

ANTÓNIO ALBINO COELHO MARQUES ABRANTES TEIXEIRA

**EFEITOS TRÓFICOS DA INERVAÇÃO
SIMPÁTICA.
PAPEL DA ADENOSINA**

PORTO, 1992

ANTÓNIO ALBINO COELHO MARQUES ABRANTES TEIXEIRA

**EFEITOS TRÓFICOS DA INERVAÇÃO
SIMPÁTICA.
PAPEL DA ADENOSINA**

PORTO, 1992

*Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Medicina do Porto.*

O trabalho experimental e a execução gráfica foram parcialmente subsidiados pelo Instituto Nacional de Investigação Científica.

Artº 48º, § 3º

*«A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação»
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 1937)*

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

• Professores Efectivos

- Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís da Rocha Tomé Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Celso Renato Rodrigues Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor João da Siva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral

Doutor José Pinto de Barros
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Henrique José Ferreira Lecour de Menezes
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego C. S. M. Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Teixeira Amarante Junior
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

• *Professores Jubilados*

Doutor Abel José da Costa Sampaio Tavares

Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos

Doutor António Fernandes da Fonseca

Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida

Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima

Doutor Casimiro Águeda de Azevedo

Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira

Doutor Francisco de Sousa Lé

Doutor João Costa

Doutor Joaquim José Monteiro Bastos

Doutor José Ruiz de Almeida Garrett

Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz

Doutor Manuel José Bragança Tender

• *Doutores Honorários*

Doutor Maurice Mercadier

Doutor Ullrich Georg Trendelenburg

Doutor Victor António Augusto de Sá Machado

Aos Meus Pais

À Deolinda

À Filipa
Ao Pedro
Ao Miguel

Aos Professores

Walter Friedrich Alfred Osswald
Maria Isabel Amorim Azevedo

**«We must always guard the liberties of mind
and remember that some degree of heresy is
often a sign of health in spiritual life».**

U.S. von Euler (1962) *Circulation*, 26, 1233.

É lugar comum dizer-se que os Serviços de Farmacologia e de Terapêutica Geral da nossa Faculdade constituem, para além de escola de ciência, uma escola de humanidade. Como em todas as escolas fecundas, nela têm crescido muitos discípulos com a natural e humana diversidade. São, no entanto, facilmente rastreáveis os traços comuns. Um dos mais significativos é o de todos se identificarem no gosto de referirem a origem. Para isso contribuíram, primeiro, e só sei de o ouvir contar, o Professor Malafaya Baptista, e, pouco mais tarde, e disso já posso dar testemunho pessoal, os Professores José Garrett e Walter Osswald, e muitos dos seus seguidores. Não esqueço o muito que lhes devo. Aqui fica a expressão simples de gratidão aos fundadores, pela obra que criaram e pelo apoio com que sempre me distinguiram.

Tendo desde o início estabelecido como projecto de vida a prática de actividade clínica associada à da investigação e da docência na farmacologia, nunca me senti dividido no desempenho das duas funções. Pelo contrário, o exercício da minha actividade clínica foi enriquecido, em rigor e domínio metodológico, pela formação e conhecimentos adquiridos com as actividades docente e investigacional no âmbito da Terapêutica Geral e da Farmacologia. Em contrapartida, a experiência clínica tem sido fecunda para o exercício destas funções.

A escolha do problema nuclear desta tese surgiu naturalmente durante a execução de trabalhos que fizeram parte da minha iniciação às técnicas e metodologia em uso no nosso laboratório. Estes trabalhos eram conduzidos pelo interesse do Professor Walter Osswald pelos efeitos tróficos da inervação simpática, e da Professora Isabel Azevedo,

pelas acções do mediador simpático nos núcleos das células efectoras. Assim nasceu o meu entusiasmo pelo tema. A história do percurso dos trabalhos que culminam com a redacção desta proposta de interpretação é um pouco o relato das "conjecturas e refutações" que lhe subjazem (segundo o trajecto que Karl Popper descreve como sendo o da ciência). Quando o trabalho começa a estar estruturado, algumas das conjecturas e muitas das refutações de que foi feito o percurso ficam esquecidas, subsistindo as que, tendo sido postas à prova experimental, lhe resistiram. As que servem de conclusão à minha proposta de interpretação são passíveis de ser submetidas a novas provas e algumas serão, seguramente, geradoras de novas conjecturas.

Este trabalho, como é óbvio, não seria possível sem o contributo de muitas pessoas.

Ao Professor Walter Osswald, à sua disponibilidade para aceitar o diverso, à sua abertura à exploração de novos caminhos, à sua afabilidade não desprovida de exigência crítica, a minha admiração.

Com a Professora Isabel Azevedo dei os primeiros passos na aprendizagem da morfo-farmacologia, e neles ganhei a admiração pela sua persistência e pelo entusiasmo, sempre fresco, com que se dedica aos projectos de investigação que inicia.

Aos Professores Rodrigues Pereira e Serafim Guimarães agradeço o apoio constante com que quiseram favorecer-me.

Senti sempre a atenção amiga dos Professores Fernando Brandão e Jorge Tavares.

Aos Professores Daniel Moura e Patrício Soares da Silva quero agradecer o estímulo e ajuda constantes que quiseram e souberam propiciar-me.

Às Senhoras D. Domingas Branco Osswald e Doutora Maria Quitéria Paiva agradeço a ajuda na aprendizagem da propedêutica laboratorial e o interesse continuado pelo progresso do meu trabalho.

Ao grupo de Farmacologistas do Instituto Gulbenkian de Ciência,

na pessoa do Professor Alexandre Ribeiro, quero expressar a minha gratidão pela ajuda prestada na pesquisa bibliográfica e na escolha de fármacos adequados às minhas circunstâncias experimentais.

Ao Professor Jorge Polónia e à Dr^a Alexandra Matias o agradecimento pela atenção que dispensaram aos trabalhos em que colaborámos.

A ajuda eficiente e sempre pronta no trabalho de laboratório das Senhoras D. Maria Luísa Vasques, D. Manuela Moura, D. Prazeres Cleto e D. Paula Serrão foi imprescindível para a execução deste trabalho.

Às Senhoras D. Aida Camarinha, D. Eva Abrantes e D. Fernanda Adrião, e ao Senhor José Martins agradeço a paciente actividade de secretariado.

Aos Senhores Aldovino Sousa e Abílio Nunes e às Senhoras D. Mabilde Gomes, D. Maria Irene e D. Deolinda Martins, que, no exercício das suas actividades no laboratório, possibilitaram o curso fluido dos trabalhos, o meu obrigado.

Aos companheiros de actividade hospitalar do Serviço de Medicina 4, e do seu sector de Reumatologia, do Hospital de S. João, agradeço o interesse que sempre mostraram no percurso deste trabalho.

A todos os amigos o meu agradecimento sentido.

Não esqueço o interesse amigo da Professora Maria Helena Fernandes e da Professora Margarida Caramona, do Doutor José Guilherme Monteiro e do Professor António Sarmento, e dos Drs. Afonso Esteves, Alberto Mota, António Dinis, Berta Carvalho, Carlos Amaro Neves, Domingos Araújo, Fátima Martel, Manuel Matos, Manuel Pestana, Manuel Vaz da Silva, Nuno Borges, Pedro Nunes, Rosa Begonha e Tiago Guimarães.

Agradeço ao colega Luís Almeida a prestimosa ajuda na elaboração gráfica deste trabalho.

À família, meus pais, minha mulher e meus filhos dedico esta dissertação.

**ALGUNS DOS RESULTADOS APRESENTADOS NESTA
DISSERTAÇÃO CONSTAM DOS SEGUINTE TRABALHOS:**

ALBINO-TEIXEIRA A, AZEVEDO I, BRANCO D, OSSWALD W (1990) Purine agonists prevent trophic changes caused by sympathetic denervation. *Eur J Pharmacol* 179: 141-149.

ALBINO-TEIXEIRA A, MATIAS A, SOARES-DA-SILVA P, SARMENTO A, AZEVEDO I (1990) Effects of sympathetic denervation on liver fibroblasts: prevention by adenosine. *J Auton Pharmac* 10: 181-189.

ALBINO-TEIXEIRA A, POLÓNIA J, AZEVEDO A (1990) Sympathetic denervation causes atrial natriuretic peptide-storing granules to appear in the ventricular myocardium of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 241-244.

ALBINO-TEIXEIRA A, AZEVEDO I, MARTEL F, OSSWALD W (1991) Superoxide dismutase partially prevents sympathetic denervation by 6- hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 36-40.

ALBINO-TEIXEIRA A, MATIAS A, POLÓNIA J, AZEVEDO I (1991) Blockade of adenosine receptors causes hypertension and cardiovascular structural changes in the rat. *J Hypertension* 9(suppl 6): S196-197.

A contribuição pessoal consistiu na:

- 1 – colaboração no planeamento do protocolo experimental;
- 2 – realização de experiências;
- 3 – colaboração na apreciação e discussão dos resultados;
- 4 – colaboração na elaboração dos trabalhos.

ÍNDICE

I - Introdução Geral	25
II - Efeitos da desnervação simpática no coração, na artéria mesentérica e na veia safena de Cão – papel dos agonistas purinérgicos	37
Introdução	37
Materiais e métodos	42
Simpaticectomia cirúrgica	42
Simpaticectomia química	42
Infusão de fármacos	43
Doseamento de noradrenalina	43
Avaliação estatística	44
Fármacos utilizados	44
Estudo morfológico	45
Resultados	46
Veias safenas	46
Teor de noradrenalina	46
Morfologia	47
Coração e artérias mesentéricas	49
Teor de noradrenalina	49
Morfologia	50
Discussão	52
III - Efeitos da desnervação simpática no fígado de Cão – papel dos agonistas purinérgicos	59
Introdução	59
Materiais e métodos	60
Simpaticectomia química	60
Reserpinização	60
Infusão de adenosina	60

Doseamento de noradrenalina	61
Estudo morfológico	61
Avaliação estatística	62
Resultados	62
Teor de noradrenalina	62
Morfologia	63
Discussão	65
IV - A dismutase do superóxido previne parcialmente a desnervação simpática causada pela 6-hidroxiopamina	71
Introdução	71
Materiais e métodos	73
Simpaticectomia <i>in vitro</i>	73
Captação neuronal de noradrenalina tritiada	73
Estudo da inativação da 6-hidroxiopamina durante a incubação	74
Simpaticectomia química no animal inteiro	74
Avaliação estatística	75
Fármacos utilizados	75
Resultados	76
Teor de noradrenalina	76
Captação neuronal de noradrenalina	78
Inativação da 6-hidroxiopamina durante a incubação	78
Morfologia	79
Discussão	79
V - Efeitos da desnervação simpática no coração do Rato – aumento do peptídeo natriurético auricular	85
Introdução	85
Materiais e métodos	86
Simpaticectomia química	86
Doseamento do peptídeo natriurético auricular	86
Resultados	87
Discussão	88

VI - A infusão prolongada de um bloqueador de receptores da adenosina determina alterações tróficas cardiovasculares	95
Introdução	95
Materiais e métodos	97
Infusão de DPSPX no Cão	97
Infusão de DPSPX no Rato	97
Resultados	98
Infusão de DPSPX no Cão	98
Teor de noradrenalina	98
Morfologia	99
Infusão de DPSPX no Rato	99
Evolução da pressão arterial	99
Teor de noradrenalina	100
Morfologia	100
Discussão	101
VII - Discussão geral	107
Resumo e conclusões	125
Summary and conclusions	131
Bibliografia	137

Capítulo I

INTRODUÇÃO GERAL

A destruição ou inactivação funcional de um órgão para estudar a sua participação em processos fisiológicos é um dos procedimentos clássicos da investigação biológica. Extensamente utilizados em metodologia experimental para o estudo do sistema nervoso simpático, os métodos de desnervação permitiram estudar os locais de síntese, armazenamento e metabolização do mediador simpático, bem como o papel da captação neuronal na inactivação da noradrenalina. Embora de há muito fosse conhecido o facto de a supressão da inervação motora dos músculos estriados se acompanhar de atrofia do órgão efector, não eram macroscopicamente aparentes alterações das estruturas privadas da inervação simpática. No entanto, a evidência de que a desnervação simpática era algo mais do que a simples ausência de nervos foi-se acumulando. Para além dos efeitos específicos atribuíveis à ausência de nervos simpáticos, havia alterações funcionais nos órgãos efectores (Trendelenburg e Weiner, 1962; Fleming, 1963; Trendelenburg, 1963 a,b; Fleming e Westfall, 1988) descritas como a supersensibilidade da desnervação. Do mesmo modo, os estudos de Guimarães et al. (1971), Osswald e Branco (1973) e Teixeira (1977) mostraram que o efeito da cocaína, inibidor clássico da captação neuronal, na remoção e acumulação de catecolaminas, era menos marcado que o que resultava da desnervação simpática. Os resultados de Branco et al. (1984), evidenciando que a

desnervação simpática da veia safena de Cão se acompanhava de diminuição da captação e metilação da noradrenalina e da isoprenalina pelo sistema de captação extraneuronal sensível aos corticosteroides, permitiram reinterpretar aqueles dados (Azevedo e Osswald, 1986). A desnervação simpática acompanha-se ainda de aumento de receptores β nas estruturas efectoras (Glaubiger et al., 1978; Arnett e Davis, 1979; De Peusner et al. 1979 a,b; Bobick et al, 1980; Fleming e Westfall, 1988).

Um aspecto não menos fascinante desta interacção entre a inervação simpática e as estruturas inervadas resultou da demonstração de que a desnervação provocava um acréscimo marcadíssimo na produção do factor de crescimento neuronal (Ebendal et al., 1980; Olson et al., 1981; Kanakis et al., 1985) aumentando a possibilidade de sobrevivência dos axónios poupados.

As publicações referindo modificações estruturais nos órgãos efectores em consequência da desnervação simpática são em menor número, surgiram mais tardiamente e com resultados aparentemente contraditórios. Assim, Bevan (1975) e Bevan e Tsuru (1980) descreveram, em coelhos jovens, após ablação do gânglio cervical superior, uma diminuição da espessura da parede da artéria central da orelha ipsilateral com menor número de células musculares lisas e um decréscimo da actividade de síntese de ADN. De modo diverso, a desnervação simpática de coelhos mais velhos não alterava o número de células musculares. Também a veia porta de Rato sofre modificações distintas, dependendo da idade dos animais, após a desnervação simpática. Nos ratos jovens, após a simpaticectomia, verifica-se um decréscimo da área de secção transversal da veia porta (Ljung et al., 1979). Pelo contrário, nos ratos adultos o mesmo procedimento determina um aumento significativo da mesma área (Sutter e Ljung,

1977). Aprigliano e Hermsmeyer (1977) descreveram despolarização parcial na veia porta de ratos recém-nascidos simpaticectomizados pela 6-hidroxidopamina, e atribuíram este efeito à remoção da ação trófica da inervação simpática, sugerindo que houvesse alterações iônicas dependentes da ação trófica do sistema nervoso simpático nos vasos sanguíneos. Há também relatos de hipertrofia das células musculares após a simpaticectomia na aorta de Coelho (Fronek, 1980, 1983), no *expansor secundariorum* do Pinto (Campbell et al., 1977, 1980), na veia safena de Cão, e nas artérias central da orelha de Coelho (Branco et al., 1984) e cerebral média de ratos e coelhos (Dimitriadou et al., 1988).

Um contributo significativo para a valorização dos efeitos tróficos da inervação simpática resultou das experiências de reinervação de tecidos após transplante para a câmara anterior do olho. Os tecidos transplantados são reinervados a partir da inervação da íris do olho hospedeiro. Esta metodologia permite avaliar o desenvolvimento e diferenciação dos tecidos transplantados, relacionando-os com a evolução da reinervação (Burnstock, 1980, 1981; Campbell et al., 1980; Hermsmeyer e Aprigliano, 1980). Foi assim que Tucker e Gist (1986) verificaram que a inervação simpática promovia o crescimento da aurícula fetal do Rato, acelerando a divisão celular e aumentando as dimensões individuais das células musculares. No mesmo modelo experimental, Campbell et al. (1980) e Abel e Hermsmeyer (1981) verificaram que quando implantavam fragmentos da artéria da cauda de ratos jovens espontaneamente hipertensos (SHR) ou controlo (WKY) na câmara anterior do olho de ratos da mesma estirpe ou da que servia para comparação, estes adquiriam, após a reinervação, as características das células do hospedeiro. Nas câmaras inervadas os vasos adquiriram as características (potencial de repouso, sensibilidade à noradrenalina)

próprias do hospedeiro. Contudo, quando transplantadas para câmaras previamente desnervadas, as artérias mantinham as propriedades de membrana próprias do dador, não se convertendo às do animal receptor.

Embora as circunstâncias em que se efectuam as culturas de células, de tecidos e de órgãos tornem a sua interpretação difícil, estas experiências têm permitido evidenciar efeitos tróficos de nervos simpáticos ou do mediador nas células musculares lisas. Os nervos simpáticos retardam o processo de desdiferenciação e proliferação das células musculares em cultura (Chamley et al., 1974; Chamley e Campbell, 1975, 1976; Burnstock, 1981).

A supersensibilidade à noradrenalina da veia porta do Rato em cultura de órgão (Abel et al., 1980) e a da veia onfalomesentérica de Galinha em cultura celular (Hermsmeyer e Aprigliano, 1980) seriam consequência da desnervação simpática. Esta supersensibilidade era suprimida quando se juntava noradrenalina ao meio de cultura. Em condições experimentais análogas, os nervos simpáticos aumentavam a formação de nexos entre as células musculares lisas, bem como a formação de feixes musculares (Chamley et al., 1974).

A noradrenalina foi logicamente o primeiro candidato considerado quando se procurava identificar o factor ou factores responsáveis pelas acções tróficas da inervação simpática. Muitos estudos documentam efeitos das catecolaminas que poderiam justificar a aceitação do seu papel como factores tróficos. As catecolaminas alteram processos metabólicos (Ellis, 1980), modificam a síntese de proteínas específicas do miocárdio (Naftchi et al, 1979), interferem no metabolismo dos ácidos nucleicos (Casti et al., 1977; Russel et al., 1976) e no controlo da proliferação celular (Whitfield, 1980). Em células miocárdicas isoladas a noradrenalina aumenta a

síntese do ARN e a síntese proteica (Simpson, 1985).

São vários os mecanismos pelos quais a noradrenalina pode actuar, ou melhor, os mecanismos de transdução dos fenómenos desencadeados na membrana celular, previsivelmente após activação de receptores, para o subsequente aumento de actividade metabólica e de crescimento celular. Os agonistas dos receptores α_1 estimulam a produção de diacilglicerol (Brown e Buxton, 1985); a activação da fosfocínase C (PKC), promovida pelo diacilglicerol pode induzir a expressão de proto-oncogenes e modular o crescimento celular subsequente (Nishizuka, 1988); por activação de receptores α_1 pode também aumentar a expressão de proto-oncogenes c-myc (Starksen et al., 1986) e verificar-se em células do miocárdio de recém-nascidos reorientação na produção de ácido ribonucleico mensageiro (ARN_m) e proteínas de β miosina de cadeia pesada, própria das células de adulto, para β miosina fetal (Waspe et al., 1990). Contudo, os estudos em células miocárdicas de ratos adultos demonstraram um acréscimo global da síntese proteica (Fuller et al., 1990), mas não da síntese de proteínas contrácteis (Dubus et al., 1990). Estas diferenças poderiam dever-se a mudanças no decurso do desenvolvimento das células do recém-nascido, ainda em divisão, para a sua situação terminal, diferenciada, do adulto, que se traduziriam por diminuição do número ou sensibilidade de receptores α_1 (Schaffer e Williams, 1986). Para além disso, e porque as células neonatais diferem bioquímica, fisiológica e farmacologicamente (Claycomb, 1983; Cooper, 1987) das suas equivalentes maduras, não é inesperado que a regulação do crescimento possa diferir marcadamente nas duas situações.

O aumento do AMP cíclico intracelular incrementa a síntese proteica em geral (Xenophontos et al., 1988). Os receptores β_1 acoplados à adenilciclase estimulam, quando activados, a sua

produção. Contudo, com a isoprenalina, apenas se verifica um aumento de proteínas não contrácteis (Dubus et al., 1990). O aumento de fluxo iónico desencadeado pelos agonistas simpáticos, particularmente de sódio, tem-se associado com o início do crescimento das células.

Os modelos de regeneração hepática após hepatectomia ou de estudo *in vitro* de células hepatocitárias também têm permitido estudar algumas das acções tróficas das catecolaminas. Estas, em modelos de proliferação hepatocitária *in vitro*, não estimulam directamente a síntese de ADN, mas podem modular a síntese desencadeada por outros factores. Em estadios iniciais da regeneração hepática após hepatectomia tem-se demonstrado (Cruise et al., 1987) que o bloqueio de receptores α_1 abole a primeira onda de síntese de ADN, usualmente manifesta às 24 horas. Também *in vitro*, em culturas de hepatócitos, se verificou que a noradrenalina, não tendo efeitos mitogénicos directos (Cruise et al., 1985), aumenta o efeito mitogénico de factores de crescimento e diminui os efeitos de factores inibitórios do crescimento, propriedades normalmente atribuídas às substâncias designadas por factores tróficos co-mitogénicos (ou desencadeantes de crescimento). A noradrenalina aumenta o efeito mitogénico de factores de crescimento tais como o factor de crescimento epidérmico (EGF), não tendo isoladamente qualquer acção mitogénica (Cruise et al., 1986). Este efeito é mediado por receptores α_1 .

Por outro lado, a noradrenalina, também por acção sobre receptores α_1 , antagoniza o efeito inibidor da mitogénese do factor β transformador do crescimento (TGFB) (Houck et al., 1988; Houck e Michalopoulos, 1989). Todos estes estudos mostram que a noradrenalina, não sendo um factor mitogénico completo para os hepatócitos, exerce efeito modulador da acção de mitogénicos e de inibidores da mitogénese, podendo modificar a proliferação celular.

As alterações descritas na veia safena de Cão após desnervação simpática por clampagem, quer as funcionais (redução da capacidade de acumulação e metilação de catecolaminas pelo sistema extraneuronal), quer as estruturais (aumento significativo das dimensões das células musculares lisas e dos fibroblastos; aumento do volume nuclear com nucléolos proeminentes; acumulação de retículo endoplasmático rugoso; aumento do número de fibroblastos; aparecimento de mastócitos), apontam para uma desdiferenciação das células efectoras, que aumentam a actividade de síntese quando privadas da inervação simpática (Branco et al., 1984). Este efeito trófico, de carácter restritivo, na modulação do fenótipo das células efectoras não parece dever-se ao mediador simpático, pois se verificou que a infusão contínua de noradrenalina, por via intravenosa, não previne as alterações morfológicas e funcionais causadas pela desnervação simpática (Branco et al., 1984). Na sequência deste estudo demonstrou-se que a noradrenalina não só não prevenia as alterações decorrentes da simpaticectomia, como determinava modificações idênticas às da desnervação (degenerescência de terminais simpáticos da veia safena contralateral, modificações do fenótipo das células musculares lisas vasculares, diminuição da captação e metilação de isoprenalina) (Albino-Teixeira et al., 1989). Estes resultados, evidenciando a ineficácia da noradrenalina na prevenção das modificações estruturais e funcionais da veia safena de Cão desnervada cirurgicamente, conduziram à tentativa de identificação de outros factores responsáveis pelas acções tróficas dos nervos simpáticos.

Os resultados obtidos até ao início deste estudo suscitaram algumas questões e a proposta nuclear de que os efeitos tróficos da inervação simpática se poderiam dever à acção do ATP ou dos seus metabolitos.

