

FERNANDO AUGUSTO ANDRADE DE ABREU BRANDÃO

**INACTIVAÇÃO DO MEDIADOR SIMPÁTICO
NUMA ESTRUTURA VASCULAR**

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO
GRAU DE DOUTOR, APRESENTADA
A FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

PORTO — 1979

FERNANDO AUGUSTO ANDRADE DE ABREU BRANDÃO

**INACTIVAÇÃO DO MEDIADOR SIMPÁTICO
NUMA ESTRUTURA VASCULAR**

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO
GRAU DE DOUTOR, APRESENTADA
À FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

PORTO — 1979

**CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO**

PROFESSORES EFECTIVOS

Doutor Manuel da Silva Pinto	— Oftalmologia
Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares	— Anat. Topográfica
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett	— Farmacologia
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões	— Química Fisiológica
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia	— Anatomia Descritiva
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos	— Semiótica Radiológica
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão	— Anatomia Patológica
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida	— Patologia Cirúrgica
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares	— Patologia Geral
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald	— Terapêutica G. e Hid.
Doutor Manuel José Bragança Tender	— Fisiologia
Doutor João da Silva Carvalho	— Ginecologia
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima	— Ortopedia e Traumat.
Doutor António Fernandes da Fonseca	— Psiquiatria
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra	— Histologia e Embriol.
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia	— Higiene e Med. Social
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira	— Medicina Operatória
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior	— Proped. Cirúrgica
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga	— Patologia Médica
Doutor Fernando Cerqueira Magro Gomes Ferreira	— Clínica Médica
Doutor José Augusto Fleming Torrinhã	— Imunologia
Doutor Manuel Pinheiro Hargreaves	— Prop. Médica e Semio- logia Laboratorial

PROFESSORES JUBILADOS

Doutor Francisco Manuel da Fonseca e Castro
Doutor José Afonso Dias Guimarães
Doutor António de Sousa Pereira
Doutor Álvaro António Pinheiro Rodrigues
Doutor Ernesto Borges Teixeira de Morais
Doutor Francisco Alberto da Costa Pereira Viana
Doutor António José de Oliveira Ferraz Júnior
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Emídio José Ribeiro
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor Joaquim José Teixeira Bastos
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz

Art.º 48.º, § 3.º — A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931.—Decreto n.º 19337).

À MEMÓRIA DO MEU PAI

À MINHA MÃE

À MINHA MULHER

ÀS MINHAS FILHAS

Ao Exmo. PROF. JOSÉ RUIZ DE ALMEIDA GARRETT

Ao Exmo. PROF. WALTER FRIEDRICH ALFRED OSSWALD

O estudo da inactivação de aminas simpaticomiméticas constitui uma linha de investigação já com relevantes tradições no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto. Durante muito tempo a falta de meios confinou estes estudos à inactivação de aminas de origem exógena. Mais recentemente, porém, a aquisição de aparelhos adequados e as maiores disponibilidades materiais e humanas tornaram possível alargar os mesmos estudos ao mediador libertado directamente pelas terminações nervosas em condições bastante próximas das fisiológicas. Este trabalho resulta da conjugação dessas possibilidades.

Incluem-se nesta dissertação muitos resultados já publicados ou em vias disso, nomeadamente os que fazem parte das publicações seguintes:

- Brandão, F. and Guimarães, S. — Inactivation of endogenous noradrenaline released by electrical stimulation *in vitro* of dog saphenous vein. *Blood Vessels*, **11**: 45-54 (1974).
- Brandão, F. — A comparative study of the role played by some inactivation pathways in the disposition of the transmitter in the rabbit aorta and saphenous vein of the dog. *Blood Vessels*, **13**: 309-318 (1976).
- Brandão, F. — Inactivation of norepinephrine in an isolated vein. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **203**: 23-29 (1977).
- Brandão, F., Paiva, M.Q. and Guimarães, S. — The role of neuronal and extraneuronal enzymatic systems in the metabolism of noradrenaline and adrenaline released from nerve terminals by electrical stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (em publicação).

A realização deste trabalho fica a dever-se em grande parte a considerável auxílio recebido.

A orientação científica deve-se ao Exmo. Prof. José Garrett, Director do Laboratório de Farmacologia. Pelo esclarecido conselho, pela generosidade do imprescindível e multifacetado apoio e pelo exemplo que continuamente nos deu de Universitário, aqui se patenteia uma profunda gratidão.

O Exmo. Prof. Walter Osswald, Director do Centro de Investigação de Farmacologia e Biopatologia Química da Universidade do Porto, desde o início seguiu com o mais vivo interesse a elaboração teórica e a realização prática deste trabalho, criticando, sugerindo e animando. Aqui se manifesta com todo o reconhecimento o incentivo permanente que permitiu ultrapassar não poucas fases de desânimo.

Ao Prof. Serafim Guimarães que muito directamente seguiu as vicissitudes da realização deste trabalho, dificilmente conseguiremos agradecer as inúmeras provas de amizade com que nos tem honrado durante estes anos de convívio no Laboratório de Farmacologia.

Ao Exmo. Prof. Waldemar Cardoso agradece-se a ajuda recebida nas simpaticectomias realizadas.

Aos Profs. Rodrigues Pereira e Jorge Tavares e aos Drs. Isabel Azevedo e José Guilherme Monteiro, agradece-se a boa camaradagem e o apoio recebido.

Uma palavra de reconhecimento é devida à Dr.^a Maria Quitéria Paiva e à D. Domingas Branco pela ajuda técnica prestada.

As excelentes aptidões técnicas e à singular dedicação da D. Maria Manuela Moura dá-se aqui, também, o devido realce.

A excelente qualidade dos desenhos incluídos nesta dissertação fica a dever-se à D. Maria Luísa Vasques, a quem se agradece.

Uma palavra de gratidão é também devida a todos os outros elementos do Laboratório, particularmente àqueles que mais directamente colaboraram na realização deste trabalho — D. Aida Camarinha e Srs. Domingos Ferreira, Aldovino Sousa e Abílio Nunes.

Finalmente, desejamos ainda agradecer ao Instituto de Alta Cultura (hoje Instituto Nacional de Investigação Científica) o subsídio que recebemos de 1972 a 1975.

SUMARIO

Introdução

Métodos

- Introdução
- Preparações de tiras de veia safena
- Registo de respostas contrácteis
- Estimulação eléctrica
- Estudo da inactivação do mediador simpático (técnicas de imersão em óleo e em Krebs-Henseleit)
- Determinação da ED₅₀
- Desnervação cirúrgica de veias safenas
- Incubação com (-)NA tritiada (NA-³H)
- Perfusão de tiras de veia safena previamente incubadas com NA-³H
- Estimulação eléctrica de tiras de veia safena previamente incubadas com NA-³H
- Métodos de doseamento da NA endógena, da NA-³H e seus metabolitos e da radioactividade (³H)
- Cálculo da fracção libertada por estímulo
- Estudo da metabolização de NA-³H
- Análise estatística
- Fármacos utilizados

Resultados

- 1 — Caracterização farmacológica do mediador responsável pelas contracções desencadeadas pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena
 - 1.1 — Acção da fenoxibenzamina e da fentolamina sobre as contracções obtidas, quer pela estimulação eléctrica, quer pela NA exógena
 - 1.2 — Influência da cocaína
 - 1.3 — Efeito da reserpina
 - 1.4 — Acção da guanetidina
 - 1.5 — Influência da desnervação

- 2 — Influência de vários fármacos sobre o T_{50} após contracção máxima provocada por estimulação eléctrica
 - 2.1 — Relaxamento em óleo
 - 2.2 — Relaxamento em Krebs-Henseleit
- 3 — Libertação e metabolização de $NA-^3H$
 - 3.1 — Efluxo espontâneo da $NA-^3H$ e seus metabolitos em tiras de veia safena incubadas previamente com essa amina durante 60 minutos
 - 3.1.1 — Efluxo de $NA-^3H$ e metabolitos em preparações não sujeitas a qualquer tratamento prévio
 - 3.1.2 — Efluxo de $NA-^3H$ e metabolitos em preparações tratadas pela cocaína
 - 3.2 — Libertação de $NA-^3H$ e seus metabolitos, produzida pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena incubadas previamente com $NA-^3H$
 - 3.2.1 — Origem do 3H libertado pela estimulação
 - 3.2.2 — Influência de vários fármacos na metabolização da $NA-^3H$

Discussão

- Natureza do mediador responsável pela contracção produzida pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena
- Inactivação do mediador libertado por estimulação eléctrica da veia safena
- Características do efluxo espontâneo de tiras de veia safena incubadas com $NA-^3H$
- Origem do 3H produzido pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena
- Metabolização da $NA-^3H$, libertada espontâneamente e por estimulação de tiras de veia safena

Resumo e Conclusões

Summary and conclusions

Bibliografia

INTRODUÇÃO

O conceito de mediação química na transmissão neuro-efectora foi proposto por Elliot em 1905, dadas as semelhanças das respostas à adrenalina e à estimulação simpática. Esta noção da mediação química foi depois generalizada ao para-simpático por Dixon em 1906, dado que a muscarina mimetizava a resposta à estimulação vagal. Apesar da noradrenalina (NA) e da acetilcolina terem sido sintetizadas respectivamente por Stolz em 1904 e por Ewins em 1914, estas substâncias não foram imediatamente reconhecidas como fazendo parte natural dos tecidos. Durante vários anos, as diferenças entre as respostas à adrenalina e à estimulação simpática e entre os efeitos da muscarina e da estimulação para-simpática, obscureceram a natureza química da transmissão neuro-efectora. Em 1921, Loewi demonstrou a libertação de mediadores químicos no coração perfundido de Rã. A substância com efeito inibidor libertada pela estimulação vagal comportava-se como a acetilcolina; a substância com acção aceleradora libertada por estimulação simpática comportava-se como a adrenalina. Embora já em 1910, Barger & Dale chamassem a atenção para o facto da NA mimetizar melhor a resposta à estimulação simpática que a adrenalina, a noção de que a NA é nos mamíferos o verdadeiro mediador simpático só se veio a estabelecer nos fins da década de 1940, quando von Euler (1946) mostrou a existência de NA nos nervos simpáticos e Peart (1949) demonstrou a libertação desta amina por estimulação nervosa.

