

Cléria Maria Moreno Giraldele

**ENVOLVIMENTO DO FATOR DE RELAXAMENTO DERIVADO DO
ENDOTÉLIO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA**

**Tese Apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do
Título de Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Gilberto de Nucci

Campinas

1993

G441e

20580/BC

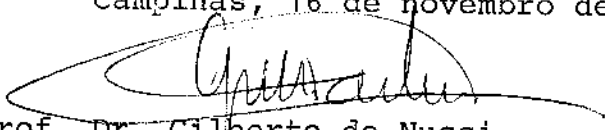
**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável (...) para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

Albert Einstein

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Bioquímica Cléria Maria Moreno Giraldelo.

Campinas, 16 de novembro de 1993



Prof. Dr. Gilberto de Nucci
-Orientador-

*A minha família
pelo estímulo e otimismo*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, orientador deste trabalho, pela oportunidade e apoio de mestre e amigo.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela contribuição fundamental e pelo exemplo de amor ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pela valiosa ajuda com rádio-imunoensaio.

Ao Airton Fernando de Paula por todo o trabalho técnico prestado.

Ao Marcelo Nicolás Muscará pela ajuda com fluorimetria e pelas importantes discussões.

À Dora Maria Grassi Kassisse pelo constante apoio e pelas agradáveis discussões.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia pela contribuição, carinho, companheirismo e amizade.

Aos Profs. Drs. Glória E. Petto de Souza, Paulina Sannomiya, Fernando C. Cunha e Carlos Alberto Flores pelas correções, sugestões e discussão desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro concedido.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	6
LISTA DE MATERIAIS	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	9
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	23
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ABSTRACT	66

LISTA DE ABREVIACOES

A23187	ionóforo de cálcio
BK	bradicinina
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Composto 48/80	agente liberador de histamina
EDRF	fator relaxante derivado do endotélio
GMPc	monofosfato de guanosina cálcico
5-HT	serotonina
L-AEE	L-arginina etil ster
L-AME	L-arginina metil ster
L-NAME	L-nitro-arginina metil ster
L-NMMA	NG-monometil L-arginina
NO	xido nítrico
OPT	orto-ftaldialdedo
PAF	fator ativador de plaquetas
POPOP	1,4-di(2-(4-metil-5-feniloxazolil))-benzeno
PPO	2,5-difeniloxazolona
RIA	radio-imunoensaio
WEB 2086	inibidor de PAF

LISTA DE MATERIAIS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Acido clorídrico	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Azul de Trypan	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Bradicinina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Cloreto de cálcio di-hidratado	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Cloreto de potássio	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Cloreto de sódio	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Composto 48/80	Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, EUA)
Éter	Reagen Quimibrás Ind. Quim. S.A., RJ
Fosfato de sódio dibásico	Reagen Quimibrás Ind. Quím. .A., RJ
Fosfato de sódio monobásico	Reagen Quimibrás Ind. Quim. S.A., RJ
Glicose	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Hidróxido de sódio	Aldrich Indústrias Químicas Ltda, Campinas
Histamina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
kit para RIA de histamina	Biomerica (EUA)
L-AEE	Sigma Chemical Co. (ST. Louis, MO, EUA)
L-AME	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
L-arginina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
L-NAME	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Mepiramina	Sigma Chemical Co. (ST. Louis, MO, EUA)
Metisergida	Sandoz Ltda (Suíça)
OPT	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Percol	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
POPOP	Koch-light Laboratories Ltd, England
PPO	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Serotonina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

Sulfato de magnésio 7H ₂ O	Merk S.A., Rio de Janeiro, RJ
Tolueno	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)
Triton X-100	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA)

Composição da solução tampão Krebs-Ringer em mM: NaCl, 154; KCl, 6.2; CaCl₂.2H₂O, 2.8; MgSO₄.7H₂O, 1.5; glicose, 5.0 e tampão fosfato pH 7.4, 0.01M.

Composição do coquetel de cintilação: POPOP, 0.04 g; PPO 4.0 g; Triton X-100, 333.0 ml; Tolueno, q.s.p. 1000 ml.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** - Efeito da administração subplantar de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina 34
- Figura 2** - Efeito da administração endovenosa de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina 35
- Figura 3** - Efeito da administração subplantar de D-nitro arginina metil éster (D-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina 36
- Figura 4** - Efeito da administração subplantar de L-arginina no edema de pata induzido por bradicinina 37
- Figura 5** - Efeito da administração subplantar de D-arginina no edema de pata induzido por bradicinina 38
- Figura 6** - Efeito da administração subplantar de L-arginina metil éster (L-AME) e L-arginina etil éster (L-AEE) no edema de pata induzido por bradicinina 39
- Figura 7** - Efeito da administração subplantar de L-glicina, L-leucina e ácido L-aspártico no edema de pata induzido por bradicinina 40
- Figura 8** - Envolvimento da histamina e serotonina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina 41

- Figura 9** - Envolvimento da histamina e serotonina no aumento produzido por L-arginina e L-arginina metil éster (L-AME) no edema de pata induzido por bradicinina 42
- Figura 10** - Envolvimento da histamina e serotonina (através da depleção crônica de seus estoques) no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina 43
- Figura 11** - Efeito da administração subplantar de L-arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por serotonina 44
- Figura 12** - Efeito da administração subplantar de L-arginina no edema de pata induzido por serotonina 45
- Figura 13** - Efeito da administração subplantar de L-arginina metil éster (L-AME) e L-arginina etil éster (L-AEE) no edema de pata induzido por serotonina 46
- Figura 14** - Efeito da administração subplantar de L-glicina, L-leucina e ácido L-aspártico no edema de pata induzido por serotonina 47
- Figura 15** - Interferência da L-arginina na dosagem de histamina por fluorimetria 48
- Figura 16** - Interferência do L-nitro arginina metil éster (L-NAME) na dosagem de histamina por fluorimetria 49

Tabela I - Efeito do WEB 2086 e da indometacina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. 50

Tabela II - Efeito do WEB 2086 e da indometacina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por serotonina. 51

RESUMO

Neste trabalho investigamos os efeitos de D-, L-nitro arginina metil éster (L-NAME), D-, L-arginina, L-arginina metil éster (L-AME) e L-arginina etil éster (L-AEE) em edema de pata em rato; descrevemos também os efeitos de L-arginina, L-NAME e N^G-monometil L-arginina (L-NMMA) em mastócitos isolados do peritônio de rato.

L-NAME (0.15 µmol/pata) reduziu significativamente o edema de pata induzido por BK e 5-HT. L-arginina, D-arginina e D-NAME, nestas mesmas doses, não interferiram na resposta edematogênica induzida por BK e 5-HT. Em contraste, L- e D-arginina, L- e D-NAME, L-AME e L-AEE, na dose de 15 µmol/pata, aumentaram significativamente o edema de pata induzido por BK e 5-HT.

O pré-tratamento dos animais com uma mistura de mepiramina (antagonista H₁) e metisergida (antagonista de 5-HT) aboliu o aumento produzido pelo L-NAME, L-arginina e L-AME no edema de pata induzido por BK. Resultado semelhante foi observado em animais que tiveram seus estoques de histamina e serotonina cronicamente depletados. A indometacina (inibidor da ciclooxigenase) e WEB 2086 (antagonista de PAF) não tiveram efeito no aumento produzido por L-NAME no edema de pata induzido por BK e 5-HT.

L-NAME e L-arginina interferiram na detecção de histamina por fluorimetria. L-arginina, L-NMMA e L-NAME, em concentração de 300 µM, não afetaram significativamente a liberação de histamina *in vitro* induzida por composto 48/80, quando medida através de radio-imunoensaio. L-arginina, L-NMMA e

L-NAME induziram liberação de histamina em 40% dos experimentos apenas e esta liberação foi significativamente menor (<10%) quando comparada com à liberação de histamina induzida por composto 48/80 (>40%).

Estes resultados indicam que a inibição observada com doses baixas de L-NAME é devido a inibição da síntese de NO. O aumento observado com doses altas de todos os análogos de arginina estudados é devido à degranulação de mastócitos *in vivo*. Contudo, este fenômeno provavelmente se deve à carga catiônica que estas substâncias apresentam, independente da via L-arginina-NO.

INTRODUÇÃO:

A resposta inflamatória aguda pode ser definida como uma reação de defesa do organismo frente a um estímulo nocivo. Os fenômenos envolvidos neste processo compreendem lesões celulares e teciduais, distúrbios circulatórios, exsudação e fenômenos proliferativos reparadores.

Como descrito por Celsus (30 a. C. - 38 d. C.), a inflamação aguda caracteriza-se pelos sinais de: calor e rubor (hiperemia ativa, em que há maior afluxo de sangue arterial), tumor (formado pelo exsudato que infiltra os tecidos), dor (por estimulação de nociceptores, compressão das terminações nervosas pelo exsudato ou por lesão destas estruturas).

Respondendo a um estímulo inicial, o processo inflamatório envolve uma interação complexa entre células do sangue, vasos sanguíneos e células do tecido que sofreu a agressão, levando a modificações locais no calibre vascular e no fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular com conseqüente formação de exsudato, infiltração de leucócitos para a área afetada. Estes fenômenos são modulados através da ativação ou liberação dos mediadores da inflamação de origem celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, proteínas catiônicas, proteases ácidas e proteases neutras) ou plasmática (cininas, frações do sistema complemento, fatores do sistema de coagulação).

A microvasculatura é o segmento do sistema vascular que caracteristicamente responde aos estímulos nocivos, levando a modificações morfológicas e funcionais. A microcirculação conecta a vasculatura arterial e venosa. As pequenas artérias dividem-se em minúsculas ramificações, as arteríolas, que originam uma fina rede de capilares de onde o sangue é drenado para vênulas emergentes. As anastomoses arteriovenosas permitem a passagem de sangue das arteríolas diretamente para as vênulas. A

microcirculação está sob constantes influências regulatórias de vários tipos tais como nervosa, humoral e química e sofre alterações através de modificações locais na concentração dos gases, pH e gradientes osmóticos produzidos pelos níveis de hormônios circulantes e pela ação de inúmeras substâncias vasoativas (Faria, 1988; Garcia-Leme, 1989).

As células endoteliais constituem um revestimento multifuncional em todo o sistema circulatório e são separadas entre si por junções intercelulares de dois tipos básicos: junções ocludentes (tight) e junções comunicantes (gap). Em resposta a determinados estímulos, o endotélio vascular da área lesada torna-se menos restritivo que o normal à passagem de constituintes do plasma para o tecido. Assim, as células endoteliais podem aparecer menos alongadas, com núcleos compactos, tornando visíveis os "gaps" intercelulares. O fenômeno é particularmente importante para o aumento de permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares observado durante o desenvolvimento da reação inflamatória (Garcia-Leme, 1989).

As células endoteliais dispostas em uma monocamada envolvem o sangue continuamente e têm sido associadas à manutenção da fluidez do mesmo, sintetizando muitas substâncias ativas, tais como: sulfato de heparan, interleucina I, fator ativador de plasminogênio tecidual, vários fatores de crescimento influenciando a angiogênese, prostaciclina, fator ativador de plaquetas (PAF), fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) e várias substâncias vasoconstritoras como endotelinas (Just, 1991). Estas substâncias produzidas pelas células endoteliais interagem com plaquetas ou leucócitos da corrente sanguínea e, nos tecidos adjacentes, interagem com células da musculatura lisa ou mastócitos. Mensageiros intracelulares como adenosina monofosfato cíclico, guanosina monofosfato

cíclico e/ou cálcio modulam as ações destas substâncias produzidas pelas células endoteliais (Just, 1991). As células endoteliais são responsáveis, ainda, pela síntese de componentes do tecido conjuntivo (laminina, fibronectina), ligação de lipase à lipoproteína e metabolismo de lipoproteínas, conversão de angiotensina I a angiotensina II, inativação de catecolaminas e serotonina por monoamina oxidase (MAO) e catecol-o-metil transferase (COMT; Vanhoutte and Eber, 1991).

Injeções intradérmicas de mediadores da inflamação como histamina, bradicinina (Spector and Willoughby, 1968), fator ativador de plaquetas (PAF; Morley *et al*, 1983; McGiven and Basran, 1984; Hwang *et al*, 1985), taquicininas (Chahl, 1977; Lembeck and Holzer, 1979; Gamse and Saria, 1985; Brain and Williams, 1989), leucotrienos B₄, C₄ e D₄ (Peck *et al*, 1981; Bray *et al*, 1981) em pele de animais aumentam a permeabilidade vascular. O aumento da permeabilidade vascular é potenciado quando estes mediadores são co-injetados com vasodilatadores incluindo as prostaglandinas E₁, E₂, prostaciclina (Williams and Morley, 1973; Williams and Peck, 1977; Chahl, 1977; Williams, 1979), ácido araquidônico (Williams and Peck, 1977), o neuropeptídeo CGRP (Brain *et al*, 1985; Brain and Williams, 1989) e o polipeptídeo intestinal vasoativo (Williams, 1982). É possível que a potenciação no edema causada pela co-injeção destes vasodilatadores esteja relacionada, principalmente, com sua ação dilatadora nas arteríolas locais levando a um aumento do fluxo sanguíneo com consequente aumento na quantidade de proteínas extravasadas.