A proposta inicial era a de verificar se a infusão de agonistas purinérgicos permitia prevenir as alterações causadas pela desnervação. Não era possível infundir ATP porque era rapidamente metabolizado, tornando difícil distinguir os seus efeitos directos dos dos seus metabolitos. Os análogos estáveis do ATP, então disponíveis, também não eram adequados para serem utilizados nas condições dos modelos experimentais que vínhamos estudando (por razões de potência e solubilidade, e por exercerem antagonismo parcial dos receptores).

Optámos, assim, pela infusão de adenosina e do seu análogo 5'-N-etilcarboxamidoadenosina. Utilizámos ainda a inosina por ser o metabolito da adenosina e não estarem descritos efeitos seus sobre os receptores adenosinérgicos, servindo assim de contra-prova à hipótese de que não se tratava de efeitos bioquímicos intracelulares da adenosina, mas antes de efeito mediado por receptores que ela activava.

Como algumas das alterações descritas poderiam ser atribuídas às condições particulares do modelo de desnervação simpática estudado (anoxia durante 5 minutos do segmento de veia safena a desnervar), resolvemos comprovar se se verificava o mesmo padrão de alterações após a desnervação da veia safena por outro processo (simpaticectomia química pela 6-hidroxi-dopamina).

Tendo-se demonstrado que as alterações eram similares, estendeu-se a este modelo o estudo dos efeitos dos agonistas purinérgicos. Sabendo-se que os efeitos tróficos da inervação simpática eram também evidenciáveis no miocárdio e no fígado, procurámos verificar se os factores em estudo eram igualmente intervenientes nestas estruturas. Como se verificou que a infusão de noradrenalina tinha efeitos neurotóxicos evocadores dos descritos para a 6-hidroxi-

dopamina, procurámos estudar os mecanismos que explicam esta similitude.

Quando finalmente se pôde dispor de um bloqueador de receptores da adenosina com propriedades de potência e solubilidade adequadas à utilização nos nossos modelos experimentais, procurámos verificar se a sua infusão causava alterações tróficas idênticas às da desnervação simpática.

Capítulo II

EFEITOS DA DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA NO CORAÇÃO, NA ARTÉRIA MESENTÉRICA E NA VEIA SAFENA DE CÃO - PAPEL DOS AGONISTAS PURINÉRGICOS

INTRODUÇÃO

A participação das purinas no metabolismo celular, na replicação e na comunicação intercelular tem atraído crescente atenção desde que foi descrita a sua intervenção na regulação de processos fisiológicos (Drury e Szent-Gyorgyi, 1929; Berne, 1964). O reconhecimento do papel fisiológico dos nucleotídeos e nucleosídeos purinérgicos na modulação de respostas celulares foi reforçado com o conhecimento de que o ATP coexiste com a noradrenalina nas vesículas dos terminais simpáticos (Schumann, 1958; Stjärne e Lishajko, 1966; Geffen e Livett, 1971; Lagercrantz e Stjärne, 1974; Richards e Da Prada, 1977; Burnstock, 1978), que são dotadas de sistema de captação de ATP e de outros nucleotídeos (Kostron et al., 1977; Winkler, 1977; Aberer et al., 1979).

É muito variável a relação descrita entre o conteúdo de noradrenalina e o de ATP nas vesículas, tendo-se referido valores entre 4 e 60 (Fredholm et al., 1988; Burnstock, 1990). Também nas vesículas das células cromafins da suprarrenal se identificou ATP coexistindo com a noradrenalina (Hillarp et al., 1955; Blaschko et al., 1956; Von

Euler et al., 1963).

A libertação conjunta de noradrenalina e ATP, inicialmente estudada nas *taenia coli* de Cobaia (Su et al., 1971) após incorporação de adenosina tritiada, foi depois sugerida, na vesícula seminal de Cobaia por Nakanishi e Takeda (1973), e verificada, em vasos de Coelho por Su (1975), tendo depois sido descrita em variadas preparações (tecido adiposo de Cão, rim de Coelho, canal deferente de Cobaia, membrana nictitante de Gato, veia porta de Coelho e canal deferente de Rato), nas quais a estimulação simpática é acompanhada de libertação de purinas. O ATP libertado dos terminais nervosos pode actuar directamente sobre receptores da membrana celular das estruturas inervadas, ou indirectamente, após a sua metabolização em adenosina. O ATP libertado é rapidamente inactivado por ecto-ATPases e ecto-nucleotidases (Gordon, 1986) formando-se adenosina que é modulador da libertação de diversos neurotransmissores (Su et al., 1971; Fredholm, 1976; Burnstock, 1978; Ribeiro e Sebastião, 1991). A capacidade das ectonucleotidases formarem adenosina a partir do ATP foi proposta como processo regulador da comunicação intercelular (Williams, 1989).

A adenosina, para além de poder ser formada por hidrólise extracelular do ATP por acção de ecto-nucleotidases, pode ser libertada para o meio extracelular a partir das células. O ATP pode ser formado dentro das células a partir da adenosina captada de novo ou recaptada após libertação. Ambos os processos estão intimamente envolvidos nas vias energéticas intracelulares. Este facto dificultou a aceitação de que as mesmas substâncias pudessem actuar como mensageiros de célula para célula. A esta dificuldade conceptual acrescia a que resultava do conhecido papel dos neurotransmissores e da especificidade dos mecanismos da sua síntese, de armazenamento em estruturas especializadas, de libertação e metabolização. Ora

estes quesitos não eram totalmente preenchidos por estes “candidatos” a mediadores. A interpretação proposta por Williams (1989) foi a de que a adenosina funciona como agente efector “parácrino”, e assim o estado metabólico tecidual e concomitantes necessidades energéticas determinariam os níveis extracelulares da adenosina. Em contraste, o ATP funcionaria como cotransmissor, sendo libertado com os neurotransmissores clássicos para a fenda sináptica.

A degradação extracelular do ATP é rápida, nela podendo estar envolvidas várias enzimas (Gordon, 1986). Assim, alguns dos efeitos do ATP podem dever-se a actuação sobre receptores A_1 ou A_2 , após metabolização em ADP e adenosina (Moody et al., 1984).

Em 1978 Burnstock propôs uma classificação de receptores purinérgicos em P_1 e P_2 assente em quatro critérios: a potência relativa do ATP, do AMP e da adenosina; a acção selectiva dos antagonistas; a activação ou inibição da adenilciclase pela adenosina, mas não pelo ATP; a indução da síntese de prostaglandinas pelo ATP, mas não pela adenosina. Partindo destes critérios, Burnstock designou como receptores purinérgicos P_1 aqueles para os quais a adenosina e o AMP são agonistas preferenciais, as metilxantinas são antagonistas competitivos e de cuja activação resulta a inibição ou estimulação da adenilciclase. Os receptores P_2 respondem melhor ao ATP e ADP do que ao AMP e à adenosina, não são antagonizados pelas metilxantinas, não têm como segundo mediador o sistema da adenilciclase e a sua activação acompanha-se de síntese de prostaglandinas.

Os receptores purinérgicos P_1 subdividem-se em A_1 e A_2 , de acordo com as potências relativas de análogos da adenosina, e também em função da activação da adenilciclase (Van Calker et al., 1979; Londos et al., 1980; Ribeiro e Sebastião, 1986; Burnstock, 1989). De modo geral, os receptores A_1 são preferencialmente activados por análogos da adenosina substituídos em N^6 , enquanto que os

A_2 mostram preferência pelos substituídos em 5'. Assim, o escalonamento com base na potência relativa para os agonistas dos receptores A_1 é o seguinte (por ordem decrescente): L-N⁶-fenilisopropiladenosina (L-PIA), N⁶-cicloexiladenosina (CHA) > 2-cloroadenosina (CADO) > 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA), D-N⁶-fenilisopropil-adenosina (D-PIA), e a sua activação acompanha-se de decréscimo da actividade da adenilciclase. A seriação em relação aos receptores A_2 é NECA > CADO > L-PIA, CHA e após a sua activação há aumento da actividade da adenilciclase. Embora obedecendo a estes padrões, a posição relativa dos agonistas neste escalonamento varia de tecido para tecido. A caracterização das acções da adenosina padecia assim de limitações resultantes de, até há pouco tempo, não haver agonistas e antagonistas específicos para cada um dos receptores. Esta limitação é acrescida pela variabilidade das potências relativas dos agonistas adenosinérgicos dependente da espécie. Também se verificam diferenças no mesmo animal, de tecido para tecido, tornando a actividade dos agonistas e bloqueadores variável em função da proveniência do receptor em estudo. Esta variabilidade é por vezes significativa e de diferentes ordens de magnitude. Recentemente têm-se desenvolvido antagonistas específicos (Ukena et al., 1986; Schwabe et al., 1988; Trivedi e Bruns, 1988), o que permitirá melhor esclarecimento destes mecanismos. Ribeiro e Sebastião (1986) propuseram um subtipo de receptor que designaram por A_3 , identificável no coração e em terminais nervosos, não acoplado à adenilciclase. Outro local activado pela adenosina, e que modula a adenilciclase, tem localização intracelular, não é bloqueável pelas xantinas e tem-se designado por P (Haslam et al., 1978; Londos et al., 1980).

Um exemplo, embora ainda com larga margem especulativa, de efeitos de modulação fenotípica dependentes das purinas, é o que tem

sido descrito no sistema nervoso central. Aqui há conexões sinápticas que são susceptíveis de serem modificadas funcionalmente e morfológicamente por estímulos externos. Estes mecanismos de plasticidade sináptica subjazem a processos de aprendizagem e memória (Tsukahara, 1981). Kuroda (1989) propôs um papel fisiológico para o ATP e adenosina na regulação da plasticidade sináptica no sistema nervoso central. O ATP e a adenosina influenciariam a memória, condicionando a sinaptogénese (a formação, estabilização para o ATP e inibição lateral para a adenosina), com eliminação selectiva de sinapses não usadas. Demonstrou-se ainda que a adenosina aumenta a actividade da hidroxilase da tirosina em sinaptossomas provenientes do estriado de Cobaia (Kuroda e Kobayashi, 1978), facto também verificado em células cromafins da suprarrenal em cultura (Kuroda et al., 1982).

Outro campo de crescente atenção ao papel da adenosina é o das situações de hipoxia, anoxia/reperfusão e neoangiogénese. A angiogénese verificada em circunstâncias de hipoxia tem motivado estudos com o objectivo de identificar o factor ou factores que a promovem. Em culturas de células endoteliais, a adenosina e a hipoxia estimulam o crescimento celular, e este efeito é antagonizado pela 8-fenilteofilina em ambas as circunstâncias (Meininger, 1988). A densidade da rede capilar da membrana corioalantoideia do embrião de Pinto é aumentada quando se implanta um sistema de libertação prolongada de adenosina (Dusseau et al, 1986). Este efeito é parcialmente antagonizado pelo bloqueador dos receptores da adenosina 3-isobutil-1-metilxantina (Dusseau e Hutchins, 1988). A administração prolongada de adenosina aumenta a densidade da rede capilar no miocárdio e nos músculos esqueléticos (Ziada et al., 1984).

Há também evidência experimental de que a adenosina é um factor quimiotático para os leucócitos, bem como para as células

endoteliais (Meininger, 1988). De maior relevo para a tese em defesa é o conhecimento de que as células musculares lisas têm receptores A_2 (Anand-Srivastava, 1982) e também A_1 que medeiam alterações bidireccionais de inibição ou de estimulação, na formação de AMP cíclico e na síntese de ADN (Jonzon et al., 1985).

MATERIAIS E MÉTODOS

Simpaticectomia cirúrgica

Cães de raça indeterminada pesando 8 a 16 kg eram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg), injectado por via endovenosa numa das patas anteriores. A veia safena lateral era exposta e dissecada do tecido subcutâneo adjacente. Efectuava-se a desnervação colocando pinças arteriais no tronco principal da veia imediatamente a montante da junção dos ramos dorsal e plantar e cerca de 5 cm acima. As pinças eram removidas após 5 minutos. A incisão operatória era suturada com seda. Injectava-se 10^6 unidades de penicilina clemizole por via intramuscular e, após recobro anestésico, mantinha-se os animais em gaiolas individuais com acesso livre a alimentos e água. Cinco dias após a cirurgia eram reoperados sob o mesmo tipo de anestesia, removendo-se fragmentos de veias controlo e desnervadas.

Simpaticectomia química

Outro grupo de cães, após indução anestésica, era injectado com 6-hidroxiopamina (6-OHDA) (10 mg/kg no dia 0 + 10 mg/kg no

dia 1) e sacrificado ao quinto dia, colhendo-se fragmentos do ventrículo esquerdo, de artérias mesentéricas e de veias safenas.

Infusão de fármacos

Utilizaram-se mini-bombas osmóticas Alzet (modelo 2ML1) para infundir prolongadamente e com débito constante os fármacos em estudo. Após preenchimento do reservatório com a solução a infundir, ligavam-se a catéteres finos de polietileno e eram colocadas em solução cloretada isotônica esterilizada, aquecida a 37°C, durante 4 horas, para que o líquido atingisse o topo do catéter e se estabilizasse o ritmo de infusão. As mini-bombas osmóticas eram implantadas no tecido celular subcutâneo da perna do cão na altura da dissecação para desnervação cirúrgica. Utilizava-se metodologia semelhante para implantação das bombas osmóticas no caso da desnervação química. O catéter era inserido no ramo plantar da veia safena desnervada e a incisão suturada. Cinco dias depois, quando os cães eram reoperados, verificava-se o estado funcional do dispositivo por inspeção visual do catéter (ausência de coágulos) e da bomba (lumen colapsado, medição do volume residual).

Recorrendo a esta metodologia infundi-se noradrenalina (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$), adenosina (10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$), inosina (10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) ou 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$).

Doseamento de noradrenalina

Cinco dias após a cirurgia ou após a primeira injeção de 6-OHDA, os cães eram reoperados, como se descreveu. Removiam-se segmentos das veias infundidas e contralaterais, das artérias mesentéricas e do ventrículo esquerdo, separavam-se fragmentos para estudo morfológico e o restante tecido era lavado em líquido de

Krebs, seco com papel de filtro, pesado e colocado em 2 ml de ácido perclórico (0,1 mol/l) durante 24 horas. Adicionava-se então 50 mg de alumina a aliquotas de 1,5 ml do ácido perclórico onde tinham permanecido os tecidos, o pH da amostra era ajustado a 8.6. As catecolaminas adsorvidas eram então eluídas da alumina em microfiltros Millipore (MF1) com 20 µl de ácido perclórico (0,1 mol/l); injectavam-se 50 µl de eluído num cromatógrafo líquido de alta pressão com detecção electroquímica (BAS modelo 302 LC4A). A fase móvel era uma solução desgaseificada de ácido cítrico (0,1 mol/l), acetato de sódio (0,1 mol/l), octilsulfato de sódio (0,5 mmol/l), EDTA (0,15 mol/l), dibutilamina (1 mmol/l) e metanol (10% v/v), perfundida com o fluxo de 1 ml/min. Utilizou-se um eléctrodo de pasta de carvão e o potencial de detecção era de 0,75 V. O padrão interno era a dihidroxibenzilamina, injectando-se noradrenalina em várias concentrações. O limite inferior de detecção de noradrenalina nas nossas condições era de 10 pg por amostra.

Avaliação estatística

Os resultados foram expressos como médias aritméticas \pm desvio padrão. Utilizou-se o teste t de Student para a comparação de médias e a diferença considerou-se significativa para $P < 0,05$.

Fármacos utilizados

A adenosina, a 6-hidroxiopamina (6-OHDA), a inosina, o bitartarato de l-noradrenalina e a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) adquiriram-se à Sigma chemical Company (St. Louis, MO, USA). A 6-hidroxiopamina era armazenada num exsiccador a 4°C e dissolvida num veículo contendo cloreto de sódio a 0,9% e ácido ascórbico (1 mg/ml), previamente borbulhado com azoto durante 5 minutos.

Estudo morfológico

Os fragmentos de tecidos eram fixados por imersão em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, durante 90 minutos à temperatura de 4°C. O tecido era então lavado durante a noite em tampão cacodilato com sacarose 0,6M a 4°C e pós-fixado numa solução de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, durante 1 hora à temperatura de 4°C. Procedia-se à desidratação com etanol e óxido de propileno e incluía-se em Epon 812 por forma a permitir seccionamento transversal. Cortes semifinos de cerca de 1 µm, obtidos num ultramicrotomo LKB (de 5 blocos de cada situação experimental), eram corados com azul de toluidina a 1% e bórax a 1% e observados no microscópio óptico. Todas as células musculares e núcleos de fibroblastos observados em cada secção (com exclusão das extremidades) eram desenhados com auxílio de câmara clara numa ampliação final de 860 vezes. Nas células musculares lisas tomava-se o diâmetro ao longo do menor eixo da secção da célula como o diâmetro real. Nos núcleos dos fibroblastos (escolhidos em vez da célula dada a forma muito irregular e variável do seu citoplasma) media-se o maior diâmetro e o eixo perpendicular. Estes dois valores eram então usados para calcular o diâmetro médio (\bar{D}) para cada núcleo (Weibel, 1973). Procedeu-se da mesma forma para efectuar as medições dos núcleos das células miocárdicas. Todas as medições foram efectuadas sob ocultação dos códigos experimentais até à sua conclusão. Cortes finos, obtidos num ultramicrotomo LKB, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, foram observados num microscópio electrónico Siemens Elmiskop a 80 KV.

RESULTADOS

VEIAS SAFENAS

Teor de noradrenalina

Os resultados do doseamento da noradrenalina nas veias safenas estão reunidos nas tabelas 1 e 2. Quer a desnervação cirúrgica (Tabela 1), quer a simpaticectomia química (Tabela 2) depletaram significativamente a noradrenalina da veia safena, reduzindo-a para valores inferiores a 10% dos valores de controlo. A infusão de adenosina, inosina ou 5'-N-etilcarboxamidoadenosina nas veias desnervadas cirurgicamente não preveniu a depleção da noradrenalina (Tabela 1). De igual modo, as veias safenas dos cães desnervados pela 6-hidroxiopamina e infundidos com adenosina apresentavam uma redução no teor de noradrenalina que não diferia da observada nos tratados exclusivamente com 6-hidroxiopamina (Tabela 2).

Tabela 1 - Teor de noradrenalina (NA) em $\mu\text{g/g}$, nas veias safenas de cães controlo, de cães desnervados cirurgicamente e de cães desnervados cirurgicamente e tratados com noradrenalina (NA), adenosina (A), inosina (I) ou 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA); valores expressos como média \pm desvio padrão.

	<i>n</i>	<i>Teor de noradrenalina</i>
Veia controlo	4	2,47 \pm 0,24
Veia desnervada	4	0,15 \pm 0,05*
Veia desnervada + NA (0,1 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	5	0,23 \pm 0,05*
Veia desnervada + A (10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	0,25 \pm 0,09*
Veia desnervada + I (10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	0,25 \pm 0,06*
Veia desnervada + NECA (0,1 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	0,24 \pm 0,07*

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$)

Tabela 2 - Teor de noradrenalina (NA) em $\mu\text{g/g}$, nas veias safenas de cães controle, de cães tratados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e de cães tratados com 6-OHDA + adenosina; valores expressos como média \pm desvio padrão.

	<i>n</i>	<i>Teor de noradrenalina</i>
Controlo	4	2,47 \pm 0,24
6-OHDA (10 + 10 mg/kg)	4	0,32 \pm 0,09*
6-OHDA (10 + 10 mg/kg) + A (10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	0,31 \pm 0,08*

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$)

Morfologia

As veias safenas dos cães desnervados pela 6-hidroxidopamina apresentavam alterações morfológicas similares às descritas em consequência da desnervação cirúrgica. Os terminais adrenérgicos apresentavam sinais de degenerescência (diminuição do número de vesículas, vesículas vazias, corpos densos). As células musculares lisas e os fibroblastos tinham núcleos de aspecto exuberante, ricos em eucromatina, com aumento do número de nucléolos, com numerosas indentações da membrana nuclear e aumento do retículo endoplasmático rugoso. Nas veias desnervadas identificava-se mastócitos, ausentes das veias safenas de controlo.

A morfometria em microscopia de luz permitiu confirmar que a desnervação se acompanhava de um aumento significativo das dimensões das células musculares lisas quer quando se procedia à desnervação cirúrgica por clampagem (Tabela 3), quer quando se efectuava a simpaticectomia química (Tabela 4), De igual modo as dimensões dos núcleos dos fibroblastos estavam significativamente aumentadas nos dois modelos experimentais (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Influência da noradrenalina (NA), Adenosina (A), inosina (I) e da 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) nos efeitos da desnervação cirúrgica sobre a morfologia da veia safena lateral do Cão. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. (*n* - número de cães tratados; número de células medidas \approx 500 em cada série experimental).

	<i>n</i>	<i>Diâmetro das células musculares lisas (μm)</i>	<i>Diâmetro médio do núcleo dos fibroblastos (μm)</i>
Veia controlo	4	6,10 \pm 0,70	3,76 \pm 0,90
Veia desnervada	4	9,70 \pm 0,20*	5,70 \pm 0,52*
Veia desnervada + NA (0,1 μ g/kg h ⁻¹)	5	10,09 \pm 1,52*	6,09 \pm 1,39*
Veia desnervada + A (10 μ g/kg h ⁻¹)	4	5,90 \pm 0,59**	4,48 \pm 1,10**
Veia desnervada + I (10 μ g/kg h ⁻¹)	4	9,60 \pm 0,31*	5,80 \pm 0,82*
Veia desnervada + NECA (0,1 μ g/kg h ⁻¹)	4	6,00 \pm 0,80**	4,42 \pm 1,00**

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$)

** Significativamente diferente da veia desnervada ($p < 0,005$)

A infusão de noradrenalina (0,1 μ g/kg h⁻¹) durante 5 dias não preveniu as alterações causadas pela desnervação cirúrgica. A adenosina (10 μ g/kg h⁻¹) e a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (0,1 μ g/kg h⁻¹), infundidas da mesma forma durante cinco dias, preveniram as alterações morfológicas das células musculares lisas e dos fibroblastos, causadas pela desnervação (Tabela 3). Nas preparações das veias safenas tratadas com adenosina ou 5'-N-etilcarboxamidoadenosina não se observaram mastócitos. A inosina (10 μ g/kg h⁻¹) não evitou as alterações morfológicas consequentes à desnervação (Tabela 3).

A adenosina (10 μ g/kg h⁻¹) preveniu totalmente as alterações morfológicas causadas pelo tratamento com a 6-hidroxiopamina, de forma análoga ao que se verificou com a desnervação cirúrgica. Assim, as células musculares lisas e os fibroblastos das veias dos animais tratados com 6-hidroxiopamina e adenosina não apresentavam sinais de aumento de actividade de síntese (Tabela 4) nem de desdiferenciação das células avaliadas.

Tabela 4 - Influência da adenosina (A) nos efeitos morfológicos da desnervação química (6-OHDA, 10 + 10 mg/kg) na veia safena lateral do Cão. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. (n - número de cães tratados; número de células medidas \approx 500 em cada série experimental).

	n	Diâmetro das células musculares lisas (μm)	Diâmetro médio do núcleo dos fibroblastos (μm)
Controlo	4	6,10 \pm 0,70	3,76 \pm 0,90
6-OHDA (10+10 mg/kg)	4	8,80 \pm 0,30*	5,30 \pm 0,48*
6-OHDA (10+10 mg/kg) + A(10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	5,95 \pm 0,62**	4,41 \pm 0,96**

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,001$)

** Significativamente diferente da veia desnervada ($p < 0,05$)

Verificou-se assim, que as dimensões destes tipos celulares não diferiam dos controlos. Também não foi possível identificar mastócitos nestas preparações.