A partir da descoberta do mediador simpático, verificaram-se rápidos progressos no domínio da sua inactivação. Desde 1937 (Blaschko, *et al.*, 1937 a e b) sabia-se que a adrenalina e a NA eram inactivadas pela monoamina oxidase (MAO), e desde então admitia-se a hipótese da inactivação do mediador simpático se fazer por desaminação. Burn (1952) e Burn & Robinson (1952), propuseram que o

papel da MAO na inativação do mediador simpático era sobreponível ao da acetilcolinestérase na inativação do mediador colinérgico. Esta proposta baseava-se no facto das preparações desnervadas serem muito sensíveis à NA e no de possuírem uma actividade desaminativa muito reduzida. Com a descoberta dos inibidores da MAO (Zeller *et al.*, 1952), logo se verificou que a inibição desta enzima não provocava aumento significativo das respostas à NA (Burn *et al.*, 1954; Furchgott, 1955; Baltzer & Holtz, 1956) ao contrário do que se verificava com a inibição da acetilcolinestérase sobre os efeitos da acetilcolina. Não se confirmaram portanto as propostas de Burn (1952) e de Burn & Robinson (1952). Também se o mediador simpático fosse fundamentalmente inativado pela MAO, era de esperar que a inibição desta enzima causasse um aumento do efluxo do mediador libertado pela estimulação nervosa, facto que se não verificou com a estimulação do nervo esplénico (Brown & Gillespie, 1957). Mesmo com a descoberta da catecol-O-metiltransferase (COMT) por Armstrong *et al.*, (1957) e Axelrod (1957), continuava a não haver explicação para a fugacidade da resposta à estimulação simpática. A partir sobretudo de 1959, e com os trabalhos de MacMillan (1959) e de Trendelenburg (1959), começaram a aparecer indícios de que a inativação do mediador simpático se fazia sobretudo por mecanismos não enzimáticos. Foi porém Paton (1960), que sugeriu pela primeira vez a hipótese de o mediador simpático poder ser inativado por captação pelos nervos simpáticos. Esta hipótese foi rapidamente confirmada por Hertting *et al.*, (1961) e Hertting & Axelrod (1961). Estes investigadores mostraram que os órgãos incubados com NA-³H podiam reter a amina por longos períodos, e que esta capacidade de fixação desaparecia com a destruição dos nervos simpáticos. Além disso, parte da NA-³H fixada em órgãos inervados pelo simpático, podia ser libertada pela estimulação simpática. A partir de então estava demonstrada a existência da captação neuronal da NA, passando a considerar-se este mecanismo como o mais importante na remoção da amina do espaço extra-celular. O trabalho de Haefely *et al.* (1964), mostrava que a inibição da captação neuronal pela cocaína sensibilizava intensamente a membrana nictitante à estimulação simpática, calculando-se que nesta preparação mais de 90 % do mediador libertado era inativado por captação neuronal. Em estudos realizados em órgãos isolados e em que se doseou o efluxo do mediador libertado por estimulação simpática, a cocaína também aumentava o efluxo do mediador (Hukovic & Muscholl, 1962; Thoenen *et al.*, 1964).

Subsistiam ainda alguns problemas. Por exemplo, quando se administrava NA-³H a animais de experiência, a perda de ³H pela urina fazia-se de forma multifásica (Axelrod et al., 1961). Quando se perfundiam órgãos previamente incubados com NA-³H, verificava-se também uma queda multifásica do efluxo de ³H (Kopin et al., 1962). Era pois evidente a existência de várias formas de ligação da NA aos tecidos. Além disso, embora a desnervação simpática produzisse uma marcada redução da captação de NA pelos tecidos, subsistia ainda alguma captação (Strömblad & Nickerson, 1961). Era pois admissível a existência dum outro tipo de captação da NA pelos tecidos, além da já referida captação neuronal. Foi Iversen (1965), que distinguiu claramente e, pela primeira vez, dois tipos de captação, designando-os por captação 1 e 2 e que posteriormente se veio a verificar corresponderem respectivamente à captação neuronal e extra-neuronal (ver revisão de Iversen, 1971). Os estudos de cinética da captação, realizados em corações de Rato perfundidos, por Iversen e colaboradores, permitiram caracterizar o funcionamento dos dois sistemas de captação. A remoção extremamente rápida por captação neuronal da NA do espaço extra-celular e a elevada afinidade da amina para este sistema de transporte, eram compatíveis com o papel fisiológico da captação neuronal na remoção do mediador libertado pela estimulação nervosa. Contudo, e ao contrário do que os estudos iniciais faziam suspeitar, o sistema de captação extra-neuronal funcionava também para todas as concentrações de NA: para as baixas, como local de perda (por metabolização pela MAO e pela COMT) e para as altas como local de perda e de acumulação. Assim estes resultados eram compatíveis com a possibilidade de o sistema de captação extra-neuronal também participar na inactivação do mediador libertado por estimulação simpática.

Hughes (1972) descreveu um método biológico para o doseamento de pequenas quantidades de NA. Com este método, esse autor estudou a influência de certos fármacos no efluxo da NA libertada por estimulação nervosa, no canal deferente e na veia porta. Tanto a cocaína como a cortexona produziam nestas preparações um aumento do efluxo do mediador (efeito que era mais marcado para a cocaína que para a cortexona), o que indicava que ambos os sistemas de captação participavam na inactivação da NA libertada. Como o efeito da cocaína mais cortexona era mais pronunciado que a soma dos efeitos individuais de cada um destes inibidores, aquele autor sugeriu a possibilidade de haver um equilíbrio dinâmico entre a captação neuronal

e extra-neuronal. Segundo Hughes (1972) mais de 90 % do mediador libertado por estimulação nervosa seria inativado pelos dois sistemas de captação. Também Crips & Dearnaley (1972) em baços isolados e perfundidos, evidenciaram a participação da captação neuronal e extra-neuronal na inativação do mediador simpático.

Desde 1970 que Langer e colaboradores têm vindo a utilizar a NA-³H como meio de estudar a cinética do mediador simpático (Langer, 1970; revisão de Langer et al., 1975). Estes estudos realizados já em várias preparações, têm mostrado que após a libertação da NA-³H, parte da amina é captada pelos nervos simpáticos, e por estruturas extra-neuronais e o resto difunde para fora das preparações. A parte captada pelos terminais simpáticos é fundamentalmente metabolizada pela MAO e pela reductase aldeídica do terminal simpático. Assim, a captação neuronal funciona sobretudo como um mecanismo de inativação do mediador e não como um meio de o reutilizar em novas libertações (Langer et al., 1975). A inibição da captação neuronal aumenta a captação extra-neuronal da amina libertada (Langer & Enero, 1974). A parte captada extra-neuronalmente é metilada pela COMT (Langer et al., 1975). Estudos mais recentes, realizados em vasos sanguíneos (Brandão, 1977; Endo et al., 1977), são compatíveis com a possibilidade da NA-³H libertada por estimulação nervosa poder ser metabolizada extra-neuronalmente não só pela COMT mas também pela MAO.

Os estudos de microscopia de fluorescência realizados a partir de 1966 por Gillespie e colaboradores (Gillespie & Hamilton, 1966; revisão de Gillespie, 1976), têm mostrado em várias preparações que a NA além de se fixar nos nervos simpáticos e nas fibras musculares, se fixa, também, em «receptores silenciosos» (principalmente colagénio e elastina). Esta ligação da NA aos «receptores silenciosos», poderia funcionar como mecanismo de inativação da amina. Com base nesta noção, Powis (1973) estudou a influência desta ligação nas respostas à NA e à estimulação simpática. Começou por verificar que as tetraciclinas inibiam a ligação da NA ao colagénio e à elastina. A oxitetraciclina potenciava amplamente as respostas à NA e à estimulação, sobretudo em preparações ricas em colagénio e elastina. Acabou por sugerir que nos tecidos com alta densidade de colagénio e elastina, a ligação da NA ou do mediador àquelas estruturas, poderia ser o mecanismo mais importante de inativação. Infelizmente estas conclusões não se vieram a confirmar (Guimarães et al., 1975; Kalsner, 1976).