O EDRF foi descrito pela primeira vez em 1980 por Furchgott e Zawadzki que, trabalhando com segmentos ou anéis de musculatura lisa arterial de coelho, sobre os quais a acetilcolina produzia relaxamento, sugeriu que este efeito ocorria de forma indireta, através da liberação de

uma substância das células endoteliais, uma vez que a remoção do endotélio previnía o relaxamento induzido por acetilcolina. Isto sugeria que a ativação dos receptores muscarínicos das células endoteliais induzia a geração de uma substância lábil capaz de se difundir facilmente para o músculo liso vascular adjacente causando vasodilatação. Esta substância foi denominada de EDRF (endothelium-derived relaxing factor).

Atualmente, o EDRF tem sido definido como sendo o próprio óxido nítrico (NO; Palmer *et al*, 1987; Ignarro *et al*, 1987) e é originado do grupo terminal guanidino do amino ácido L-arginina, através da N-oxidação por radicais de oxigênio, produzidos na ativação de fosfolipases (Hibbs *et al*, 1987; Palmer *et al*, 1988a,b) ou de um composto intermediário (composto orgânico nitroso, nitrito ou amônia) gerado no metabolismo deste terminal (Ignarro, 1989). A síntese do NO ocorre de modo específico e foi estudado pela primeira vez por Palmer *et al* (1988 a,b) trabalhando com uma cultura de células endoteliais de aorta de suínos como doadora de NO e uma tira espiral de aorta de coelho como receptor do efluente. Foi demonstrado que a estimulação das células endoteliais com o ionóforo de cálcio A23187 libera NO, que é originado a partir de L-arginina, mas não D-arginina e que esta liberação é aumentada pela administração de L-arginina e L-citrulina, mas não por D-arginina. A partir destes trabalhos, muitos outros foram feitos sugerindo a especificidade na formação do NO, através da ação da enzima NO-sintase levando à formação do NO, que é uma molécula endógena responsável pela estimulação da enzima guanil ciclase solúvel em vários tecidos como, cérebro, glândula adrenal, plaquetas. No entanto, o NO liberado pela ativação de macrófagos é um fator citotóxico (Moncada, 1992). Estas duas diversidades biológicas, comunicação intercelular e citotoxicidade, diferem pela quantidade de NO liberada, o que leva a duas

classes diferentes de NO sintase: uma é constitutiva, citosólica, dependente de Ca^{2+} e calmodulina e libera picomoles de NO em resposta à estimulação; está presente no endotélio (Palmer *et al*, 1987; Palmer and Moncada, 1989), cérebro (Bredt *et al*, 1990) e plaquetas (Radomski *et al*, 1990). O outro tipo de NO sintase é induzível, citosólica, independente de Ca^{2+} , sensível a estímulo imunológico e libera nanomoles de NO por longos períodos; sua indução é inibida por glicocorticóides e está presente em macrófagos ativados (Hibbs *et al*, 1987; Marletta *et al*, 1988). Um terceiro tipo de NO sintase tem sido descrita e é dependente de Ca^{2+} mas não de calmodulina, presente em neutrófilos polimorfonucleares (Hiki *et al*, 1991).

O envolvimento do NO na resposta inflamatória, aguda ou crônica, não está totalmente esclarecido. No entanto, existem algumas evidências de como o NO poderia modular a inflamação aguda, através dos seguintes mecanismos:

1. Controle do fluxo arterial: o NO é liberado pelas células endoteliais e atingem a musculatura lisa vascular por difusão ou através dos canais comunicantes entre as células endoteliais, relaxando-a (Vanhoutte and Eber, 1991). O NO produz relaxamento da microvasculatura do músculo tenuíssimo de coelho *in vivo* (Persson *et al*, 1990), da microvasculatura do mesentério exteriorizado de rato (Fortes *et al*, 1990), anéis de artéria omental de humanos (Vila *et al*, 1991), de microvasculatura da pele de rato (Ralevic *et al*, 1992). O NO produz, ainda, inibição da adesão e agregação plaquetária *in vitro* (Furlong *et al*, 1987; Radomski *et al*, 1987; Sneddon and Vane, 1988) e agregação plaquetária *in vivo* (May *et al*, 1991). Estes efeitos ocorrem através da estimulação da enzima guanil ciclase solúvel, levando a um acúmulo de GMPc nos tecidos (Rapoport and Murad, 1983; Ignarro, 1989; Salvemini *et al*, 1990; Salvemini *et al*, 1991). Autacóides liberados

localmente em uma reação inflamatória e que produzem vasodilatação local, como histamina (Toda *et al*, 1984), serotonina (Cocks and Angus, 1983), bradicinina (Cherry *et al*, 1982), substância P (Zawadzki *et al*, 1981), policátions (Thomas *et al*, 1989; Ignarro *et al*, 1989; Antunes *et al*, 1990) induzem a liberação de NO.

2. Controle da permeabilidade vascular: a atuação do NO diretamente neste controle não está totalmente esclarecida, mas alguns mediadores da inflamação que induzem a liberação de NO, quando injetados intradermicamente em pele de animais aumentam a permeabilidade vascular, tais como, histamina, bradicinina (Spector and Willoughby, 1968), fator ativador de plaquetas (PAF; Moeley *et al*, 1983; McGiven and Basran, 1984; Hwang *et al*, 1985), substância P (Hughes *et al*, 1990). Recentemente tem sido sugerido que o NO modula a permeabilidade vascular em bochecha de hamster em resposta a adenosina 5-difosfato e bradicinina (Mayhan, 1992).

3. Migração celular: leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares produzem NO (Rimele *et al*, 1988; Salvemini *et al*, 1989) e o próprio NO inibe a ativação de leucócitos *in vivo* e *in vitro*, podendo estar envolvido no fenômeno de adesão, dependendo da dose utilizada (Moncada, 1992). Leucócitos PMN e mononucleares circulam no sangue periférico e parte deles margeia a parede vascular. Sob certas condições, como em um processo infeccioso, substâncias são liberadas de células hospedeiras e difundidas através dos tecidos formam um gradiente que orienta a migração de PMN (quimiotaxia) para próximo da área lesada, podendo ocorrer a fagocitose de substâncias ou células responsáveis pelo desencadeamento da resposta (van der Valk and Herman, 1987). O monócito também é uma célula circulante com muitas funções, dentre elas, a sua diferenciação nos tecidos, transformando-se em histiócito, célula de Kupffer, macrófago

alveolar e peritoneal e outras. Os monócitos são responsáveis pela defesa não específica do organismo, com característica de quimiotaxia e fagocitose semelhantes às dos PMN (van der Valk and Herman, 1987). Os neutrófilos produzem NO, o que parece estar relacionado com a citotoxicidade destas células (Moncada, 1992).

4. Células residentes: NO é produzido por mastócitos (Salvemini *et al*, 1990) que estão presentes em inúmeros tecidos como: pele, pulmão, intestino e, quando ativados, liberam mediadores químicos pré-formados, dentre eles, histamina, heparina, serotonina e radicais livres que podem agir como mensageiros em muitos processos fisiológicos e patológicos como em uma reação inflamatória aguda. O NO tem importante papel no controle da reatividade destas células, através da estimulação da guanil ciclase solúvel que modula a liberação de histamina por estas células (Salvemini *et al*, 1991). O NO é produzido por macrófagos (Marletta *et al*, 1988) a partir da L-arginina. É um intermediário dos produtos finais NO_2^- e NO_3^- , os quais possuem atividade citotóxica (Moncada, 1992).

5. Transmissão neuronal: utilizando anticorpos marcados contra NO sintase purificada de cerebelo, a localização desta enzima foi mapeada imunohistoquimicamente no cérebro, a qual foi encontrada em inervação neuronal da parte posterior da glândula pituitária, em fibras do nervo autônomo na retina, em fibras nervosas do plexo mesentérico do intestino, medula adrenal (Bredt *et al*, 1990). Além disso, alguns neuropeptídeos como substância P e CGRP, que são liberados de terminações nervosas periféricas por vários estímulos, são potentes vasodilatadores, contribuindo para a instalação de uma inflamação neurogênica (Payan, 1989). A substância P, que é liberada de fibras C de terminais nervosos, é um potente mediador da formação de edema em pele de rato (Brain and Williams, 1989) através da

ativação de mastócitos ou agindo diretamente nas células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular (Hughes *et al*, 1990). O NO parece estar envolvido na modulação da resposta inflamatória induzida por substância P (Hughes *et al*, 1990) mas não modula a ação do CGRP (Ralevic *et al*, 1992).

Alguns análogos da L-arginina são descritos como inibidores da síntese de EDRF. O N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), mas não o seu enantiômero D-NMMA, inibe a liberação de EDRF em macrófagos (Marletta *et al*, 1988), em fibroblastos de pulmão de rato (Ishii *et al*, 1990), em mastócitos (Salvemini *et al*, 1991), em músculo circular do íleo humano (Maggi *et al*, 1991), em aorta de suíno (Palmer *et al*, 1988b), em aorta de coelho (Rees *et al*, 1989), em microcirculação de mesentério exteriorizado de rato (Fortes *et al*, 1990). Esta inibição é revertida pela L-arginina mas não pela D-arginina (Rees *et al*, 1989; Salvemini *et al*, 1991; Maggi *et al*, 1991, Fortes *et al*, 1990).

Outros análogos da L-arginina também têm sido descritos como inibidores da síntese de EDRF, como a L-nitro arginina (Ishii *et al*, 1990; Maggi *et al*, 1991), nitro arginina metil éster (Moore *et al*, 1990; van Gelderen *et al*, 1991), N^W-nitro arginina benzil éster (inibição irreversível; Thomas and Ramwell, 1991) e N^G-amino-L-arginina (Fukuto *et al*, 1990).

Em 1990, Antunes e colaboradores, demonstraram que o L-NMMA reduz de forma significativa o edema de pata induzido por poli-L-arginina em rato. O análogo estável da prostaciclina, iloprost, reverte parcialmente o efeito inibitório do L-NMMA, sugerindo que este inibidor exerce seus efeitos por redução de fluxo sanguíneo, não alterando a permeabilidade vascular.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o envolvimento do EDRF, através da utilização de inibidores quimicamente derivados da arginina; e avaliar os

efeitos da arginina e de alguns de seus análogos na resposta inflamatória aguda, mensurada através da resposta edematogênica induzida por BK e 5-HT em edema de pata em rato e por ativação de mastócitos isolados do peritônio de rato *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Procedência dos animais

Foram utilizados ratos machos Wistar procedentes do Biotério Central da UNICAMP.

2.2. Edema de pata

Ratos machos Wistar (130-200 g, mantidos com água e comida *ad libitum*) foram anestesiados superficialmente com éter e submetidos a uma injeção sub-plantar de 0.1 ml do agente edematogênico (dissolvido em solução fisiológica) na pata traseira esquerda do animal. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidroplestimômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

Os agentes edematogênicos utilizados foram a BK e a 5-HT nas doses de 50 nmol/pata e 17 nmol/pata, respectivamente. Estas doses foram previamente selecionadas a partir de curvas dose-efeito desses agentes, de forma que fosse possível modular (inibir ou aumentar) o edema formado nos diferentes tratamentos utilizados.

As respostas inflamatórias foram expressas como aumento do volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão das médias. Em alguns casos, os resultados foram apresentados como área (Área; ml.min), calculada a partir da curva de edema em função do tempo, utilizando-se o método trapezoidal. Eventualmente, os resultados foram expressos como % de variação

(aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com animais controle, os quais receberam apenas solução fisiológica.

2.3. Esgotamento crônico dos estoques de histamina e 5-HT

O esgotamento crônico dos estoques de histamina e 5-HT dos animais foi feito por injeções repetidas do composto 48/80. O composto 48/80 (0.1% p/v, dissolvido em solução fisiológica) foi administrado intraperitonealmente nos animais, de manhã e à tarde, perfazendo um total de 8 doses, começando com a dose da tarde. Nas primeiras 6 injeções, a dose utilizada foi de 0.6 mg/Kg e nas duas últimas, 1.2 mg/Kg. Os experimentos foram realizados 5 a 6 horas após a última injeção do composto 48/80 (Di Rosa *et al*, 1971).

O esgotamento crônico foi considerado eficiente visto que o edema subplantar induzido por composto 48/80 (10 µg/pata) foi reduzido significativamente ($76.0 \pm 5.3\%$, $n = 10$).