CORAÇÃO E ARTÉRIAS MESENTÉRICAS

Teor de noradrenalina

Os resultados do doseamento da noradrenalina no coração e artérias mesentéricas (Tabela 5) evidenciam a depleção significativa de noradrenalina tecidual nos animais tratados com a 6-hidroxi-dopamina. Nos ventrículos verificou-se redução para valores inferiores a 10% dos valores controlo, enquanto que nas artérias mesentéricas a depleção foi menos intensa, atingindo, no entanto, valores inferiores a 20% dos valores de controlo. A infusão de adenosina não prevenia a depleção de noradrenalina causada pela simpaticectomia química.

Tabela 5 - Teor de noradrenalina (NA) no coração e artérias mesentéricas de cães controlo e cães tratados com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), adenosina ou 6-OHDA + adenosina (valores expressos como média \pm desvio padrão da média).

	n	NA ($\mu\text{g/g}$)	
		Ventrículo esquerdo	Artéria mesentérica
Controlo	4	570 \pm 29	4480 \pm 264
6-OHDA (10+10 mg/kg)	4	50 \pm 19*	998 \pm 226*
Adenosina (10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	566 \pm 32	4450 \pm 249
6-OHDA (10+10 mg/kg) + A(10 $\mu\text{g/kg h}^{-1}$)	4	54 \pm 23*	1024 \pm 296*

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,01$)

Morfologia

Os núcleos das células miocárdicas dos cães simpaticectomizados tinham um aumento significativo das dimensões (Tabela 6) e apresentavam maior número de nucléolos do que os núcleos das células ventriculares dos animais controlo. De igual modo, as dimensões dos núcleos dos fibroblastos estavam significativamente aumentadas nos ventrículos dos animais desnervados. As artérias mesentéricas de cães desnervados pela 6-hidroxi-dopamina apresentavam alterações morfológicas idênticas às descritas em consequência da desnervação das veias safenas. Os terminais adrenérgicos apresentavam sinais de degenerescência. As células musculares lisas e os fibroblastos tinham núcleos aumentados de volume de aspecto exuberante e era evidente marcado aumento do retículo endoplasmático rugoso.

Tabela 6 - Diâmetro médio do núcleo das células miocárdicas e fibroblastos do ventrículo de cães controle, tratados com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), adenosina ou 6-OHDA + adenosina; resultados expressos como média \pm desvio padrão da média (n - número de cães tratados; número de células contadas: 400 a 600).

	<i>n</i>	<i>Miócitos</i> (μm)	<i>Fibroblastos</i> (μm)
Controle	4	5,71 \pm 0,96	3,86 \pm 0,92
6-OHDA (10+10 mg/kg)	4	7,21 \pm 0,88*	5,32 \pm 0,44*
Adenosina (10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	5,81 \pm 0,99	3,74 \pm 0,76
6-OHDA (10+10 mg/kg) + A(10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	5,86 \pm 0,79	3,82 \pm 0,88

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,001$)

A morfometria em microscopia de luz permitiu confirmar que a simpaticectomia química se acompanhava de um aumento significativo das dimensões das células musculares lisas, bem como das dimensões dos núcleos dos fibroblastos (Tabela 7).

A adenosina (10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) preveniu totalmente estas alterações morfológicas quer no ventrículo esquerdo, quer nas artérias mesentéricas (Tabelas 6 e 7). Foi assim evidente que a adenosina prevenia os sinais de aumento da síntese e de desdiferenciação das células avaliadas, que acompanhavam a desnervação química.

Tabela 7 - Diâmetro médio das células musculares e dos núcleos dos fibroblastos da artéria mesentérica de cães controle e cães tratados com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), adenosina ou 6-OHDA + adenosina; resultados expressos como média \pm desvio padrão da média (n - número de cães tratados; número de células contadas: fibroblastos \approx 300, células musculares \approx 1000).

	<i>n</i>	<i>Células musculares</i> (μm)	<i>Fibroblastos</i> (μm)
Controle	4	4,66 \pm 1,28	3,68 \pm 0,90
6-OHDA (10+10 mg/kg)	4	6,41 \pm 1,63*	5,44 \pm 0,61*
Adenosina (10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	4,54 \pm 1,18	3,59 \pm 0,84
6-OHDA (10+10 mg/kg) + A(10 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	4,56 \pm 1,59	3,78 \pm 0,69

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,001$)

DISCUSSÃO

A veia safena lateral de Cão foi eficazmente desnervada pela 6-hidroxi-dopamina, como se comprovou pelo doseamento da noradrenalina nos tecidos e pela observação ultraestrutural de terminais neuroniais em degenerescência, não sendo visíveis varicosidades simpáticas normais, cinco dias após o início do tratamento. A utilização de 6-hidroxi-dopamina com o objectivo de efectuar simpaticectomia está largamente consagrada (Tranzer e Thöenen, 1968; Thöenen, 1972), embora os tecidos vasculares sejam usualmente menos sensíveis ao neurotóxico do que o coração (Berkowits et al., 1972; Finch et al., 1973; Kostrzewa e Jacobowits, 1974; Lorez et al., 1975). De igual modo, era conhecida a resistência relativa da veia safena de Cão à desnervação pela 6-hidroxi-dopamina (Soares-da-Silva e Davidson, 1985). Como se pretendia desnervar este vaso por outro processo, para além do da desnervação cirúrgica, com o objectivo de verificar se modalidades distintas de desnervação produziam efeitos semelhantes, ensaiaram-se doses crescentes do neurotóxico. Verificou-se que elevando a dose administrada era possível obter desnervação da veia safena lateral do Cão.

Os resultados das experiências anteriores em que, quando se procedia à desnervação cirúrgica de vasos se encontrava alterações extraneuroniais, funcionais e morfológicas muito intensas (Branco et al., 1984), motivaram a convicção de que o sistema nervoso simpático exerce um efeito modulador do fenótipo das células efectoras.

Do mesmo modo, os resultados da desnervação química das veias safenas evidenciam o mesmo padrão de aumento de actividade sintética das células musculares lisas e dos fibroblastos. Este será,

assim, indubitavelmente atribuível à privação da inervação simpática, porquanto se verifica com dois procedimentos experimentais dissimilares. Esta conclusão é consonante com as de Campbell et al. (1977), Fronek (1983), Azevedo e Osswald (1986) e Dimitriadou et al. (1988) em tecidos e espécies variadas. Embora as modificações manifestas por células em cultura devam ser interpretadas com alguma reserva, o efeito trófico dos nervos simpáticos tinha já sido sugerido em estudos de células musculares lisas em cultura (Chamley et al., 1974; Chamley e Campbell, 1975, 1976; Burnstock, 1981).

O aparecimento de mastócitos em veias desnervadas pela 6-hidroxi-dopamina, a exemplo do que se verificara após a desnervação cirúrgica (Branco et al., 1984), não tinha sido descrito anteriormente e é muito interessante. Também encontramos aumento na densidade de mastócitos nos espaços porta do fígado desnervado quimicamente. É conhecida a associação de mastócitos com processos anormais de fibrose (revisto por Claman, 1985), mas a modulação conjunta de mastócitos e fibroblastos pelo sistema nervoso simpático, sugerida pelos nossos resultados, nunca foi, que saibamos, considerada. (Este ponto é retomado na discussão do capítulo III, a propósito da desnervação hepática).

A noradrenalina parece não ser o principal factor responsável pela acção trófica da inervação simpática, uma vez que não preveniu as alterações extraneuroniais causadas pela desnervação. O ATP é cotransmissor com a noradrenalina na inervação simpática de numerosos tecidos (Lagercrantz, 1976; Daly, 1983; Burnstock, 1986; Campbell, 1987), entre eles se incluindo a veia safena de Cão (Flavahan e Vanhoutte, 1986), sendo lógico avaliar o seu papel ou o do seu metabolito, a adenosina, nestas acções de modulação fenotípica exercida pelos nervos simpáticos.

O ATP é libertado para a fenda sináptica após estimulação dos nervos em que é cotransmissor (Lagercrantz, 1976; Fredholm e Hedqvist, 1980; Sneddon e Burnstock, 1984; Muramatsu, 1986), podendo actuar directamente nas células efectoras ou indirectamente, após degradação metabólica em adenosina. Quer o ATP quer a adenosina podem ainda actuar como neuromoduladores, influenciando a libertação da noradrenalina (De Mey et al., 1979; Paton, 1981; Su, 1983; Snyder, 1985; Ishikawa, 1985; Burnstock, 1986; Burnstock e Kenedy, 1986; Campbell, 1987). Como infundimos a adenosina em tecidos desnervados, os seus efeitos não são atribuíveis a acções pré-sinápticas. Os resultados obtidos, evidenciando a capacidade da adenosina prevenir as alterações de desdiferenciação que acompanham a simpaticectomia, apoiam a hipótese formulada de que seja ela a responsável pela modulação fenotípica das células efectoras.

A infusão de inosina, metabolito da adenosina que com ela partilha acções metabólicas, não preveniu as alterações estruturais causadas pela desnervação, facto indicativo de que os efeitos tróficos da adenosina não dependem de acções metabólicas inespecíficas (Frank-Henderson, 1985). Os efeitos da adenosina poderiam dever-se a acções mediadas por receptores de membrana ou a acções intracelulares (Paterson, 1979; Daly, 1983; Burnstock e Buckley, 1985; Frank-Henderson, 1985; Ribeiro e Sebastião, 1986). O facto de a adenosina e a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina terem sido eficazes é altamente sugestivo de que o mecanismo dependa da activação de receptores. De facto, a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina actua extracelularmente, não sendo metabolizada (Daly, 1983) nem submetida a captação apreciável (Daly, 1983; Burnstock e Buckley, 1985). Assim, os resultados obtidos com a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina são compatíveis com um efeito exercido na membrana celular, muito possivelmente sobre receptores A_2 .

Não se pode excluir o(s) efeito(s) de factor(es) trófico(s) secundários libertados pela adenosina ou pela 5'-N-etilcarboxamido-adenosina a partir das veias ou de outra fonte não identificável.

Tendo-se verificado que a adenosina também previne as alterações morfológicas causadas pela desnervação química do fígado de Cão (discutido no Capítulo III), bem como do coração e da artéria mesentérica do Cão, é evidente que a acção da adenosina não se confina aos tecidos vasculares. O conjunto dos resultados permite sugerir que os mecanismos purinérgicos desempenhem um papel geral nas acções tróficas do sistema nervoso simpático. É assim evidente, nestas circunstâncias experimentais, o envolvimento das purinas nos efeitos tróficos da inervação simpática, nomeadamente sobre as células musculares lisas, as células miocárdicas e os fibroblastos. Os resultados permitem ainda sugerir que a adenosina, resultante da degradação metabólica do ATP libertado das varicosidades simpáticas, actua sobre receptores da membrana das células musculares lisas, das células miocárdicas e/ou dos fibroblastos exercendo, directa ou indirectamente, as suas acções tróficas sobre estas células.

Capítulo III

EFEITOS DA DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA NO FÍGADO DE CÃO - PAPEL DOS AGONISTAS PURINÉRGICOS

INTRODUÇÃO

Em vasos sanguíneos os fibroblastos dispõem-se na proximidade anatômica de varicosidades adrenérgicas, observação que motivou a hipótese da sua inervação simpática (Azevedo e Soares-da-Silva, 1981; Soares-da-Silva e Azevedo, 1985). Esta hipótese foi reforçada pelo achado de reactividade dos fibroblastos à desnervação simpática das veias (Branco et al., 1984, Azevedo e Osswald, 1986, Albino-Teixeira et al., 1988), artérias e coração (Dimitriadou et al., 1988; Sarmiento et al., 1987). Em muitas das situações experimentais até agora estudadas a desnervação simpática, química ou cirúrgica, acompanha-se de aumento da actividade nuclear e proliferação de fibroblastos (Branco et al., 1984; Azevedo e Osswald, 1986; Dimitriadou et al., 1988; Sarmiento et al., 1987; Albino-Teixeira et al., 1988, 1990a). Do mesmo modo, a simpaticectomia química determina um aumento de fibroblastos e mastócitos nos espaços porta de fígado de Cão e de Coelho. Estas modificações dos fibroblastos em consequência da desnervação reforçam a validade da hipótese de que estas células estejam sob a influência da inervação simpática que sobre elas exerce um efeito repressivo.

Para avaliar o factor trófico responsável pelo controlo do fenótipo dos fibroblastos no espaço porta do Cão, estudámos o efeito da reserpina, que depleta a noradrenalina dos terminais simpáticos sem afectar o conteúdo em ATP das vesículas sinápticas, assim permitindo destrinçar entre os efeitos dependentes da ausência de noradrenalina e os dependentes de outros factores, nomeadamente do ATP ou seus metabolitos. Estudámos também, em cães tratados com 6-hidroxi-dopamina, os efeitos da adenosina na prevenção das consequências da simpaticectomia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Simpaticectomia química

Cães de raça indeterminada pesando 15 a 20 kg eram anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg), injectado por via endovenosa numa pata anterior. A simpaticectomia química efectuava-se administrando 6-hidroxi-dopamina (10 mg/kg no dia 0 + 10 mg/kg no dia 1) por via endovenosa. O grupo controlo era injectado com o veículo segundo o mesmo protocolo.

Reserpinização

A reserpinização efectuou-se injectando reserpina (0,5 mg/kg no dia 0 + 0,1 mg/kg no dia 1) por via endovenosa.

Infusão de adenosina

Utilizaram-se minibombas osmóticas Alzet 2ML1 implantadas no tecido celular subcutâneo com o catéter inserido na veia safena

lateral direita para infundir adenosina ($10 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) ou solução fisiológica. Todos os animais, após o recobro anestésico, permaneciam em gaiolas individuais sendo-lhes fornecidos alimentos e água *ad libitum*.

Doseamento de noradrenalina

Ao quinto dia os cães eram reoperados, colhiam-se amostras de fígado para estudo morfológico e morfométrico e o tecido restante (pesando cerca de 500 mg) era lavado em solução de Krebs Henseleit à temperatura de 4°C , limpo em papel de filtro, cortado, pesado e colocado em 2 ml de ácido perclórico $0,1 \text{ mol/l}$, durante 24 horas. Procedia-se então ao doseamento de noradrenalina segundo o método descrito no Capítulo II.

Estudo morfológico e morfométrico

Os métodos utilizados foram os descritos no Capítulo II. Os fragmentos de tecido eram mergulhados em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol/l}$, pH 7,3, a 4°C ; 5 minutos depois eram cortados com lâmina de bisturi, permanecendo no mesmo fixador durante 90 minutos. Os fragmentos eram então lavados em tampão cacodilato com sacarose $0,6 \text{ mol/l}$, pós-fixados numa solução de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato ($0,1 \text{ mol/l}$), pH 7,3, a 4°C por uma hora, desidratados com etanol e óxido de propileno e incluídos em Epon 812. Obtiveram-se cortes semifinos de 10 blocos de cada animal, cortados ao acaso, com um ultramicrotomo LKB, corados com azul de toluidina a 1% em borax a 1%. Os cortes eram examinados em microscopia óptica.

Para contagem de fibroblastos e mastócitos nos espaços porta escolheram-se os espaços que continham pelo menos um perfil de

ducto biliar, uma veia porta e um capilar ou arteríola. Procedia-se ao desenho em câmara clara dos limites dos espaços porta com o contorno de vasos sanguíneos e ductos biliares com uma ampliação final de 860 vezes. O número de fibroblastos era contado e expresso como o número de células por 1000 μm^2 de espaço porta (densidade de fibroblastos no espaço porta). Procedeu-se da mesma forma para a quantificação dos mastócitos. A área dos espaços porta era determinada cortando e pesando os desenhos dos espaços porta (excluindo os espaços vasculares e ductos biliares).

Avaliação estatística

Utilizou-se o teste *t* de Student para comparar médias dos níveis teciduais de noradrenalina e das densidades de fibroblastos e mastócitos nos espaços porta, obtidos nos animais controlo e nos tratados com reserpina, 6-hidroxiopamina, adenosina e adenosina + 6-hidroxiopamina. Também se efectuaram comparações múltiplas pelo teste de Tuckey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981).

RESULTADOS

Teor de noradrenalina

Os resultados dos doseamentos de noradrenalina no fígado dos cães tratados nas condições de controlo e nas situações experimentais estudadas encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Teor de noradrenalina (NA) no fígado de cães controlo e de cães tratados com reserpina, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), adenosina ou adenosina + 6-OHDA. Valores expressos como média \pm desvio padrão da média.

	<i>n</i>	<i>NA (ng/g)</i>	<i>% do controlo</i>
Controlo	4	860,2 \pm 150,3	100%
Reserpina (0,5 + 0,1 mg/kg)	3	96,3 \pm 18,1*	11%
6-OHDA (10+10 mg/kg)	4	97,5 \pm 10,8*	11%
Adenosina (10 μ g/kg h ⁻¹)	4	891,3 \pm 158,1	104%
6-OHDA (10+10 mg/kg) + A(10 μ g/kg h ⁻¹)	4	91,6 \pm 11,6*	10%

* Significativamente diferente do controlo ($p < 0,01$)

A 6-hidroxi-dopamina reduziu o conteúdo de noradrenalina do fígado de Cão para 11% do valor de controlo. A adenosina não modificou os teores de noradrenalina no fígado quando infundida na situação de controlo nem na situação de desnervação pela 6-hidroxi-dopamina. A depleção determinada pelo tratamento com reserpina foi muito intensa, observando-se uma redução no teor de noradrenalina semelhante à da simpaticectomia química.

Morfologia

A observação em microscopia óptica de cortes de fígado permitiu verificar um aumento significativo na densidade de mastócitos e de fibroblastos nos espaços porta dos cães desnervados pela 6-hidroxi-dopamina. Não se encontraram outras alterações morfológicas. A área média dos espaços porta (0,018 \pm 0,010 mm²; n=7 em cães controlo) não foi modificada pela simpaticectomia química (0,014 \pm 0,013 mm²; n=8).

Os valores obtidos na quantificação dos mastócitos e fibroblastos nos espaços porta encontram-se na tabela 9.

DISCUSSÃO

O marcado aumento do número de fibroblastos nos espaços porta dos animais simpaticectomizados, a exemplo do que ocorre noutros tecidos, comprova a acção restritiva que a inervação simpática exerce sobre estas células. A reserpinação, embora tenha reduzido o teor de noradrenalina tecidual para valores sobreponíveis aos determinados pela 6-hidroxiopamina, não produziu qualquer alteração no número de fibroblastos nos espaços porta. Dado que a reserpina depleta selectivamente a noradrenalina dos terminais simpáticos sem interferir com os cotransmissores purinérgicos (Burnstock, 1986), o efeito trófico da inervação simpática não deve ser da sua responsabilidade. O facto de a adenosina infundida em cães simpaticectomizados prevenir o aumento da densidade de fibroblastos nos espaços porta, sugere ser o componente purinérgico da inervação simpática o principal agente destas acções tróficas.

Os resultados obtidos nas situações estudadas em que a desnervação simpática se acompanhou sistematicamente de um aumento do número de mastócitos (fígado, veias desnervadas química e cirurgicamente) estão em consonância com a afirmação de que o tono simpático exerce um efeito frenador sobre o fenótipo deste tipo celular.

A metodologia empregue não permite distinguir entre real hipertrofia celular ou manifestação de acumulação de material granular metacromático em células previamente não detectáveis. Do mesmo modo, a situação inversa, promoção de desgranulação, poderia acompanhar-se de aparente diminuição do número de mastócitos. Se o efeito da adenosina fosse o de promover a desgranulação, tal

explicaria a aparente diminuição destas células por nós encontrada quando os animais eram infundidos com adenosina e com 5'-N-etil-carboxaminoadenosina. Os resultados obtidos parecem permitir afastar esta objecção porquanto nunca observámos mastócitos parcialmente desgranulados ou vacuolizados, nem material metacromático adjacente aos mastócitos identificados, ao contrário do que se verifica em situações experimentais em que se promove a desgranulação mastocitária (Selye, 1965). Por outro lado, os estudos de Gordon (1986) mostraram que a adenosina não interfere com a desgranulação mastocitária e, de uma larga série de substâncias experimentadas, só o ATP promove a desgranulação (Kiernan, 1972). Mais recentemente, identificaram-se os receptores mastocitários para o ATP como sendo P_{2Z} (Gordon, 1986). A ser assim, a inervação simpática exerceria sobre os mastócitos um duplo efeito. O mediador simpático inibiria a desgranulação, enquanto que o ATP a favoreceria e a adenosina inibiria a proliferação. Os resultados obtidos no fígado de cães reserpinizados são de difícil interpretação. Alguns dos fármacos indutores de desgranulação mastocitária como o 48/80 promovem libertação do mediador simpático, ignorando-se o que ocorre com a reserpina em relação aos mastócitos.

Há evidência morfológica da inervação simpática dos mastócitos nas artérias cerebrais (Aubineau et al., 1986), em que se verifica uma distância de terminações simpáticas semelhante ou inferior à verificada para as células musculares lisas (Marinkovic et al., 1979). Do mesmo modo, nas veias e no coração há evidência indirecta dado que após a desnervação há aumento do número de mastócitos.

Outro aspecto curioso é o da concomitância da resposta hiperplásica/hipertrófica dos fibroblastos e mastócitos, conhecida a sua habitual interacção em processos inflamatórios e fibroplásicos. Em algumas situações experimentais a aquisição de grânulos por

mastócitos é facilitada na presença de fibroblastos (Davidson et al., 1983). Os modelos experimentais por nós utilizados não permitem concluir sobre a importância relativa da hipertrofia fibroblástica e hiperplasia mastocitária, e portanto, sobre se o efeito frenador da adenosina se exerce sobre todos os tipos celulares ou apenas sobre um deles (os fibroblastos, por exemplo), dependendo os outros efeitos de mediadores intercelulares não identificados.

Capítulo IV

A DISMUTASE DO SUPERÓXIDO PREVINE PARCIALMENTE A DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA CAUSADA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA

INTRODUÇÃO

Verificámos que a infusão contínua de noradrenalina (0,1 µg/kg h⁻¹) determinava, no Cão, alterações dos terminais simpáticos, com degenerescência das varicosidades da veia safena lateral infundida (Albino-Teixeira et al., 1989). Encontrámos ainda alterações morfológicas e funcionais extraneuroniais (hipertrofia das células musculares lisas, espessamento da parede dos vasos, diminuição da capacidade metilante) idênticas às descritas após deservação cirúrgica (Branco et al., 1984). Estas alterações eram prevenidas pela desipramina (25 mg/kg h⁻¹) e pela dismutase do superóxido (5 mg/kg h⁻¹). O efeito neurotóxico da noradrenalina assim infundida parecia paradoxal, sendo difícil aceitar que o mediador simpático cause alterações tóxicas nos terminais em que é sintetizado e armazenado. Também não nos parecia invocável o argumento de que se estava a verificar efeito tóxico por utilização de concentrações excessivamente elevadas, porquanto a dose infundida, embora causando elevações significativas dos níveis plasmáticos, era muito baixa.

A demonstração de que o bloqueio da captação neuronal pela desipramina, ou a neutralização de radicais livres pela dismutase do superóxido, permitia prevenir a simpaticectomia química causada pela noradrenalina, permitiu-nos aventar a explicação para o fenómeno. De facto, poderia tratar-se de um metabolito da noradrenalina na formação do qual intervissem radicais livres resultantes da metabolização da noradrenalina. As quinonas e semiquinonas originadas a partir das catecolaminas podem desnaturar proteínas por ligações cruzadas através de compostos tioéter (Graham, 1978; Saner e Thöenen, 1980), e esta poderia ser uma causa de neurotoxicidade. Dado que a dismutase do superóxido é uma proteína de elevado peso molecular que se distribui, após administração exógena, exclusivamente no espaço extracelular (Marklund, 1980), o seu efeito protector deve exercer-se extraneuronalmente. Provavelmente, a reacção ocorre extraneuronalmente e o metabolito tóxico da noradrenalina é captado pelo processo clássico, bloqueável pela desipramina, o que explicaria a eficácia protectora deste fármaco.