Referimos os mecanismos pelos quais o mediador simpático é removido do espaço extra-celular — captação neuronal e extra-neuronal e difusão para fora do órgão efector. Os trabalhos realizados com a NA-³H apoiam a noção de que a metabolização do mediador ocorre após a sua captação (pelas estruturas neuronais e extra-neuronais). Ignora-se porém o papel destes mecanismos (captação neuronal e extra-neuronal, difusão e metabolização pela MAO e pela COMT) na terminação da resposta à estimulação simpática. Por isso, neste trabalho, começamos pelo estudo dos mecanismos que determinam directamente a terminação da resposta à estimulação nervosa. Para o efeito, adaptamos a técnica de «imersão em óleo» de Kalsner & Nickerson (1968 a), para o estudo da inactivação do mediador simpático (Brandão & Guimarães, 1974). Como complemento deste trabalho, estudamos também a metabolização da NA-³H libertada por estimulação simpática de acordo com a técnica descrita por Langer & Enero (1974). Os resultados deste trabalho foram obtidos exclusivamente em preparações de veia safena de Cão. Escolheu-se esta preparação por duas razões fundamentais: a) por haverem já sido estudados nesta preparação os mecanismos da terminação da resposta à NA exógena (Osswald et al., 1971; Guimarães et al., 1971); b) por serem bem conhecidas as relações existentes na veia safena de Cão entre os terminais simpáticos e as fibras musculares lisas (Coimbra et al., 1974). Havia assim a possibilidade de confrontar os resultados sobre a inactivação do mediador simpático com a inactivação da NA exógena. O conhecimento das relações neuro-musculares poderia ajudar-nos na interpretação dos resultados, dado que se admite que a distância neuro-muscular poderá determinar a importância relativa de certos mecanismos de inactivação (Trendelenburg, 1972; Su & Bevan, 1974).

MÉTODOS

Introdução

As experiências foram feitas com a veia safena lateral de Cão. Estudaram-se, primeiro, os mecanismos responsáveis pela terminação da resposta (inactivação) à estimulação simpática, e depois, o destino (metabolização) do mediador libertado durante a estimulação. Para o estudo da inactivação, foi utilizada a técnica de «imersão em óleo» (Kalsner & Nickerson, 1968 a), adaptada ao estudo da terminação da resposta à estimulação nervosa (Brandão & Guimarães, 1974). Com esta técnica, tanto a contracção provocada pela estimulação como o relaxamento observado após a interrupção da estimulação, decorreu com as preparações mergulhadas em óleo, afim de impedir a difusão do mediador simpático para fora das preparações. Nestas condições, o desaparecimento da resposta à estimulação, resulta da diminuição progressiva da concentração do mediador junto dos receptores. A velocidade de relaxamento é portanto um índice da actividade dos mecanismos de inactivação. A importância da difusão na terminação da resposta, foi estudada também, comparando-se a velocidade de relaxamento em óleo e em líquido nutritivo, de preparações previamente contraídas pela estimulação nervosa (Brandão, 1976). A importância relativa de cada uma das vias conhecidas de inactivação, foi determinada através da diminuição da velocidade de relaxamento devido ao bloqueio selectivo de cada uma dessas vias.

Dado que é actualmente impossível dosear directamente a NA endógena libertada pela estimulação nervosa, realizamos os estudos de metabolização do mediador em preparações de veia safena que haviam acumulado NA-³H por incubação prévia de tiras de veia safena em Krebs-Henseleit contendo a referida substância marcada. Após este período de incubação (período de «carga»), as preparações eram

perfundidas com líquido nutritivo a fluxo constante. Atingido o período de efluxo «estável» de NA-³H e seus metabolitos, submeteram-se as preparações à estimulação nervosa. Determinou-se o efluxo de NA-³H e seus metabolitos antes, durante e após a estimulação nervosa; as determinações foram realizadas até que o efluxo de NA-³H e dos seus metabolitos atingisse valores sobreponíveis aos observados antes da estimulação nervosa. Estudaram-se, tanto em relação ao efluxo espontâneo como ao efluxo produzido pela estimulação nervosa, as modificações da metabolização da NA-³H provocada pela inibição específica das vias de inactivação da NA conhecidas.

Para se atingirem os objectivos que acabamos de referir, foram utilizadas várias técnicas, que passaremos a descrever em pormenor.

Preparação de tiras de veia safena

A veia safena lateral era obtida a partir de cães de raça indeterminada de 7 a 16 Kg de peso, anestesiados pelo pentobarbital sódico (30 mg/kg i.v., injectado numa das patas anteriores). Após a remoção de dois segmentos (um de cada lado), preparavam-se, em regra, 4 tiras a partir de cada um deles, por corte helicoidal, segundo a técnica de Guimarães & Osswald (1969). Essas tiras tinham, aproximadamente, um comprimento de 3 a 4 cm e uma largura de 3 a 4 mm.

Imediatamente após a colheita, os segmentos eram colocados em cápsulas contendo solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM em água bidestilada): NaCl 118,8; KCl 4,7; Ca Cl₂ 2,5; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄.7H₂O 1,2; NaHCO₃ 25,0; d-glicose 10,0; EDTA sódico 0,03 e ácido ascórbico 0,06. Esta solução era saturada por uma mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. As tiras, obtidas e preparadas como se referiu, eram transferidas para banhos de órgãos isolados com 25 ml de capacidade, contendo, também, solução de Krebs-Henseleit a 37°C e oxigenada. Entre a colheita dos segmentos venosos e a colocação das tiras nos banhos decorreu um intervalo de aproximadamente 5 a 10 minutos.

Registo de respostas contrácteis

As respostas registaram-se pelo método mecânico (inscrição em quimógrafo), por meio de uma alavanca isotónica de inscrição frontal com ampliação variável entre 5 e 7 vezes, ou por processo electrónico, mediante um miógrafo isotónico (Part. N.º 91-100-73) e respectivo sistema pré-amplificador, num polígrafo (Physiograph Four, Narco-

-Biosystem). As preparações eram, em ambas as circunstâncias, submetidas a uma tensão de 1-2 g.

Estimulação eléctrica

Para estudar a inactivação do mediador simpático, recorreu-se à estimulação eléctrica. Mantendo as tiras mergulhadas na solução de Krebs-Henseleit contida na cápsula em que foi preparada (antes de a transportar para o banho de órgãos isolados), prendia-se cada uma das suas extremidades a um eléctrodo de platina. Seguidamente, montavam-se no dispositivo para órgãos isolados e ligavam-se os eléctrodos a um estimulador (M. Thomas Electronic Stimulator, mod. 751) por meio de dois fios condutores bastante flexíveis. A verificação prévia de que a estimulação eléctrica não provocava contracção das tiras venosas, quando estas eram incubadas em solução de Krebs-Henseleit, levou a realizar a estimulação eléctrica com as preparações mergulhadas em óleo mineral puro a 37°C e previamente oxigenado.

Para a obtenção das curvas de «estímulo-efeito», variava-se a duração da estimulação, mantendo-se constantes a frequência (10Hz), a intensidade (30V) e a duração (2 ms) do estímulo (pulso). Sempre que se não desejavam curvas de «estímulo-efeito», mas respostas únicas a um estímulo uniforme que permitissem a sua análise comparativa, o estímulo era de 10Hz, 30 V e 2 ms, por se ter verificado que era esse o estímulo mínimo capaz de provocar ao fim de 4 a 6 minutos de estimulação, respostas justa-máximas em todas as preparações. Após uma estimulação de 4 a 6 minutos, observava-se uma fase de equilíbrio da resposta. Uma vez atingida essa fase o estímulo era interrompido e registava-se o tempo necessário para que a preparação se relaxasse 50 % (T_{50}). Em algumas preparações, determinou-se, também, o T_{50} em Krebs-Henseleit. Para isso, findo o período de estimulação, e atingida a fase de equilíbrio da contracção, substituiu-se rapidamente o óleo por solução de Krebs-Henseleit e determinava-se o T_{50} .

Estudo da inactivação do mediador simpático

Técnica de imersão em óleo

Para o estudo da inactivação do mediador simpático usou-se uma

adaptação (Brandão & Guimarães, 1974) do método da «imersão em óleo» descrito por Kalsner & Nickerson (1968 a). Atingida a fase de equilíbrio da contracção produzida pela estimulação eléctrica como já foi referido, interrompia-se a estimulação e determinava-se o T_{50} em óleo; este valor era tomado como controlo. Após algumas lavagens com solução de Krebs-Henseleit e obtido assim o regresso da preparação ao nível inicial de tono, adicionavam-se ao banho os bloqueadores específicos de cada uma das vias de inactivação da NA conhecidas: o U-0521 ($10^{-4}M$) (3'-4'-hidroxi-2-metilpropiofenona) para a catecol-O-metiltransferase (COMT), a iproniazida ($7 \times 10^{-4}M$) para a monoaminoxidase (MAO), a cocaína ($10^{-5}M$) para a captação neuronal e a cortexona ($6 \times 10^{-5}M$) para a captação extra-neuronal. Para estudar a influência exercida pelo U-0521, pela cocaína ou pela cortexona, estas substâncias eram adicionadas à solução de Krebs-Henseleit e aí permaneciam durante um período de 30 minutos. Findo esse período de tempo procedia-se à estimulação. Atingido o período de equilíbrio da contracção determinava-se o T_{50} . Para o estudo da influência da MAO na inactivação do mediador, recorreu-se a preparações tratadas «in vitro» pela iproniazida. Para a inibição da MAO «in vitro» a iproniazida era adicionada ao banho e mantida em contacto com a preparação durante 30 minutos. Findo este período, faziam-se várias lavagens para a supressão do bloqueio adrenérgico alfa (um mínimo de 8) durante um período adicional de 30 minutos, a seguir ao qual se procedia à estimulação eléctrica e subsequente determinação do T_{50} de modo semelhante ao referido para as outras substâncias utilizadas. Para a determinação do papel desempenhado por cada uma destas vias de inactivação da NA, os T_{50} após a inibição da COMT, da captação neuronal, da MAO ou da captação extra-neuronal eram comparados com os T_{50} , obtidos nas mesmas preparações, antes de qualquer tratamento (controlo). A razão entre o T_{50} obtido após a adição dos inibidores (da COMT, da MAO, da captação neuronal e captação extra-neuronal) e o controlo dá o múltiplo do tempo controlo (MTC); o MTC transforma-se em percentagem da capacidade de inactivação bloqueada, utilizando a fórmula:

$$\frac{MTC - 1}{MTC} \times 100 \quad (\text{Osswald et al., 1971})$$

Técnica de imersão em Krebs-Henseleit

Para avaliar o papel da difusão do mediador simpático, determi-

nou-se o T_{50} com a preparação mergulhada em Krebs-Henseleit. Obtida a contracção justa-máxima pela estimulação das preparações mergulhadas em óleo, interrompia-se a estimulação e simultaneamente substitua-se o óleo por líquido nutritivo (Brandão, 1976).