2.4. Obtenção do lavado peritoneal

Ratos machos (180-300 g) foram anestesiados profundamente com éter e, a seguir, foram exanguinados por secção ampla dos vasos cervicais, colocados em decúbito dorsal e injetados intraperitonealmente com 10 ml de tampão Krebs-Ringer. O abdômen foi massageado por cerca de 90 segundos; em seguida, foi aberto longitudinalmente e o lavado retirado. A suspensão de células foi centrifugada a 300g por 10 minutos (centrífuga Hermle Z 360K), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em solução tampão Krebs-Ringer (método de Uvnas and Thon, 1959, modificado por Moran et al, 1962). O número de mastócitos presentes nesta suspensão de células peritoneais foi determinado através de esfregaço em

lâminas de vidro, coradas com solução de azul de toluidina (0.1%). A contagem foi realizada através de microscopia óptica comum. A população de mastócitos encontrada foi de $11.2 \pm 0.8\%$ ($n = 12$).

2.5. Purificação dos mastócitos peritoneais

A suspensão de células, obtida como descrito anteriormente, foi centrifugada a 300g por 5 minutos à 4°C e ressuspendida em 0.75 ml de tampão Krebs-Ringer. A seguir, foram adicionados 3.5 ml de solução de Percol isotônico e deixado sedimentar por 10 min. Após a sedimentação, foi adicionado 0.5 ml de tampão Krebs-Ringer ao topo da solução e centrifugada a 125g por 15 min à 4°C. As fases superiores foram removidas com o auxílio de uma pipeta Pasteur. O precipitado (onde estão contidos os mastócitos em uma população de $86.0 \pm 6.9\%$, $n = 18$) foi lavado duas vezes com tampão Krebs-Ringer e centrifugado a 300g por 5 minutos à 4°C. O rendimento foi determinado em câmara de Neubauer numa diluição de 1:2 em solução 0.1% de azul de toluidina (Enerback and Svensson, 1980).

A viabilidade das células ($88.9 \pm 1.9\%$, $n = 10$) foi avaliada por exclusão com azul de Trypan 0.1%, numa diluição de 1:2 em câmara de Neubauer.

2.6. Incubação dos mastócitos peritoneais

Após purificação, a suspensão de mastócitos foi padronizada para uma concentração final de $1-2 \times 10^5$ células/ml. Cada tubo de polipropileno recebeu uma alíquota de 500 μ l desta suspensão de células e 300 μ l de solução tampão Krebs-Ringer. Os tubos foram colocados em banho-maria por 10 minutos à 37°C para estabilização. Para a pré-incubação (37°C por

1 hora) foram adicionados 100 µl de L-arginina (300 µM), L-NMMA (300 µM), L-NAME (300 µM) ou tampão Krebs-Ringer. A seguir, uma alíquota de 100 µl de composto 48/80 (0.5 ou 1.0 µg/ml) ou tampão Krebs-Ringer, foi adicionada para uma incubação de 10 min, perfazendo um volume final de 1 ml. Terminada a incubação, os tubos foram colocados em gelo para que a liberação de histamina fosse interrompida e, em seguida, foram centrifugados a 300g por 10 min. O sobrenadante (histamina liberada) e o precipitado (histamina mastocitária residual) foram separados e, a seguir, adicionado 0.2 ml de HCl 1N e 1 ml de HCl 0.1N, respectivamente. O sobrenadante e o resíduo foram levados à fervura por 10 minutos para rompimento de células. A concentração em cada tubo foi quantificada por RIA com duplo anticorpo ou fluorimetria.

Os resultados foram expressos como porcentagem de histamina liberada, calculada em função da quantidade de histamina no sobrenadante em relação à concentração total de histamina (sobrenadante + resíduo). Todos os valores foram corrigidos pela liberação espontânea de histamina ($16.9 \pm 3.2\%$, $n = 6$), a qual ocorreu na ausência de estímulo.

2.7. Dosagem de histamina por fluorimetria

Alíquotas de 2 ml de soluções de histamina, com concentrações crescentes de 0.005 a 0.5 µg/ml, foram transferidas para tubos de ensaio. A seguir, 0.4 ml de NaOH 1N foi adicionado em cada tubo, seguido por 0.1 ml de solução de OPT (1% em metanol). Após 4 minutos, 0.2 ml de HCl 3N foi adicionado, para estabilização do complexo histamina-OPT, agitando-se os tubos a cada nova adição. A solução foi transferida para uma cubeta e a fluorescência medida a 450 nm, resultado da ativação a 360 nm, em um espectrômetro de fluorescência Perkin-Elmer MPF-44B (Shore *et al*, 1959).

2.8. Dosagem de histamina por RIA

As alíquotas de solução de histamina com concentrações desconhecidas foram diluídas (1:100) e a estas amostras foram adicionados 100 μ l de histamina marcada (H^3) seguidos por 100 μ l de anticorpo para histamina. Os tubos foram agitados fortemente e incubados à temperatura ambiente por 30 min. Uma alíquota de 200 μ l do segundo anticorpo de histamina foi adicionada em cada amostra e os conteúdos dos tubos foram, então, ligeiramente misturados e incubados à 2-8°C por 30 min. Os tubos foram centrifugados a 4000g por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado diluído em 50 μ l de NaOH 0.5N, 0.5 ml de água destilada e 4.5 ml de coquetel de cintilação. A radioatividade foi contada em cada tubo durante 1 min utilizando um contador beta de cintilação. O mesmo procedimento foi feito com padrões de histamina nas concentrações de 1.5 a 100 ng/ml. As concentrações de histamina das amostras, procedentes da incubação com mastócitos, foram determinadas a partir da curva padrão de histamina.

2.9. Análise estatística

Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias. A análise estatística dos dados foi feita através do teste *t* de Student não pareado, considerando-se $p < 0.05$ como significante.

3. RESULTADOS

3.1. Edema de pata induzido por BK

3.1.1. Efeito do L- e D-NAME

O edema de pata induzido por BK foi dependente de tempo, com resposta máxima obtida em torno de 15-30 minutos (Figura 1). A co-administração subplantar de L-NAME nas doses de 0.15 e 1.5 $\mu\text{mol/pata}$ produziram inibição do edema (Figura 1), enquanto que na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$ produziu um aumento significativo. A área (ml.min) do grupo controle foi de 3.78 ± 0.20 ; do grupo que recebeu L-NAME 0.15 $\mu\text{mol/pata}$: 2.76 ± 0.41 , $p < 0.05$; L-NAME 1.5: 2.80 ± 0.30 , $p < 0.05$; L-NAME 15: 4.72 ± 0.31 , $p < 0.01$.

De maneira semelhante, a administração endovenosa deste composto produziu inibição ou aumento do edema, dependendo da dose utilizada (100 e 370 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivamente; Figura 2). A área (ml.min) do grupo controle foi de 1.28 ± 0.17 ; do grupo que recebeu L-NAME 100 $\mu\text{mol/Kg}$: 0.71 ± 0.11 , $p < 0.05$; L-NAME 370: 1.64 ± 0.14 , $p < 0.05$.

A co-administração do enantiômero inativo, D-NAME, na dose de 0.15 $\mu\text{mol/pata}$, não alterou a resposta edematogênica induzida por BK. No entanto, na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$ produziu aumento significativo do edema, semelhante à resposta do L-NAME (Figura 3). A área (ml.min) do grupo controle foi de 1.32 ± 0.13 ; do grupo que recebeu D-NAME 0.15 $\mu\text{mol/pata}$: 1.46 ± 0.15 ; D-NAME 15: 1.85 ± 0.14 , $p < 0.01$.

3.1.2. Efeito da L- e D-arginina

A co-administração de L-arginina produziu aumento significativo no edema de pata induzido por BK nas doses de 0.15, 1.5 e 15 $\mu\text{mol/pata}$ (Figura 4).

A co-administração de D-arginina, enantiômero inativo, não alterou o edema induzido por BK nas doses de 0.15 e 1.5 $\mu\text{mol/pata}$; no entanto, na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$ produziu aumento significativo do edema (Figura 5).

3.1.3. Efeito de alguns derivados da arginina e aminoácidos

A L-AME (15 $\mu\text{mol/pata}$) e a L-AEE (15 $\mu\text{mol/pata}$) produziram aumento significativo do edema (Figura 6). No entanto, o ácido L-aspártico (molécula polar carregada negativamente), L-glicina (molécula polar sem carga) e L-leucina (molécula apolar), na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$, não modificaram significativamente o edema induzido por BK (Figura 7).

3.1.4. Envolvimento da histamina e serotonina no aumento produzido por L-NAME, L-AME e L-arginina

O aumento produzido pelo L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$) no edema induzido por BK foi abolido em animais tratados com uma mistura de mepiramina (6 mg/Kg) e metisergida (6 mg/Kg), administrada intraperitonealmente, 30 min antes da indução do edema (Figura 8). Resultados semelhantes foram obtidos no aumento produzido por L-arginina (15 $\mu\text{mol/pata}$) e L-AME (15 $\mu\text{mol/pata}$; Figura 9).

O esgotamento crônico dos estoques de histamina e serotonina dos animais, utilizando o composto 48/80, também aboliu o aumento produzido por L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$) no edema induzido por BK (Figura 10).

3.1.5. Efeito da indometacina e do WEB 2086

O pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores de PAF (fator ativador de plaquetas), o WEB 2086 (20 mg/Kg, via oral, 30 minutos antes), não modificou significativamente o aumento produzido por L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$) no edema de pata induzido por BK (Tabela I). Da mesma maneira, o inibidor de ciclooxigenase, a indometacina (10 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes), não modificou significativamente o aumento produzido pelo L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$) neste edema (Tabela I).

3.2. Edema de pata induzido por 5-HT

3.2.1. Efeito do L-NAME

A 5-HT injetada subplantarmente na pata do rato induziu a formação de um edema dependente de tempo, com pico aos 15-30 minutos (Figura 11). A co-injeção de L-NAME, na dose de 0.15 $\mu\text{mol/pata}$, produziu discreta inibição do edema. Na dose de 1.5 $\mu\text{mol/pata}$, o L-NAME não alterou o edema; no entanto, produziu aumento significativo quando administrado na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$ (Figura 11).

3.2.2. Efeito da L-arginina

A L-arginina e a D-arginina não modificaram o edema induzido por 5-HT quando administradas na dose de 0.15 $\mu\text{mol/pata}$. Doses maiores destes compostos (1.5 e 15 $\mu\text{mol/pata}$) aumentaram significativamente o edema (Figura 12). A área (ml.min) do grupo controle foi de 1.77 ± 0.10 ; do grupo que recebeu L-NAME 0.15 $\mu\text{mol/pata}$: 1.48 ± 0.09 , $p < 0.05$; L-NAME 15: 2.33 ± 0.13 , $p < 0.01$.

3.2.3. Efeito de alguns derivados da arginina e outros aminoácidos

A L-AME (15 $\mu\text{mol/pata}$) e a L-AEE (15 $\mu\text{mol/pata}$) produziram aumento significativo no edema de pata induzido por 5-HT, semelhante à resposta obtida com a co-administração de D- e L- arginina nas mesmas doses (Figura 13). No entanto, o edema produzido por 5-HT não sofreu alteração significativa quando os animais foram co-injetados com ácido L-aspártico, L-glicina e L-leucina, administrados na dose de 15 $\mu\text{mol/pata}$ (Figura 14).

3.2.4. Efeito da indometacina e do WEB 2086

O pré-tratamento dos animais com WEB 2086 (20 mg/Kg, via oral, 30 minutos antes) não modificou significativamente o aumento produzido por L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$) no edema de pata induzido por 5-HT (Tabela II).

O pré-tratamento com indometacina (10 mg/Kg, i.p., 30 minutos antes) também não modificou significativamente o aumento produzido por L-NAME (15 $\mu\text{mol/pata}$; tabela II).

3.3. Efeito da L-arginina, L-NMMA, L-NAME e composto 48/80 na liberação de histamina *in vitro*

A dosagem de histamina por fluorimetria baseia-se na formação do complexo lábil histamina-OPT em meio fortemente básico, que é estabilizado após acidificação, e capaz de emitir luz a 450 nm quando estimulado a 360 nm. Assim, a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de histamina. Nas amostras de histamina que continham arginina ou algum de seus derivados, houve redução significativa na fluorescência emitida pelo complexo histamina-OPT (Figuras 15 e 16) e aparecimento de cor, impossibilitando, assim, o uso desta técnica nos

protocolos experimentais onde houvesse presença destes compostos em concentrações acima de 1.5 μM .

O espectro de absorção para os complexos OPT-derivados da arginina (D- e L-arginina, D- e L-NMMA, D- e L-NAME) foram muito semelhantes, com um coeficiente de absorção molar médio a 450 nm (E_{450}) de $27 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (variando de 16 a $41 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O espectro de absorção de histamina apresentou um vale importante a 450 nm (comprimento de onda onde há emissão máxima), apesar de que o valor de E_{450} ($875 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi maior que para os análogos da arginina. Embora este valor seja 32 vezes maior que para os análogos da arginina, estes últimos foram utilizados, em nossos experimentos, em concentrações muito maiores (10.000 vezes maior), sendo portanto, responsáveis pelo efeito "quencher" observado, caracterizado pela inibição da curva de histamina (figuras 15 e 16).