A similitude deste facto com o que se verifica para a 6-hidroxidopamina, cujo efeito neurotóxico também é impedido pelos inibidores da captação (Stone et al., 1964), é apelativa. Dado que utilizámos a 6-hidroxidopamina para verificar se mecanismos diversos de desnervação simpática (cirúrgica, anóxica, química) produziam efeitos semelhantes, que fossem inequivocamente atribuíveis à falta de inervação simpática e não ao processo experimental em causa, pareceu útil verificar qual o papel dos radicais livres no efeito neurotóxico da 6-hidroxidopamina. Avaliámos com esse objectivo os efeitos da dismutase do superóxido na acção neurotóxica da 6-hidroxidopamina em dois modelos experimentais: na desnervação *in vitro* da veia safena de Cão e na simpaticectomia periférica de ratos Wistar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Simpaticectomia química *in vitro*

Procedia-se à remoção da veia safena lateral de Cão de raça indeterminada sob anestesia (pentobarbital sódico, 30 mg/kg). Utilizaram-se fragmentos pesando cerca de 60 mg que eram pré-incubados em solução de Krebs-Henseleit oxigenada. Alguns fragmentos eram incubados em solução de Krebs-Henseleit contendo dismutase do superóxido em concentrações variadas (1,25, 2,5 e 5 mg/ml) durante trinta minutos e depois incubadas em condições controlo, na presença de 6-hidroxiopamina (0,1 mg/ml) ou com 6-hidroxiopamina (0,1 mg/ml) + dismutase do superóxido (1,25, 2,5 ou 5 mg/ml) durante três horas. Todas as soluções eram borbulhadas com CO₂ a 5% em O₂ a 37°C durante todo o período de incubação e mantidas sob agitação constante. Terminado o período de incubação, procedia-se à lavagem durante duas horas, efectuando mudanças repetidas da solução de Krebs. Os fragmentos eram então utilizados para determinação do teor de noradrenalina por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica como descrito previamente (Capítulo II); outros eram preparados para observação ultraestrutural segundo os métodos referidos (Capítulo II).

Captação neuronal de noradrenalina tritiada

Com o objectivo de estudar o efeito da dismutase do superóxido na captação neuronal, procedeu-se à pré-incubação de tiras de veia safena de Cão, colhidas da forma descrita anteriormente. Estas eram mantidas durante trinta minutos em solução oxigenada de Krebs-Henseleit, contendo pargilina (1 mmol/l) e hidrocortisona (40 mmol/

l), sob agitação constante e aquecida a 37°C. O grupo controlo era pré-incubado nestas circunstâncias e comparado com outro contendo dismutase do superóxido na concentração de 5 mg/ml. Após trinta minutos adicionava-se ³H-noradrenalina na concentração final de 0,1 mmol/l. No fim do período de incubação (15 minutos) os tecidos eram lavados rapidamente em solução fria de Krebs-Henseleit, secos, pesados e colocados em 3 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l, onde eram mantidos durante vinte e quatro horas à temperatura de 4°C. Uma aliquota de 0,5 ml era utilizada para determinação do conteúdo de trítio por cintilometria líquida num contador LKB 1208 Rackbeta.

Estudo da inactivação da 6-hidroxi-dopamina durante a incubação

Procedeu-se à incubação a 37°C, durante quinze minutos, em recipientes contendo 2 ml de solução de Krebs-Henseleit com 6-hidroxi-dopamina na concentração de 0,1mg/ml ou 6-hidroxi-dopamina na mesma concentração adicionada de dismutase do superóxido na concentração de 5 mg/ml. No termo da incubação procedia-se à acidificação adicionando 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l, e depois à diluição a 1/10 com o mesmo ácido. Preparou-se uma solução padrão de 6-hidroxi-dopamina a 0,1 mg/ml em ácido perclórico 0,2 mol/l, que se diluía da mesma forma. As amostras em estudo e a solução padrão eram passadas por alumina a pH 8,6 e os catecois eluídos em microfiltros MF1 eram determinados por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica, como se descreveu.

Simpaticectomia química no animal inteiro

Ratos machos Wistar pesando 250 a 300 gramas eram

anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) administrado por via intraperitoneal. Canulava-se uma veia da cauda pela qual se infundia durante quinze minutos uma solução cloretada isotónica que era administrada num volume de carga inicial de 0,3 ml e depois, a fluxo constante de cerca de 0,15 ml/minuto. Segundo o mesmo protocolo infundia-se, noutra grupo experimental, dismutase do superóxido (dose de carga de 7,5, 15 ou 30 mg) seguida de infusão de 0,25, 0,5 ou 1 mg/minuto no mesmo volume de solução cloretada isotónica. Em quatro ratos de cada um dos grupos experimentais procedeu-se à injeção de 6-hidroxi-dopamina (100 mg/kg), cinco minutos após ter sido iniciada a infusão, tendo-se utilizado o sistema já instalado.

Após o recobro da anestesia, os animais eram conservados em gaiolas individuais com acesso livre a água e alimentação, até ao quinto dia. Procedia-se então ao sacrifício por decapitação, colhendo-se fragmentos do ventrículo esquerdo e da porção média do *vas deferens* que eram utilizados para determinação dos teores de noradrenalina e preparados para observação morfológica de acordo com os métodos descritos.

Avaliação estatística

Utilizou-se o teste *t* de student para comparar as médias dos níveis teciduais de noradrenalina e das concentrações de 6-hidroxi-dopamina nas soluções de incubação. Também se efectuaram comparações múltiplas pelo teste de Tuckey-Krammer (Sokal e Rohlf, 1981).

Fármacos utilizados

Dismutase do superóxido (Peroxinorm, Chemie Grunenthal

GmbH, Stolberg, República Federal da Alemanha); pentobarbital sódico (Abbott, Lisboa, Portugal); 6-hidroxiopamina e pargilina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA); (-)-7-³H-noradrenalina 13.0 Ci/mmol (NEN, Dreieich, República Federal da Alemanha).

RESULTADOS

A incubação *in vitro* de tiras da veia safena de Cão com 6-hidroxiopamina durante três horas resultou em depleção marcada da noradrenalina, cujo teor ficou reduzido a 5% dos valores controlo (Tabela 10). A dismutase do superóxido, utilizada isoladamente, não produziu qualquer modificação nos conteúdos de noradrenalina dos vasos, mas reduziu significativamente, e de forma dependente da dose, o efeito da 6-hidroxiopamina.

Tabela 10 - Teor de noradrenalina (NA) de veias safenas de Cão incubadas durante três horas. Nas preparações tratadas com dismutase do superóxido (SOD) esta era adicionada 30 minutos antes da 6-hidroxiopamina (6-OHDA) e mantida durante todo o período de incubação. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média.

	<i>n</i>	NA (nmol/g)	% do controlo
Controlo	4	13,95±0,58	100
SOD (5 mg/ml)	4	14,31±0,63	103
6-OHDA (0,1 mg/ml)	4	0,72±0,21*	5
SOD (1,25 mg/ml) + 6-OHDA	4	1,38±0,54*	8
SOD (2,5 mg/ml) + 6-OHDA	4	3,17±0,46**	24
SOD (5 mg/ml) + 6-OHDA	4	5,19±0,60**	37

* Significativamente diferente do grupo controlo; $p < 0,05$

** Significativamente diferente do grupo 6-OHDA; $p < 0,05$

A administração *in vivo* de 6-hidroxi-dopamina na dose de 100 mg/kg por via endovenosa causou depleção significativa de noradrenalina no ventrículo esquerdo, sendo o respectivo teor reduzido para 8% dos valores de controlo ao 5º dia após a administração (Tabela 11).

Tabela 11 - Conteúdo em noradrenalina (NA) do ventrículo esquerdo de ratos controlo, de ratos tratados com dismutase do superóxido (SOD), 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) ou SOD + 6-OHDA; os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média.

	<i>n</i>	Ventrículo esq. NA (nmol/g)	% do controlo
Controlo	5	5,85±0,16	100%
SOD (170 mg/kg)	4	5,83±0,18	99%
6-OHDA (100 mg/kg)	5	0,47±0,05*	8%
SOD (42,5 mg/kg) + 6-OHDA	4	0,70±0,31*	11%
SOD (85 mg/kg) + 6-OHDA	4	1,34±0,42**	23%
SOD (170 mg/kg) + 6-OHDA	4	2,26±0,37**	39%

* Significativamente diferente do controlo; $p < 0,05$

** Significativamente diferente de 6-OHDA; $p < 0,05$

O teor de noradrenalina do *vas deferens*, embora de forma menos marcada, foi também significativamente diminuído nos animais tratados com 6-hidroxi-dopamina (para cerca de 18% do valor de controlo) (Tabela 12).

O conteúdo de noradrenalina no ventrículo esquerdo e no *vas deferens* dos ratos tratados com dismutase do superóxido não diferia dos valores de controlo. Quando administrada antes da 6-hidroxi-dopamina, a dismutase do superóxido reduzia de forma significativa o efeito da 6-hidroxi-dopamina, sendo esta redução proporcional à dose (Tabelas 11 e 12).

Tabela 12 - Conteúdo em noradrenalina (NA) do *vas deferens* de ratos controle, de ratos tratados com dismutase do superóxido (SOD), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ou SOD + 6-OHDA; os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da média.

	<i>n</i>	<i>Vas Deferens</i> NA (nmol/g)	% do controle
Controle	5	72,70 \pm 0,16	100%
SOD (170 mg/kg)	4	73,29 \pm 0,12	101%
6-OHDA (100 mg/kg)	5	13,06 \pm 0,18*	18%
SOD (42,5 mg/kg) + 6-OHDA	4	14,36 \pm 0,24*	20%
SOD (85 mg/kg) + 6-OHDA	4	25,42 \pm 0,24**	35%
SOD (170 mg/kg) + 6-OHDA	4	33,10 \pm 0,18**	46%

* Significativamente diferente do controle; $p < 0,05$

** Significativamente diferente de 6-OHDA; $p < 0,05$

Captação neuronal de noradrenalina

A captação de noradrenalina tritiada pelas tiras de veia safena incubadas durante 15 minutos com ^3H -noradrenalina 0,1 $\mu\text{mol/l}$ foi de 277 \pm 25 pmol/g (média \pm SEM; $n=4$). A dismutase do superóxido, na concentração de 5 mg/ml, não afectou a captação neuronal tendo a captação nestas circunstâncias experimentais sido de 280 \pm 28 pmol/g ($n=4$).

Inactivação da 6-hidroxidopamina durante a incubação

Durante os quinze minutos de incubação em solução de Krebs-Henseleit verificou-se uma perda significativa da amina. Assim, no fim do período de incubação a perda era de 70,1% \pm 15,3%, notando-se o aparecimento de picos adicionais de natureza desconhecida no cromatograma, correspondendo provavelmente a produtos de auto-oxidação da 6-hidroxidopamina. A perda de 6-hidroxidopamina foi significativamente menor, não excedendo 38,5% \pm 8,1% quando incubada na presença da dismutase do superóxido na concentração

de 5 mg/ml (n=5 em cada grupo, $p < 0,05$). Os picos de produtos não identificados também eram menores do que na ausência da dismutase do superóxido.

Morfologia

Nas tiras de veia safena incubadas com 6-hidroxi-dopamina não se identificava terminais adrenérgicos intactos. As células de Schwann apresentavam corpos densos, correspondendo provavelmente a terminais adrenérgicos degenerados. Pelo contrário, nas tiras que foram incubadas com dismutase do superóxido antes e durante a exposição à 6-hidroxi-dopamina, identificavam-se varicosidades adrenérgicas de aspecto normal.

No coração e no *vas deferens* dos ratos injectados com 6-hidroxi-dopamina encontrou-se imagens idênticas às descritas na veia safena do Cão, com corpos densos bem evidentes e ausência de terminais de morfologia normal. Quando se observavam os tecidos de ratos que, antes da injeção de 6-hidroxi-dopamina, tinham sido tratados com dismutase do superóxido, na dose mais alta, demonstrou-se terminais com aspecto normal a par de terminais parcialmente degenerados.

DISCUSSÃO

Os resultados do doseamento de noradrenalina nos tecidos estudados, bem como a avaliação ultrastrutural, comprovam a eficácia da metodologia empregue para a desnervação simpática do Rato. A depleção de noradrenalina no ventrículo esquerdo e no *vas deferens*, e as alterações morfológicas causadas pela 6-hidroxi-dopamina

reproduzem o padrão de neurotoxicidade selectiva para os nervos simpáticos descrita classicamente por Thöenen e Tranzer (1968) e Kostrzewa e Jacobowitz (1974).

Verificámos também que, nas condições experimentais descritas, a 6-hidroxi-dopamina é capaz de desnervar *in vitro* a veia safena de Cão, o que contrasta com a resistência relativa deste vaso à simpaticectomia química *in vivo* (Soares-da-Silva e Davidson, 1985; Albino-Teixeira et al., 1990a). Têm sido descritas diferenças de tecido para tecido na eficácia neurotóxica da 6-hidroxi-dopamina que foram atribuídas a variabilidade na vulnerabilidade dos terminais adrenérgicos, bem como a diferenças no acesso da amina aos tecidos (Kostrzewa e Jacobowitz, 1974; Thöenen, 1972). Os mecanismos pelos quais se exerce a neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina não estão claramente estabelecidos. De entre as várias hipóteses é geralmente reconhecida a importância da auto-oxidação do fármaco (Thoenen e Tranzer, 1973; Heikkila et al., 1973).

As diferenças entre os vários mecanismos propostos referem-se ao papel dos produtos de auto-oxidação e aos seus alvos celulares. Thöenen e Tranzer (1973) sugeriram que as quinonas se ligam de forma covalente a grupos nucleofílicos de macromoléculas desnaturando-as, e interferindo assim com processos biológicos importantes. Uma explicação alternativa, proposta por Heikkila et al. (1973) e Cohen e Heikkila (1974), implica a acção dos produtos reactivos da redução parcial de oxigénio ($O^{\cdot -}$ e $OH^{\cdot -}$), que são formados durante a auto-oxidação da 6-hidroxi-dopamina e das aminas análogas, no efeito neurotóxico. Esta explicação é apoiada pelos resultados do nosso estudo que mostram o efeito protector da dismutase do superóxido, tanto *in vitro* como *in vivo*, da neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina. A dismutase do superóxido é uma proteína de elevado peso molecular que se distribui predominantemente no espaço

extracelular (Marklund, 1980), e assim, a protecção que ela exerce poderá dever-se à neutralização de radicais livres fora dos neurónios. A substância tóxica parece, por isso, ser formada fora dos neurónios, sendo depois sujeita a captação neuronal.

A especificidade dos efeitos tóxicos da 6-hidroxi-dopamina ou dos seus derivados sobre neurónios simpáticos deve-se à sua captação selectiva por células alvo. Estes efeitos podem ser prevenidos por fármacos como a desipramina, que bloqueiam a captação de aminas pelos terminais noradrenérgicos. Nem a reserpina (que bloqueia o armazenamento intravesicular) nem os inibidores da monoaminooxidase previnem os efeitos tóxicos da 6-hidroxi-dopamina (Bennet et al., 1970; Breese e Traylor, 1971).

O efeito protector da dismutase do superóxido poderia dever-se a uma acção inibitória da captação neuronal, semelhante à da desipramina. Esta hipótese é excluída pelos resultados que evidenciam que a dismutase do superóxido, na concentração mais alta por nós utilizada, é inteiramente desprovida de efeitos sobre a captação neuronal. Também não pode atribuir-se o efeito protector à eventual inactivação química da 6-hidroxi-dopamina pela dismutase do superóxido, uma vez que os resultados das experiências em que as duas substâncias eram incubadas conjuntamente demonstraram que não havia redução no teor de 6-hidroxi-dopamina. Verificou-se, pelo contrário, que havia até ligeiro acréscimo, provavelmente devido a alguma protecção em relação à sua auto-oxidação, exercida pela dismutase do superóxido. O efeito protector exercer-se-ia, assim, sobre uma concentração maior de 6-hidroxi-dopamina. Em trabalho anterior (Albino-Teixeira et al., 1989) tínhamos verificado que a noradrenalina infundida tinha um efeito neurotóxico similar ao da 6-hidroxi-dopamina, embora de menor magnitude, o qual era reduzido ou prevenido pela desipramina e pela dismutase do su-

peróxido. A interpretação mais plausível destes resultados sugeria o envolvimento de radicais livres na formação de uma substância com efeito neurotóxico. É sabido que no decurso da auto-oxidação de substâncias como as catecolaminas há formação de radicais superóxido (Cohen e Heikkila, 1974).

O efeito da noradrenalina é muito menos intenso do que o da 6-hidroxi-dopamina, não sendo surpreendente que, embora se tenha verificado um padrão semelhante de acções e de mecanismos, tenha havido necessidade de usar concentrações muito mais elevadas de dismutase do superóxido quando se procurava evitar a neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina. Estes resultados, evidenciando nos dois modelos, o efeito neurotóxico da 6-hidroxi-dopamina e o papel protector da dismutase do superóxido, quer a nível bioquímico, quer morfológico, são compatíveis com o envolvimento de radicais livres na desnervação química e apoiam a hipótese de que haja similitude de mecanismos na neurotoxicidade da 6-hidroxi-dopamina e da noradrenalina.

Capítulo V

EFEITOS DA DESNERVAÇÃO SIMPÁTICA NO CORAÇÃO DO RATO - AUMENTO DO PEPTÍDEO NATRIURÉTICO AURICULAR

INTRODUÇÃO

O peptídeo natriurético auricular (PNA) deve a sua designação ao facto de ter sido inicialmente identificado nos miócitos auriculares de vários mamíferos, estando localizado em grânulos secretórios (Cantin et al., 1984; Anderson et al., 1986). Embora tenha sido identificado no miocárdio auricular, há agora evidência de que os miócitos ventriculares o podem sintetizar, tendo-se identificado, no ventrículo de Rato, ácido ribonucleico mensageiro (ARN_m) para o PNA, bem como imunoreactividade para o peptídeo natriurético auricular (Anderson et al., 1986; Gardner et al., 1986).

Mais recentemente, verificou-se que, em contraste com o que ocorre nos adultos, se detecta níveis significativos de ARN_m do peptídeo natriurético auricular no miocárdio ventricular durante o período fetal e neonatal (Bloch et al., 1986; Wharton et al., 1988), bem como em miócitos ventriculares em cultura (Hassal et al., 1988). Como nestas situações o tono simpático é nulo ou baixo (De Champlain et al., 1970), em contraste com a rica inervação simpática dos ventrículos de animais adultos (Chidsey et al., 1964), pareceu-nos

interessante avaliar, no Rato, os efeitos da simpaticectomia química na expressão ventricular do peptídeo natriurético auricular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Simpaticectomia química

Ratos machos Wistar, pesando 250 a 300 gramas eram anestesiados administrando pentobarbital sódico por via intraperitoneal (40 mg/kg), procedendo-se depois à canulação de uma veia da cauda. Esta cânula era utilizada para a injeção endovenosa de 6-hidroxidopamina (100mg/kg) ou de solução cloretada isotônica. Deixavam-se recuperar da anestesia e eram mantidos em gaiolas individuais com ingestão livre de água e alimentos, sendo sacrificados ao quinto dia. Após a decapitação procedia-se rapidamente à dissecação do coração, separando-se as aurículas e os ventrículos. A aurícula direita era colhida para doseamento do peptídeo natriurético auricular, e a esquerda para doseamento de noradrenalina. Alguns fragmentos do ventrículo esquerdo eram preparados para estudo morfológico (microscopia óptica e ultrastrutural) e para determinação dos teores de noradrenalina e do peptídeo natriurético auricular.

Doseamento do peptídeo natriurético auricular

A preparação dos tecidos para o doseamento do peptídeo natriurético foi executada de acordo com o método descrito por Miyata et al. (1985). Os fragmentos colhidos para doseamento do peptídeo natriurético eram homogeneizados utilizando homogeneizadores de vidro (Duell-Kontes), por três períodos de vinte segundos após fervura durante cinco minutos em vinte volumes de ácido

acético a 0,1 mol/l, contendo 1% de triton X-100. O homogeneizado era centrifugado durante trinta minutos a 25000 G e a 4°C. Utilizaram-se colunas C18 de fase reversa (Waters Associates, Milford, USA) para a extração do peptídeo natriurético do sobrenadante. A taxa de recuperação do peptídeo natriurético sintético foi de $86 \pm 5\%$ (média \pm SEM).

O processo utilizado para medição da imunoreactividade do peptídeo auricular nos extratos teciduais reconhecia a sequência do carbono terminal do peptídeo natriurético auricular α do Rato (anti-soro para o peptídeo adquirido à Amersham International, UK), tendo por isso sido utilizado o peptídeo natriurético auricular α de Rato (adquirido à Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) para determinar a curva padrão para a radioimunoafirmação.

RESULTADOS

Os ventrículos dos animais sacrificados cinco dias após a desnervação química apresentavam alterações estruturais evidenciáveis em microscopia óptica e ultraestrutural. Em microscopia óptica observavam-se numerosos grânulos concentrados na região perinuclear dos miócitos ventriculares com morfologia e padrão de distribuição similares aos dos grânulos auriculares. Nos ventrículos dos animais controlo não se observavam grânulos. A observação em microscopia electrónica de preparações de ventrículos desnervados permitiu evidenciar varicosidades degeneradas, com vesículas em menor número e vazias, e aparecimento de corpos densos.

Os teores teciduais de noradrenalina e da imunoreactividade ao peptídeo natriurético auricular das aurículas e ventrículos dos animais

controle e desnervados pela 6-hidroxi-dopamina encontram-se na tabela 13.

TABELA 13 - Pesos dos fragmentos de tecidos e teores de noradrenalina (NA) e de imunoreactividade semelhante à do peptídeo natriurético auricular (ANP-Li) nas aurículas e nos ventrículos dos animais simpaticectomizados pela 6-hidroxi-dopamina e dos animais controle. Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média.

<i>Tecido</i>	<i>n</i>	<i>peso</i>	<i>ANP-LI</i>	<i>NA</i>
<i>Aurícula</i>		<i>(mg)</i>	<i>(nmol/g)</i>	
Controle	8	12 \pm 4	150 \pm 37	
6-OHDA	8	15 \pm 4	1112 \pm 312*	
<i>Ventrículo</i>		<i>(mg)</i>	<i>(pmol/g)</i>	<i>(ng/g)</i>
Controle	8	150 \pm 20	147 \pm 19	990 \pm 27
6-OHDA	8	147 \pm 18	1570 \pm 702*	79 \pm 8*

* ($p < 0,001$) significativamente diferente dos ratos controle

Não havia diferenças nos pesos dos tecidos que foram usados para as determinações analíticas nos dois grupos de ratos. A simpaticectomia foi adequada dado que os teores de noradrenalina ventricular decresceram significativamente, verificando-se uma depleção de 92% nos ventrículos. Verificou-se um aumento significativo (de cerca de 10 vezes) no teor de imunoreactividade semelhante à do peptídeo auricular, quer nas aurículas, quer nos ventrículos dos animais simpaticectomizados.

DISCUSSÃO

Estes resultados mostram que a simpaticectomia do coração de Rato se acompanha de aumento marcado de peptídeo natriurético

auricular quer nas aurículas, quer nos ventrículos, e do aparecimento de grânulos com características morfológicas idênticas às dos grânulos auriculares, nos miócitos ventriculares. O peptídeo natriurético deve a sua designação à convicção inicial de que a sua produção era exclusivamente auricular. Sabe-se, todavia, que os miócitos ventriculares em cultura e o tecido ventricular também expressam o peptídeo e o seu ARN_m, embora se observem valores mais elevados em tecidos fetais do que nos provenientes de adultos (Bloch et al., 1986; Wharton et al., 1988). Os nossos resultados mostram que, embora os teores do peptídeo nos ventrículos sejam menores do que os auriculares quer nas situações controlo, quer após a desnervação, esta determina um aumento semelhante (de cerca de dez vezes) do peptídeo natriurético nas aurículas e nos ventrículos.

