Immunol.*, 73: 226-231, 1954b
- BOYD, W.C. The lectins: Their present status. *Vox Sang.*, 8: 1-32, 1963
- BOYSE, E.A.; OLD, L.J.; CHOUDOLINKOV, I. VI. Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. *Methods Med. Res.*, 10: 39-47, 1964
- BROEKMAN, M.J.; WARD, J.W.; MARCUS, A.J. Phospholipid metabolism in stimulated human platelets. *J. Clin. Invest.*, 66(2): 275-283, 1980
- BROWN, J.C.; HUNT, R.C. Lectins. *Int. Rev. Cytol.*, 52: 277-349, 1978
- BRZEZINSKA-BLASCZYK, E.; ZAWILSKA, J.; WYCZOLKOWSKA, J. Histamine-releasing properties of mast cells from various strains of mice. *Agents Actions*, 14(3/4): 361-364, 1984
- BURGER, M.M. A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells. *Biochemistry (Washington)*, 62: 994-1001, 1969
- CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19(5): 667-675, 1981
- CARLINI, C.R.; GOMES, C.; GUIMARÃES, J.A.; MARKUS, R.P. SATO, H.; TROLIN, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 54: 161-166, 1984

- CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Canatoxin induces cellular secretion: through activation of lipoxygenase pathway. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 52(3): 388-389, 1985
- CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M.C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 84: 551-560, 1985
- CARRAWAY, R.E.; COCHRANE, D.E.; GRANIER, C.; KITABGI, P.; LEEMAN, E.; SINGER, E.A. Parallel secretion of endogenous 5-hydroxytryptamine and histamine from mast cells stimulated by vasoactive peptides and compound 48/80. *Br. J. Pharmacol.*, 81(2): 227-229, 1984
- COCKCROFT, S.; BENNETT, J.P.; GOMPERS, B.D. The dependence on Ca^{+2} of phosphatidylinositol breakdown and enzyme secretion in rabbit neutrophils stimulated by formylmethionyl-leucylphenylalanine or ionomycin. *Biochem. J.*, 200: 501-508, 1981
- COHEN, N.M.; SCHMIDT, D.M.; MCGLENNEN, R.C.; KLEIN, W.L. Receptor-mediated increases in phosphatidylinositol turnover in neuron-like cell lines. *J. Neurochem.*, 40(2): 547-554, 1983
- COLLARES, C.B.; RIBEIRO-DA SILVA, G. Involvement of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in hypoxia and metabolic alkalosis produced by canatoxin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21: 107-110, 1988

- CUATRECASAS, P. Interaction of concanavalin A and wheat germ agglutinin with the insulin receptor of fat cells and liver. *J. Biol. Chem.*, 248(10): 3528-3534, 1973
- CUATRECASAS, P.; TELL, G.P.E. Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin-direct interactions with insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 70(2): 485-489, 1973
- CURRY, S.H.; BROWN, E.A.; KUCK, H.; CASSIN, S.; Preparation and stability of indomethacin solutions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60: 988-992, 1982
- DAVIS, B.; LAZARUS, N.R. Insulin release from mouse islets. Effect of glucose and hormones on adenylate cyclase. *Biochem. J.*, 122: 373-379, 1972
- DIAMANT, B. The influence of anoxia and glucose on histamine liberation caused by a principle in Ascaris suis. *Acta Physiol. Scand.*, 50 [Suppl. 175]: 34, 1960
- DIAMANT, B.; UVNAS, 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, 1961
- DIAMANT, B. Histamine secretion: research in retrospect. *Agents Actions*, 12(1/2): 5-11, 1982
- DORSCH, W.; RING, J.; RIEPEL, H. Effect of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) on anti-immunoglobulin E- and calcium ionophore-induced histamine release from human leukocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 73: 274-279, 1984