O estudo da influência da cocaína, U-O521, cortexona ou associações destes inibidores sobre o relaxamento das preparações de veia safena nestas condições, foi analisado de modo semelhante ao referido para a técnica de imersão em óleo, após a obtenção do T_{50} antes (controlo) e após actuação dos referidos inibidores.

Determinação da ED_{50}

Para analisar a influência dos diferentes fármacos ou procedimentos sobre a sensibilidade à NA exógena (adicionada ao banho), determinava-se a ED_{50} desta amina, antes e depois do tratamento cuja influência se desejava estudar. A determinação da ED_{50} fazia-se por interpolação, a partir da curva de dose-efeito obtida pelo método das adições não cumulativas (Guimarães, 1972). Para estudar as variações de sensibilidade à NA endógena provocadas pelos mesmos factores estudados relativamente à exógena, comparava-se os estímulos eléctricos necessários para provocarem uma resposta de 50 % da resposta máxima à estimulação eléctrica, antes e depois da intervenção do factor em estudo.

Desnervação cirúrgica de veias safenas

Após a anestesia pelo pentobarbital sódico e aberta a parede abdominal anterior da região correspondente à fossa ilíaca esquerda, adoptou-se a técnica descrita por Guimarães et al. (1971): remoção de 5 cm da parte terminal da cadeia simpática para-vertebral esquerda e periarteriectomia femoral do mesmo lado numa extensão de cerca de 3 cm. Os cães recuperavam bem da intervenção cirúrgica realizada assepticamente, colhendo-se as veias safenas, de ambos os lados, entre o 8.º e o 10.º dia após a simpaticectomia.

Incubação com (-) NA tritiada ($NA\text{-}^3H$)

Depois de convenientemente lavada em líquido nutritivo, cada tira de veia safena com 2 a 3 cm de comprimento e com cerca de 100 mg de peso, preparada pela técnica já descrita, era incubada du-

rante 30 minutos a 37°C em solução de Krebs-Henseleit, com agitação contínua, numa atmosfera de O₂ (95 %) e CO₂ (5 %). Findo este período inicial de lavagem, a tira era suavemente limpa com papel de filtro e transferida para um pequeno matraz (com 10 cm³ de capacidade) contendo 3 ml de solução de Krebs-Henseleit, ao qual se adicionava momentos antes (-)-7-³H-noradrenalina (New England Nuclear Chemicals, Dreieichenhain, Alemanha), na concentração de 1,4×10⁻⁶ M e com uma actividade de 3,8 Ci/mmol. A incubação da tira na presença da amina era feita a 37°C, com agitação contínua, na atmosfera de O₂ e CO₂ já referida, durante 60 minutos. Uma rolha de borracha perfurada, que obliterava a boca do matraz, permitia a passagem de um fluxo constante da mistura gasosa.

Perfusão de tiras de veia safena previamente incubadas com NA-³H

Após os 60 minutos de incubação com NA-³H, cada tira de veia safena era colocada num pequeno banho de 1 ml de capacidade, próprio para perfusão contínua (Farnebo & Malmfors, 1971). A tira era submetida a uma tensão aproximada de 1 g e perfundida a fluxo constante (0,8 ml/min), com líquido nutritivo a 37°C proveniente de uma proveta em que se fazia borbulhar constantemente a mistura gasosa (O₂ e CO₂). A perfusão era efectuada com uma bomba peristáltica (Harvard Peristaltic Pump, mod. 1201).

Estimulação eléctrica de tiras de veia safena previamente incubadas com NA-³H

Montada a tira de veia safena no banho de perfusão, colocava-se um eléctrodo de platina em contacto com cada uma das extremidades da tira. Cada eléctrodo era ligado a um estimulador (já referido) por intermédio de dois fios condutores. Este estimulador dispunha dum dispositivo que alternava a direcção dos estímulos, por forma a evitar a electrólise do líquido nutritivo. As características do estímulo eléctrico eram semelhantes ao referido em **Estimulação Eléctrica**, com excepção da intensidade, que foi aumentada para 100 Volts. Introduziu-se esta modificação porque em experiências preliminares se verificou que, nestas condições, a estimulação eléctrica com as características apontadas (10 Hz, 2 ms e 100V) produzia respostas contrácteis justa-máximas entre 3 e 5 minutos de estimulação. A gene-

ralidade das preparações de veia perfundida foi submetida a dois períodos de estimulação de 2,5 minutos de duração, o primeiro (S_1) dos 125 aos 127,5 minutos e o segundo (S_2) dos 185 aos 187,5 minutos de perfusão, contados a partir do momento em que se iniciava a perfusão da tira.

Métodos de doseamento da NA endógena, da NA- ^3H e seus metabolitos e da radioactividade (^3H)

Depois de convenientemente lavadas em líquido nutritivo por forma a retirar todo o sangue aderente às suas paredes, as tiras eram secas em papel de filtro e pesadas; posteriormente as tiras eram reduzidas a segmentos muito pequenos, com o auxílio de uma tesoura, e homogenizadas com um homogenizador de vidro (Tissue Grinder, Potter, Elvehjen), em 5 ml de ácido perclórico 0,4 N, a 0°C, ao qual se havia adicionado EDTA (0,8 mg/ml). Seguidamente, deixava-se o homogenizado em repouso durante 40 minutos a 4°C e centrifugava-se, a seguir, durante 10 minutos, a 8000 g, numa centrífuga refrigerada. Neutralizava-se, seguidamente, uma parte alíquota (2 ml) de sobrenadante com bicarbonato de sódio até pH 6. A determinação espectrofotofluorimétrica da NA (endógena) era feita de acordo com a modificação introduzida por Palmer (1964) ao método descrito por von Euler & Floding (1955), sendo o comprimento de onda da luz excitadora de 410 nm e o da emitida de 510 nm. O limite inferior de sensibilidade do método era de 5 ng de NA por amostra.

A determinação da radioactividade (^3H) da NA- ^3H e dos seus metabolitos, foi feita em amostras do líquido de perfusão e em homogenizados de tiras de veia safena. As determinações no líquido de perfusão foram feitas a partir de colheitas de 4 ml (correspondentes a 5 minutos de perfusão). A separação de NA- ^3H e seus metabolitos foi executada em colunas de cromatografia de alumina e DOWEX, de acordo com a técnica descrita por Graefe *et al.* (1973). As colunas, de 0,5 cm de diâmetro, tinham a extremidade inferior obliterada por pequenas esferas de vidro. A alumina (Óxido de alumínio 90 estandardizado, grau de actividade II — III, — Merck —) foi preparada de acordo com Crout (1961) e lavada com acetato de sódio 0,2M. Utilizou-se DOWEX 50×4 (200 — 400 mesh) que antes de usado era submetido ao seguinte tratamento: lavagens repetidas a 50°C com hidróxido de sódio 2N (contendo 1% de EDTA sódico) até que o sobrenadante ficasse incolor; seguidas de novas lavagens sucessiva-

mente em água destilada, ácido clorídrico 2N, água bidestilada. Finalmente o DOWEX era levado a pH 2 pela adição de ácido clorídrico 0,01N. Antes de serem utilizadas as colunas para o DOWEX eram lavadas com 20 ml da mistura etanol-ácido clorídrico 6N (em volumes iguais) e depois equilibradas com ácido clorídrico 0,01N. Cada coluna de alumina continha 200 mg desta substância. As colunas com DOWEX eram de 1,5 cm de altura. Antes de cada utilização todas as colunas eram lavadas com 2 ml de água bidestilada. Regra geral, as colunas com DOWEX eram reutilizadas, após a regeneração da resina. A regeneração consistia em lavagens sucessivas, com 10 ml da mistura etanol-ácido clorídrico (em partes iguais), 20 ml de ácido clorídrico 2N, 20 ml de água bidestilada e finalmente com 20 ml de ácido clorídrico 0,01N. A técnica geral da separação a partir das amostras (do líquido de perfusão e de homogenizados de veia) está resumida no esquema (Fig. 1). Este método permite a separação das seguintes frações: 1 — noradrenalina (NA); 2 — 3,4-dihidroxifenilglicol (DOPEG); 3 — ácido 3,4-dihidroximandélico (DOMA); 4 — normetanefrina (NMN); 5 — metabolitos desaminados e O-metilados