No sentido de investigar o efeito de doses maiores destes compostos ($> 1.5 \mu\text{M}$) sobre mastócitos *in vitro*, foi utilizado RIA para a quantificação de histamina. Assim, os resultados abaixo foram obtidos através de Kit para rádio-imunoensaio, com o qual não se observou reatividade do L-NAME com anticorpo para histamina. A capacidade do anticorpo de se ligar à histamina marcada com H^3 não foi alterada na presença de até 168 μM de L-NAME, correspondendo a uma concentração de 1 mM de L-NAME na suspensão de células (a média total de ligação foi de 105.4%, variando de 99.4 a 111.0%)

A dosagem de histamina por RIA baseia-se na formação de um complexo histamina-anticorpo específico, que é isolado por centrifugação após reação com o segundo anticorpo.

O L-NAME (300 μM), L-NMMA (300 μM) e L-arginina (300 μM) praticamente não induziram liberação de histamina de mastócitos isolados

do peritônio de rato ($3.0 \pm 3.3\%$; $6.9 \pm 5.2\%$ e $10.1 \pm 5.2\%$, respectivamente; $n=3$; resultados expressos em % de liberação; $p>0.1$). A pré-incubação com L-NAME (300 μM) não modificou a liberação de histamina por composto 48/80 (0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$; $35.1 \pm 16.9\%$ e 50.7 ± 19.0 ; $n=3$; ausência e presença de L-NAME, respectivamente). A liberação de histamina induzida por composto 48/80 (0.5-1.0 $\mu\text{g/ml}$) também não foi alterada pela pré-incubação com L-NMMA (300 μM ; $29.1 \pm 5.7\%$ e $26.4 \pm 3.8\%$; $n=3$; ausência e presença de L-NMMA, respectivamente), nem por pré-incubação com L-arginina (300 μM ; $29.1 \pm 5.7\%$ e $18.4 \pm 14.2\%$; $n=3$; ausência e presença de L-arginina, respectivamente).

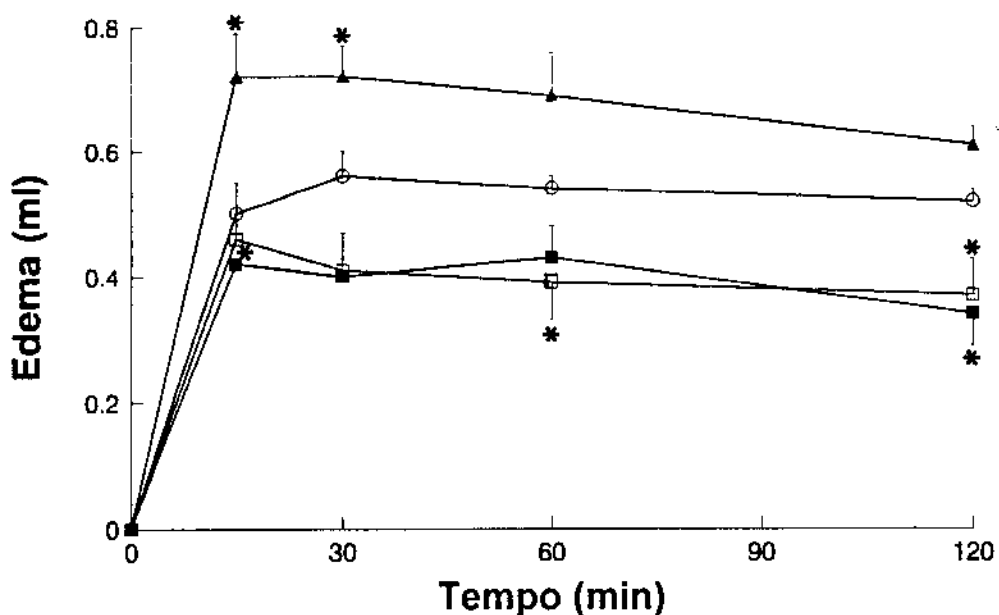


Figura 1: Efeito da administração subplantar de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi injetada individualmente em animais controle (○) ou co-injetada com L-NAME nas doses de 0.15 (□), 1.5 (■) e 15 (▲) μmol/pata . As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=5). * $p < 0.05$, quando comparados ao grupo controle.

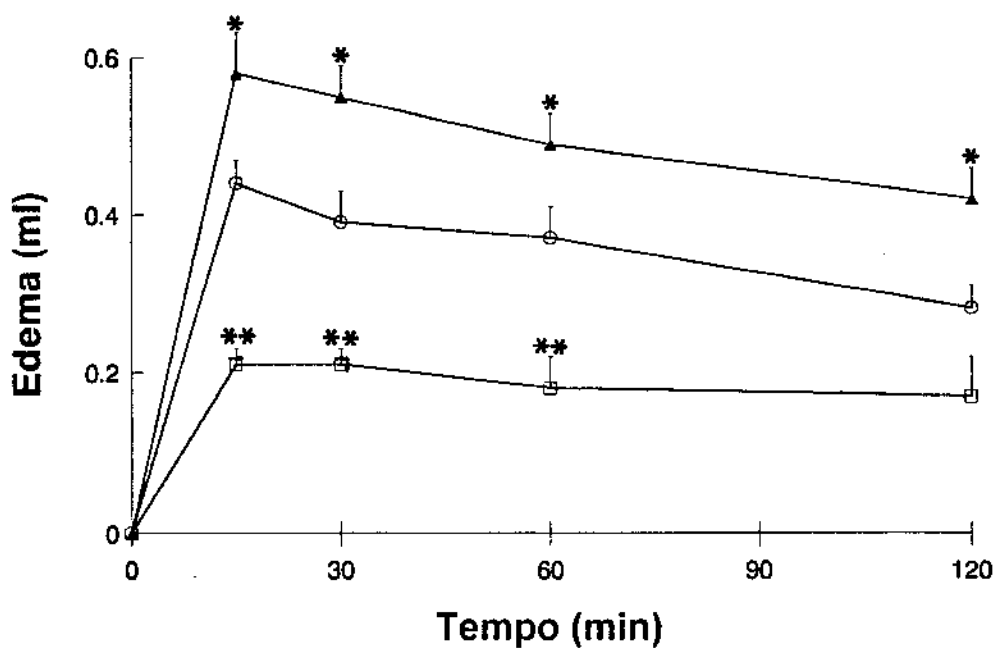


Figura 2: Efeito da administração endovenosa de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. Os animais foram injetados com salina (O) ou L-NAME imediatamente antes da injeção subplantar de bradicinina (50 nmol/pata). As doses utilizadas de L-NAME foram 100 (□) e 370 (▲) $\mu\text{mol/Kg}$. As barras verticais representam o erro padrão das médias ($n=5$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$, quando comparados ao grupo controle.

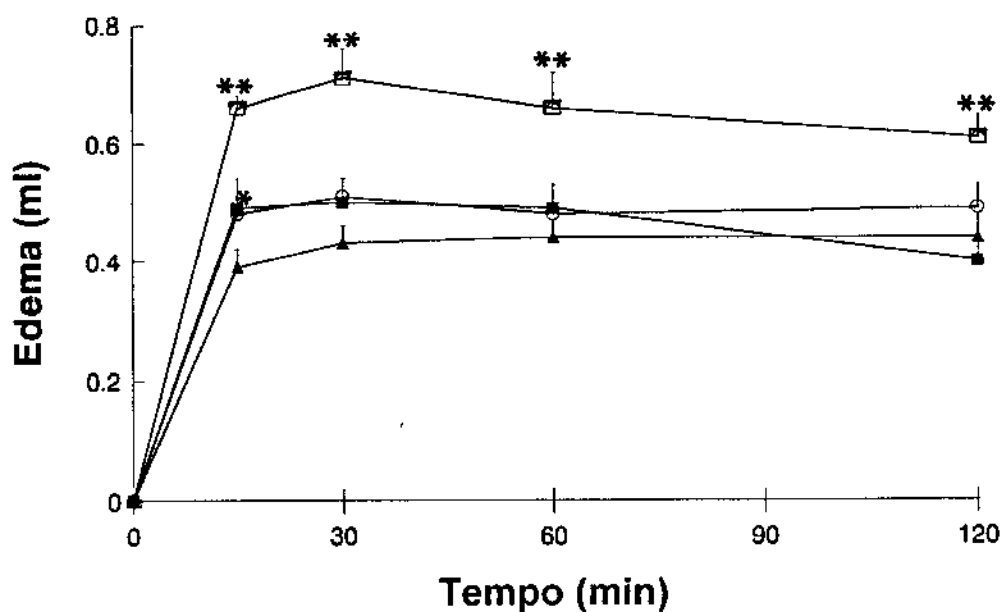


Figura 3: Efeito da administração subplantar de D-nitro arginina metil éster (D-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi injetada individualmente em animais controle (▲) ou co-injetada com D-NAME nas doses de 0.15 (■), 1.5 (○) e 15 (□) μmol/pata. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5-10). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, quando comparados ao grupo controle.

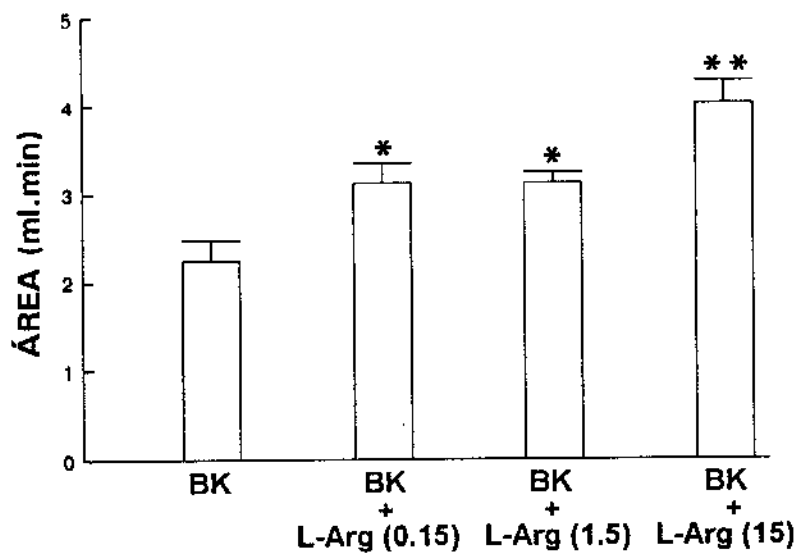


Figura 4: Efeito da administração subplantar de L-arginina no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle ou co-administrada com L-arginina nas doses de 0.15, 1.5 e 15 μ mol/pata. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, quando comparados ao grupo controle.

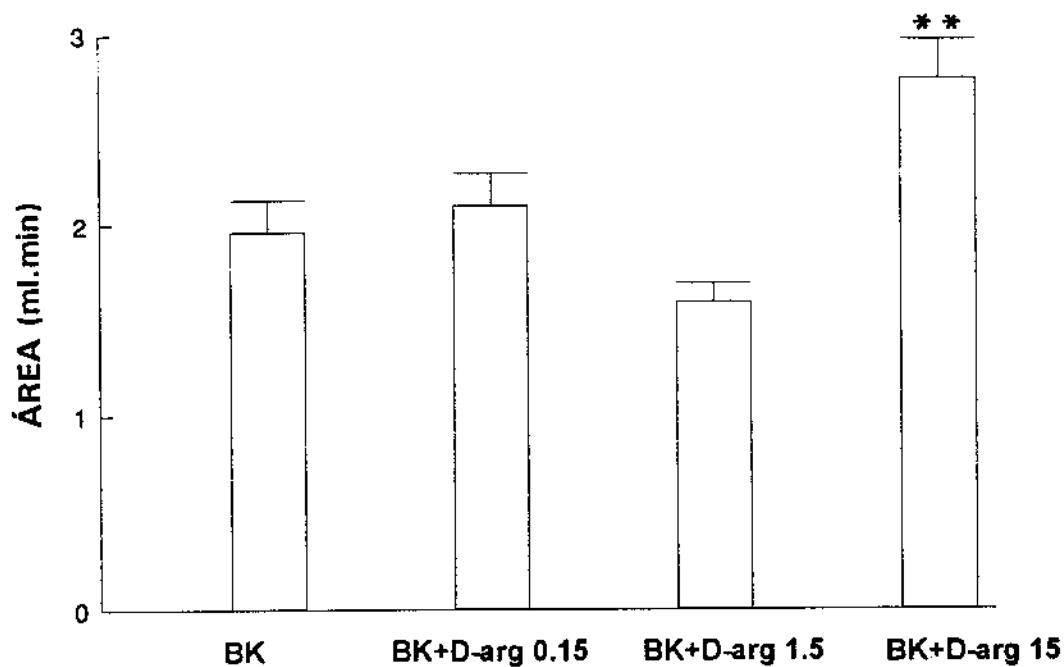


Figura 5: Efeito da administração subplantar de D-arginina no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle ou co-administrada com D-arginina nas doses de 0.15, 1.5 e 15 μ mol/pata. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5-10). ** $p < 0.01$, quando comparados ao grupo controle.