A modulação simpática da secreção do peptídeo natriurético foi sugerida por estudos anteriores. A estimulação de receptores adrenérgicos α promove a libertação do peptídeo no coração perfundido do Rato (Currie e Newman, 1986) enquanto que a desnervação abole a secreção induzida pela expansão de volume circulante (Petterson et al., 1985). Assim, o aparecimento de grânulos nos ventrículos e o acréscimo do peptídeo natriurético nas aurículas e ventrículos, verificados após a desnervação, poderão dever-se não só a um aumento da síntese do peptídeo, mas também à inibição da sua libertação ou à conjugação dos dois efeitos.

A importância fisiológica e fisiopatológica do peptídeo natriurético ventricular e os mecanismos pelos quais este contribui para os níveis circulantes do peptídeo não estão ainda completamente esclarecidos. O teor tecidual do peptídeo auricular e do seu ARN_m está aumentado em vários modelos de hipertrofia ventricular experimental ou patológica. A localização e o teor da síntese correlacionam-se com o local e extensão da hipertrofia. A sobrecarga de pressão

produzida pela constrição da aorta abdominal do Rato acompanha-se de hipertrofia ventricular esquerda e de um acréscimo de uma a três vezes do factor natriurético e do ARN_m no ventrículo esquerdo, mas não no direito (Day et al., 1987). A coloração imunocitoquímica para o peptídeo demonstrou coloração granular profusa apenas no ventrículo esquerdo e não no direito.

A sobrecarga ventricular direita determinada por hipertensão pulmonar secundária a hipoxia induz a síntese do peptídeo auricular e do ARN_m no ventrículo direito (Stockman et al, 1988). A acumulação do peptídeo no ventrículo direito acompanhou o desenvolvimento de hipertrofia ventricular, tendo as concentrações tediuais decrescido para valores normais com o retorno às condições "normoxicas".

Em vários modelos de sobrecarga de volume aguda e crónica, no Rato, verifica-se a expressão ventricular do peptídeo auricular (Lattion et al., 1986). A fístula aorto-cava é a situação que se acompanha de maior acréscimo de peptídeo no ventrículo (aumento de onze vezes do ARN_m), e é também a circunstância experimental em que se verifica a hipertrofia ventricular mais marcada (Stockman et al., 1988).

Também em vários modelos animais de hipertrofia ventricular espontânea e cardiomiopática se verifica a expressão ventricular do peptídeo auricular. Uma estirpe de ratos Wistar Kioto, que desenvolve espontaneamente hipertrofia ventricular, tem acumulação marcada de peptídeo auricular e de ARN_m para o peptídeo em ambos os ventrículos, com um acréscimo de seis vezes de ARN_m no ventrículo esquerdo, e esta alteração não se acompanha de aumento significativo do ARN_m nem do peptídeo na aurícula (Lee et al., 1988). A miocardiopatia e insuficiência cardíaca espontâneas do Criceto é outro modelo em que se verifica aumentos marcados de peptídeo e ARN_m nos ventrículos, proporcionais à severidade da insuficiência cardíaca,

chegando a aumentar onze vezes nas situações extremas (Franch et al., 1988; Edwards et al., 1988).

Em doentes com miocardiopatia dilatada surgem grânulos imunoreativos nos miócitos ventriculares (ventrículos direito e esquerdo), predominando em localização subendocárdica (Saito et al., 1987).

Não é conhecido o estímulo para a expressão ventricular do peptídeo auricular. Há semelhanças ultrastruturais do tecido ventricular hipertrófico com o do recém-nascido, incluindo o reaparecimento de grânulos secretórios (Schwartz et al., 1986). Por outro lado, o miocárdio ventricular hipertrófico expressa formas fetais de actina e miosina (Izumo, 1987). Tal parece representar uma regressão do miócito ventricular a um estadio de desenvolvimento anterior, com reexpressão de fenótipo fetal. Foi invocada a hipoxia intracelular como possível explicação para o estímulo da secreção (Needleman et al., 1989). O ventrículo sintetizaria, acumularia e libertaria o peptídeo natriurético para reduzir a pré- e pós-carga, diminuindo a solicitação metabólica do miocárdio ventricular.

Embora a capacidade de armazenamento dos ventrículos seja reduzida, o seu potencial de síntese e de libertação sustentada é significativo. A massa ventricular capaz de expressar peptídeo auricular é cerca de dez vezes maior do que a auricular (Needleman et al., 1989). O conteúdo de ARN_m para o peptídeo expresso no ventrículo hipertrófico pode aproximar-se de um terço a metade do presente nas aurículas (Day et al., 1987). O peptídeo de proveniência ventricular pode participar na manutenção da homeostasia hidroelectrolítica e de pressão arterial nas situações de sobrecarga hemodinâmica crónica. A associação entre a hipertrofia ventricular e a sua expressão sugere que o peptídeo natriurético tenha efeito local modulador do desenvolvimento de hipertrofia ventricular

(Needleman et al., 1989). Com base no teor de ARN_m verificou-se uma proporção entre ARN_m das aurículas e dos ventrículos maior que a esperada (cerca de 100 vezes enquanto que para o peptídeo auricular era de cerca de 400 vezes), parecendo não haver diferenças na transdução do ARN_m entre as aurículas e os ventrículos (Tolunay, comunicação pessoal citada por Needleman, 1989). O peptídeo do ventrículo pode ser libertado “constitutivamente”, isto é, sem prévia acumulação em grânulos de armazenamento, e, dada a larga massa ventricular, pode contribuir significativamente para o peptídeo circulante (Needleman et al., 1989). Os miócitos ventriculares neonatais em cultura segregam peptídeo auricular constitutivamente (Bloch et al., 1986). Assim, os teores baixos usualmente descritos em ventrículos normais poderiam dever-se a uma taxa elevada de libertação ou à pequena capacidade de armazenamento. Durante o desenvolvimento fetal (De Champlain et al., 1970) e nas condições em que se realizam as culturas o tono simpático é baixo ou nulo. Na insuficiência cardíaca também foi descrita uma redução do conteúdo ventricular de noradrenalina (Chidsey et al., 1964). Estes factos, quer os referentes ao acréscimo de ARN_m do peptídeo natriurético em situações de tono simpático reduzido (Bloch et al., 1986; Edwards et al., 1988; Wharton et al., 1988), quer os nossos, verificados após a simpaticectomia, sugerem que o aumento de síntese e armazenamento ventricular, nestas situações, constitua mais um exemplo de modulação fenotípica de carácter repressivo das células efectoras exercida pela inervação simpática.

Capítulo VI

A INFUSÃO PROLONGADA DE UM BLOQUEADOR DE RECEPTORES DA ADENOSINA DETERMINA ALTERAÇÕES TRÓFICAS CARDIOVASCULARES

INTRODUÇÃO

Os resultados obtidos com a infusão de adenosina ou de 5'-N-etilcarboxamidoadenosina eram fortemente sugestivos do envolvimento de mecanismos purinérgicos nos efeitos tróficos da inervação simpática. Sendo inquestionável que os agonistas adenosinérgicos, quando infundidos nas condições experimentais descritas, permitem evitar as alterações morfológicas consequentes à simpaticectomia das estruturas estudadas (veia safena, coração, artérias mesentéricas e fígado), permaneciam questões quanto ao significado da participação da adenosina endógena neste processo de manutenção de fenótipo das células inervadas. Uma forma de pôr à prova a solidez da hipótese seria reproduzir os efeitos morfológicos da desnervação simpática bloqueando os receptores da adenosina. Na fase inicial deste estudo não existiam bloqueadores com características de solubilidade e potência adequadas para serem utilizados em infusão contínua segundo o protocolo necessário. Os disponíveis eram dificilmente solúveis e requeriam a administração de grandes volumes, incompatíveis com a utilização de bombas Alzet. Quando finalmente ficou disponível a 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX), blo-

queador hidrossolúvel não selectivo dos receptores da adenosina (Daly et al., 1985) com características de solubilidade e potência adequadas às nossas circunstâncias experimentais, utilizámo-la para infusão endovenosa recorrendo a bombas Alzet 2ML1 implantadas nas condições descritas no Capítulo II.

Infundimos o mesmo bloqueador por via intraperitoneal em ratos Wistar para mais facilmente avaliar os efeitos tróficos do bloqueio dos receptores da adenosina, estudando simultaneamente a evolução da pressão arterial.

Múltiplos dados bibliográficos motivavam o nosso interesse pela avaliação da pressão arterial nestas circunstâncias. A adenosina está envolvida no controlo da função cardiovascular a vários níveis, com acções nem sempre convergentes e, por vezes, antagónicas. A adenosina tem efeitos inibitórios sobre a transmissão adrenérgica no Coelho (Su, 1978) e no Rato espontaneamente hipertenso (Kamikava et al., 1980; Illes et al., 1989), mas noutras circunstâncias experimentais e no Rato não foi possível demonstrar qualquer efeito com relevo fisiológico sobre a transmissão adrenérgica (Jackson, 1987). O seu papel inibidor na regulação da libertação de renina está bem demonstrado (Tagawa e Vander, 1970; Spielman e Thompson, 1982; Kuan et al., 1990; Jackson, 1991). Os seus efeitos no sistema nervoso central foram documentados verificando-se diminuição da frequência do pulso e da pressão arterial no Rato (Robertson et al., 1988), mas também, e em sentido oposto, elevação tensional (Barraco, 1988; Barraco et al., 1992). A sua bem conhecida acção vasodilatadora pode contribuir para a manutenção de um tónus vasodilatador com importância fisiológica no Rato (Gustafsson et al., 1988). As divergências verificadas em alguns dos trabalhos citados têm sido interpretadas como podendo dever-se a diferenças de espécie e de circunstâncias experimentais, à activação preferencial de receptores A_1 ou A_2 , e

algumas são claramente atribuíveis à necessidade de efectuar os estudos sob anestesia, condicionando respostas adaptativas diversas das que ocorrem em condições mais próximas das fisiológicas.

Estes factos motivaram o interesse pela avaliação da evolução da pressão arterial no Rato tratado com o bloqueador dos receptores da adenosina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Infusão de DPSPX no Cão

Utilizaram-se minibombas Alzet (modelo 2ML1) para, segundo a metodologia descrita no capítulo II infundir DPSPX ($2,5 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) na veia safena de cães de raça indeterminada pesando 6 a 8 kg.

Os fragmentos das veias safenas colhidos ao quinto dia foram processados para doseamento de noradrenalina e para estudo morfológico segundo os métodos descritos no capítulo II.

O DPSPX foi adquirido à RBI (Natick, MA, USA).

Infusão de DPSPX no Rato

Ratos Wistar (pesando 250 a 300 g) eram treinados durante sete dias para a medição da pressão arterial pelo método do braçal na cauda. Utilizava-se a média de quatro determinações consecutivas para todos os cálculos ulteriores. Excluía-se os animais hipertensos ou com grande variabilidade dos valores basais. Os ratos seleccionados eram anestesiados com pentobarbital sódico ($30 \text{ mg}/\text{kg}$) por via intraperitoneal. Procedia-se à incisão da pele e da massa muscular subjacente na zona média da parede abdominal. Implantava-se na

cavidade peritoneal minibombas Alzet (modelo 2ML1) carregadas com 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina, por forma a infundir 30 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$, ou com o mesmo volume de água destilada. Suturava-se a incisão operatória por planos. Após o recobro anestésico os ratos eram mantidos em gaiolas com acesso livre a comida e água.

Efectuou-se determinações diárias da pressão arterial sistólica e diastólica. Um grupo de quatro ratos de cada série experimental (ratos controlo e ratos tratados com DPSPX) foi sacrificado no termo da infusão (7º dia), mantendo-se os restantes oito até ao 28º dia, sendo sacrificados por decapitação. Colhiam-se fragmentos do ventrículo esquerdo e artérias mesentérica, renal e da cauda para doseamento da noradrenalina e para estudo morfológico segundo a metodologia descrita no Capítulo II.

RESULTADOS

Infusão de DPSPX no Cão

Teor de noradrenalina

O teor de noradrenalina nas veias safenas dos cães infundidos com DPSPX não diferiu dos valores de controlo (Tabela 14).

Tabela 14 - Teor da noradrenalina (NA) nas veias safenas de cães controlo e tratados com 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX). Valores expressos como média \pm desvio padrão.

	<i>n</i>	<i>NA ($\mu\text{g}/\text{g}$) veia safena</i>
Controlo	4	2,40 \pm 0,32
DPSPX (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	2,51 \pm 0,28

Morfologia

As veias safenas dos cães infundidos com DPSPX não apresentavam alterações morfológicas. Os terminais adrenérgicos apresentavam aspectos semelhantes aos dos controlos.

A morfometria em microscopia de luz permitiu confirmar que a infusão deste bloqueador na dose de $2,5 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$ não determinava alterações em relação ao controlo (Tabela 15).

Tabela 15 - Diâmetro médio das células musculares lisas e dos núcleos dos fibroblastos das veias safenas de cães controlo e de cães tratados com 1,3-dipropil-8-sulfafenilxantina (DPSPX). Valores expressos como média \pm desvio padrão.

	<i>n</i>	<i>Células musculares</i> (μm)	<i>Fibroblastos</i> (μm)
Controlo	4	$6,25 \pm 0,60$	$3,56 \pm 0,74$
DPSPX ($2,5 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$)	4	$6,15 \pm 0,52$	$3,64 \pm 0,91$

Infusão de DPSPX no Rato

Evolução da pressão arterial

A infusão de DPSPX em ratos Wistar determinou aumento da pressão arterial, detectável entre o 3º e o 4º dia após o início do tratamento. No fim do período de infusão (7º dia) as pressões diastólica e sistólica estavam em média, respectivamente, 10,4 e 12,2 mmHg acima dos valores controlo ($p < 0,005$). Nos animais mantidos vivos até ao 28º dia verificou-se diminuição progressiva dos valores tensionais, com normalização pelo fim da segunda semana.

Teor de noradrenalina

Não se verificaram diferenças no teor tecidual de noradrenalina entre os animais controle e tratados (Tabela 16).

Tabela 16 - Teor de noradrenalina (NA) em nmol/g, no ventrículo esquerdo e nas artérias mesentérica e da cauda de ratos controle e de ratos tratados com 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX) durante sete dias, valores expressos como média \pm desvio padrão da média.

	<i>n</i>	<i>Controlo</i>	<i>n</i>	<i>DPSPX</i> (30 μ g/kg h ¹)
Ventrículo esquerdo	4	2,60 \pm 0,33	4	2,72 \pm 0,21
Artéria mesentérica	4	7,62 \pm 0,38	4	7,84 \pm 0,54
Artéria da cauda	4	14,50 \pm 0,95	4	15,40 \pm 0,79

Morfologia

O estudo morfológico dos ratos sacrificados ao 7º dia revelou alterações muito interessantes. Os animais tratados com DPSPX apresentavam fibrose peritoneal em grau variável, que em alguns era exuberante. O lume dos ramos das pequenas artérias mesentéricas (com cerca de 60 μ m de diâmetro exterior) encontrava-se francamente diminuído e por vezes ocluído, pela proliferação de células da íntima. Quer nas artérias renais, quer nas da cauda verificava-se a ocorrência de proliferação intimal com formação de botões que protruíam no lume dos vasos. A espessura da média das artérias renais e da cauda estava francamente aumentada. O diâmetro médio das células musculares lisas estava significativamente aumentado na artéria da cauda (6,55 \pm 0,85 μ m, n=4, vs. 4,51 \pm 0,31, n=4 no grupo controle; p<0,01).

O diâmetro médio dos núcleos das células miocárdicas dos ratos infundidos com DPSPX também se encontrava significativamente

aumentado ($7,81 \pm 0,38 \mu\text{m}$, $n=4$, vs. $5,25 \pm 0,26 \mu\text{m}$, $n=4$ no grupo controle; $p < 0,01$).

Nos animais sacrificados três semanas após o termo da infusão verificou-se regressão das alterações hipertróficas das artérias renais e da cauda, embora se mantivessem as hiperplásicas (botões de células musculares lisas ainda presentes na íntima).

DISCUSSÃO

A infusão de DPSPX, bloqueador não selectivo dos receptores da adenosina (Daly et al., 1985), na veia safena do Cão na dose de $2,5 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$, não determinou qualquer modificação, quer no teor de noradrenalina, quer na morfologia das veias infundidas.

Os resultados obtidos, demonstrando a ausência de efeitos em consequência da infusão prolongada de DPSPX neste modelo experimental, são susceptíveis de várias interpretações. A mais provável, é a de que não se tenha conseguido bloquear os receptores dado que a dose infundida foi muito baixa (embora no limite da solubilidade da substância). Menos consentânea com as hipóteses formuladas sobre os efeitos tróficos da adenosina, seria a interpretação de que, embora se verificasse bloqueio dos receptores, este não determinava os mesmos efeitos que a falta de mediador verificada na desnervação. Não era muito fácil aceitar esta explicação porquanto já tínhamos evidência de que a acção da adenosina se exercia sobre receptores e provavelmente na membrana celular, dado que a 5'-N-etilcarboxamido-adenosina, que não é metabolizada nem submetida a captação pelas células, tinha efeitos idênticos aos da adenosina. Interpretações mais rebuscadas obrigavam a considerar que estas discrepâncias se

poderiam dever a um balanço diverso de efeitos dos agonistas e do bloqueador sobre receptores A_1 e A_2 . Os agonistas actuariam sobre receptores A_1 e A_2 de cuja activação combinada resultava o efeito de manutenção do fenótipo das células alvo. O resultado do bloqueio dos receptores não seria o oposto do da activação porque esta se faria em proporção diversa da do bloqueio.

A primeira hipótese, mais provável e aparentemente mais fácil de pôr à prova, não podia ser testada nesta espécie animal com este bloqueador, por não ser possível aumentar a dose infundida. Decidimos por essa razão infundir a DPSPX no Rato, o que permitiu utilizar doses muito superiores.

A infusão contínua, durante sete dias, de DPSPX ($30 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) no Rato, determinou profundas alterações cardiovasculares. A pressão arterial aumentou gradualmente até ao termo da infusão, decrescendo depois progressivamente, para atingir valores basais no fim da segunda semana.

O estudo morfológico evidenciou alterações idênticas às descritas em consequência da desnervação simpática (hipertrofia das células musculares das artérias estudadas, aumento do diâmetro dos núcleos das células miocárdicas, fibroplasia). Tínhamos atribuído estas alterações hiperplásicas e hipertróficas, verificadas nos modelos de desnervação simpática, à falta de adenosina que deixava de se formar por não se libertar ATP dos terminais simpáticos. Os resultados obtidos com a infusão de DPSPX no Rato, reproduzindo um padrão morfológico muito semelhante ao da desnervação, reforçam a evidência experimental a favor do papel desempenhado pela adenosina como modulador do fenótipo das células efortoras. Esta interpretação deve ser ponderada porquanto se verificou simultaneamente uma elevação da pressão arterial que, podendo resultar,

pelo menos em parte, destas alterações tróficas nos vasos de resistência (Mulvany et al., 1980; Struyker-Boudier et al., 1990), também pode ter contribuído para a sua instalação (Folkow et al., 1958; Lever et al., 1986). Verificou-se, no entanto, que estas alterações também surgiam em locais não submetidos à influência do regime elevado de pressão arterial (fibroplasia do mesentério). Por outro lado, havia grande desproporção entre a magnitude das alterações tróficas e a modéstia da elevação tensional. Estes factos, não invalidando a influência da subida da pressão arterial em algumas das alterações descritas, permitem considerar com segurança que, quando se bloqueia os receptores da adenosina, se reproduz as modificações fenotípicas verificadas com a simpaticectomia.

Vários mecanismos podem concorrer para a génese de hipertensão neste modelo. A activação simpática por acção central (Barraco, 1988; Barraco et al., 1992) e/ou periférica (Su, 1981), a inibição do tono vasodilatador da adenosina, a inactivação do "travão" da libertação da renina (Jackson et al., 1991) e as alterações morfológicas vasculares (Folkow, 1983; Mulvany et al., 1980) são alguns dos factores previsíveis. Outros efeitos da adenosina podem contribuir simultaneamente para as acções hipertrófica/hiperplásica e hipertensiva do bloqueio dos receptores. De entre os conhecidos merecem ser considerados o possível acréscimo de agregação plaquetar (Haslam et al., 1978; Haslam e Cusack, 1981; Quattrim et al., 1988) com libertação de factores tróficos, a eventual diminuição da protecção contra lesão endotelial (Cronstein et al., 1986, 1989; Cronstein, 1992), a resistência à insulina (Green et al., 1990). Merece particular destaque a hipótese de alguns dos efeitos tróficos serem mediados pela angiotensina. Esta, a exemplo de outros factores vasopressores, pode ter efeitos pró-proliferativos (Daemen et al., 1991; Griffin et al., 1991; Mulvani, 1991) nas células musculares

lisas. A parede vascular tem sistemas geradores de angiotensina que podem ser antagonizados localmente pela adenosina, ou pelo menos esta actuando sobre a libertação da renina no rim (Jackson et al., 1991), pode influenciar a formação de angiotensina localmente. É curioso verificar que a infusão de adenosina determina aumento do efluxo de angiotensina quer nas artérias do antebraço quer nas coronárias do Homem com hipertensão essencial (Marzilli et al., 1992; Taddei et al., 1992). A maior exuberância das alterações fenotípicas verificadas neste modelo, em comparação com as que descrevemos nos modelos de simpaticectomia, poderá dever-se à conjugação dos efeitos resultantes do bloqueio da acção da adenosina de proveniência neuronal, com o bloqueio da proveniente das outras células, dos fibroblastos, das células musculares, das células endoteliais, que são as principais armazenadoras de adenosina. Também a adenosina oriunda da própria circulação, seja a adenosina plasmática, seja a proveniente de elementos celulares, fundamentalmente das plaquetas, poderá ter o seu efeito bloqueado nestas circunstâncias.

Capítulo VII

DISCUSSÃO GERAL

No início deste trabalho, quando nos questionávamos quanto ao papel trófico da inervação simpática e procurávamos identificar os mecanismos envolvidos, a primeira interrogação era a de se os efeitos da desnervação seriam dependentes do método utilizado e não consequência directa da simpaticectomia, e por isso não reproduzíveis por outros mecanismos de desnervação. A clampagem da veia safena durante cinco minutos poderia desencadear alterações distintas das atribuíveis à simpaticectomia. Havia já evidência de que o fenómeno de desdiferenciação das células alvo não era exclusivo deste modelo, uma vez que a ganglionectomia cervical determinava na artéria central da orelha de Coelho alterações semelhantes, embora de menor magnitude (Branco et al., 1984) e com distribuição topográfica diversa da da veia safena, em paralelo com o padrão de inervação destes dois vasos. Mesmo assim havia interesse em verificar na mesma estrutura (veia safena de Cão) se a desnervação simpática produzida por outro processo acarretava alterações semelhantes. Mostrámos que a desnervação química pela 6-hidroxiopamina determinava o mesmo padrão de desdiferenciação e aumento da actividade de síntese das células musculares lisas e dos fibroblastos. As alterações verificadas nas artérias mesentéricas, no coração e no fígado do Cão, e no coração do Rato, quando se procedia à simpaticectomia química, foram do mesmo tipo. O estudo morfométrico

permitiu demonstrar aumento das dimensões dos núcleos das células musculares lisas, fibroblastos e células miocárdicas, das dimensões das células musculares lisas e do número de fibroblastos. No Rato a desnervação química aumentou intensamente a produção de peptídeo natriurético no coração, tendo aparecido grânulos de tipo auricular, conhecidos como armazenadores do peptídeo natriurético, no ventrículo. Pudemos, desta forma, afastar o espectro de uma falsa atribuição de responsabilidade à desnervação e concluir que era de facto a ausência de inervação simpática o *primum movens* dos fenómenos descritos.