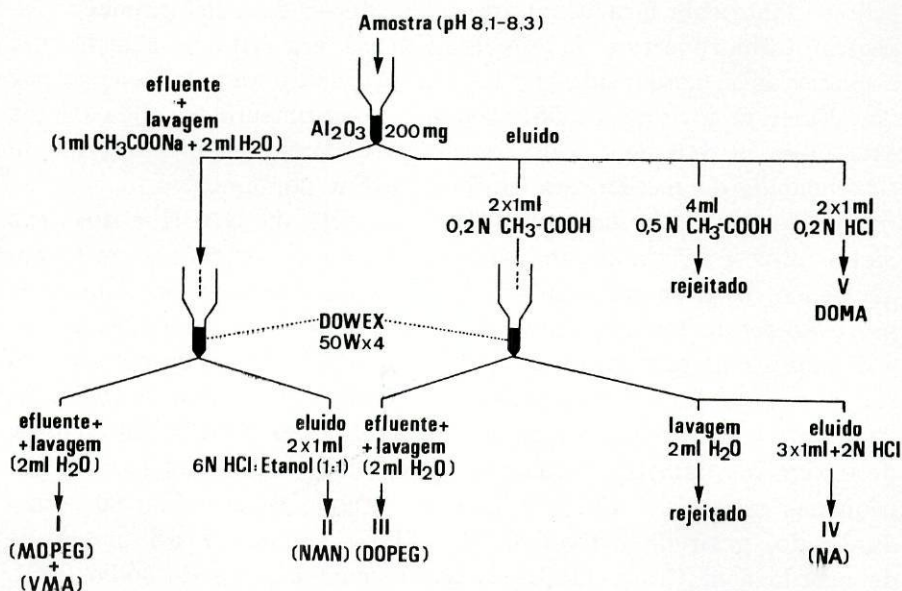


Fig. 1 — Sistema de colunas de Alumina e Dowex, para a separação cromatográfica de NA e metabolitos, segundo Graefe *et al.*, 1973. Amostra de 1 ml, contendo por amostra 12,5 µg de sulfito de sódio e 10 mg de EDTA. Técnica geral: passagem inicial da amostra por coluna, seguida de lavagem e finalmente de eluição, conforme o esquema.

(OMDA) ou seja o 4-hidroxi, 3-metoxifenilglicol (MOPEG) e o ácido 4-hidroxi, 3-metoximandélico (VMA). De acordo com Graefe et al. (1973), a eficiência da recuperação destas fracções é a seguinte: OMDA — 90,0 %, NMN 96,0 %, DOPEG 87,2 %, NA 80,6 %, DOMA 88,8 %.

As veias eram homogenizadas num homogenizador de vidro (Tissue Grinder, Potter, Elvehjen), após a secagem rápida em papel de filtro e pesagem. A homogenização era feita a 0°C em 5 ml de ácido perclórico (0,4N) contendo 1,0 mg/ml de EDTA e 1,25 mg/ml de metabissulfito de sódio. O sobrenadante (após centrifugação a 8000 g) era levado a pH 8,2 pela adição de tampão Tris-HCl (0,5 M e pH 11,0) e analisado cromatograficamente pela técnica já referida.

A radioactividade (^3H) foi determinada num espectrofotómetro de cintilação líquida (Packard mod. 3320), utilizando uma mistura de cintilação (330 ml de Triton X-100, 5,5 ml de Permablend III — Packard, 1 l de Tolueno — Merck). Os resultados obtidos para a radioactividade foram expressos em equivalentes de radioactividade de NA- ^3H (em ng/g de tecido no líquido de perfusão ou, em $\mu\text{g/g}$ de tecido, na preparação). A recuperação do processo cromatográfico foi testada para todas as amostras de cada experiência, pela relação: soma de ^3H das 5 fracções/ ^3H total por amostra. A recuperação foi de $98,0 \pm 2,0$ % ($n=31$). A recuperação de NA- ^3H foi determinada em todas as experiências em que se procedeu à separação cromatográfica das amostras; a recuperação foi de $93,5 \pm 0,3$ % ($n=31$); o trítio restante distribuiu-se pelas restantes fracções: OMDA $1,9 \pm 0,1$ %, NMN $0,3 \pm 0,2$ %; DOPEG $1,0 \pm 0,1$ %, DOMA $3,3 \pm 0,4$ %. Não se fizeram correcções para a recuperação de nenhuma das fracções.

Cálculo da fracção libertada por estímulo

A libertação de ^3H produzida pela estimulação S_1 ou S_2 (150 s a 10Hz=1500 estímulos), foi determinada pelo aumento do efluxo de ^3H verificado durante e após o período de estimulação, relativamente ao efluxo espontâneo no período de colheita que precede imediatamente o início da estimulação. Este aumento do efluxo de ^3H dividido por 1500 estímulos dá-nos a libertação produzida por estímulo. Esta libertação estará dependente do teor de ^3H da preparação, no momento em que é estimulada. A libertação foi por isso expressa pela **fracção de libertação por estímulo (F.L.)** de acordo com Langer

& Enero, 1974. Esta fracção calculou-se pela razão entre a libertação por estímulo e o teor de ^3H existente na preparação no início da estimulação. O teor de ^3H da preparação (no início da estimulação) calculou-se adicionando o ^3H perdido pela preparação desde o início da estimulação ao ^3H existente na tira no fim da experiência.

Estudo da metabolização de $\text{NA-}^3\text{H}$

Empregaram-se fármacos que inibem as vias de inactivação da NA conhecidas, e, que já foram em parte referidos a propósito do estudo da inactivação do mediador simpático. Tivemos porém de introduzir certas modificações ao esquema de tratamento já apontado. Assim, o estudo da inibição da MAO foi feito em tiras de veia safena de animais tratados com iproniazida (duas doses, ministradas por via i.v., numa 1.^a de 60 mg/kg e uma 2.^a de 180 mg/kg, respectivamente 48 e 24 h antes da experiência) pois que a iproniazida «in vitro» exigia, como já se referiu, um tratamento de 1 hora (30 minutos de incubação e 30 minutos de lavagem), o que prolongava excessivamente a experiência. Em vez de cortexona como inibidor da captação extra-neuronal, preferiu-se utilizar o fosfato de hidrocortisona, por ser extremamente solúvel na água.

Para o estudo da captação neuronal, da actividade da COMT e da captação extra-neuronal, utilizamos, como atrás já se apontou, a cocaína (10^{-5}M), o U-O521 (10^{-4}M) e a hidrocortisona ($2,8 \times 10^{-5}\text{M}$). Estas substâncias eram postas em contacto com a preparação 25 minutos antes da 2.^a estimulação (S_2) e, mantinham-se naquela concentração até ao fim da experiência.

O estudo do efeito da inibição da MAO, na metabolização da $\text{NA-}^3\text{H}$, fez-se, como dissemos, em tiras de veia safena de animais tratados com iproniazida. Estas tiras foram submetidas apenas a um período de estimulação (S_1).

Com vista ao estudo da participação da captação extra-neuronal no efluxo espontâneo durante a perfusão, utilizaram-se tiras tratadas pela cocaína. Para este efeito, as preparações eram postas em contacto com a cocaína ($4 \times 10^{-5}\text{M}$) durante 25 minutos, antes de se proceder à incubação com $\text{NA-}^3\text{H}$ (na concentração já referida, de $1,4 \times 10^{-6}\text{M}$ e durante 60 minutos). Durante o período de incubação com $\text{NA-}^3\text{H}$ e perfusão, a cocaína foi mantida em contacto com as preparações, na concentração já referida.

A hipótese do sistema extra-neuronal poder contribuir também

para a libertação de ^3H produzida pela estimulação eléctrica, foi estudada, recorrendo-se a tiras de animais previamente reserpinizados (duas doses de reserpina ministradas por via i.m., a 1.^a 24 h antes da experiência de 1,5 mg/kg e a 2.^a de 0,5 mg/kg 20 horas depois da 1.^a dose) e depois submetidas à acção da cocaína, segundo o esquema de tratamento acabado de referir. Estas tiras depois de incubadas com $\text{NA-}^3\text{H}$ (na mesma concentração e durante o mesmo tempo), e perfundidas, foram submetidas a um período de estimulação (S_1) determinando-se o efluxo espontâneo de ^3H (antes do início da estimulação) e o efluxo de ^3H durante e após o período de estimulação.

Análise estatística

Determinaram-se os valores médios bem como os desvios padrões da média. O significado das diferenças das médias foi efectuado a partir do valor t de Student, utilizando-se umas vezes dados emparelhados e não emparelhados outras. Em alguns casos foi calculado o coeficiente de correlação (r). Os valores de t e r foram considerados significativos quando corresponderam a $P < 0,05$. Para os cálculos numéricos foi utilizada uma máquina calculadora Compucorp (Micro-Computer, mod. 3206).

Fármacos utilizados

(+) Ácido ascórbico (**pro analysi**, Merck); cocaína (cloridrato de cocaína, Bios); cortexona (Shwarz-Mann); 3', 4'-dihidroxi-2-metilprolofenona (U-O521, Upjohn); fenoxibenzamina (cloridrato de dibenzilina, Smith, Kline & French — solução a 10 % em propilenoglicol acidificada pelo HCl N/20); fentolamina (Regitina Ciba — solução comercial a 1 %); guanetidina (Ismelina, Ciba); hidrocortisona (fosfato de hidrocortisona, Actocortin, Vitória); iproniazida (fosfato de iproniazida, F. Hoffman-La Roche); (-)noradrenalina (Hoechst); (-)- ^3H -noradrenalina (New England Nuclear Chemicals, 3,8 Ci/mmol); pentobarbital sódico (Siegfried); reserpina (K & K — solução preparada com 10 % de ácido ascórbico); sal dissódico do ácido etilenodiamino-tetracético (Titriplex III, Merck); tiramina (cloridrato de tiramina, Sigma).