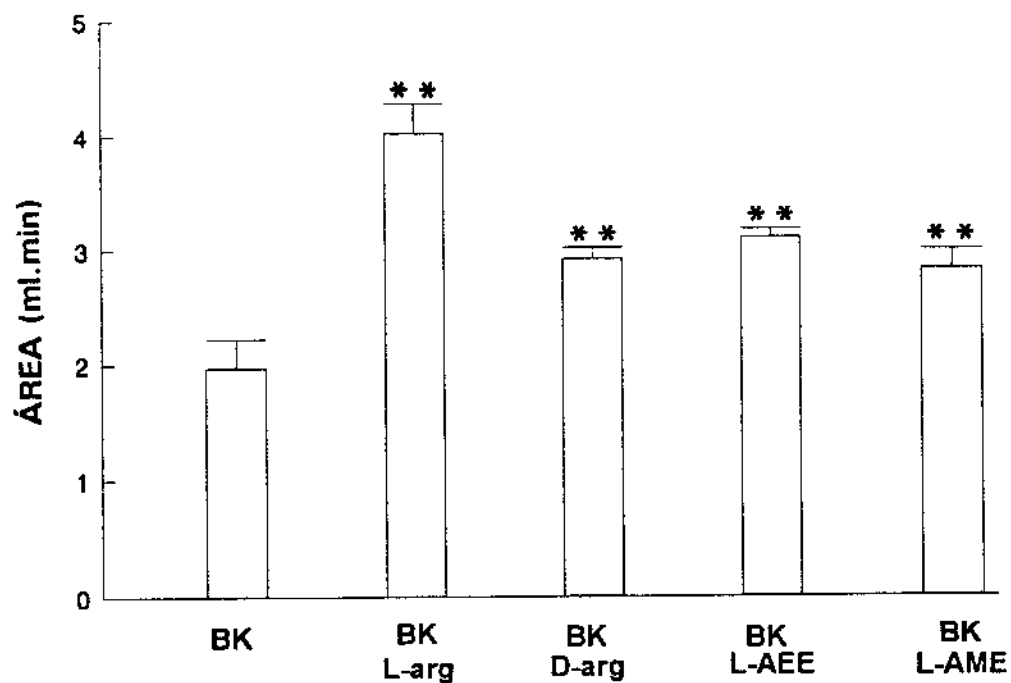


Figura 6: Efeito da administração subplantar de L-arginina metil éster (L-AME) e L-arginina etil éster (L-AEE) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle ou co-administrada com L-arginina (15 μ mol/pata), D-arginina (15 μ mol/pata), L-AEE (15 μ mol/pata) e L-AME (15 μ mol/pata). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5-15). ** $p < 0.01$, quando comparados ao grupo controle.

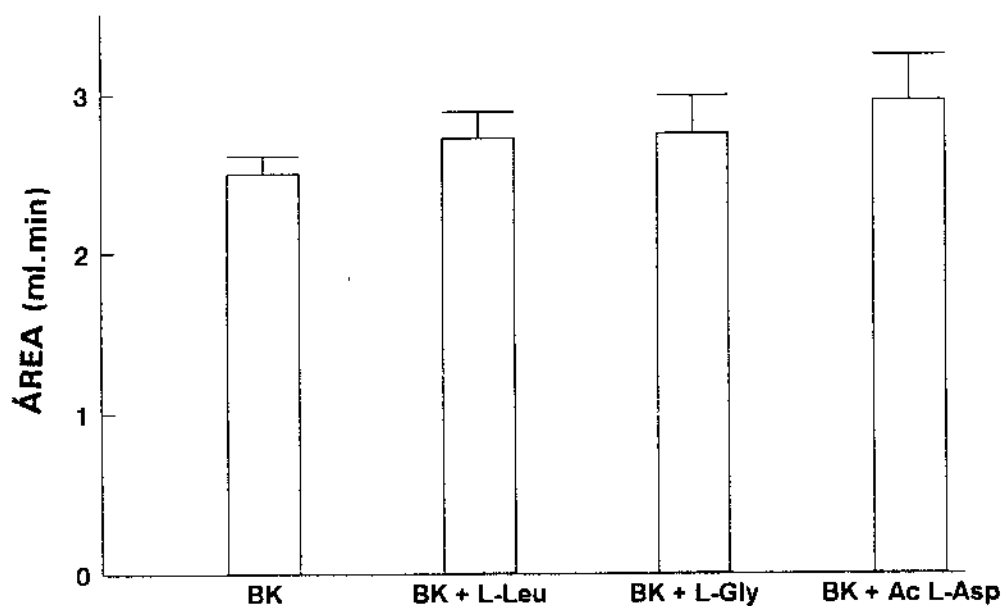


Figura 7: Efeito da administração subplantar de L-glicina, L-leucina e ácido L-aspártico no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina foi administrada individualmente em animais controle ou co-administrada com L-leucina (15 $\mu\text{mol/pata}$), L-glicina (15 $\mu\text{mol/pata}$) e ácido L-aspártico (15 $\mu\text{mol/pata}$). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 10).

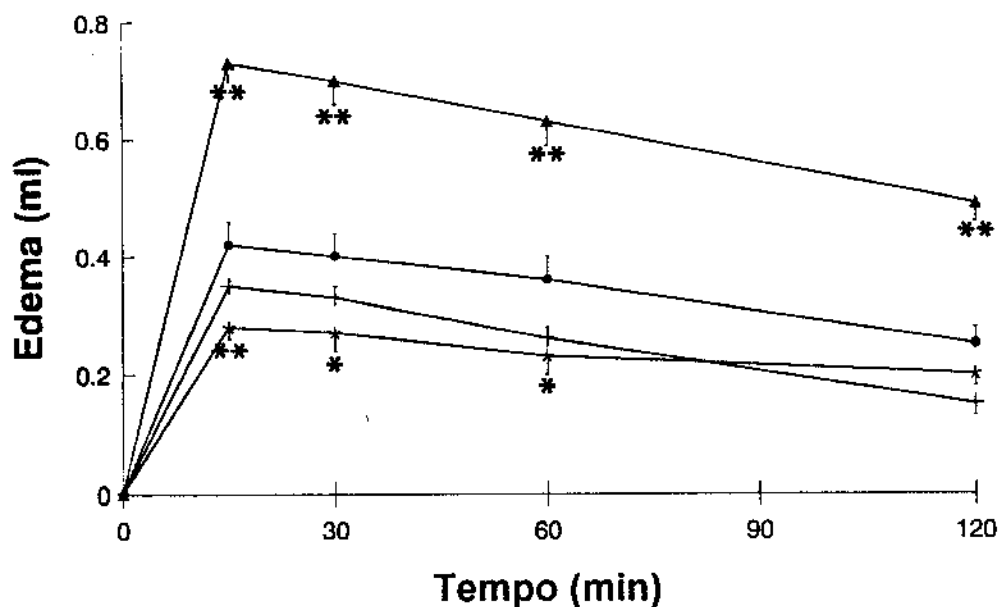


Figura 8: Envolvimento da histamina e serotonina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi administrada individualmente em ratos controle, que receberam salina (●) e em ratos pré-tratados com uma mistura de mepiramina (6mg/Kg, i.p., 30 min) e metisergida (6 mg/Kg, i.p., 30 min) (✱). Bradicininina foi co-administrada com L-NAME (15 μmol/pata) em ratos controle (▲) e em ratos pré-tratados com mepiramina e metisergida (+). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5-10). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, quando comparados os grupos pré-tratados aos seus respectivos controles.

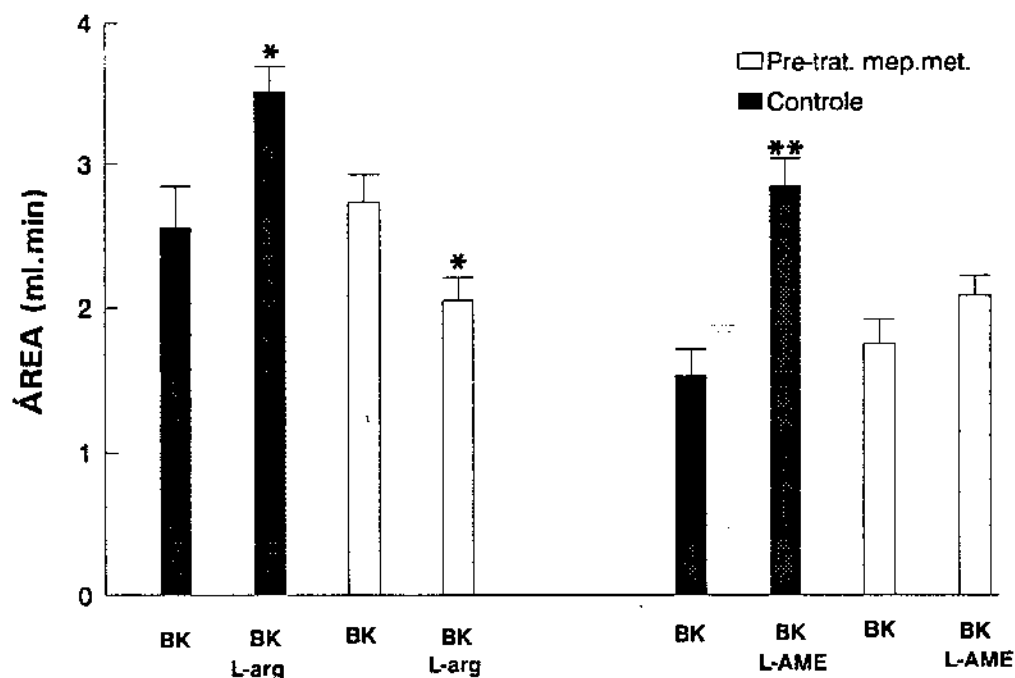


Figura 9: Envolvimento da histamina e serotonina no aumento produzido por L-arginina e L-arginina metil éster (L-AME) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicininina (50 nmol/pata) foi injetada individualmente em animais controle, que receberam salina e em animais pré-tratados com uma mistura de mepiramina (6 mg/Kg, i.p., 30 min) e metisergida (6 mg/Kg, i.p., 30 min). A bradicininina foi, ainda, co-administrada com L-arginina (15 μ mol/pata) em animais controle e em animais tratados; e foi co-administrada com L-AME (15 μ mol/pata) em animais controle e em animais tratados. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5-10). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, quando comparados os grupos pré-tratados aos seus respectivos controles.

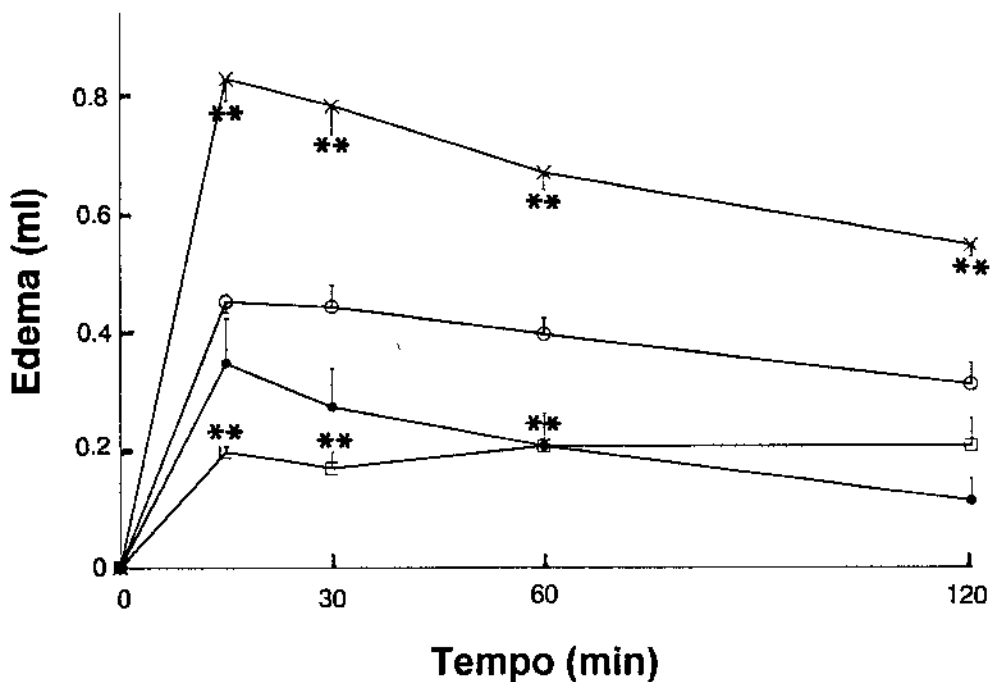


Figura 10: Envolvimento da histamina e serotonina (através de depleção crônica de seus estoques) no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por bradicinina. Bradicinina (50 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle (O) e em animais depletados de histamina e serotonina (ver métodos) (□). Bradicinina foi co-administrada com L-NAME (15 μ mol/pata) em ratos controle (x) e em ratos depletados (●). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=10).** p<0.01, quando comparados os grupos pré-tratados aos seus respectivos controles.