- DOUGLAS, W.W.; POISNER, A.M. Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis. *J. Physiol. (Lond.)*, 172: 1-18, 1964
- ENERBACK, L.; HAGGENDAL, J. Uptake and storage of catecholamines in mucosal mast cells of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, 18(11): 803-811, 1970
- ENNIS, M.; TRUNEH, A.; WHITE, J.R.; PEARCE, F.L. Calcium pools involved in histamine release from rat mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 62: 467-471, 1980
- ENNIS, M.; TRUNEH, A.; PEARCE, F.L. Lectin-induced histamine secretion from isolated rat and guinea pig mast cells. *Biochem. Pharmacol.*, 30(15): 2179-2181, 1981
- ENNIS, M. Histamine release from human pulmonary mast cells. *Agents Actions*, 12(1/2): 60-63, 1982
- FLOWER, R.J. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacol. Rev.*, 26(1): 33-67, 1974
- FOREMAN, J.C.; HALLETT, M.B.; MONGAR, J.L. The relationship between histamine secretion and ⁴⁵calcium uptake by mast cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 271(1): 193-214, 1977
- FRISH-HOLMBERG, M. On the mechanism of chlorpromazine-induced histamine release from rat mast cells. *Acta Physiol. Scand.*, 83: 412-421, 1971
- GARRISON, J.C. Histamine, Bradykinin, 5-Hydroxytryptamine, and their antagonists. In: Goodman & Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 8th ed., New York, Pergamon Press, 1990, pp. 575-599

- GEROZISSIS, K.; VULLIEZ, B.; SAAVEDRA, J.M.; MURPHY, R.C.; DRAY, F. Lipoxygenase products of arachidonic acid stimulate LHRH release from rat median eminence. *Neuroendocrinology*, 40: 272-276, 1985
- GOLDSTEIN, I.J.; RIECHERT, C.M.; MISAKI, A. Interaction of concanavalin A with model substrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 234: 283-296, 1974
- GOLDSTEIN, I.J.; HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35: 127-340, 1978
- GOMES, J.C.; PEARCE, F.L. Comparative studies on the effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) on histamine release from mast cells of the rat and guinea pig. *Agentes Actions*, 24(3/4): 266-271, 1988
- GUIMARÃES, J.A.; UBATUBA, S.; CARLINI, C.R. Physico-chemical properties of canatoxin, a hemilectin displaying convulsant activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 57(3): 387-389, 1985
- HAMBERG, M. On the formation of thromboxane B₂ and 12 L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid (12ho-20:4) in tissues from guinea pig. *Biochim. Biophys. Acta*, 431: 651-654, 1976
- HELLMAN, B. The effects of calcium and divalent ionophores on the stability of isolated insulin secretory granules. *FEBS Lett*, 54: 343, 1975
- HIRATA, F.; AXELROD, J.; CREWS, F.T. Concanavalin A stimulates phospholipid methylation and phosphatidyl

- serine decarboxylation in rat mast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 76(10): 4813-4816, 1979
- HOMMA, Y.; ONOZAKI, K.; HASHIMOTO, T.; NAGAI, Y.; TAKENAWA, T. Differential activation of phospholipids metabolism by formylated peptide and ionophore A 23187 in guinea pig peritoneal macrophages. J. Immunol., 129(4): 1619-1626, 1982
- HONG, S.L.; DEYKIN, D. Activation of phospholipases A₂ and C in pig aortic endothelial cells synthesizing prostacyclin. J. Biol. Chem., 257(12): 7151-7154, 1982
- HOOK, W.A.; BROWN, H.; OPPENHEIM, J.J. Histamine release from human leucocytes by concanavalin A and other mitogens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 147(3): 659-663, 1974a
- HOOK, W.A.; DOUGHERTY, S.F.; OPPENHEIM, J.J. Release of histamine from hamster mast cells by concanavalin A and phytohemagglutinin. Infect. Immun., 2(5): 903-908, 1974b
- IMAI, A.; ISHIZUKA, Y.; NAKASHIMA, S.; NOZAWA, Y. Differential activation of membrane phospholipid turnover by compound 48/80 and ionophore A 23187 in rat mast cells. Arch. Biochem. Biophys., 232(1): 259-268, 1984
- INBAR, M.; SACHS, L. Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Biochemistry (Washington), 63: 1418-1425, 1969
- IRVINE, R.F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells ? Biochem. J., 204: 3-16, 1982