RESULTADOS

1 — Caracterização farmacológica do mediador responsável pelas contracções desencadeadas pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena

A estimulação eléctrica com as características referidas nos Métodos, nunca produziu resposta contráctil detectável, quando a preparação se encontrava mergulhada na solução de Krebs-Henseleit (em banhos de órgãos isolados de 25 a 50 ml de volume). Só quando se substituiu esta solução por óleo mineral se passou a obter contracções proporcionais à intensidade do estímulo. As características da estimulação eléctrica de que mais directamente dependeu a amplitude das contracções foram a frequência e o tempo da estimulação. O início da resposta contráctil verificava-se 1 a 3 segundos após o início da estimulação (período de latência) (Fig. 2). As curvas de «estímulo-

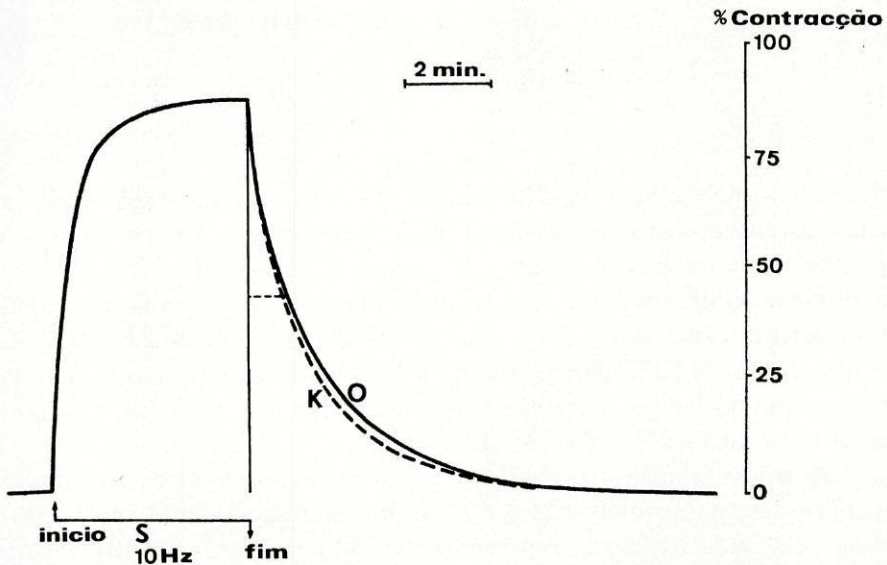


Fig. 2 — Contracção de veia safena provocada pela estimulação eléctrica (S) seguida de relaxamento: O-óleo; K-solução de Krebs-Henseleit. Escala: contracção máxima produzida pela NA exógena.

-efeito» das Figs. 3, 4 e 5 foram obtidas fazendo variar a duração do período de estimulação e conservando constantes os outros parâmetros do estímulo eléctrico. Nas mesmas preparações em que se obtiveram curvas de «estímulo-efeito» determinaram-se, também, curvas de

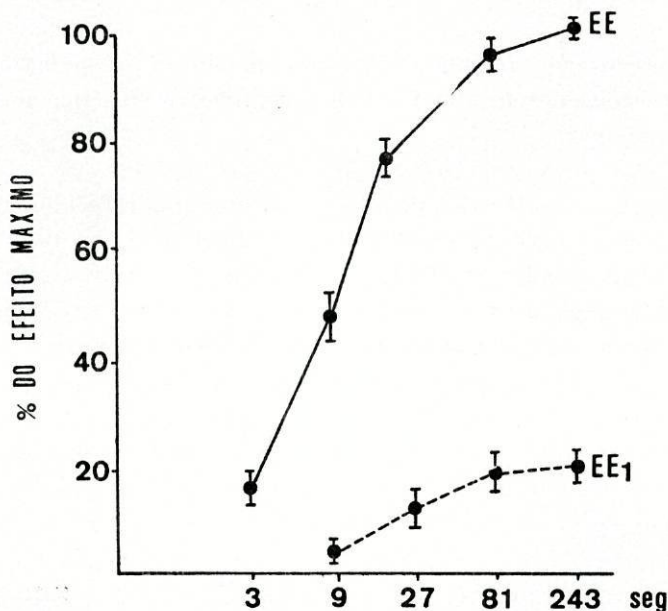


Fig. 3 — Curvas de «estímulo-efeito», antes (EE) e após (EE₁) fenoxibenzamina ($7,5 \times 10^{-6}$ M)

dose-efeito pela adição de NA exógena. Para a representação gráfica das curvas de «estímulo-efeito» foram considerados, arbitrariamente, pontos na linha das abcissas que as aproximassem das obtidas com a noradrenalina exógena. Verificou-se que as duas curvas são, aparentemente, paralelas. A ED₅₀ para a NA exógena foi de $2,8 \times 10^{-6}$ M, enquanto que a ED₅₀ para a estimulação eléctrica se verificou quando um estímulo, com as características definidas nos Métodos era aplicado durante $14,3 \pm 2,6$ s (n=12).

A resposta máxima obtida pela estimulação eléctrica foi, quase sempre, levemente menor (Fig. 2) do que a resposta máxima produzida pela NA exógena, representando $92,1 \pm 3,8$ % (n=9) desta, e, observando-se, geralmente, ao fim de 5 minutos de estimulação.

A tiramina produziu respostas máximas cuja amplitude foi de

90,3 ± 4,7 % (n=9) das respostas desencadeadas pela NA exógena, sendo a ED₅₀ de 2,2 × 10⁻⁵ M. A amplitude das respostas máximas produzidas pela tiramina e pela estimulação eléctrica, não foram estatisticamente diferentes.

1.1. Acção da fenoxibenzamina e da fentolamina sobre as contracções obtidas, quer pela estimulação eléctrica, quer pela NA exógena

A fenoxibenzamina (7,5 × 10⁻⁶ M) após um contacto de 30 minutos, anulou, completamente, a resposta à NA exógena (10⁻⁵ M), reduzindo muito, sem todavia, anular a resposta máxima desencadeada pela estimulação eléctrica. Em relação a esta resposta, verificou-se uma redução de 76,6 ± 6,2 % (n=8) na sua amplitude (Fig. 3).

A fentolamina desviou, paralelamente, para a direita, quer a curva de dose-efeito da NA exógena, quer a curva produzida pela estimulação eléctrica. O desvio, foi maior para a curva produzida pela NA exógena (Fig. 4).

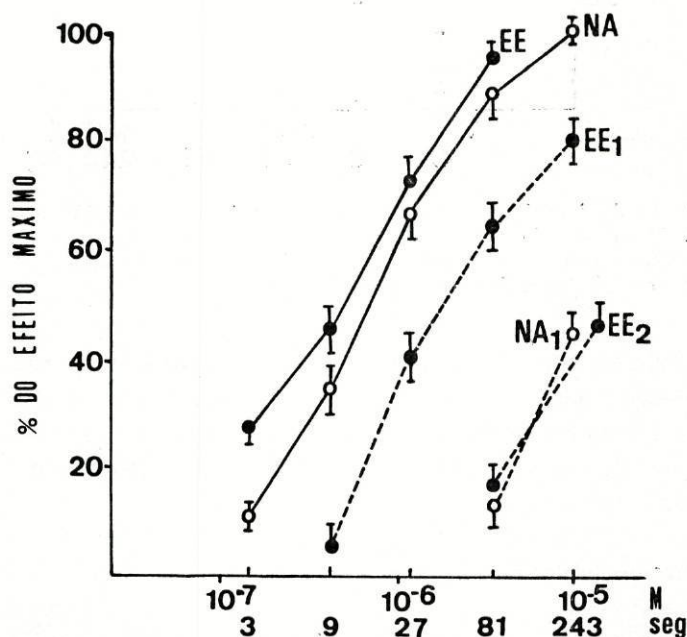


Fig 4 — Curvas de dose-efeito para a noradrenalina exógena (NA) e de «estímulo-efeito» para a estimulação eléctrica (EE). NA₁ representa a curva de dose-efeito após fentolamina (10⁻⁶ M) e EE₁ e EE₂ as curvas de «estímulo-efeito» após fentolamina, respectivamente, 10⁻⁶ e 5 × 10⁻⁶ M.