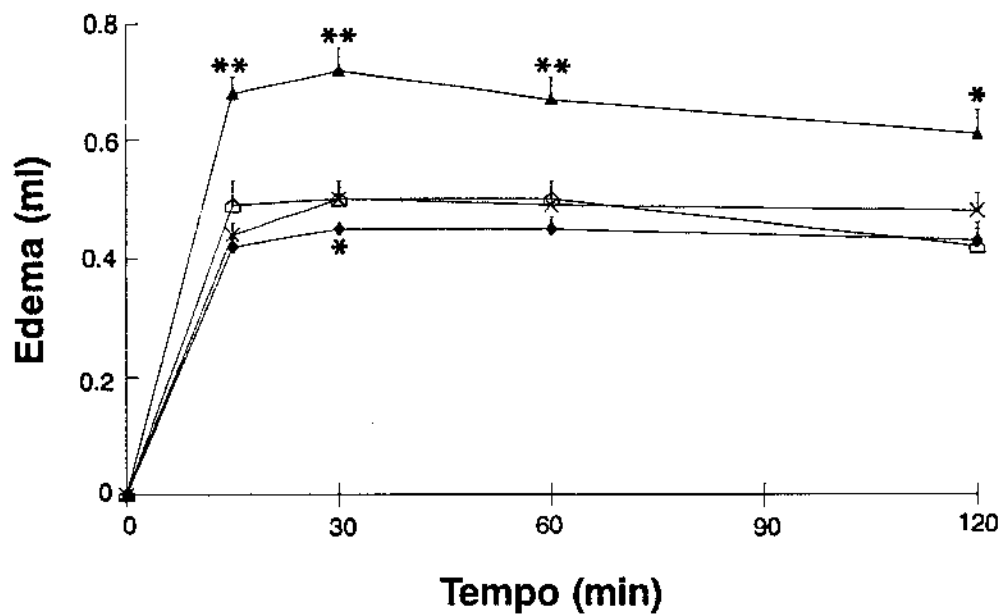


Figura 11: Efeito da administração subplantar de L-nitro arginina metil éster (L-NAME) no edema de pata induzido por serotonina. Serotonina (17 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle (X) e co-administrada com L-NAME) nas doses de 0.15 (◆), 1.5 (△) e 15 (▲) μmol/pata. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 10). * p < 0.05), ** p < 0.01, quando comparados ao grupo controle.

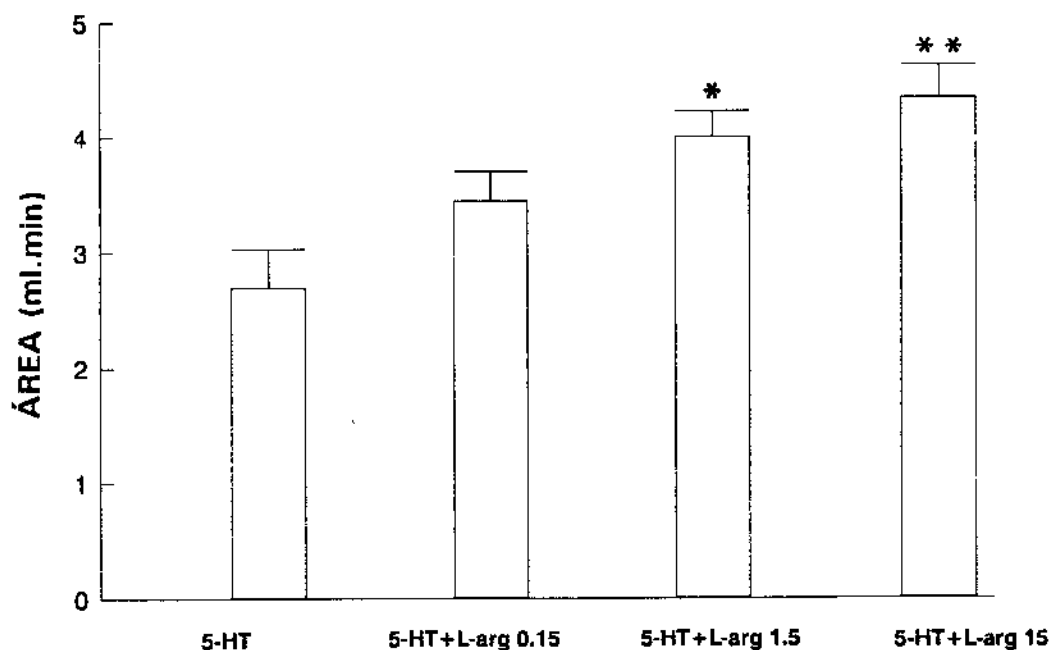


Figura 12: Efeito da administração subplantar de L-arginina no edema de pata induzido por serotonina. Serotonina (17 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle e co-administrada com L-arginina nas doses de 0.15, 1.5 e 15 μ mol/pata. As barras verticais representam o erro padrão das médias (n=5). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, quando comparados ao grupo controle.

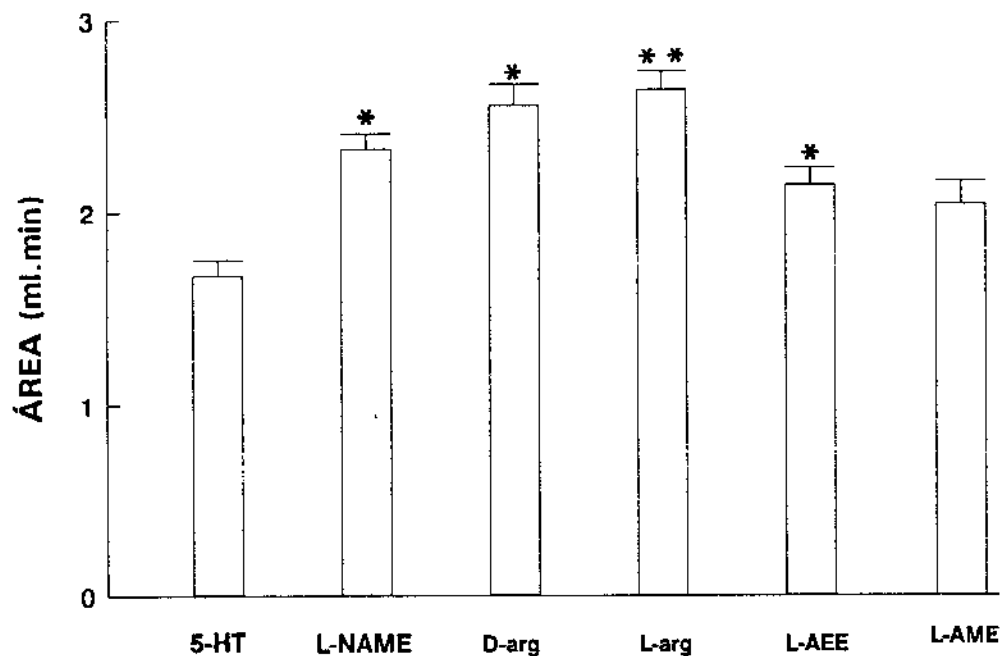


Figura 13: Efeito da administração subplantar de L-arginina metil éster (L-AME) e L-arginina etil éster (L-AEE) no edema de pata induzido por serotonina. Serotonina (17 nmol/pata) foi administrada subplantarmente em animais controle e co-administrada com L-arginina (15 μ mol/pata), D-arginina (15 μ mol/pata), L-AEE (15 μ mol/pata) e L-AME (15 μ mol/pata). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 5). * p < 0.05; ** p < 0.01, quando comparados ao grupo controle.

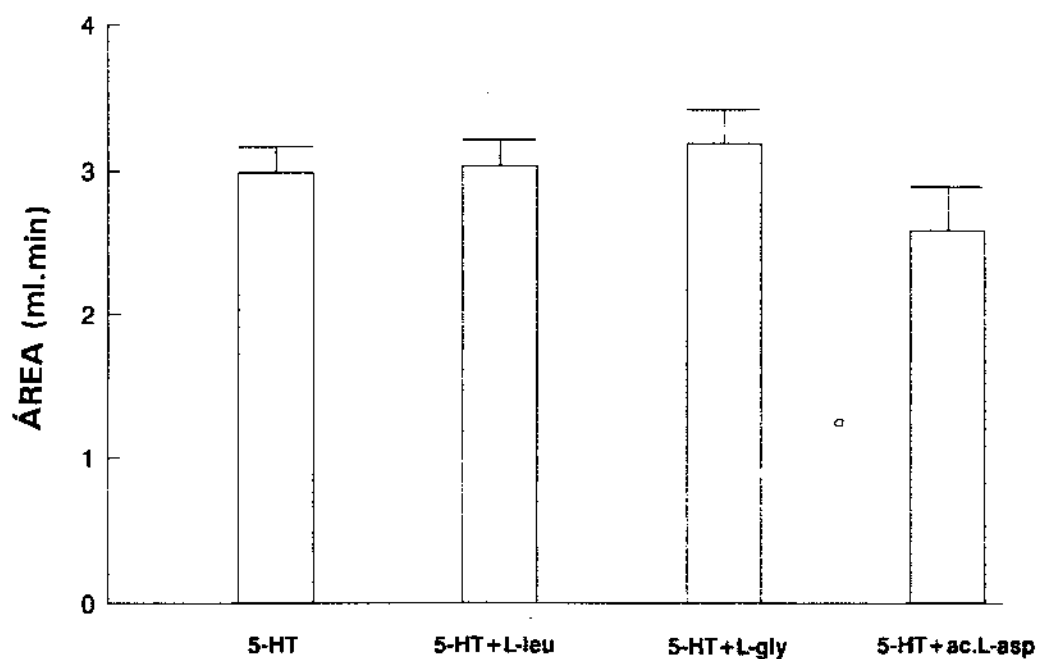


Figura 14: Efeito da administração subplantar de L-glicina, L-leucina e ácido L-aspártico no edema de pata induzido por serotonina. Serotonina (17 nmol/pata) foi administrada individualmente em animais controle e co-administrada com L-glicina (15 μ mol/pata), L-leucina (15 μ mol/pata) e ácido L-aspártico (15 μ mol/pata). As barras verticais representam o erro padrão das médias (n = 10).

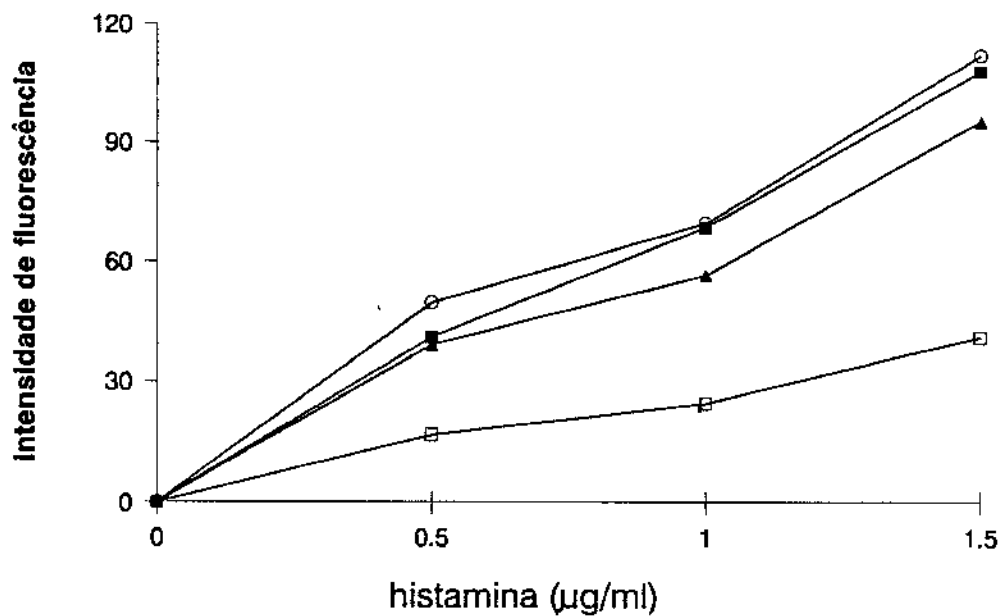


Figura 15: Interferência da L-arginina na dosagem de histamina por fluorimetria. Doses crescentes de histamina foram quantificadas através de fluorimetria, resultando em uma curva dose-resposta controle (O); esta curva dose-resposta foi quantificada também na presença de L-arginina nas doses de 1.5 (■), 15 (▲) e 150 (□) μM . [As barras verticais representam o erro padrão das médias ($n = 2$).]