- ISHIGURO, M.; TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G.; HAYASHI, K.; FUNATSU, M. Biochemical studies on ricin. J. Biochem. (Tokyo), 55(6): 587-592, 1964
- ISHIZUKA, Y.; NOZAWA, Y. Concerted stimulation of PI-turnover, Ca²⁺-influx and histamine release in antigen-activated rat mast cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 117(3): 710-717, 1983
- JOHNSON, A.R.; MORAN, N.C. Comparison of several methods for isolation of rat peritoneal mast cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123(1): 886-888, 1966.
- KAZIMIERCZAK, W.; DIAMANT, B. Mechanisms of histamine release in anaphylactic and anaphylactoid reactions. Prog. Allergy, 24: 295-365, 1978.
- 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.
- KENNERLY, D.A.; SULLIVAN, T.J.; PARKER, C.W. Activation of phospholipid metabolism during mediator release from stimulated rat mast cells. J. Immunol., 122(1): 152-159, 1979.
- KIRSHNER, N.; VIVEROS, O.H. The secretory cycle in the adrenal medulla. Pharmacol. Rev., 24(2): 385-398, 1972.
- KO, L.; LAGUNOFF, D. Depletion of mast cell ATP inhibits complement-dependent cytotoxic histamine release. Exp. Cell Res., 100: 313-321, 1976

- KRUGER, G. The histamine release process and concomitant structural changes in rat peritoneal mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 51: 608-626, 1976
- LAGUNOFF, D.; WAN, H. Temperature dependence of mast cell histamine secretion. *J. Cell Biol.*, 61: 809-811, 1974
- LAGUNOFF, D.; MARTIN, T.W.; READ, G. Agents that release histamine from mast cells. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23: 331-351, 1983
- LANSMAN, J.B.; 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.; RAFF, M.C. Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads. *J. Cell Biol.*, 72(2): 394-400, 1978
- LIS, H.; SELA, B.A.; SACHS, L. Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 211: 582-585, 1970
- LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.*, 42: 541-574, 1973
- MAGRO, A.M. Involvement of IgE in con A-induced histamine release from human basophils *in vitro*. *Nature*, 249: 572-573, 1974
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 35(Suppl 11): 7-133, 1957

- MARONE, G.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L.M. Effects of arachidonic acid and its metabolites on antigen-induced histamine release from human basophils in vitro. *J. Immunol.*, 123(4): 1669-1677, 1979
- MARONE, G.; HAMMARSTROM, S.; LICHTENSTEIN, L.M. An inhibitor of lipoxygenase inhibits histamine release from human basophils. *Clin. Immunol. and Immunopathol.*, 17: 117-122, 1980
- MARTIN, T.W.; LAGUNOFF, D. Interaction of phosphatidylserine with mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75(10): 4997-5000, 1978
- MARTIN, T.W.; LAGUNOFF, D. Rat mast cell phospholipase A₂ activity toward exogenous phosphatidylserine and inhibition by N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidylserine. *Biochemistry (Washington)*, 21: 1254-1260, 1982
- MC GIVNEY, A.; MORITA, Y.; CREWS, F.T.; HIRATA, F.; AXELROD, J.; SIRAGANIAN, R.P. Phospholipase activation in the IgE-mediated and Ca²⁺ ionophore A 23187-induced release of histamine from rat basophilic leukemia cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 212(2): 572-580, 1981
- METZ, S.; LITTLE, S.; FUJIMOTO, W.; ROBERTSON, R.P. Lipoxygenase inhibitors reduce cyclic AMP (cAMP) and insulin release in cultured islet cells. *Clin. Res.*, 30(1): 63a, 1982