1.2. Influência da cocaína

A adição de cocaína ao banho (10^{-5} M), nas condições descritas nos Métodos, deslocou para a esquerda, quer a curva de «estímulo-efeito» quer a curva de dose-efeito à NA exógena, sendo maior a deslocação sofrida por esta última (Fig. 5). Enquanto que a curva

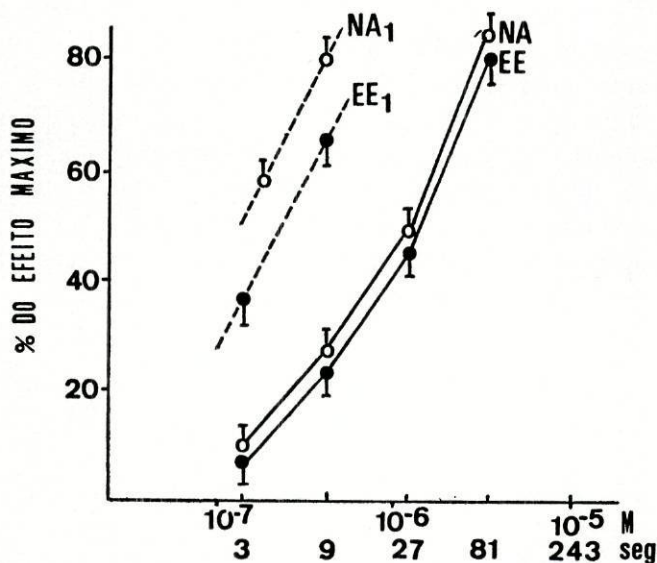


Fig. 5 — Curvas de dose-efeito para a noradrenalina exógena antes (NA) e após (NA₁) cocaína (10^{-5} M). Curvas de «estímulo-efeito» para a estimulação eléctrica antes (EE) e após (EE₁) cocaína, na mesma concentração. Verifica-se um desvio, para a esquerda, mais acentuado no caso da curva da noradrenalina exógena.

de «estímulo-efeito» sofreu um desvio correspondente a uma potenciação de $4,5 \pm 0,3$ ($n=12$), a curva de dose-efeito para a NA exógena sofreu uma deslocação correspondente a uma potenciação de $7,1 \pm 0,5$ ($n=12$), sendo estatisticamente significativa a diferença entre estes dois desvios ($P < 0,01$).

1.3 Efeito da reserpina

Nas tiras de cães previamente injectados com reserpina, o teor em NA foi de $0,22 \pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$ ($n=15$) de tecido fresco, valor correspondente a cerca de 8% do controlo. A contracção provocada nestas tiras pela estimulação eléctrica apareceu muito pouco ampla, sendo

praticamente nula naquelas em que a depleção em NA atingiu maior grau. A resposta à NA exógena, pelo contrário, não foi alterada. Quando as tiras depletadas pela reserpina eram, posteriormente, expostas a um contacto com a NA exógena (5×10^{-5} M durante 30 minutos) assistia-se ao aparecimento de resposta à estimulação eléctrica nos casos em que ela era inicialmente nula ou ao seu aumento quando já havia uma resposta inicial (Fig. 6). A resposta máxima nestas con-

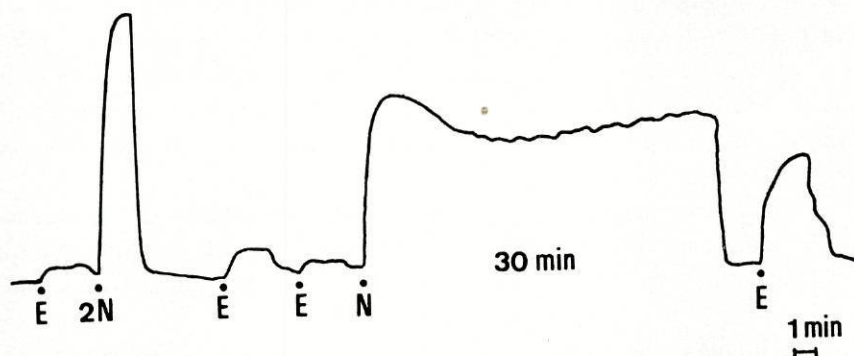


Fig. 6 — Contrações provocadas numa tira de veia safena obtida de um cão tratado pela reserpina. E—estimulação eléctrica (30V; 2ms; 10 Hz); N—noradrenalina (5×10^{-5} M). Após a incubação com noradrenalina durante 30 min, há um aumento da resposta à estimulação eléctrica.

dições — após contacto da preparação com NA exógena — nunca ultrapassou os 50 % da resposta máxima para a NA exógena.

A acção da tiramina foi, também, muito reduzida ou anulada pelo tratamento prévio com a reserpina.

1.4. Acção da guanetidina

Nas preparações às quais se adicionou guanetidina (5×10^{-4} M), que foi deixada no banho durante 30 minutos, verificou-se o aparecimento de contrações que obrigavam a fazer uma a duas lavagens para a recuperação do tono inicial. Nestas condições, a estimulação eléctrica produziu contrações máximas que atingiram uma amplitude de 15 a 30 % da amplitude máxima produzida pela estimulação eléctrica, antes do tratamento pela guanetidina.

1.5. Influência da desnervação

Nas tiras desnervadas, as respostas à estimulação eléctrica foram, em todos os casos, proporcionais ao grau de desnervação, avaliado pelos seguintes parâmetros: a) teor em NA da veia safena; b) aumento de sensibilidade à NA exógena; c) T_{50} após contracção máxima produzida pela NA exógena ($10^{-5}M$), com o relaxamento efectuado em óleo. Nas preparações em que a NA era indoseável, em que a sensibilidade à NA exógena era grande e não era modificada pela exposição à cocaína e em que o T_{50} era longo e não era modificado pela cocaína, a resposta à estimulação eléctrica foi muito reduzida, mas nunca anulada. A resposta máxima obtida nestas condições atingiu uma amplitude média de $12,1 \pm 2,4 \%$ ($n=6$) da resposta máxima obtida com NA exógena.

Com estimulações demoradas e repetidas atingia-se frequentemente uma anulação da resposta mecânica. As preparações em que a desnervação era parcial não foram consideradas neste estudo.

2. Influência de vários fármacos sobre o T_{50} após contracção máxima provocada por estimulação eléctrica

A contracção padrão que serviu para este estudo foi produzida por um estímulo com as características referidas nos Métodos, estímulo esse mantido por 6 minutos. A utilização deste tempo de estimulação baseou-se em ensaios preliminares em que se verificou que ele era suficiente para que em todas as preparações se atingisse a fase de equilíbrio das respostas máximas.

2.1. Relaxamento em óleo

O T_{50} após contracção máxima pela estimulação eléctrica foi de $0,95 \pm 0,06$ min ($n=40$). Este tempo foi considerado controlo. A influência das diferentes substâncias na inactivação do mediador responsável pela resposta mecânica à estimulação eléctrica foi determinada comparando o T_{50} obtido após tratamento prévio por cada uma destas substâncias, ou por associações delas, com o T_{50} do controlo. Essas influências encontram-se resumidas na Tabela 1. Poderá constatar-se que nem o U-0521, nem a cortexona prolongaram o relaxamento. A iproniazida apenas prolongou ligeiramente o tempo de relaxamento (cerca de 1,1 vezes). A cocaína prolongou o tempo de

Tabela 1 — Influência da Cocaína, Iproniazida, U-0521 e Cortexona na inativação do mediador simpático na veia safena, em óleo.

Tratamentos	n	T ₅₀ do relaxamento (minutos)	MTC (1)	Bloqueio da inativação (1) (% do controle)
Controlo	40	0,95 ± 0,06	1	—
Cocaína	18	2,70 ± 0,15	2,9	65,5 a)
Iproniazida	10	1,08 ± 0,11	1,1	9,1 b)
U-0521	6	0,95 ± 0,11	1	0,0
Cortexona	6	0,97 ± 0,10	1	0,0
Cocaína + Iproniazida	6	2,70 ± 0,21	2,9	65,5 a)
Cocaína + U-0521	6	5,50 ± 0,31	5,8	82,8 a) c)
Cocaína + Cortexona	6	9,97 ± 0,59	10,5	90,5 a) c)
Cocaína + U-0521 + Cortexona	6	11,38 ± 0,70	12,0	91,7 a) c)

a) P < 0,01 quando comparado com o controlo.

b) P < 0,05 quando comparado com o controlo.

c) P < 0,001 quando comparado com a cocaína.

(1) MTC representa a relação entre o T₅₀ do relaxamento após a exposição aos fármacos e o T₅₀ de relaxamento na ausência de fármacos (controlo). O bloqueio da inativação foi calculado com base na seguinte fórmula: $\frac{MTC - 1}{MTC} \times 100$

relaxamento 2,9 vezes. O U-0521 ou a cortexona porém, reforçaram significativamente o efeito da cocaína sobre relaxamento; a inibição da inativação do mediador foi quase completa (90,5 %) quando a preparação foi tratada pela cocaína juntamente com cortexona.

Estes resultados mostram que a captação neuronal desempenha na veia safena o principal papel na inativação do mediador simpático; a inibição da COMT ou da captação extra-neuronal só se tornam evidentes após a inibição da captação neuronal. A MAO parece desempenhar um papel pouco relevante na inativação do mediador simpático, mesmo após a inibição da captação neuronal.

2.2. Relaxamento em Krebs-Henseleit

O T_{50} em Krebs-Henseleit, após contração máxima produzida pela estimulação eléctrica, foi nas preparações sem tratamento, semelhante ao verificado em óleo (0,85 minutos). A influência sobre o T_{50} das diferentes substâncias capazes de interferir na inactivação da NA, está resumida na Tabela 2. Como era de prever, o U-0521 e a corte-

Tabela 2 — Influência da Cocaína, U-0521 e Cortexona na inactivação do mediador simpático na veia safena, em Krebs-Henseleit.