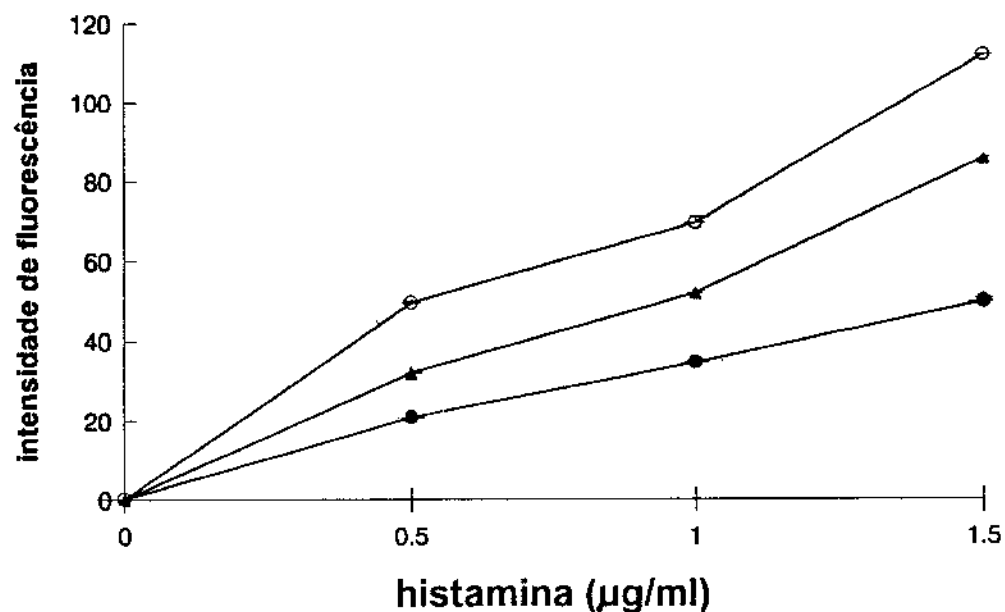


Figura 16: Interferência do L- nitro arginina metil éster (L-NAME) na dosagem de histamina por fluorimetria. Doses crescentes de histamina foram quantificadas através de fluorimetria, resultando em uma curva dose-resposta controle (○); esta curva dose-resposta foi quantificada também na presença de L-NAME nas doses de 15 (▲) e 150 (●) μM . As barras verticais representam o erro padrão das médias ($n = 2$).

Tabela I - Efeito do WEB 2086 e da indometacina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME; 15 μ mol/pata) no edema de pata induzido por bradicinina (50 nmol/pata):

	% aumento de edema
controle	46.8 \pm 9.0
tratado com WEB (20 mg/Kg, v.o., 30 min antes)	55.5 \pm 7.1

	% aumento de edema
controle	40.2 \pm 11.6
tratado com indometacina (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes)	66.4 \pm 10.7

n = 10

Tabela II - Efeito do WEB 2086 e da indometacina no aumento produzido por L-nitro arginina metil éster (L-NAME; 15 μ mol/pata) no edema de pata induzido por serotonina (17 nmol/pata):

	% aumento de edema
controle	53.7 \pm 8.5
tratado com WEB (20 mg/Kg, v.o., 30 min antes)	64.2 \pm 11.9

	% aumento de edema
controle	49.2 \pm 9.0
tratado com indometacina (10 mg/Kg, i.p., 30 min antes)	87.1 \pm 11.9

n = 10

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o inibidor da síntese de EDRF/NO estudado (L-NAME) é capaz de inibir ou aumentar a resposta edematogênica induzida por bradicinina e serotonina, dependendo da dose utilizada. Por outro lado, a arginina (enantiômeros L- ou D-) e os derivados testados (L-AME, L-AEE) apenas aumentam a resposta edematogênica quando administrados em doses elevadas.

A redução da resposta edematogênica causada por doses baixas de L-NAME parece ser devido à inibição da síntese de EDRF/NO visto que, em doses equimolares, a L-arginina (precursor de EDRF), D-arginina (enantiômero inativo) e D-NAME (enantiômero inativo) não apresentam efeito inibitório no edema de pata induzido por BK e 5-HT. O EDRF é produzido localmente em diversos leitos vasculares para manter um tônus dilatador da microvasculatura (Furchgott and Zawadzki, 1980; Hughes *et al*, 1990; Lawrence and Brain, 1992; Fortes *et al*, 1990; Persson *et al*, 1990). Na microcirculação cutânea de ratos, o L-NAME e o L-NMMA reduzem o fluxo sanguíneo basal acarretando inibição da resposta inflamatória induzida por substância P (Hughes *et al*, 1990), carragenina e dextrana (Ialenti *et al*, 1992). Estes efeitos foram associados à inibição da síntese de EDRF, pois os mesmos não foram compartilhados por D-NAME; além disso, a L-arginina (mas não a D-arginina) foi capaz de reverter a inibição produzida por L-NAME e L-NMMA.

Em pata de rato, o L-NMMA é capaz de inibir a formação de edema induzido por BK, 5-HT, composto 48/80 (Antunes *et al*, 1992) e polications, sendo que esta inibição é particularmente revertida pela co-administração de um vasodilatador como o iloprost (análogo estável da prostaciclina; Antunes *et al*, 1990). Estes resultados sugeriram que o efeito inibitório do L-NMMA é

principalmente devido à redução de fluxo sanguíneo e não permeabilidade vascular. A possibilidade do EDRF atuar diretamente a nível de permeabilidade vascular tem sido também investigada. Em preparações de bochecha de hamster *in vivo* foi demonstrado que o L-NAME inibe, de maneira dose-dependente, a permeabilidade vascular induzida por BK e adenosina di-fosfato (Mayhan, 1992).

Curiosamente, doses maiores de L-NAME produziram um aumento significativo no edema de pata induzido por 5-HT e BK. Este aumento não foi abolido em animais que receberam WEB 2086 e indometacina, indicando que nem o PAF (fator ativador de plaquetas), nem os derivados do ácido araquidônico, via ciclo-oxigenase, participam deste fenômeno. No entanto, o aumento produzido pelo L-NAME foi abolido através do pré-tratamento dos animais com uma mistura de mepiramina (antagonista de histamina) e metisergida (inibidor da serotonina) ou por esgotamento crônico de histamina e serotonina dos animais pelo composto 48/80 (desgranulador de mastócitos). Estes resultados sugerem que o aumento produzido pelo L-NAME no edema de pata de rato induzido por BK e 5-HT é devido à ativação de mastócitos, com conseqüente desgranulação e liberação local de histamina e 5-HT.

No edema de pata induzido por 5-HT e BK, o aumento produzido pelos análogos de arginina testados, inclusive a D- e L-arginina, provavelmente deve-se à ativação de mastócitos, pois este efeito é revertido em animais tratados com mepiramina e metisergida.

Esta ativação de mastócitos *in vivo* provavelmente ocorre por interação destas células com as cargas catiônicas da arginina e de seus análogos, independente da via L-arginina-NO, pois estes efeitos também ocorrem com a D-arginina, mas não são observados com amino-ácidos

neutros como a L-glicina e L-leucina ou com amino-ácido carregado negativamente, como o ácido L-aspártico. Compostos ricos em cargas catiônicas como polications (Ennis *et al*, 1980; Antunes *et al*, 1990), composto 48/80 (Paton, 1951) e proteínas catiônicas (Ranadive and Ruben, 1973) degranulam mastócitos *in vitro* e *in vivo*. Vários peptídeos derivados da substância P e BK, quando comparados em sua atividade como liberadores de histamina de mastócitos peritoneais de ratos, mostram que para induzirem a liberação de histamina há necessidade da presença de um terminal arginina, contendo um nitrogênio carregado positivamente (Devillier *et al*, 1985; Devillier *et al*, 1989). Para liberação de histamina de mastócitos peritoneais de rato induzida por substância P, neuropeptídeo Y, peptídeo YY é essencial, também, a presença de resíduos de amino-ácidos com o nitrogênio terminal carregado positivamente (Shibata *et al*, 1985; Grundemar and Hakanson, 1991).

Por outro lado, alguns autores trabalhando com mastócitos peritoneais de rato, descreveram que estas células são capazes de sintetizar e liberar EDRF (Salvemini *et al*, 1990) à semelhança de outras células sanguíneas, tais como leucócitos polimorfonucleares e mononucleares (Rimele *et al*, 1988), neutrófilos (Salvemini *et al*, 1989; Condino-Neto *et al*, 1993), macrófagos (Marletta *et al*, 1988) e astrócitos (Murphy *et al*, 1990). O L-NMMA é capaz de aumentar a liberação de histamina induzida por agitação ou LPS, quando incubado com mastócitos peritoneais de rato *in vitro*. Este aumento é revertido por L-arginina, e não por D-arginina, indicando um mecanismo dependente de NO nestas células (Salvemini *et al*, 1991). Estes autores propuseram que a inibição da síntese de NO em mastócitos levaria a uma queda dos níveis intracelulares de GMPc,

resultando em uma degranulação destas células com consequente liberação de histamina e 5-HT.

Em contraste, nossos resultados mostram que L-NAME, L-NMMA e L-arginina, quando incubados com mastócitos peritoneais de rato *in vitro*, liberam quantidades semelhantes de histamina, apesar de muito pequenas. Além disso, estes agentes não alteraram a liberação de histamina induzida por composto 48/80. Esta discrepância nos resultados é devido, provavelmente, à utilização do método fluorimétrico para dosagem de histamina por aqueles autores. Em nossas condições de quantificação de histamina, demonstramos que, apesar do complexo OPT-derivado de arginina ser uma espécie fluorescente (com comprimento de onda de excitação máxima e emissão menores que os comprimentos de onda para histamina), nas quantidades utilizadas neste estudo, os derivados de arginina contribuíram principalmente como "quencher" levando a uma diminuição na intensidade total de fluorescência.

O efeito da arginina e seus derivados *in vivo*, foi maior quando comparado com os experimentos *in vitro*. Esta diferença pode ser devido às diferentes populações de mastócitos (pata de rato *in vivo* e peritoneais *in vitro*). Em roedores, como camundongos, algumas populações de mastócitos (peritoneais, de mucosa, derivados da medula óssea) apresentam diferentes características na densidade granular, quantidade de histamina e reação frente a diversos agentes (Stevens and Austen, 1989; Katz *et al*, 1991).

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o emprego de quantidades elevadas de L-arginina para reverter efeitos do L-NAME e L-NMMA como evidência do envolvimento do NO em inflamação aguda (Ialenti *et al*, 1992), deve ser feito com cautela pois tal reversão pode

ser devido a outras ações da L-arginina, como degranulação de mastócitos *in vivo*.

α

CONCLUSÕES

1. O EDRF modula as respostas edematogênicas induzidas por BK e 5-HT *in vivo*, pois o seu inibidor, L-NAME, produziu redução destas respostas enquanto que D-NAME e L- e D-arginina, em doses equimolares, não produziram alterações nestas respostas edematogênicas.
2. A arginina e seus análogos, em doses altas, produziram aumento nas respostas edematogênicas induzidas por BK e 5-HT *in vivo*.
3. Este aumento é devido à ativação de mastócitos com consequente liberação local de histamina e 5-HT, pois o pré-tratamento com mepiramina e metisergida e o esgotamento crônico dos estoques de histamina e 5-HT aboliram este aumento.
4. A ativação de mastócitos provavelmente deve-se à carga catiônica da arginina e de seus derivados, independente da via L-arginina-NO, pois o aumento que produziram nas respostas edematogênicas induzidas por BK e 5-HT também ocorreram com D-arginina, L- e D-NAME, mas não foi observado com amino ácidos neutros (L-leucina e L-glicina) ou com amino-ácido carregado negativamente (ácido L-aspártico)
5. A dosagem de histamina por fluorimetria na presença de L-arginina e L-NAME não foi possível pois, nas concentrações utilizadas, produziram efeito "quencher", diminuindo a fluorescência emitida.

6. A L-arginina, L-NMMA e L-NAME induziram à liberação de quantidades muito pequenas de histamina de mastócitos peritoneais de rato *in vitro* (<10%) quando comparados com a liberação induzida por composto 48/80 (>40%) e não alteraram a liberação induzida por composto 48/80 *in vitro*.

7. O contraste entre os resultados *in vivo* e *in vitro* provavelmente se deve às diferenças morfológicas e funcionais das populações de mastócitos utilizadas (mastócitos de pata *in vivo* e mastócitos peritoneais *in vitro*).

BIBLIOGRAFIA

Antunes, E.; Mariano, M.; Cirino, G.; Levi, S. and de Nucci, G. Pharmacological characterization of polycation-induced rat-hind paw oedema. **Br. J. Pharmacol.** **101**:986-990, 1990.

Antunes, E.; Giraldeho, C.M.M.; Cirino, G. and de Nucci, G. Effects of NG-monomethyl-L-arginine and its D-enantiomer on rat hind paw oedema *in*: **Biology of nitric oxide-Physiological and clinical aspects**. ed. Moncada, S.; Marletta, M.A.; Hibbs, J.B. and Higgs, E.A. pp.264-266. London: Portland Press.

Brain, S. D.; Williams, T. J.; Tippins, J. R.; Morris, H. R. and MacIntyre, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilatador. **Nature.** **313**: 54-56, 1985.

Brain, S. D. and Williams, T.J. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. **Br. J. Pharmacol.** **97**: 77-82, 1989.

Bray, M. H.; Cunningham, F. M.; Ford-Hutchinson, A.W. and Smith, M. J. H. Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.** **72**: 483-486, 1981.

Bredt, D.S.; Hwang, P. M. and Snyder, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature.** **347**: 768-770, 1990.

Chahl, L.A. Interactions of substance P with putative mediators of inflammation and ATP. **Eur. J. Pharmacol.** **44**: 45-49, 1977.