Todos os resultados deste trabalho conduzem à conclusão de que o sistema nervoso simpático exerce actividade moduladora do fenótipo das células efectoras, e de que esta actividade é de carácter repressivo, restringindo as dimensões e/ou actividade secretora, e, por vezes, proliferativa, das células. Não são muitos os trabalhos existentes na literatura sobre este assunto, embora seja possível encontrar publicações com resultados e interpretações semelhantes às nossas, após a desnervação simpática do expansor *secundariorum* do Pinto (Campbell et al., 1977), da aorta do Coelho (Fronek, 1983) e da artéria cerebral do Coelho (Dimitriadou et al., 1988).

O interesse pelas acções a longo prazo dos neuromediadores tem crescido desde que se acumularam dados a favor de acções mais duradouras do que as que eram observadas agudamente. O seu papel na regulação da síntese de proteínas, o modo como regulam a expressão de genes específicos em populações celulares diversas e exercem efeitos variáveis na mesma célula sob condições de crescimento distintas, são algumas das questões que têm suscitado actividade investigacional. O fenótipo celular condiciona a forma como os neurotransmissores regulam a expressão dos genes (Morgan e Curran, 1991). O fenótipo celular das células alvo influencia ou

deter-mina quais os receptores e sistemas de segundos mensageiros que estão presentes e que genes podem ser activamente transcritos. Assim, os receptores ou segundos mensageiros, o estado da cromatina, que genes imediatos e proteínas podem ser activamente transcritos ou que proteínas de transporte e ligação estão presentes, são factores condicionantes da regulação exercida pelos neuromediadores. Em suma, o ambiente intracelular influencia a interpretação dos sinais externos. Em contrapartida, os neuromediadores podem influenciar o estado de desenvolvimento das células, regulando a transcrição de genes (Morgan e Curran, 1991). Os mediadores podem funcionar como factores de crescimento de modo variável, dependendo da célula em que actuam. Por exemplo, a 5-hidroxitriptamina funciona como factor mitogénico para fibroblastos, mas em células epiteliais diferenciadas aumenta a produção de ferritina, proteína específica do tecido diferenciado. Assim, em células diferenciadas, que não estão em divisão, o efeito trófico do neuromediador pode contribuir para manter o estadio diferenciado, influenciando a transcrição de genes caracterizadores do fenótipo celular (Esterle e Sanders-Bush, 1991).

É curioso, a este propósito, verificar que a simpaticectomia efectuada durante o crescimento tem consequências diversas das verificadas nas nossas circunstâncias experimentais. Na realidade, enquanto no presente estudo verificámos que a simpaticectomia determinava alterações hipertróficas e, por vezes, hiperplásicas, na artéria central da orelha de coelhos em crescimento verifica-se decréscimo da síntese de ADN e diminuição da espessura da parede do vaso (Bevan e Tsuru, 1980). Da mesma forma, e ao contrário do que acontece no animal adulto, na veia porta do Rato recém-nascido verifica-se diminuição da área de corte transversal após a desnervação simpática (Ljung et al., 1979).

Procurando identificar o factor responsável pelo efeito trófico da inervação simpática, verificámos que a noradrenalina, que medeia na veia safena de Cão a actividade funcional simpática (Brandão e Guimarães, 1974) não evitava as alterações resultantes da simpaticectomia. Era, assim, necessário continuar a investigação, procurando identificar o factor trófico de entre as substâncias que podem ser libertadas pelos terminais simpáticos (ATP, polifosfatos, neuropeptídeo Y, cromograninas). O ATP parecia merecer atenção prioritária dado o seu papel de mediador, quase pode dizer-se universal, na inervação simpática. Sabe-se que o ATP é cotransmissor no sistema nervoso simpático (Burnstock, 1986; Flavahan e Vanhoutte, 1986; Campbell, 1987; Starke et al., 1991; Ribeiro e Sebastião, 1991) e que após a libertação é metabolizado em adenosina (Gordon, 1986). No entanto, não era fácil avaliar os efeitos do ATP quando infundido nas nossas circunstâncias experimentais, dado que a sua rápida metabolização extracelular tornava impossível distinguir as suas eventuais acções das dos seus metabolitos (entre os quais a adenosina). Por outro lado, os análogos estáveis do ATP que estavam disponíveis tinham acções de agonismo parcial e dessensibilização de receptores, o que complicaria adicionalmente a valorização dos resultados experimentais. Iniciámos, por isso, o estudo infundindo a adenosina e, com alguma felicidade, fomos bem sucedidos às primeiras tentativas. A adenosina, bem como a 5'-N-etilcarboxamidoadenosina, seu análogo estável não metabolizável nem sujeito a captação celular, preveniram os efeitos morfológicos da desnervação quando infundidas continuamente a partir do início desse processo. Este facto, a par da impossibilidade de obter os mesmos efeitos com a infusão de inosina, é muito sugestivo de que a acção dos agonistas purinérgicos se deva a efeitos sobre a membrana celular e à activação de receptores.

Não é fácil discutir efeitos tróficos de um mediador ou mesmo de factores de crescimento já bem caracterizados, isolando-os dos efeitos dos outros e das múltiplas interacções que entre eles se pode identificar. Assim, em relação ao factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), sabe-se que a prostaglandina E_1 inibe a estimulação da síntese do ADN por ele desencadeada nas células musculares lisas arteriais, provavelmente por estimulação da formação de AMP cíclico (Nilsson e Olson, 1984). Outros factores presentes na parede arterial podem modificar a acção deste factor trófico. De entre eles merece aqui particular atenção a adenosina (Berne et al., 1983). As células musculares lisas têm receptores A_2 capazes de estimular a adenilciclase (Anand-Srivastava et al., 1982). Em 1985 Jonzon et al. verificaram, em culturas de células musculares lisas provenientes da aorta de Rato, que a adenosina e os seus análogos L-PIA e NECA tinham efeitos sobre a proliferação celular. Os seus resultados eram compatíveis com a presença de receptores A_1 e A_2 cuja activação se acompanhava de diminuição de AMP cíclico no primeiro caso e de aumento no segundo, e associadamente de aumento ou diminuição de incorporação de timidina e de síntese de ADN. Este efeito era antagonizado por um bloqueador de receptores da adenosina, a 8-fenilteofilina, e potenciado pelo dipiridamol, inibidor da captação da adenosina. Estes resultados favorecem a interpretação de que os efeitos se devam a acções sobre receptores de membrana das células musculares. A activação de receptores A_1 pela L-PIA potencia a acção de estimulação da síntese de ADN desencadeada por concentrações sub-eficazes do factor de crescimento libertado das plaquetas (Jonzon et al., 1985). Este conjunto de resultados é fortemente sugestivo da participação da adenosina na regulação da proliferação das células musculares lisas. Assim, Jonzon et al. (1985) aventaram a possibilidade da adenosina poder ser um dos factores reguladores da

proliferação muscular lisa verificada na aterosclerose.

Muito interessante foi o facto de se verificar que o efeito inibitório dos agonistas purinérgicos só era detectável quando previamente se activava a adenilciclase, tratando as células musculares com forskolina. Nas células musculares não pré-incubadas com forskolina a actividade basal da adenilciclase era tão baixa que não era possível detectar efeitos inibitórios. Com base nestes achados, Jonzon et al. (1985) sugeriram que o balanço entre a activação de receptores A_1 e A_2 é um mecanismo pelo qual a célula muscular pode modular o efeito de mitogéneos extracelulares. Em aparente contradição com os resultados de Jonzon et al (1985), Rozengurt (1982a e b), em culturas de células Swiss 3T3, verificou aumento da produção de AMP cíclico e da síntese de ADN após activação pela NECA. Esta incongruência foi atribuída, considerando os resultados de Ralphe (1983) a efeitos diversos, consoante o tipo celular estudado, do AMP cíclico na disponibilização do cálcio.

Vários factos motivaram o interesse pelo papel dos radicais livres nos modelos experimentais que utilizámos. Por um lado, poder-se-ia discutir se a clampagem durante cinco minutos da veia safena de Cão não desencadeava lesões de reperfusão após anoxia, nas quais se implicam usualmente os radicais livres de oxigénio. Por outro, a analogia de efeitos resultantes da infusão de noradrenalina com desnervação parcial da veia infundida (Albino-Teixeira et al., 1989) e os efeitos da simpaticectomia química motivaram os estudos, que efectuámos, das acções da dismutase do superóxido nos modelos de desnervação pela 6-hidroxiopamina da veia safena de Cão, *in vitro*, e dos ventrículos e canal deferente do Rato, *in vivo*. A dismutase do superóxido preveniu parcialmente a desnervação simpática nestes dois modelos de simpaticectomia química. Estes resultados foram muito semelhantes aos que tínhamos descrito quando verificámos

que conseguíamos prevenir o efeito neurotóxico da noradrenalina infundida por via endovenosa, com a infusão simultânea de dismutase do superóxido (Albino-Teixeira et al., 1989). Concluiu-se, assim, pela similitude de acções neurotóxicas da noradrenalina e da 6-hidroxidopamina, reconhecendo o papel dos radicais livres de oxigénio nas duas circunstâncias experimentais.

É curioso verificar neste contexto que existem agora dados experimentais que estabelecem nexos entre os efeitos da adenosina e dos radicais de oxigénio com influências recíprocas em vários modelos experimentais. Usualmente, as acções tóxicas dos radicais livres de oxigénio merecem mais atenção do que as acções moduladoras de respostas fisiológicas. No entanto, estão já bem caracterizadas algumas acções deste último tipo. Por exemplo, os radicais livres em concentrações elevadas inibem a proliferação de fibroblastos, mas em concentrações baixas têm efeito pro-proliferativo (Murrell et al., 1990). Os próprios fibroblastos libertam radicais superóxido que estimulam a proliferação de outros fibroblastos (Murrell et al., 1990). Os radicais livres podem assim funcionar como desencadeadores rápidos, sensíveis e relativamente específicos da proliferação de fibroblastos. Estes, quando estimulados prolongadamente podem causar fibrose. Este mecanismo foi invocado para explicar a progressão da fibrose na contractura de Dupuytren (Murrell et al., 1987), bem como da fibrose pulmonar causada pela bleomicina (Phan e Fantone, 1984).

A adenosina é simultaneamente a unidade básica para a síntese dos ácidos nucleicos, elemento importante no sistema de armazenamento - utilização de energia (ATP) e factor regulador de numerosas funções biológicas. Entre estas, é particularmente interessante a sua acção anti-inflamatória. A adenosina é o inibidor endógeno da lesão endotelial causada pelos neutrófilos (Cronstein et al., 1986). Ela

pode, a exemplo do que ocorre na isquemia do miocárdio (Engler, 1987), funcionar como um autacoide com efeito anti-granulócitos, modificando a adesão destes às células endoteliais e inibindo a produção de radicais livres. Por um mecanismo semelhante ao do fenómeno designado na literatura anglo-saxónica por "pre-conditioning", em que períodos breves de isquemia miocárdica conferem protecção contra a lesão subsequente à reperfusão após isquemia (Murry et al., 1990), a adenosina pode proteger tecidos submetidos a hipoxia. Este efeito de "condicionamento" pode ser mimetizado por agonistas adenosinérgicos e é abolido por bloqueadores dos receptores da adenosina (Liu et al., 1991). A adenosina libertada nessas circunstâncias tem efeito vasodilatador e também acções anti-inflamatórias. O efeito anti-inflamatório é em parte devido à inibição da produção de radicais livres pelos neutrófilos. No modelo de isquemia miocárdica por microembolização (Hori et al., 1991), que é bastante distinto dos modelos clássicos de reperfusão após isquemia, o tratamento prévio com dismutase do superóxido exerce efeito protector que seria facilmente atribuível à neutralização de radicais livres. Surpreendentemente, este tratamento acompanhava-se de aumento de libertação de adenosina. O mesmo ocorria quando eram ensaiados outros fármacos que interferem com a formação de radicais livres, como o alopurinol e o CV3611. Esta protecção era abolida bloqueando os receptores da adenosina. O mecanismo pelo qual estes três fármacos aumentam a libertação de adenosina é desconhecido. Esta, por seu turno, tem efeitos inibitórios da activação leucocitária e da produção de radicais livres pelos leucócitos.

A adenosina parece ser o sinal químico que impede que a reacção inflamatória lese células viáveis junto de tecido necrótico (Engler et al., 1986). A adenosina seria o "sinal de vida" (Engler, 1987; Gruber et al., 1989) funcionando como indicador da viabilidade

das células. As células que já não catabolizam ATP não libertam adenosina, sendo assim identificadas como despojos necróticos prontos para remoção pelas células fagocitárias.

O efeito benéfico da dismutase do superóxido nos modelos de isquemia que referimos é fundamentalmente atribuível ao aumento de libertação da adenosina (Hori et al., 1991). A adenosina atenua, por um lado, a adesão e activação leucocitária e inibe a produção de radicais livres pelos leucócitos. O tratamento com prazosina agrava a isquemia do miocárdio inibindo a libertação de adenosina (Hori et al., 1989) e a clonidina tem papel benéfico, aumentando a libertação de adenosina (Kitakaze, 1987; Simpson et al., 1987). Por outro lado, a adenosina formada extracelularmente antagoniza muitos dos efeitos extracelulares do ATP. As suas acções tendem a reverter os efeitos dos estímulos que depletam o ATP intracelular. Em consequência desta "acção retaliatória" da adenosina (Newby, 1984) é possível aumentar o fornecimento energético por vasodilatação e estimular a captação da glicose dependente da insulina. É curioso verificar que muitas das nossas circunstâncias experimentais (desnervação por clampagem, simpaticectomia química) podem implicar a participação de radicais livres. Este facto, conjugado com os conhecimentos sobre os nexos entre as acções da adenosina e os efeitos dos radicais livres, suscita a especulação de que os mecanismos pelos quais a adenosina exerce os seus efeitos tróficos envolvem a modulação de acções dos radicais livres. Não é ainda possível responder a esta questão, embora pareça merecer ser posta à prova experimentalmente.

Os resultados obtidos com a infusão de adenosina ou de 5'-N-etilcarboxamidoadenosina eram fortemente sugestivos do envolvimento de mecanismos adenosinérgicos nos efeitos tróficos da inervação simpática. Uma forma de comprovar a importância da

adenosina nesta acção de modulação fenotípica das células efectoras seria reproduzir os efeitos morfológicos da desnervação simpática bloqueando os receptores da adenosina. Os resultados que obtivemos com a infusão de DPSPX no Rato, em que este bloqueador não selectivo dos receptores da adenosina desencadeou alterações tróficas semelhantes, embora de expressão mais exuberante, às das desnervação simpática, constituem um suporte significativo à tese de que os efeitos tróficos da inervação simpática se devem à activação de receptores da adenosina nas células efectoras. Que saibamos, este foi o primeiro estudo em que se procedeu à infusão prolongada deste bloqueador de receptores da adenosina e em que se avaliaram as suas repercussões tróficas cardiovasculares, bem como a sua influência no padrão de evolução da pressão arterial. O facto de neste modelo se ter verificado elevação da pressão arterial poderia ter contribuído para a exuberância das alterações hipertróficas e hiperplásicas encontradas nos animais tratados. De qualquer modo, a sua instalação em locais não submetidos ao regime tensional elevado, a grande desproporção entre a magnitude da elevação tensional e a das alterações vasculares, o curto espaço de tempo em que se instalaram, são argumentos fortes a favor de efeitos tróficos directos resultantes da acção do bloqueio dos receptores da adenosina. A extensão das alterações resultantes do bloqueio, muito mais exuberantes do que as resultantes da simpaticectomia, poderá depender em grande parte da interacção conjugada do bloqueio dos efeitos da adenosina proveniente dos nervos simpáticos, com o bloqueio da proveniente de outras células (fibroblastos, células musculares e células endoteliais), bem como da oriunda da circulação. Não querendo retomar a discussão, já a florada no capítulo VI, dos prováveis mecanismos desta subida tensional, é de sublinhar que parece justificado prosseguir o seu estudo para melhor caracterização deste novo modelo de

hipertensão e das suas possíveis implicações na compreensão da hipertensão essencial no Homem.

Desde que, em 1929, Drury e Szent-Gyorgyi descreveram os efeitos cardiovasculares da adenosina, têm sido identificadas muitas outras acções deste nucleosídeo. A adenosina tem efeitos cronotrópico e inotrópico negativos (Berne, 1964) e acção vasodilatadora em quase todos os territórios vasculares (Olsson e Pearson, 1990). Os seus efeitos no sistema nervoso central incluem a inibição da libertação de mediadores, a acção reguladora da pressão arterial e da frequência de pulso e respiratória em sistemas de integração neurovegetativa, acção sedativa e anticonvulsivante, e acção protectora em relação a noxas (isquemia, excitotoxicidade) (Williams, 1989,1992). Alguns factos contribuíram para a génese da hipótese de que a adenosina seja um dos anticonvulsivantes endógenos. A adenosina e agonistas adenosinérgicos têm acções anticonvulsivantes, enquanto os bloqueadores de receptores da adenosina têm efeito convulsivante no electrochoque, bem como nas convulsões audiogénicas e causadas por irritantes químicos (Dunwiddie e Worth, 1982; Walker, 1981). São bem conhecidos os efeitos proconvulsivantes das xantinas, cafeína e teofilina. Durante as crises convulsivas verifica-se aumento rápido e muito marcado da adenosina (Win et al., 1981; Schultz e Lowenstein, 1978), atingindo valores máximos com o termo da convulsão. Estes factos suscitaram a hipótese de que a actividade convulsiva produza uma rápida subida dos níveis de adenosina no sistema nervoso central que, activando receptores extracelulares, termina as convulsões por produzir hiperpolarização dos neurónios (Dragunow, 1986). A adenosina também exerceria efeito no período pós-convulsão, prolongando o período refractário (Burley e Ferrendelli, 1984).

O papel da adenosina nas situações de acidente vascular cerebral, exercendo um efeito descrito como neuroprotector, tem motivado

crescente atenção (Dragunow e Faull, 1988; Marangos, 1990). A adenosina, actuando como metabolito retaliatório e neuromodulador homeostático que é formado e/ou libertado em situações de desequilíbrio entre a solicitação e o aporte energético, permitiria restaurar este balanço. A adenosina diminui a excitação neuronal glutamatérgica desencadeada pela isquemia, determinando menor utilização de energia. De forma mais significativa a adenosina antagoniza a acumulação de cálcio livre citosólico, que pode ter efeito neurotóxico. Esta acção deve-se ao efeito inibitório directo dos canais de cálcio do tipo O e à interrupção do ciclo vicioso de despolarização das membranas neuroniais e activação de receptores glutamatérgicos. Estes factos têm sido explorados na busca de fármacos úteis nas situações de acidente vascular cerebral (Rudolphi et al., 1990).

A adenosina interfere ainda na regulação da libertação da renina (Jackson, 1991), inibe a agregação plaquetar, modula a actividade linfocitária, causa broncospasmo, inibe a lipólise em adipócitos (Rankumar et al., 1988; Williams, 1992). Os efeitos tróficos da adenosina mediados por receptores podem reconhecer-se, em vários modelos (para além dos que nós observámos em relação à desnervação simpática da veia safena, do miocárdio e da artéria mesentérica do Cão, da artéria central da orelha do Coelho e do miocárdio do Rato, e em relação às alterações cardiovasculares determinadas pela infusão prolongada do bloqueador dos receptores da adenosina, DPSPX, no Rato). Dois deles merecem referência particular. A adenosina previne parcialmente a fibrose hepática após lesão por tetracloreto de carbono (Hernández-Munoz et al., 1990) não interferindo com a acção hepatotóxica do mesmo. Embora a metodologia empregue não permita comparações directas, estes resultados merecem ser valorizados tendo presentes os que obtivemos quando estudámos os espaços porta do fígado de cães desnerva-

dos pela 6-hidroxi-dopamina. Nestas circunstâncias experimentais a hiperplasia de fibroblastos e mastócitos causada pela simpaticectomia é prevenida pela infusão de adenosina. Se o papel da adenosina na regulação do fluxo sanguíneo hepatocitário está bem estudado (Lautt et al., 1988), não há, que saibamos, estudos que permitam estabelecer nexos entre estes efeitos e as situações de fibroplasia hepática. Tendo presentes as acções moduladoras de respostas inflamatórias, as interacções com os mecanismos que envolvem radicais livres, é tentadora a especulação sobre o papel da adenosina na prevenção das lesões resultantes de agentes hepatotóxicos. Por outro lado, e também com carácter especulativo mas merecedor de verificação, pode aventar-se a hipótese de que a desnervação simpática contribua para a fibroplasia hepática, nomeadamente a associada com a ingestão de etanol (Moura, 1985). De facto, sabe-se que as catecolaminas podem originar produtos de condensação com o aldeído acético que, quando oxidados, formam substâncias semelhantes à 6-hidroxi-dopamina (Collins et al., 1982, Moura, 1985). Está bem determinado o efeito neurotóxico sobre os terminais simpáticos de produtos de condensação da adrenalina com o aldeído acético (Azevedo e Osswald, 1977). Outro exemplo de efeito trófico da adenosina é o descrito na transdiferenciação celular, ou conversão de um tipo celular noutro, que ocorre nas células epiteliais da íris durante a regeneração após lentectomia. O processo de desdiferenciação que precede a rediferenciação em células do cristalino (alterações morfológicas e despigmentação) é estimulado pela adenosina (Torres et al., 1988). Todos estes efeitos poderão ter importância clínica para explicação da patogenia e eventualmente para o desenvolvimento de novas formas de terapêutica (na hipertensão, na aterosclerose, no "pre-conditioning", na prevenção de lesões de reperfusão após isquemia transitória, nos acidentes vasculares cerebrais, na epilepsia,

na ansiedade e na depressão, e na regulação imunológica e inflamatória).

O tratamento da taquicardia supraventricular paroxística e o uso em estudos de imagiologia cardiovascular são as únicas situações de emprego clínico já consagrado. Sendo a adenosina ubiquitária e tão importante o balanço fino dos seus efeitos, é difícil conseguir fármacos com grande especificidade de acção. A escolha de fármacos agonistas ou bloqueadores específicos para um dos subtipos de receptores conhecidos não modifica muito esta limitação. O mesmo raciocínio se aplica aos bloqueadores de captação ou modificadores do metabolismo, embora neste último campo se possa prever alguma especialização topográfica. A grande esperança é a da obtenção de fármacos que, por qualquer dos mecanismos invocados, só sejam activos em circunstâncias anormais de produção ou utilização da adenosina. Apesar destas limitações, há já um número apreciável de fármacos em várias fases de ensaio, destinados a eventual utilização terapéutica, para quase todos os campos enunciados: ansiolíticos, antidepressores, antipsicóticos, anti-epilépticos, na prevenção e tratamento do acidente vascular cerebral, na prevenção e no tratamento do enfarte do miocárdio, anti-hipertensores, anti-agregantes plaquetares, anti-inflamatórios e imunomoduladores (Williams, 1992). Não é tarefa fácil prever qual ou quais de entre estes terão real relevância clínica. Tal depende de, para além dos factores já indicados, se vir a verificar especificidade de efeitos que justifiquem a utilização de novos fármacos em campos terapêuticos já relativamente bem apetrechados, como é o caso dos anti-hipertensores. De qualquer modo, os resultados do presente trabalho tornam imperativo o reconhecimento da necessidade de aprofundar a avaliação dos mecanismos adenosinérgicos no campo da hipertensão, quer no estudo da sua génese, quer no desenvolvimento de novos

fármacos. Parece justificada igual expectativa nos resultados do estudo do envolvimento da adenosina na prevenção e tratamento de situações clínicas em que a participação de radicais livres é conhecida, nomeadamente as de reperfusão após anoxia, tais como o enfarte do miocárdio e o acidente vascular cerebral.