- METZ, S.; VANROLLIS, M.; STRIFE, R.; FUJIMOTO, W.; ROBERTSON, R. P. Lipoxygenase pathway in islet endocrine cells. *J. Clin. Invest.*, 71: 1191-1205, 1983
- METZ, S.; MURPHY, R. C.; FUJIMOTO, W. Effects on glucose-induced insulin secretion of lipoxygenase-derived metabolites of arachidonic acid. *Diabetes*, 33: 119-124, 1984
- MICHELL, R.H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta*, 415(1): 81-147, 1975
- MONGAR, J.L.; SCHILD, H.O. Effect of temperature on the anaphylactic reaction. *J. Physiol. (Lond.)*, 135: 320-338, 1957
- MONGAR, J.L.; SCHILD, H.O. The effect of calcium and pH on the anaphylactic reaction. *J. Physiol. (Lond.)*, 140: 272-284, 1958
- NACCACHE, P.H.; MOLSKI, T.F.P.; BECKER, E.L.; BORGEAT, P.; PICARD, S.; VALLERAND, P.; SHA'AFI, R.I. Specificity of the effect of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on calcium homeostasis in neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 257(15): 8608-8611, 1982
- NICOLSON, G.L. Ultrastructural analysis of toxin binding and entry into mammalian cells. *Nature*, 251: 628-630, 1974
- NICOLSON, G.L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M.E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their

- quantitative interaction with a murine lymphoma. *Biochemistry (Washington)*, 13(1): 196-204, 1974
- OLSNES, S.; PIHL, A. Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Eur. J. Biochem.*, 35: 179-185, 1973a
- OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry (Washington)*, 12(16): 3121-3126, 1973b
- OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*, 249: 627-631, 1974a
- OLSNES, S.; SALTVEDT, E.; PIHL, A. Isolation and comparison of galactose-binding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. *J. Biol. Chem.*, 249(3): 803-810, 1974b
- PADAWER, J.; GORDON, A.S. Isolation of mast cells from other cellular elements of rat peritoneal fluid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 88(1): 29-31, 1955
- PATERSON, N.A.M.; WASSERMAN, S.I.; SAID, J.W.; AUSTEN, K.F. Release of chemical mediators from partially purified human lung mast cells. *J. Immunol.*, 117(4): 1356-1362, 1976
- PATON, W.D.M. Histamine release by compounds of simple chemical structure. *Pharmacol. Rev.*, 9: 269-328, 1957
- PEARCE, F.L.; ENNIS, M.; TRUNEH, A.; WHITE, J.R. Role of intra- and extracellular calcium in histamine release

- from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions*, 11(1/2): 51-54, 1981
- PETERS, S.P.; SIEGEL, M.I.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L.M. Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils. *Nature*, 292: 455-457, 1981
- PETERS, S.P.; KAGEY-SOBOTKA, A.; MacGLASHAN, D.W.Jr, LICHTENSTEIN, L.M. Effect of prostaglandin D₂ in modulating histamine release from human basophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228(2): 400-406, 1984
- PIRES-BARBOSA, R.; RIBEIRO-DeSILVA, G. Sex-related canatoxin-induced blood glucose alterations in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 1507-1513, 1989
- POISNER, A.M.; DOUGLAS, W.W. A possible mechanism of release of posterior pituitary hormones involving adenosine triphosphate and an adenosine triphosphatase in the neurosecretory granules. *Mol. Pharmacol.*, 4: 531, 1968
- REEKE, G.N.Jr.; BECKER, J.W.; CUNNINGHAM, B.A.; GUNTHER, G.R.; WANG, J.L.; EDELMAN, G.M. Relationships between the structure and activities of concanavalin A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 234: 369-382, 1974
- REFSNES, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. On the toxic proteins abrin and ricin. *J. Biol. Chem.*, 249(11): 3557-3562, 1974
- RIBEIRO-DeSILVA, G.; CARLINI, C.R.; PIRES-BARBOSA, R.; GUIMARÃES, J.A. Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean

- (Canavalia ensiformis) seeds. *Toxicon*, 24(8): 775-782, 1986
- RIBEIRO-DaSILVA, G.; PRADO, J.F. Hypoglycemia and lipoxigenase-dependent insulin secretion produced in rats by canatoxin. *Toxicon*, 27: 73-74, 1989
- RIBEIRO-DaSILVA, G.; COLLARES, C.B.; GRASSI, D.M.; PRADO, J.F.; ZAPPELLINI, A.; CARLINI, C.R. Alterations in rat carbohydrate metabolism induced by canatoxin as a probable consequence of primary hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 1405-1413, 1989a
- RIBEIRO-DaSILVA, G.; PIRES-BARBOSA, R.; CARLINI, C.R. Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 387-395, 1989b
- RIBEIRO-DaSILVA, G.; PIRES-BARBOSA, R.; PRADO, J.F.; CARLINI, C.R. Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 877-880, 1989c
- RILEY, J.F.; WEST, G.B. The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.*, 120(4): 528-537, 1953
- RILEY, J.F.; WEST, G.B. The occurrence of histamine in mast cells. In: ROCHA E SILVA, M. *Handbook of Exp. Pharmacol. Histamine. Its Chemistry, Metabolism and Physiological and Pharmacological Action*. XVIII/1, Berlin-Heidelberg, N.Y., Springer, 1966. pp. 116-178

- ROBINSON, I.C.A.F.; RUSSELL, J.T.; THORN, N.A. Calcium and stimulus secretion coupling in the neurohypophysis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 83: 36-49, 1976
- ROTHSCHILD, A.M. Histamine release by bee venom phospholipase A and mellitin in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 25: 59-66, 1965
- ROTHSCHILD, A.M. Histamine release by basic compounds. In: ROCHA E SILVA. *Handbook of Exp. Pharmacol. Histamine. Its Chemistry, Metabolism and Physiological and Pharmacological Action.* vol. XVIII/1, Berlin-Heidelberg, N.Y., Springer, 1966. pp. 386-430
- ROTHSCHILD, A.M. Mechanisms of histamine release by compound 48/80. *Br. J. Pharmacol.*, 38: 253-262, 1970
- RUBIN, R.P. The metabolic requirements for catecholamine release from the adrenal medulla. *J. Physiol. (Lond.)*, 202: 197-209, 1969
- RUBIN, R.P. The role of energy metabolism in calcium-evoked secretion from the adrenal medulla. *J. Physiol. (Lond.)*, 206, 181-192, 1970
- RUSSELL, J.T.; HANSEN, E.L.; THORN, N.A. Calcium and stimulus-secretion coupling in the neurohypophysis. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 77: 443-450, 1974
- SAMUELSSON, B.; FOLCO, G.; GRANSTROM, E.; KINDAHL, H.; MALMSTEN, C. Prostaglandins and thromboxanes: biochemical and physiological considerations. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, 4: 1-25, 1978a

- SAMUELSSON, B.; GOLDYNE, M.; GRANSTROM, E.; HAMBERG, M.; HAMMARSTROM, S.; MALMSTEN, C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu. Rev. Biochem.*, 47: 997-1029, 1978b
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, 177(4053): 949-959, 1972
- SHORES, A.J.; MONGAR, J.L. Modulation of histamine secretion from concanavalin A-activated rat mast cells by phosphatidylserine, calcium, cAMP, pH and metabolic inhibitors. *Agents Actions*, 10: 131-137, 1980
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. Rio de Janeiro, McGraw-Hill do Brasil-LTDA, 1979. pp. 302-305
- SIRAGANIAN, P.A.; SIRAGANIAN, R.P. Basophil activation by concanavalin A: characteristics of the reaction. *J. Immunol.*, 112(6): 2117-2125, 1974
- SIRAGANIAN, R.P.; SIRAGANIAN, P.A. Mechanism of action of concanavalin A on human basophils. *J. Immunol.*, 114(2): 886-893, 1975
- SIRAGANIAN, R.P. Histamine secretion from mast cells and basophils. *TIPS*, 432-437, 1983
- SLORACH, S.A.; UVNAS, B. Amine formation by rat mast cells "in vitro". *Acta Physiol. Scand.*, 73(4): 457-470, 1968
- SULLIVAN, T.J.; PARKER, K.L.; EISEN, S.A.; PARKER, C.W. Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. II. Studies on the relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and histamine release. *J. Immunol.*, 114(5): 1480-1485, 1975a