Condino-Neto, A., Muscará, M.N., Grumach, A., Carneiro-Sampaio, M.S. and de Nucci, G. Neutrophil and mononuclear cells from chronic granulomatous disease patients release nitric oxide. **Brit. J. Clin. Pharmacol.** **35**: 485-490, 1993.

Devillier, P.; Renoux, M.; Giroud, J.P. and Regoli, D. Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. **Eur. J. Pharmacol.** **117**: 89-96, 1985.

Devillier, P.; Drapeau, G.; Renoux, M. and Regoli, D. Role of the N-terminal arginine in the histamine-releasing activity of substance P, bradykinin and related peptides. **Eur. J. Pharmacol.** **168**: 53-60, 1989.

Di Rosa, M.; Giroud, J.P. and Willoughby, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Path.* **104**: 15-29, 1971.

Enerback, I. and Svensson, I. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of percoll. *J. Immunol. Meth.* **39**: 135-145, 1980.

Ennis, M.; Pearce, F.L. and Weston, P.M. Some studies on the release of histamine from mast cells stimulated with polylysine. *Br. J. Pharmacol.* **70**: 329-334, 1980.

Faria, J.L. Mecanismos de defesa do organismo. Inflamação *in*: **Patologia geral: fundamentos das doenças com aplicações clínicas**. Ed. Guanabara, 3 ed., p.137-144, 1988.

Fortes, Z.B.; Oliveira, M.A.; Scivoletto, R.; Carvalho, M.H.C.; de Nucci, G and Nigro, D. Nitric oxide release may be involved in the microcirculatory response to acetylcholine. *Eur. J. Pharmacol.* **182**: 143-147, 1990.

Fukuto, J.M.; Wood, K.S.; Byrns, R.E. and Ignarro, L.J. N^G-amino-L-arginine: a new potent antagonist of L-arginine-mediated endothelium-dependent relaxation. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **168**: 458-465, 1990.

Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**: 373-376, 1980.

Furlong, B.; Henderson, A.H.; Lewis, M. J. and Smith, J.A. Endothelium-derived relaxing factor inhibits *in vitro* platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.* **90**: 687-692, 1987.

Gamse, R. and Saria, A. Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* **144**: 61-66, 1985.

Garcia-Leme, J. The vascular response to injury, *in*: **Hormones and inflammation**. CRC Press, Inc., p.115-122, 1989.

Grundemar, L. and Hakanson, R. Neuropeptide Y, peptide YY and C-terminal fragments release histamine from rat peritoneal mast cells. *Br. J. Pharmacol.* **104**: 776-778, 1991.

Hibbs, J.B.; Taintor, R.R. and Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrate. *Science*. **235**: 473-476, 1987.

Higgs, E. A.; Moncada, S. and Vane, J. R. Inflammatory effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-oxo-PGF₁α in the rat paw. *Prostaglandins*. **16**: 153-162, 1978.

Hiki, K.; Yui, Y.; Hattory, R.; Eizawa, H.; Kosuga, K. and Kawai, C. Three regulation mechanisms of nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **206**: 163-164, 1991.

Hughes, S. R.; Williams, T. J. and Brain, S. D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. *Eur. J. Pharmacol.* **191**: 481-484, 1990.

Hwang, S.B.; Li, C.L.; Lam, M.H. and Shen, T.Y. Characterization of cutaneous vascular permeability induced by platelet-activating factor in guinea-pig and rats and its inhibition by a platelet-activating factor receptor antagonist. *Lab. Invest.* **52**: 617-630, 1985.

Ialenti, A.; Iannaro, A.; Moncada, S. and Di Rosa, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* **211**: 177-182, 1992.

Ignarro, L.J.; Buga, G. M.; Wood, K.S.; Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 9265-9268, 1987.

Ignarro, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and release from artery and vein. *Circ. Res.* **65**: 1-21, 1989.

Ignarro, L.J.; Gold, M.E.; Buga, G.M.; Byrns, R.E.; Wood, K.S.; Chaudhuri, G. and Frank, G. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ. Res.* **64**: 315-329, 1989.

Ishii, K.; Chang, B.; Kerwin, J.F.; Huang, Z.J. and Murad, F. NW-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* **176**: 219-223, 1990.

Katz, H.R.; Kaue, R.E. and Austen, K.F. Mast cells biochemical and functional heterogeneity. *Transplantation Proc.* **26**: 2900-2904, 1991.

Lawrence, E. and Brain, S. D. Responses to endothelins in the rat cutaneous microvasculature: a modulatory role of locally produced nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.** **106**: 733-738, 1992.

Lembeck, F. and Holzer, P. Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.** **310**: 175-183, 1979.

Lykke, A.W.J. and Cummings, R. Inflammation in Healing. I. Time course and mediation of exudation in wound healing in the rat. **Br. J. Exp. Path.** **50**: 309-318, 1969.

Maggi, C.A.; Barbanti, G.; Turini, D. and Giuliani, S. Effect of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and N^G-nitro-L-arginine (L-NOARG) on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the circular muscle of the human ileum. **Br. J. Pharmacol.** **103**: 1970-1972, 1991.

Mayhan, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation.** **16**: 295-305, 1992.

Marletta, M.A.; Yoon, P.S.; Iyengar, R.; Leaf, C.D. and Wisnhnok, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry.** **27**: 8706-8711, 1988.

Martin, W.; Cusack, N.J.; Carleton, J.S. and Gordon, J.L. Specificity of P₂-purinoceptor that mediates endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. **Eur. J. Pharmacol.** **108**: 295-299, 1985.

May, G. R.; Croock, P.; Moore, P.K. and Page, C.P. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. **Br. J. Pharmacol.** **102**: 759-763, 1991.

Moncada, S.; Gryglewski, R.; Bunting, S. and Vane, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature.** **263**: 663-665, 1976.

Moncada, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.** **145**: 201-227, 1992.

Moore, P.K.; al-Swayeh, A.O.; Chong, N.W.S.; Evans, R.A. and Gibson, A. L-N^G-nitro arginine (L-NOARG), a novel L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.** **99**: 408-412, 1990.

- Moran, N.C.; Uvnas, B. and Westerholm, B. Release of 5-hydroxytryptamine and histamine from mast cells. **Acta Physiol. Scand.** **56**:26-41, 1962.
- Morley, J.; Page, C.P and Paul, W. Inflammatory actions of platelet activating factor (PAF-acether) in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.** **80**: 503-509, 1983.
- Murphy, S.; Minor, L.; Welk, G. and Harrison, D. G. Evidence for an astrocyte-derived vasorelaxing factor with properties similar to nitric oxide. **J. Neurol. Chem.** **55**: 349-345, 1990.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** **327**: 524-526, 1987.
- Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S. and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature.** **333**: 664-666, 1988a.
- Palmer, R.M.J.; Rees, D.D.; Ashton, D.S. and Moncada, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **153**: 1251-1256, 1988b.
- Palmer, R.M.J. and Moncada, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** **158**: 348-352, 1989.
- Paton, W.D.M. Compound 48/80: a potent histamine liberator. **Br. J. Pharmacol.** **6**: 499-508, 1951.
- Payan, D. G. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. **Ann. Rev. Med.** **40**: 341-352, 1989.
- Peck, M. J.; Piper, P. J. and Williams, T. J. The effect of leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea-pig skin. **Prostaglandin.** **21**: 315-321, 1981.
- Person, M.G.; Gustafsson, L.E.; Wiklund, N.P.; Hedqvist, P and Moncada, S. Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.** **100**: 463-466, 1990.
- Radomski, M.W.; Palmer, R. M. J. and Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet.** **2**: 1057-1058, 1987.

Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. An L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 5193-5197, 1990.

Ralevic, V.; Khalil, Z.; Dusing, G.J. and Helme, R.D. Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin microvasculature. *Br. J. Pharmacol.* **106**: 650-655, 1992.

Ranadive, N.S. and Ruben, D.H. Mechanism of histamine release from mast cells by compound 48/80. Comparison with the release induced by cationic protein. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* **44**: 745-758, 1973.

Rapoport, R.M. and Murad, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* **52**: 352-357, 1983.

Rees, D.D.; Palmer, R.M.J.; Hodson, H.F. and Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* **96**: 418-424, 1989.

Rimele, T.J.; Sturn, R.J. and Adams, L. M. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**: 102-111, 1988.

Salvemini, D.; de Nucci, G.; Gryglewski, R. and Vane, J. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6328-6332, 1989.

Salvemini, D.; Masini, E.; Anggard, E.; Mannaioni, P.F. and Vane, J. Synthesis of nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **169**: 596-601, 1990.

Salvemini, D.; Masini, E.; Pistelli, A.; Mannaioni, P.F. and Vane, J. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**: S258-264, 1991.

Shibata, H.; Mio, M. and Tasaka, K. Analysis of the mechanism of histamine release induced by substance P. *Bioch. Biophys. Acta.* **846**: 1-7, 1985.

Shore, P.A.; Burkhalter, A. and Cohen Jr., V.H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**: 182-186, 1959.

Sneddon, J.M. and Vane, J. Endothelial-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2800-2804, 1988.

Spector, W. G. and Willoughby, D.A. The pharmacology of inflammation. The English Universities Press. Ltd., by Butler & Tanner Ltd, Frome and London, 1968.

Stevens, R.L. and Austen, K.F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunology Today.* **10**: 381-386, 1989.

Thomas, G. and Ramwell, P.W. N^W -nitro-L-arginine benzyl ester, a potent irreversible inhibitor of endothelium dependent relaxation. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **179**: 1677-1682, 1991.

Uvnas, B. and Thon, I.L. Isolation of "Biologically intact" mast cells. *Exp. Cell. Res.* **18**: 512-520, 1959.

van der Valk, P. and Herman, C.J. Leukocyte functions *in*: Biology of disease. *Laboratory Investigation.* **57**: 127-137, 1987.

van Gelderen, M.; Heiligers, J.P.C. and Saxena, P.R. Haemodynamic changes and acetylcholine-induced hypotensive responses after N^G -nitro-L-arginine methyl ester in rats and cats. *Br. J. Pharmacol.* **103**: 1899-1909, 1991.

Vila, J.; Esplugues, J.V.; Martinez-Cuesta, M.A.; Martinez-Martinez, M.C.; Aldasoro, M.; Flor, B. and Leuch, S. N^G -monomethyl-L-arginine and N^G -nitro-L-arginine inhibit endothelium-dependent relaxation in human isolated omental arteries. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 869-870, 1991.

Williams, T. J. and Morley, J. Prostaglandins as potentiators of increased permeability in inflammation. *Nature.* **246**: 215-217, 1973.

Williams, T. J. and Peck, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature.* **270**: 530-532, 1977.

Williams, T. J. Prostaglandin E_2 , prostaglandin I_2 and the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **65**: 517-524, 1979.

Williams, T. J. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E_2 as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* **77**: 505-509, 1982.

ABSTRACT

The effects caused by L-arginine (L-ARG), D-arginine (D-ARG), N_w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), L-arginine methyl ester (L-AME) and L-arginine ethyl ester (L-AEE) on the rat hind paw oedema induced by bradykinin (BK) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) were investigated. We have also examined the effects caused by L-ARG, L-NMMA and L-NAME on *in vitro* rat mast cell activation, as measured by histamine release. The rat paw volume was measured with a hydroplethysmometer at 15, 30, 60 and 120 min after the subplantar injection of the inflammatory agent. Histamine release from peritoneal rat mast cells was measured either fluorometrically or by radioimmunoassay. L-NAME (0.15 µmol/paw) significantly reduced both BK- and 5-HT-induced oedema. At this dose L-ARG, D-ARG and D-NAME had no effect on the oedematogenic responses induced by these agents. In contrast, L-NAME, L-ARG, D-ARG, D-NAME, L-AME and L-AEE, at the dose of 15 µmol/paw, significantly potentiated both BK- and 5-HT-induced oedema. Pre-treatment of the animals with both mepyramine and methysergide abolished the potentiation caused by L-NAME, L-AME and L-ARG on paw oedema induced by BK. Similar results were observed in rats chronically treated with the histamine releasing agent compound 48/80. Indomethacin and WEB 2086 had no effect on the potentiation induced by L-NAME in both BK and 5-HT-induced oedema. L-NAME and L-ARG dose-dependently (1.5-150 µM) decreased histamine detection by fluorescence. L-NAME, L-NMMA and L-ARG, at the concentration of 300 µM, did not significantly affect compound 48/80-induced histamine release from rat peritoneal mast cells as detected by radioimmunoassay. L-NAME, L-NMMA and L-ARG induced histamine release in only 40% of the experiments.

Histamine release induced by L-NAME, L-NMMA and L-ARG was significantly smaller (<10%) than that induced by compound 48/80 (>40%). Our results indicate that the inhibition of rat paw oedema observed with low doses of L-NAME is due to NO synthesis inhibition. The potentiation of BK- and 5-HT-induced paw oedema observed with higher doses of all arginine analogues is caused by *in vivo* mast cell degranulation. However, this latter phenomenon is probably due to the cationic charge of these substances rather than to the involvement of NO.