Resumo e Conclusões

RESUMO E CONCLUSÕES

O efeito trófico da inervação simpática sobre as células efectoras estava já bem estudado na veia safena de Cão e na artéria central da orelha de Coelho. Após a desnervação verificam-se alterações morfológicas muito marcadas. A parede dos vasos está espessada, há hipertrofia das células musculares lisas cujos núcleos estão aumentados de volume, com numerosas indentações e com redução de heterocromatina, verificando-se ainda haver aumento acentuado do retículo endoplasmático rugoso. O número de fibroblastos está aumentado, podendo também observar-se nestas células um padrão de alterações morfológicas similar. Estes resultados permitem afirmar que a inervação simpática modula o fenótipo das células efectoras.

Procurando identificar o factor responsável pelo efeito trófico da inervação simpática, verificámos que a noradrenalina infundida continuamente, não evitava as alterações resultantes da simpaticectomia. Sabe-se que o ATP é cotransmissor no sistema nervoso simpático e que após a libertação é metabolizado em adenosina. Decidimos, por isso, estudar a participação da componente purinérgica da inervação simpática nestes efeitos tróficos. Com esse objectivo, infundimos continuamente adenosina ou análogos por via endovenosa e estudámos os seus efeitos sobre as consequências da desnervação cirúrgica (veia safena de Cão) ou química (veia safena, coração, fígado e artérias mesentéricas de Cão). As consequências morfológicas da desnervação química induzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na veia safena de Cão foram sobreponíveis às descritas após a desnervação cirúrgica. De igual modo, a desnervação química provocou hipertrofia e hiperplasia das células efectoras no coração, fígado e

artérias mesentéricas de Cão. Procedeu-se à infusão contínua, por via endovenosa, durante cinco dias, recorrendo a bombas Alzet 2ML1, de noradrenalina ($0,1 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$), adenosina ($10 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$), inosina ($10 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) ou 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) ($0,1 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$) em cães desnervados e em cães controlo. A noradrenalina e a inosina não preveniram as alterações morfológicas causadas pela desnervação. Pelo contrário, quer a adenosina quer a NECA preveniram totalmente as alterações morfológicas provocadas pela simpaticectomia. Estes resultados são fortemente sugestivos de que o seu efeito se exerça por um mecanismo dependente da activação de receptores da membrana celular, porquanto a NECA actua extracelularmente, não sendo metabolizada nem submetida a captação celular significativa.

A reprodução dos efeitos morfológicos da desnervação simpática após bloqueio de receptores da adenosina seria uma forma de comprovar a sua importância nesta acção de modulação fenotípica.

Por outro lado, em vários modelos de hipertensão há alterações estruturais semelhantes às encontradas após simpaticectomia.

Decidimos, por isso, infundir continuamente, durante sete dias, por via intraperitoneal, no Rato, 1,3-dipropil-8-sulfofenilxantina (DPSPX), um bloqueador não selectivo dos receptores da adenosina, na dose de $30 \mu\text{g}/\text{kg h}^{-1}$. Este tratamento determinou profundas alterações cardiovasculares.

A pressão arterial aumentou gradualmente até ao fim da infusão.

O estudo morfológico evidenciou alterações hiperplásicas e hipertróficas idênticas, embora mais exuberantes, às descritas em consequência da simpaticectomia (hipertrofia das células musculares lisas das artérias mesentérica, renal e da cauda, proliferação intimal com formação de botões que protrudiam no lume dos vasos, aumento

do diâmetro dos núcleos das células miocárdicas, fibroplasia). No seu conjunto, estes resultados reforçam a evidência experimental a favor do papel desempenhado pela adenosina como modulador do fenótipo das células efectoras, e indiciam a participação de mecanismos adenosinérgicos no desenvolvimento da hipertensão.

Verificámos que a noradrenalina, quando infundida por via endovenosa, causava desnervação simpática por um mecanismo que dependia da formação de radicais livres. A analogia de efeitos resultantes da infusão de noradrenalina, com desnervação parcial da veia infundida, e os efeitos da simpaticectomia química pela 6-OHDA, motivaram os estudos, que efectuámos, das acções da dismutase do superóxido nos modelos de desnervação pela 6-OHDA da veia safena de Cão, *in vitro*, e do ventrículo e do canal deferente do Rato, *in vivo*. A dismutase do superóxido preveniu parcialmente a desnervação simpática, nestes dois modelos experimentais. Estes resultados permitem concluir pela similitude de acções neurotóxicas da noradrenalina e da 6-OHDA, e reconhecer o papel dos radicais livres de oxigénio em ambas as circunstâncias experimentais.

Dos resultados experimentais apresentados pode concluir-se que:

1. A inervação simpática exerce efeitos tróficos modulando a expressão fenotípica das células efectoras.
2. Esta acção trófica é mediada pela adenosina.
3. O papel trófico da adenosina na inervação simpática não está confinado ao sistema cardiovascular.
4. O efeito trófico da adenosina parece dever-se à activação de receptores de membrana das células efectoras.

5. O bloqueio prolongado dos receptores da adenosina provoca alterações estruturais no sistema cardiovascular e hipertensão arterial.
6. A noradrenalina pode exercer efeitos neurotóxicos sobre os terminais simpáticos por mecanismos semelhantes aos da 6-hidroxi-dopamina.
7. Os radicais livres estão envolvidos nas acções neurotóxicas da noradrenalina e da 6-hidroxi-dopamina.

Summary and Conclusions

SUMMARY AND CONCLUSIONS

There is evidence for a trophic influence exerted by the sympathetic innervation of blood vessels upon vascular effector cells. Surgical denervation of the canine lateral saphenous vein or of the rabbit ear artery produced thickening of the vessel wall accompanied by marked morphological changes of extraneuronal cells. Smooth muscle cells were larger and presented indentation of the nuclear envelope, reduction of heterochromatin and accentuation of the rough endoplasmic reticulum. Fibroblasts were more numerous and showed similar structural alterations. These results allowed us to conclude that sympathetic innervation modulates the phenotype of effector cells.

Since the cotransmission by noradrenaline and adenosine-5'-triphosphate (ATP) in sympathetic nerve endings is well established, the role played by the noradrenergic and purinergic components in determining these trophic effects was evaluated. The effects of noradrenaline and adenosine, an ATP metabolite, in a number of tissues after surgical (saphenous vein of the dog) or chemical (saphenous vein, heart, liver and mesenteric arteries of the dog) sympathetic denervation were studied. Chemical denervation by 6-hydroxidopamine (6-OHDA) produced the same morphological changes as surgical denervation in the saphenous vein of the dog. Similarly, light microscopy morphometry showed hypertrophic-hyperplastic changes of effector cells in the heart, liver and mesenteric arteries of the dog. Noradrenaline ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$), adenosine ($10 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$), inosine ($10 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$) or 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$) were infused by the intravenous route, for

five days beginning immediately after denervation, using Alzet minipumps. Noradrenaline and inosine infusions did not prevent the morphological changes caused by denervation. In contrast, both adenosine and NECA infusions totally prevented those changes. Since NECA acts extracellularly, being neither metabolized nor subjected to significant cellular uptake, the positive effect of both adenosine and NECA is strongly suggestive of a receptor-operated mechanism.

Structural changes similar to those occurring after sympathetic denervation have been observed in various hypertensive models. Considering the trophic role of adenosine, that similarity led us to investigate the effect of long-term, continuous intraperitoneal administration of 1,3-dipropyl-8-sulphophenylxanthine (DPSPX) (30 $\mu\text{g}/\text{kg. h}^{-1}$ for seven days), a non-selective adenosine antagonist, in normotensive rats. DPSPX induced profound alterations in the cardiovascular system. Blood pressure increased progressively until the seventy day. The lumen of small mesenteric arteries was narrowed or occluded due to proliferation of intimal cells. Smooth muscle cells of the mesenteric, renal and caudal arteries presented hypertrophy and the nuclei of myocardial cells was increased. These results confirm the trophic action of adenosine and suggest its involvement in hypertensive mechanisms.

We had previously found that continuous intravenous infusion of noradrenaline through the lateral saphenous vein of the dog damaged the sympathetic nerve endings of the infused vein. The same study provided evidence that a substance derived from noradrenaline exerted a 6-OHDA-like effect. In order to further explore the analogy of the neurotoxic effects of noradrenaline and 6-OHDA, the effects of superoxide dismutase (SOD) were studied in two models of 6-OHDA-induced denervation (denervation of the

lateral saphenous vein of the dog, *in vitro*, and denervation of the ventricle and vas deferens of the rat, *in vivo*). SOD exerted a protective effect toward the neurotoxic action of 6-OHDA. These results are compatible with an involvement of free radicals in 6-OHDA-induced denervation and represent a further contribution to the view that the mechanisms involved in 6-OHDA- and noradrenaline-induced neurotoxicity are similar.

From the present results, it may be concluded that:

1. Sympathetic innervation exerts trophic effects, modulating the phenotype of effector cells.
2. Adenosine is the trophic factor responsible for these actions.
3. The trophic role of adenosine is not restricted to vascular tissue.
4. Adenosine trophic effects are mediated by activation of membrane receptors on the effector cells.
5. Long-term blockade of adenosine receptors induces cardiovascular structural changes and hypertension.
6. Noradrenaline may exert neurotoxic effects upon sympathetic varicosities reminiscent of those of 6-OHDA.
7. Free radicals are involved in the neurotoxic actions of the noradrenaline and 6-OHDA.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

Abel PW, Hermsmeyer K (1981) Sympathetic cross-innervation of SHR and genetic controls suggests a trophic influence on vascular muscle membranes. *Circ Res* 49: 1311-1318

Abel PW, Trapani AJ, Aprigliano O, Hermsmeyer K (1980) Trophic effect of norepinephrine on the rat portal vein in organ culture. *Circ Res* 47: 770-775

Aberer W, Stitzel R, Winkler H, Huber E (1979) Accumulation of ^3H -ATP in small dense core vesicles of superfused vasa deferentia. *J Neurochem* 33: 797-801

Albino-Teixeira A, Azevedo I, Osswald W (1988) Prevention by purines of the structural changes caused at the extraneuronal level by surgical and chemical denervation. *Br J Pharmacol* 96: 785

Albino-Teixeira A, Azevedo I, Branco D, Rodrigues-Pereira E, Osswald W (1989) Sympathetic denervation caused by long-term noradrenaline infusions; prevention by desipramine and superoxide dismutase. *Br J Pharmacol* 97: 95-102

Albino-Teixeira A, Azevedo I, Branco D, Osswald W (1990a) Purine agonists prevent trophic changes caused by sympathetic denervation. *Eur J Pharmacol* 179: 141-149.

Albino-Teixeira A, Matias A, Soares-da-Silva P, Sarmiento A, Azevedo I (1990b) Effects of sympathetic denervation on liver fibroblasts: prevention by adenosine. *J Auton Pharmac* 10: 181-189

Albino-Teixeira A, Azevedo I, Martel F, Osswald W (1991) Superoxide dismutase partially prevents sympathetic denervation by 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344: 36-40

Anand-Srivastava MB, Franks DJ, Cantin M, Genest J (1982) Presence of "Ra" and "P" site receptors for adenylate cyclase in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 108: 213-219

Anderson JV, Christofides ND, Vinas P (1986) Radioimmunoassay of alpha rat atrial natriuretic peptide. *Neuropeptides* 7: 159-173

Aprigliano A, Hermsmeyer K (1977) Trophic influence of the sympathetic nervous system on the rat portal vein. *Circ Res* 41: 198-206

Arnett CO, Davis JN (1979) Denervation-induced changes in α and β -adrenergic receptors of the rat submandibular gland. *Pharmacol Exp Ther* 211: 394-400

Aubineau P, Dimitriadou V, Bouchaud C, Seylaz J (1986) Direct innervation of neurolipomastocytes in the rabbit and rat cerebral artery wall. *Acta Physiol Scand* 126: 21-24

Azevedo I, Osswald W (1977) Adrenergic nerve degeneration induced by condensation products of adrenaline and acetaldehyde. *Archives of Pharmacology* 300: 139-144

Azevedo I, Osswald W (1986) Trophic role of the sympathetic innervation. *J Pharmacol (Paris)* 17 (Suppl II): 30-43

Azevedo I, Soares-da-Silva P (1981) Are fibroblasts adrenergically innervated cells? *Blood Vessels* 18: 330-332

Barraco RA (1988) Adenosinergic modulation of brainstem mechanisms involved in cardiovascular control. In: Paton DM (ed) *Adenosine and Adenine Nucleotides. Physiology and Pharmacology*. Taylor and Francis, London, pp 233-240

Barraco RA, Ergene E, El-Ridi MR (1992) Purinergic receptors

in the nucleus tractus solitarius mediate distinct cardiorespiratory response patterns: pathophysiologic implications. *Int J Purine and Pyrimidine Res* 3: 39

Bennett T, Burnstock G, Cobb JLS, Malmfors T (1970) An ultrastructural and histochemical study of the short-term effects of 6-hydroxydopamine on adrenergic nerves in domestic fowl. *Br J Pharmacol* 38: 802-809

Berkowitz BA, Spector S, Tarver JH (1972) Resistance of noradrenaline in blood vessels to depletion by 6-hydroxydopamine or immuno-sympathectomy. *Br J Pharmacol* 44: 10-16

Berne RM (1964) Regulation of coronary blood flow. *Physiol Rev* 44: 1-29

Berne RM (1983) Regulatory function of adenosine. In: Rall TW, Rubio R (eds). *Developments in Pharmacology 2*. Martinus Nijhoff, the Hague

Bevan RD (1975) Effect of sympathetic denervation on smooth muscle cell proliferation in the growing rabbit ear artery. *Circ Res* 37: 14-19

Bevan RD, Tsuru H (1980) Changes in the tunica media of the rabbit ear artery after denervation are age related. In: Bevan JA, Godfraind T, Maxwell RA, Vanhoutte PM (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Raven Press, New York, pp 119-123

Blaschko H, Born GVR, D'Lorio A, Eade NR (1956) Observations on the distribution of catecholamines and adenosine triphosphate in the bovine adrenal medula. *J Physiol (Lond)* 133: 548-557

Bloch KD, Seidman JC, Naftilan JD, Fallon JT, Seidman CE (1986) Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell* 47: 695-702

Bobik A, Korner P, Carson V, Oliver JR (1980) Cardiac α -adrenoceptors and adenylcyclase activity in rabbit heart during conditions of altered sympathetic activity. *Circ Res* 46 (Suppl 1): 43-44

Branco D, Albino-Teixeira A, Azevedo I, Osswald W (1984) Structural and functional alterations caused at the extraneuronal level by sympathetic denervation of blood vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326: 302-312

Brandão F, Guimarães S (1974) Inactivation of endogenous noradrenaline released by electrical stimulation in vitro of dog saphenous vein. *Blood Vessels* 11: 45-54

Breese GR, Traylor TD (1971) Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br J Pharmacol* 42: 88-99

Brown JH, Buxton IL (1985) α 1-Adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res* 57: 532-537

Burley ES, Ferrendelli JA (1984) Regulatory effects of neurotransmitters on electroshock and pentylene-tetrazol seizures. *Fed Proc* 43: 2521-2524

Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L (eds.) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. Raven Press, New York, pp 107-118

Burnstock G (1980) Purinergic receptors in the heart. *Circ Res* 46: 175-182

Burnstock G (1981) Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. *J Physiol* 313: 1-35

Burnstock G (1986) The changing face of autonomic neurotransmission. *Acta Physiol Scand* 126: 67-91

Burnstock G (1989) Purine receptors. In: Ribeiro JA (ed). Adenosine Receptors in the Nervous System. Taylor and Francis, London, pp 1-14

Burnstock G (1990) Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. *Neurochem Int* 17: 357-368

Burnstock G, Buckley NJ (1985) The classification of receptors for adenosine and adenine nucleotides. In: Paton DM (ed) *Methods in Pharmacology*. Plenum Press, New York, London, pp 193-212

Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P₂ purinoceptor?. *Gen Pharmacol* 16: 433-440

Burnstock G, Kennedy C (1986) A dual function for adenosine 5'-triphosphate with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ Res* 58: 319-330

Campbell GR (1987) Cotransmission. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 27: 51-70

Campbell GR, Gibbins I, Allan I, Gannon B (1977) Effects of long term denervation on smooth muscle of the chicken expensor secundariorum. *Cell Tissue Res* 176: 143-156

Campbell GR, Chamley-Campbell J, Robinson R, Hermsmeyer K (1980) Trophic interactions between nerve and vascular smooth muscle in transplants to the anterior eye chamber. In: Bevan JA, Godfraind T, Maxwell RA, Vanhoutte PM (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Raven Press, New York, pp 107-113

Cantin M, Gutkowska J, Thibaut G (1984) Immunocytochemical localization of atrial natriuretic factor in the heart and salivary glands. *Histochemistry* 80: 113-127

Casti A, Corti A, Reali N, Mezzetti G, Orlandini G, Caldarera CM

(1977) Modifications of major aspects of myocardial ribonucleic acid metabolism as a response to noradrenaline: *Biochem J* 168: 333-340

Chamley JH, Campbell GR (1975) Trophic influences of sympathetic nerves and cyclic AMP on differentiation and proliferation of isolated smooth muscle cells in culture. *Cell Tissue Res* 161: 497-510

Chamley JH, Campbell GR (1976) Tissue culture: interaction between sympathetic nerves and vascular smooth muscle. In: Bevan JA, Burnstock G, Johansson B, Maxwell RA, Nedergaard OA (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Karger, Basel, pp 10-18

Chamley JH, Campbell GR, Burnstock G (1974) Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture. *J Embryol Exp Morphol* 32: 297-323

Chidsey AC, Kaiser GA, Sonnenblick EH, Spann JF, Braunwald E (1964) Cardiac norepinephrine stores in experimental heart failure in the dog. *J Clin Invest* 43: 2386-2392

Claman H (1985) Mast cells, T cells and abnormal fibrosis. *Immunology Today* 6: 192-195

Claycomb WC (1983) Cardiac muscle cell proliferation and cell differentiation in vivo and in vitro. *Adv Exp Med Biol* 161: 249-265

Cohen G, Heikkila R (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249: 2447-2452

Collins MA, Hannigan JJ, Origitano T, Moura D, Osswald W (1982) On the occurrence, assay and metabolism of simple tetrahydroisoquinolines in mammalian tissue. In: Bloom F, Barchas J, Sandler M, Usdin E (eds) *Beta-carbolines and Tetrahydroisoquinolines*. Alan R Liss, New York, pp 155-166

Cooper GIV (1987) Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol* 49:501-518

Cronstein BN (1992) Adenosine an antiinflammatory autocoid. *Int J Purine and Pyrimidine Res* 3: 27

Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R (1986) Adenosine is an endogenous inhibitor of neutrophil mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 18: 760-770

Cronstein BN, Rose FR, Pughise C (1989) Adenosine, a cytoprotective autocoid: effects of adenosine on neutrophil plasma membrane viscosity and chemoattractant receptor display. *Biochem Biophys Acta* 987: 176-180

Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK (1985) Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of α -1 adrenoceptor by norepinephrine. *Science* 227: 749-751

Cruise JL, Cotecchia S, Michalopoulos G (1986) Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 127: 39-44

Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos GK (1987) α 1-Adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 7: 1189-1194

Currie MG, Newman WH (1986) Evidence for alpha1 adrenergic receptor regulation of atriopeptin release from the isolated rat heart. *Biochem Biophys Res Comm* 137: 94-100

Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM (1991) Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 68: 450-456

Daly JW (1983) Role of ATP and adenosine receptors in physiol-

ogic processes: Summary and prospectus. In: Daly JW, Kuroda I, Phillis JW, Shimizer J (eds) *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives*. Raven Press, New York, pp 275

Daly JW, Padgett W, Shamin MT, Butts-Lamb P, Waters J (1985) 1,3-Dialkyl-8-(p-sulfophenyl) xanthines: potent water soluble antagonists for A₁- and A₂-adenosine receptors. *J Med Chem* 28: 487-492

Davidson S, Mansour A, Gallily R, Smolarski M, Rofolovitch M, Ginsburg H (1983) Mast cell differentiation depends on T-cells and granule synthesis on fibroblasts. *Immunology* 48: 439-452

Day ML, Schwartz D, Wiegand RC, Stockmann PT, Brunnert SR (1987) Ventricular atriopeptin: unmasking of messenger RNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexametasone. *Hypertension* 9: 485-491

De Champlain J, Malmfors T, Olson L, Sachs CA (1970) Ontogenesis of peripheral adrenergic neurons in the rat pre- and post-natal observations. *Acta Physiol Scand* 80: 276-288

De Mey J, Burnstock G, Vanhoutte PM (1979) Modulation of the voked release of noradrenaline in canine saphenous vein via presynaptic receptors for adenosine but not ATP. *Eur J Pharmacol* 55: 401

De Peusner ICW, Stefano FJE, Perec CJ (1979a) Effects of sympathectomy on the in vivo α and β -responses of the parotid gland. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 308: 211-216

De Peusner ICW, Perec CJ, Stefano FJE (1979b) Effects of sympathectomy on the in vitro α and β -responses of the parotid gland. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 308: 217-221

Dimitriadou V, Aubineau P, Taxi J, Seylaz J (1988) Ultrastructural changes in the cerebral artery wall induced by long-term

sympathetic denervation. *Blood Vessels* 25: 122-143

Dragunow M (1986) Adenosine: The brain's natural anticonvulsivant?. *Trends Pharmacol Sci* 7: 128-130

Dragunow M, Faull RLM (1988) Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol Sci* 9: 193-194

Drury AN, Szent-Gyorgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their actions upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237

Dubus I, Samuel JL, Marotte F, Delcayre C, Rappaport L (1990) β -Adrenergic agonists stimulate the synthesis of noncontractile but not contractile proteins in cultured myocytes isolated from adult rat heart. *Circ Res* 66: 867-874

Dunwiddie TV, Worth T (1982) Sedative and anticonvulsivant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 200: 70-76

Dusseau JW, Hutchins PM (1988) Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: a role for adenosine. *Respir Physiol* 71: 33-44

Dusseau JW, Hutchins PM, Malbasa DS (1986) Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Circ Res* 59: 163-170

Ebendal T, Olson L, Seiger A, Hedlund KO (1980) Nerve growth factors in the rat iris. *Nature (London)* 286: 25-28

Edwards BS, Ackermann DM, Lee ME, Reeder GS, Wold LE, Burnett JC (1988) Identification of atrial natriuretic factor within ventricular tissue in hamsters and humans with congestive heart failure. *J Clin Invest* 81: 82-86

Ellis S (1980) Effects on the metabolism. In: Szekeres L (ed) *Adrenergic Activators and Inhibitors (Part I)* Springer Verlag, Berlin, pp 319-349

Engler RL (1987) Consequences of activation and adenosine mediated inhibition of granulocytes during myocardial ischemia. *Fed Proc* 46: 2407-2412

Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW (1986) Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251: 314-318

Esterle TM, Sanders-Bush E (1991) From neurotransmitter to gene. *FASEB J* 5A: 1231

Finch L, Hanslen H, Khun H, Thöenen H (1973) Rapide recovery of vascular adrenergic nerves in the rat after chemical sympathectomy with 6-OHDA. *Br J Pharmacol* 48: 59-72

Flavahan NA, Vanhoutte PM (1986) Sympathetic purinergic vasoconstriction and thermosensitivity in a canine cutaneous vein. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 784-789

Fleming WW (1963) A comparative study of supersensitivity to norepinephrine and acetylcholine produced by denervation, decentralization and reserpine. *J Pharmacol Exp Ther* 141: 173-179

Fleming WW, Westfall DP (1988) Adaptive supersensitivity. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines I (Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 90)*. Springer-Verlag, pp 509-559