- SULLIVAN, T.J.; GREENE, W.C.; PARKER, C.W. Concanavalin A-induced histamine release from normal rat mast cells. *J. Immunol.*, 115(1): 278-282, 1975b
- SULLIVAN, T.J.; PARKER, C.W. Pharmacologic modulation of inflammatory mediator release by rat mast cells. *Am. J. Pathol.*, 85(2): 437-463, 1976
- SULLIVAN, T.J.; PARKER, C.W. Possible role of arachidonic acid and its metabolites in mediator release from rat mast cells. *J. Immunol.*, 122(2): 431-436, 1979
- SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.*, 32(2): 227-237, 1936
- TAKAHASHI, T.; FUNATSU, G.; FUNATSU, M. Biochemical studies on castor bean hemagglutinin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 52(1): 50-53, 1962
- TAPPEL, A.L.; LUNDBERG, W.O.; BOYER, P.D. Effect of temperature and antioxidants upon the lipoxidase-catalyzed oxidation of sodium linoleate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 42: 293-304, 1953
- URATA, C.; SIRAGANIAN, R.P. Pharmacologic modulation of the IgE or Ca^{+R} ionophore A 23187 mediated Ca^{+R} influx, phospholipase activation, and histamine release in rat basophilic leukemia cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 78: 92-100, 1985
- VLASKOVSKA, M.; KNEPEL, W. Beta-endorphin and adrenocorticotropin release from rat adenohypophysis in vitro: evidence for local modulation by arachidonic

- acid metabolites of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathway. *Neuroendocrinology*, 32: 334-342, 1984
- WALSH, C.E.; WAITE, B.M.; THOMAS, M.J.; DeCHATELET, L.R. Release and metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 256(14): 7228-7234, 1981
- WEI, C.H.; KOH, C.; PFUDERER, P.; EINSTEIN, J.R. Purification, properties, and crystallographic data for a principal nontoxic lectin from seeds of *Abrus precatorius*. *J. Biol. Chem.*, 250(12): 4790-4795, 1975
- WEST, G.B. Histamine release from isolated and intact mast cells of rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 66: 225-228, 1981
- WEST, G.B. Thoughts on mast cells, histamine release and immunoglobulin E. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 78: 221-223, 1985
- WHITE, J.R.; PEARCE, F.L. Effect of anti-allergic compounds on anaphylactic histamine secretion from rat peritoneal mast cells in the presence and absence of exogeneous calcium. *Immunology*, 46: 361-367, 1982a
- WHITE, J.R.; PEARCE, F.L. Characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells sensitized to the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology*, 46: 353-359, 1982b
- WILLIAMSON, J.R.; LACY, P.E.; GRISHAM, J.W. Ultrastructural changes in islets of the rat produced by tolbutamide. *Diabetes*, 10: 460, 1961

- YAMADA, K.; OKANO, Y.; MIURA, K.; NOZAWA, Y. Arachidonic acid release in BW 755C-pretreated rat peritoneal mast cells stimulated with A 23187, concanavalin A and compound 48/80. *Biochem. Biophys. Acta*, 917: 290-295, 1987
- YAMAMOTO, S.; ISHII, M.; NAKADATE, T.; NAKAKI, T.; KATO, R. Modulation of insulin secretion by lipoxygenase products of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, 258(20): 12149-12152, 1983
- YAMAMOTO, S.; NAKADATE, T.; UZUMAKI, H.; KATO, R. Lipoxygenase inhibitors and cyclic AMP-mediated insulin secretion caused by forskolin, theophylline and dibutyryl cyclic AMP. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233(1): 176-180, 1985

AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS FORAM ORGANIZADAS DE
ACORDO COM A ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT)
- NBR 6023, AGOSTO, 1989.