Folkow B (1983) Neurotrophic effects on the vascular bed. *Acta Med Scand Suppl* 672: 95-99

Folkow B, Grimby G, Thulesius O (1958) Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of peripheral resistance. *Acta Physiol Scand* 44: 255-272

Franch HA, Dixon RAF, Blaine EH, Siegel PKS (1988) Ventricular atrial natriuretic factor in the cardiomyopathic hamster model of congestive heart failure. *Circ Res* 62: 31-36

Frank Henderson J (1985) The study of adenosine metabolism in isolated cells and tissues. In Paton DM (ed) *Methods in Pharmacology*, vol.6, *Methods Used in Adenosine Research*. Plenum Press, New York, pp 67

Fredholm BB (1976) Release of adenosine-like material from isolated perfused dog adipose tissue following sympathetic stimulation and its inhibition by adrenergic α -receptor blockade. *Acta Physiol Scand* 96: 422-430

Fredholm BB, Hedqvist P (1980) Modulation of neurotransmission by purine nucleotides and nucleosides. *Biochem Pharmacol* 29: 1635-1643

Fredholm BB, Lindgren E, Duner-Engstrom M, Fastbom J, Wang J, Haggblad J, Van der Ploeg I, Andersson T, Jondal M, JNG, Nordstedt C (1988) Relationship of pharmacological actions of adenosine to activation or inhibition of adenylate cyclase. In: Paton DM (ed) *Adenosine and Adenine Nucleotides: Physiology and Pharmacology*. Taylor and Francis, London, pp 121-132

Fronek K (1980) New view on the sympathectomy of the arterial wall. *Abst (477) 12th World Congress of Angiology, Atenas*

Fronek K (1983) Trophic effect of the sympathetic nervous system on vascular smooth muscle. *Ann of Biom Engineering* 11: 607-615

Fuller SJ, Gaitanaki CJ, Sugden PH (1990) Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused hearts isolated from adult rats. *Biochem J* 266: 727-736

Gardner DG, Deschepper CF, Ganong WF (1986) Extra-atria expression of the gene for atrial natriuretic factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6697-6670

Geffen LB, Livett BG (1971) Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol Rev* 51: 98-157

Glaubiger G, Tsai BS, Leftkowitz RJ, Weiss B, Johnson EM (1978) Chronic guanethidine treatment increases cardiac β -adrenergic receptors. *Nature* 273: 240-242

Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-319

Graham DG (1978) Oxidative pathways for catecholamine and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14: 633-643

Green A, Johnson JL, DiPette DJ (1990) Decrease in A1-adenosine receptors in adipocytes from spontaneously hypertensive rats. *Metabolism* 39: 1334-1338

Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF (1991) Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635

Gruber HE, Hoffer ME, McAllister DR, Laikind PK, Lane TA (1989) Increased adenosine concentration in blood from ischemic myocardium by AICA riboside: Effects on flow, granulocytes and injury. *Circulation* 80: 1400-1411

Guimarães S, Osswald W, Cardoso W, Branco D (1971) The effects of cocaine and denervation on the sensitivity to noradrenaline, its uptake and the termination of its action in isolated venous tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 271: 262-273

Gustafsson LE, Person M, Ohlém A, Hedqvist P (1988) Purines are regulators of skeletal muscle vascular tone. In: Paton DM (ed) Adenosine and Adenine Nucleotides. Physiology and Pharmacology. Taylor and Francis, London, pp 289

Haslam RJ, Cusack NJ (1981) Blood platelet receptors for ADP and for adenosine. In: Burnstock G (ed) Purinergic Receptors. Chapman and Hall, London, pp 223-285

Haslam RJ, Davidson MML, Desjardins TV (1978) Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochem J* 176: 83-95

Hassall CJS, Wharton J, Gulbenkian S, Anderson JV, Frater J, Bailey DJ, Merighi A, Bloom SR, Polak JM, Burnstock (1988) Ventricular and atrial myocytes of newborn rats synthesise and secrete atrial natriuretic peptide in culture: Light- and electron-microscopical localisation and chromatographic examination of stored and secreted molecular forms. *Cell Tissue Res* 251: 161-169

Heikkila RE, Mytilineou C, Côté L, Cohen G (1973) Evidence for degeneration of sympathetic nerve terminals caused by the ortho- and para-quinones of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 20: 1345-1350

Hermesmeyer K, Aprigliano O (1980) Cellular mechanisms of the neurotrophic influence in vascular muscle. In: Bevan JA, Godfraind T, Maxwell RA, Vanhoutte PM (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Raven Press, New York, pp 113-119

Hernández-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suárez J, Sánchez VC (1990) Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* 12: 242-248

Hillarp NA, Hogberg B, Nilson B (1955) Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow. *Nature* 176: 1032-1033

Hori M, Gotoh K, Kitakaze M, Iwai K, Iwakura K, Sato H, Koretsune Y, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T (1991) Role of oxygen derived free radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microembolization. *Circulation* 84: 828-840

Hori H, Tamai J, Kitakaze M, Iwakura K, Gotoh K, Iwai K, Koretsune Y, Kagiya T, Kitabatake A, Kamada T (1989) Adenosine-induced hyperemia attenuates myocardial ischemia in coronary microembolization in dogs. *Am J Physiol* 257: 244-251

Houck KA, Michalopoulos GK (1989) Altered responses of regenerating hepatocytes to TGF. *J Cell Physiol* 141: 503-509

Houck KA, Cruise JL, Michalopoulos GK (1988) Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 125: 551-555

Illes P, Rickmann H, Brod I, Bucher I, Stoclet J-C (1989) Subsensitivity of presynaptic adenosine A1-receptors in caudal arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 1989: 174: 237-251

Ishikawa S (1985) Actions of ATP and α , β -methylene ATP on neuromuscular transmission and smooth muscle membrane of the rabbit and guinea-pig mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 86: 777-787

Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interactions between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 79: 970-977

Jackson EK (1987) Role of adenosine in noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 253: H909-H918

Jackson EK (1991) Adenosine: a physiological brake on renin release. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31: 1-35

Jonzon B, Nilsson J, Fredholm B (1985) Adenosine receptor-mediated changes in cyclic AMP production and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 124: 451-456

Kamikawa Y, Cline Jr WH, Su C (1980) Diminished purinergic modulation of the vascular adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 66: 347-353

Kanakis SJ, Hill CE, Hendry IA, Watters DJ (1985) Sympathetic neuronal survival factors change after denervation. *Developmental Brain Res* 20: 197-202

Kiernan JA (1972) Effects of known and suspected neurotransmitter substances and of some nucleotides on isolated mast cells. *Experientia* 28: 653-654

Kitakaze M, Hori M, Tamai J, Iwakura K, Koretsune Y, Kagiya T, Iwai K, Kitabatake A, Inoue M, Kamada T (1987) α 1-Adrenoceptor activity regulates release of adenosine from the ischemic myocardium in dogs. *Circ Res* 60: 631-635

Kostrzewa RM, Jacobowitz DM (1974) Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol Rev* 26: 199-288

Kostron H, Winkler H, Peer LJ, König P (1977) Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience* 2: 159-166

Kuan CJ, Wells JN, Jackson EK (1990) Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. *Circ Res* 66: 637-646

Kuroda Y (1989) "Tracing circuit" model for the memory process in human brain: roles of ATP and adenosine derivatives for dynamic change of synaptic connections. *Neurochem Int* 14: 309-319

Kuroda Y, Kobayashi K (1978) Activation of tyrosine hydroxylase in a synaptosomal preparation from guinea pig striatum by adenosine derivatives. *Proc Japan Acad Ser B*54: 640-644

Kuroda Y, Kobayashi K, Kumakura K (1982) Short- and long-term regulation of tyrosine hydroxylase activity by adenosine derivatives in primary culture of bovine adrenal chromaffin cells. In: Izumi F (ed) *Advances in Biosciences*. Pergamon Press, Oxford, vol. 36, pp 195-200

Lattion AL, Michel JB, Arnauld E, Corvol P, Soubrier F (1986) Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume overload in the rat. *Am. J. Physiol* 251: 890-896

Lautt WW (1988) Adenosine mediated regulation of hepatic vasculature. In: Paton DM (ed) *Adenosine and Adenine Nucleotides. Physiology and Pharmacology*. Taylor and Francis, London, pp 185-192

Lee RT, Block KD, Pfeffer JM, Pfeffer NA, Neer EJ, Seidman CE (1988) Atrial natriuretic factor gene expression in ventricles of rats with spontaneous biventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 81: 431-434

Lagercrantz H (1976) On the composition of large dense-cored vesicles in sympathetic nerves. *Neuroscience* 1: 81-92

Lagercrantz H, Stjärne L (1974) Evidence that most noradrenaline in sympathetic large dense core vesicles is stored without ATP. *Nature* 249: 843-845

Lever AF (1986) Slow pressor mechanisms in hypertension: a role for hypertrophy of resistance vessels? *J Hypertension* 4: 515-524

Liu G, Thornton J, VanWinkle D, Stanley A, Olsson R, Downey J (1991) Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in the rabbit heart. *Circulation* 84: 350-356

Ljung B, Lundberg JM, Dahlstrom A, Kjellstedt A (1979) Structural and functional ontogenetic development of the rat portal vein after neonatal 6-hydroxydopamine treatment. *Acta Physiol Scand* 106: 271-279

Londos C, Cooper DM, Wolff J (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2552-2554

Lorez HP, Kuhn H, Bartholini G (1975) Degeneration and regeneration of adrenergic nerves in mesenteric blood vessels, iris and atrium of the rat after 6-hydroxydopamine injection. *J Neurocytol* 4: 157-176

Marangos PJ (1990) Adenosinergic approached to stroke therapeutics. *Med Hypoth* 32: 45-49

Marinkovic S, Bogdanovic D, Nestorovic D, Teofilovski G (1979) Mast cells in the middle cerebral artery wall. *Acta Med Iug* 33: 381-387

Marklund S (1980) Distribution of CuZn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand (Suppl 111)* 492: 19-23

Marzilli M, Taddei S, Mauraccini P, Viridis A, Salvatti A (1992) Adenosine causes angiotensin II release in human coronary arteries. *Int J Purine and Pyrimidine Res* 3: 34

Meininger CJ, Schellind ME, Granger HJ (1988) Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol* 255: H554-H562

Miyata A, Kangawa K, Toshimori T, Hatoh T, Matsuo H (1985) Molecular forms of atrial natriuretic polypeptides in mammalian tissues and plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 248-255

Moody CJ, Meghji P, Burnstock G (1984) Stimulation of P1-purinoceptors by ATP depends partly on its conversion to AMP and adenosine and partly in direct action. *Eur J Pharmacol* 97: 47-54

Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451

Moura D (1985) Farmacologia dos alcalóides humanos derivados das catecolaminas e da 5-hidroxitriptamina. Prova de aptidão pedagógica. Porto 1985

Mulvany MJ (1991) Abnormalities of resistance vessel structure in essential hypertension: are these important? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18: 13-20

Mulvany MJ, Aalkjar C, Christensen J (1980) Changes in noradrenaline sensitivity and morphology of arterial resistance vessels during development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2: 664-671

Muramatsu I (1986) Evidence for sympathetic, purinergic transmission in the mesenteric artery of the dog. *Br J Pharmacol* 87: 478-480

Murrell GA, Francis MJ, Bromley L (1987) Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295: 1373-1375

Murrell GA, Francis MJ, Bromley L (1990) Modulation of fibrob-

last proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265: 659-665

Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB (1990) Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 66: 913-931

Naftchi NE, Tuchin NW, Helldman J, Ciaranello RD, Axelrod J (1979) Relationship between α -adrenergic receptor and specific myocardial protein synthesis. In: Usdin E, Kopin IJ, Barchas J (eds) *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers*. Pergamon Press, New York, pp 462-464

Nakanishi H, Takeda H (1973) The possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission between the hypogastric nerve terminal and seminal vesicle in the guinea-pig. *Jap J Physiol* 23: 479-490

Needleman P, Blaine EH, Greenwald JE, Marshall LM, Clifford BS, Stockmann PT, Tolunay HE (1989) The biochemical pharmacology of atrial peptides. *Ann Rev Pharm Tox* 29: 23-54

Newby AC (1984) Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites". *Trends Biochem Sci* 9: 42-44

Nilsson J, Olsson G (1984) Prostaglandin E1 inhibits DNA synthesis in arterial smooth muscle cells stimulated with platelet-derived growth factor. *Atherosclerosis* 53: 77-82

Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature (Lond)* 334: 661-665

Olson L, Björklund H, Ebendal T; Hedlund KO, Hoffer F (1981) Factors regulating growth of catecholamine-containing nerves, as revealed by transplantation and explantation studies. In: *Ciba*

Foundation Symposium 83: Development of the autonomic nervous system. Pitman Medical, pp 213-231

Olsson RA, Pearson JD (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845

Osswald W, Branco D (1973) The effects of drugs and denervation on removal and accumulation of noradrenaline in the perfused hind-limb of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 277: 175-190

Paton DM (1981) Structure-activity relations for presynaptic inhibition of noradrenergic and cholinergic transmission by adenosine: evidence for action on A1 receptors. *J Auton Pharmacol* 1: 287-290

Paterson ARP (1979) Adenosine transport. In: Baer HP, Drummond GI (eds) *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*. Raven Press, New York, pp 305-309

Pettersson A, Ricksten S-E, Towle AC, Hedner J, Hedner T (1985) Effect of blood volume expansion and sympathetic denervation on plasma levels of atrial natriuretic factor (ANF) in the rat. *Acta Physiol Scand* 124: 309-311

Phan SH, Fantone JC (1984) Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by lipopolysaccharide. *Lab Invest* 50: 587-591

Quattrin S, Genovese A, Cirillo R, Formisano S, Marone G (1988) Functional and biochemical evidence of a specific adenosine A2/Ra receptor on human platelets. *Ric Clin Lab* 18: 105-118

Ralph RK (1983) Cyclic AMP, calcium and cell growth. *FEBS Lett* 161: 1-8

Ramkumar V, Pierson G, Stiles GL (1988) Adenosine receptors:

Clinical implications and biochemical mechanisms. *Prog Drug Res* 32: 195-247

Ribeiro JA, Sebastião AM (1986) Adenosine receptors and calcium: Basis for proposing a third (A₃) adenosine receptor. *Prog Neurobiol* 26: 179-209

Ribeiro JA, Sebastião AM (1991) Purinergic modulation of neurotransmitter release in the peripheral and central nervous systems. In: Feigenbaum J, Hanani M (eds) *Presynaptic Regulation of Neurotransmitter Release: a Handbook*. Freund Publishing House, Tel Aviv, 451-495

Richards JG, Da Prada M (1977) Uranaffin reaction: a new cytochemical technique for the localization of adenine nucleotides in organelles storing biogenic amines. *J Histochem Cytochem* 25: 1322-1336

Robertson D, Biaggioni I, Tsang C-J (1988) Adenosine and cardiovascular control. In: Paton DM (ed) *Adenosine and Adenine Nucleotides. Physiology and Pharmacology*. Taylor and Francis, London, pp 241-250

Rozenfurt E (1982a) Synergistic stimulation of DNA synthesis by cyclic AMP derivatives and growth factors in mouse 3T3 cells. *J Cell Physiol* 112: 243-250

Rozenfurt E (1982b) Adenosine receptor activation in quiescent Swiss 3T3 cells. *Exp Cell Res* 139: 71-78

Rudolphi K, Keil M, Grome JJ (1990) Adenosine- a pharmacological concept for the treatment of cerebral ischemia. In: J Kriegelstein H (eds) *Pharmacology of Cerebral Ischemia 1990*. Oberpichler Wissenschaftliche Verlag GmbH, Stuttgart, pp 439-448

Russel DH, Byus CV, Manen CA (1976) Proposed model of major sequential biochemical events of a trophic response. *Life Sci* 19: 1297-1306

Saito Y, NaKao K, Arai H, Sugawara A, Morii N (1987) Atrial natriuretic polipeptide (ANP) in human ventricle increase gene expression of ANP in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 211-217

Saner A, Thöenen E (1980) Model experiments in molecular mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol* 7: 147-151

Sarmento A, Soares-da-Silva P, Albino Teixeira A, Azevedo I (1987) Effects of denervation induced by 6-hydroxydopamine on cell nucleus activity of arterial and cardiac cells of the dog. *J Auton Pharmacol* 7: 119-126

Schaffer W, Williams RS (1986) Age-dependent changes in expression of alpha1 adrenergic receptors in rat myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 387-391

Schultz V, Lowenstein JM (1978) The purine nucleotide cycle studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J Biol Chem* 253: 1938-1943

Schumann HJ (1958) Uber der noradrenaline und ATP - Gehalt sympathetischer nerven. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmakol* 233: 296-300

Schwabe U (1988) Use of radioligands in the study of adenosine receptors. In: Paton DM (ed) *Adenosine and Adenine Nucleotides. Physiology and Pharmacology*. Taylor and Francis, London, pp 3-16

Schwartz K, de la Bastie D, Bouvert P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M (1986) Alpha skeletal muscle actin in mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* 59: 551-555

Selye H (1965) *The Mast Cells*. Butterworths, Washington

Simpson PC (1985) Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α 1-adrenergic receptor and induction of beating through an α 1- and β 1-adrenergic receptor interaction: evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res* 58: 692-705

Simpson PJ, Mitsos SE, Ventura A, Gallagher KP, Fontone JC, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR (1987) Prostacyclin protects ischemic reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am Heart J* 113: 129-137

Sneddon P, Burnstock G (1984) ATP as a cotransmitter in rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 106: 149-152

Snyder SH (1985) Adenosine as a neuromodulator. *Ann Rev Neurosci* 8: 103-124

Soares-da-Silva P, Azevedo I (1985) Fibroblasts and sympathetic innervation of blood vessels. *Blood Vessels* 22: 278-285

Soares-da-Silva P, Davidson R (1985) Effects of 6-hydroxydopamine on dopamine and noradrenaline content in the dog blood vessels and heart: evidence for a noradrenaline-independent dopamine pool. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329: 253-257

Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W.H. Freeman and Company, New York, 2nd ed.

Spielman WS, Thompson CI (1982) A proposed role for adeno-

sine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. *Am J Physiol* 242: 423-435

Starke K, von Kugelgen I, Bulloch JM, Illes P (1991) Nucleotides as cotransmitters in vascular sympathetic neuroeffector transmission. *Blood Vessels* 28: 9-26

Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N (1986) Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc proto-oncogene expression. *Proc Natl Acad Sci* 83: 8348-8350

Stjärne L, Lishajko F (1966) Comparison of spontaneous loss of catecholamines and ATP in vitro from isolated bovine adrenomedullary, vesicular gland, vas deferens and splenic nerve granules. *J Neurochem* 13: 1213-1216

Stockmann PT, Will DH, Sides SD, Brunnert SR, Wilner GD, Leahy KM, Wiegand RC, Needleman P (1988) Reversible induction of right ventricular atriopeptin synthesis in hypertrophy due to hypoxia. *Circ Res* 63: 207-213

Stone CA, Porter CC, Stavorski JM, Ludden CT, Totaro JA (1964) Antagonism of certain effects of catecholamine depleting agents by antidepressants and related drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 144: 196-204

Struyker-Boudier BH, Van Bortel L, De Mey JGR (1990) Remodeling of the vascular tree in hypertension: drug effects. *Trends Pharmacol Sci* 11: 240-245

Su C (1975) Neurogenic release of purine compounds in blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 195: 159-166

Su C (1978) Purinergic inhibition of adrenergic transmission in rabbit blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 204: 351-361

Su C (1983) Purinergic neurotransmission and neuromodulation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23: 397-411

Su C, Bevan JA, Burnstock G (1971) ^3H -A adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 173: 336-338

Sutter MC, Ljung B (1977) Contractility, muscle mass and agonist-sensitivity of isolated portal veins from normo- and hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 99: 484-495

Taddei S, Viridis A, Favilla S, Salvetti A (1992) Adenosine activates a vascular-renin-angiotensin system in hypertensive subjects. *Hypertension* 19: 672-675

Teixeira F (1977) The effects of drugs and denervation on removal and accumulation of adrenaline in the perfused hind-limb of the dog. *Arch Intern Pharmacol Ther* 225: 221-231

Thöenen H (1972) Surgical, immunological and chemical sympathectomy - their application in the investigation of the physiology and pharmacology of the sympathetic nervous system. In: Blaschko H, Muscholl E (eds). *Catecholamines. Hand Exp Pharmacol.*, Springer-Verlag, Berlin, pp 813-844

Thöenen H, Tranzer JP (1968) Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 261: 271-288

Thöenen H, Tranzer JP (1973) The pharmacology of 6-hydroxydopamine. *Ann Rev Pharmacol* 13: 169-180

Torres LD, Alonso HM, Ortiz JR (1988) The effect of catecholamines and adenosine on the induction of morphological alterations and depigmentation of newt iris epithelial cells in vitro. *Differentiation* 38: 104-114

Tranzer JP, Thöenen H (1968) An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia (Basel)* 24: 155-156

Trendelenburg U (1963a) Time course of changes in sensitivity after denervation of the nictitating membrane of the spinal cat. *J Pharmacol Exp Ther* 142: 335-342

Trendelenburg U (1963b) Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol Rev* 15: 225-276

Trendelenburg U, Weiner N (1962) Sensitivity of the nictitating membrane after various procedures and agents. *J Pharmacol Exp Ther* 136: 152-161

Trivedi BK, Bruns RF (1988) A new class of A1 receptor selective adenosine antagonists. *J Med Chem* 31: 1011-1014

Tsukahara N (1981) Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 4: 351-379

Tucker DC, Gist R (1986) Sympathetic innervation alters growth and intrinsic heart rate of fetal rat atria maturing in oculo. *Circ Res* 59: 534-544

Ukena DK, Jacobson KA, Padgett WL, Ayala C, Shamin MT, Kirk KL, Olsson RA, Daly JW (1986) Species differences in structure-activity relationships of adenosine agonists and xanthine antagonists at brain A1 adenosine receptors. *FEBS Lett* 209: 122-128

Van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005

Von Euler US, Lishajko F, Stjärne L (1963) Catecholamines and

adenosine triphosphate in isolated adrenergic nerve granules. *Acta Physiol Scand* 59: 495-496

Walker JE (1981) Effect of aminophylline on seizure thresholds and brain regional cyclic nucleotides in the rat. *Exp Neurol* 74: 299-304

Wharton J, Anderson RH, Springall D, Power RF, Rose M, Smith A, Espejo R, Khaghani A, Wallwork J, Yakub MH, Polak JM (1988) Localization of atrial natriuretic peptide immunoreactivity in the ventricular myocardium and conduction system of the human fetal and adult heart. *Br Heart J* 60: 267-274

Whitfield JF (1980) Adrenergic agents, calcium ions, and cyclic nucleotides in the control of cell proliferation. In: Szekeres L (ed) *Adrenergic Activators and Inhibitors (Part 1)*, Springer-Verlag, Berlin, pp 267-317

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC (1990) The cardiac β -myosin heavy chain isogene is induced selectively in α -adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85: 1206-1214

Weibel ER (1973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Hayat Ma (ed) *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Vol III. Van Nostrand Reinhold Company, New York

Williams M (1989) Adenosine: the prototypic neuromodulator. *Neurochem Int* 14: 249-264

Williams M (1992) New perspectives in the development of purinergic drugs. *Int J Purine and Pyrimidine Res* 3: 58

Winn HR, Rubio GR, Berne RM (1981) The role of adenosine in

the regulation of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 239-244

Winkler H (1977) The biogenesis of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 2: 657-683

Xenophontos XP, Watson PA, Chua BHL, Haneda T, Morgan HE (1988) Increased cyclic AMP content accelerates protein synthesis in rat heart. *Circ Res* 65: 647-656

Ziada AM, Hudlicka O, Tyler, KR, Wright AJ (1984) The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 18: 724-732