Tratamentos	n	T_{50} do relaxamento (minutos)	MTC (1)	Bloqueio da inactivação (1) (% do controlo)
Controlo	25	$0,85 \pm 0,03$	1	—
Cocaína	16	$2,38 \pm 0,34$	2,8	64,3
U-0521	9	$0,85 \pm 0,07$	1,0	0,0
Cortexona	4	$0,85 \pm 0,09$	1,0	0,0
Cocaína + U-0521	9	$3,02 \pm 0,42$	3,6	72,2 a)
Cocaína + Cortexona	7	$3,57 \pm 0,6$	4,2	76,2 a) b)

a) $P < 0,01$ quando comparado com o mesmo tipo de experiências em óleo (Tabela 1).

b) $P < 0,02$ quando comparado com cocaína.

(1) — Ver Tabela 1.

xona, continuam a não prolongar o tempo de relaxamento das tiras contraídas pela estimulação eléctrica. A cocaína produziu um prolongamento do T_{50} , sensivelmente igual ao verificado em óleo. Porém, o reforço do efeito da cocaína sobre o T_{50} exercido pela cortexona ou pelo U-0521 foi mais modesto do que o verificado em óleo.

Estes resultados mostram que a difusão como mecanismo de inactivação do mediador, no caso da veia safena, é evidenciável apenas após a inibição da captação neuronal.

3. Libertação e metabolização de NA-³H

3.1. Efluxo espontâneo de NA-³H e seus metabolitos em tiras de veia safena incubadas previamente com essa amina durante 60 minutos

Um dos objectivos de parte do nosso trabalho, era determinar a participação do sistema neuronal e extra-neuronal no efluxo espontâneo de NA-³H e seus metabolitos ao longo do período de perfusão de 215 minutos. Para esta finalidade, utilizaram-se preparações com captação neuronal intacta e preparações tratadas pela cocaína (ver Métodos). Antes de iniciada a perfusão, retirava-se de cada tira uma pequena amostra (20-30 mg) para o doseamento da NA-³H e seus metabolitos. No fim da perfusão, toda a tira era aproveitada para novo doseamento dos mesmos produtos. Ao longo da perfusão (215 min) recolheram-se 10 amostras, correspondendo cada uma a 5 minutos de perfusão (Fig. 7). Em cada amostra fez-se a separação da NA-³H e metabolitos.

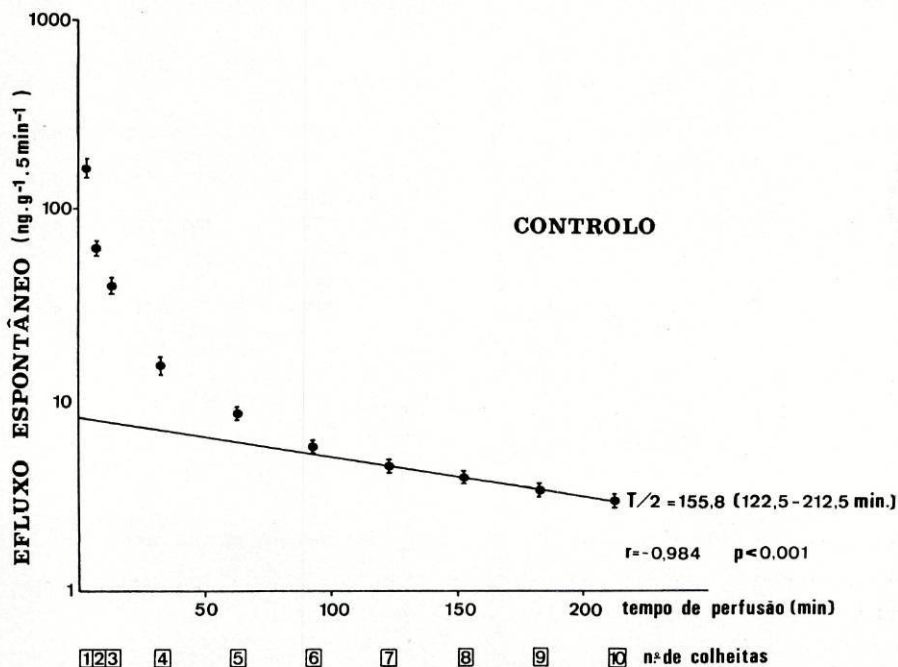


Fig. 7 — Efluxo de ³H, ao longo de 215 minutos de perfusão, de tiras de veias previamente incubadas com NA-³H e perfundidas a fluxo constante. Cada valor representa o efluxo durante 5 minutos de perfusão (média de 3 experiências). T/2 — semi-vida de ³H, em minutos entre os 120 e os 215 minutos de perfusão.

Ordenadas: efluxo de ³H em ng por g de tecido e por 5 minutos de perfusão.

Abcissas: tempo de perfusão. Por baixo da linha das abcissas, indicam-se os períodos de colheita, referentes a cada valor do efluxo de ³H.

3.1.1. Efluxo de NA-³H e metabolitos em preparações não sujeitas a qualquer tratamento prévio

No fim do período de incubação (no início da perfusão) a quantidade de ³H encontrada nas veias foi de $1,26 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$, sendo $78,8 \pm 0,9 \%$ de NA; $9,1 \pm 0,5 \%$ de OMDA; $7,1 \pm 0,4 \%$ de DOMA; $4,3 \pm 0,2 \%$ de DOPEG e $0,7 \pm 0,1 \%$ de NMN ($n=3$).

O efluxo de ³H ao longo dos 215 minutos de perfusão, está representado na Fig. 7. Pela observação desta figura, poderemos distinguir nitidamente duas fases de efluxo. A primeira, correspondente aos 90 minutos iniciais de perfusão, caracteriza-se por um efluxo que sendo muito intenso inicialmente decresce muito rapidamente. A segunda, correspondente ao período entre os 120 e os 215 minutos de perfusão, é caracterizada por um efluxo menos intenso do que o da fase anterior, mas relativamente mais estável (semi-vida de 156 minutos). Aproveitou-se a estabilidade do efluxo desta fase para proceder às estimulações eléctricas nas experiências em que elas foram feitas (ver capítulo seguinte). A Fig. 8 representa o efluxo espontâneo das

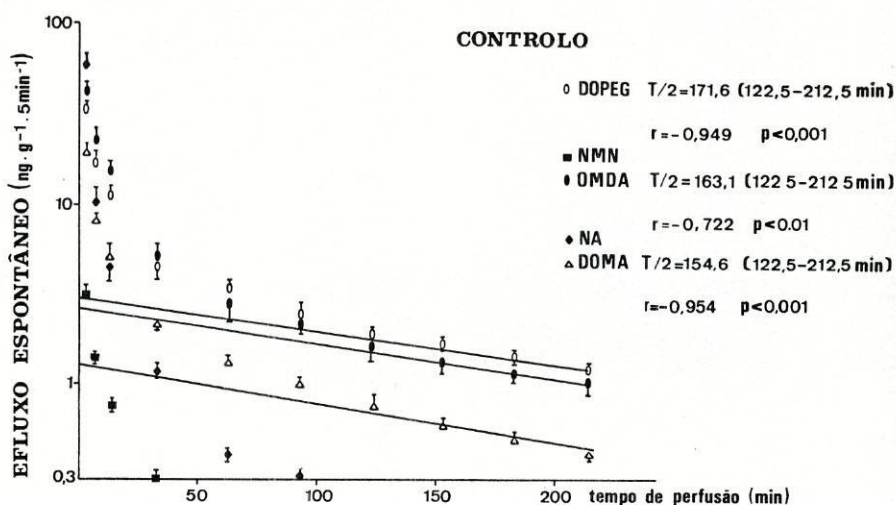


Fig. 8 — Efluxo espontâneo de NA-³H e seus metabolitos, correspondente ao efluxo de ³H, das experiências da Fig. 7. $T/2$ = semi-vida em minutos.

várias fracções após separação por cromatografia, a partir de amostras do líquido de perfusão, colhidas ao longo da experiência. Tal como referimos para o efluxo de ³H, poderemos também distinguir na Fig. 8, dois períodos de efluxo. O período inicial de 90 minutos,

é caracterizado por um efluxo intenso que cai muito rapidamente. Pode ainda verificar-se que o efluxo da NA neste período inicial decresce mais rapidamente do que o das restantes fracções. A partir dos 90 minutos de perfusão, o efluxo das várias fracções, mantém-se relativamente estável, isto é diminui regular e lentamente e de forma aproximadamente paralela para todas elas. O efluxo de cada uma das várias fracções, em percentagem do efluxo total no período dos 120 aos 215 minutos foi o seguinte: DOPEG $42,3 \pm 1,0 \%$; OMDA $32,8 \pm 1,0 \%$; DOMA $13,0 \pm 0,7 \%$; NA $7,5 \pm 0,3 \%$ e NMN $3,1 \pm 0,4 \%$. Deverá notar-se que o efluxo de NMN e da NA nesse período foi muito pequeno, e aproximando-se do limite inferior de sensibilidade do método utilizado para a sua determinação.

No fim da perfusão as tiras retinham ainda $0,73 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ de ^3H , assim distribuído: NA $86,4 \pm 0,8 \%$; OMDA $7,7 \pm 1,5$; DOMA $4,8 \pm 1,7 \%$; DOPEG $0,8 \pm 0,1 \%$ e NMN $0,3 \pm 0,0 \%$. Comparando estes valores com os verificados no início da perfusão (fim da incubação) verifica-se que a preparação perde durante os 215 minutos de perfusão, cerca de $42,1 \%$ do ^3H que continha no seu início.

3.1.2. Efluxo de NA- ^3H e metabolitos em preparações tratadas pela cocaína

Nas tiras tratadas com cocaína (a cocaína estava presente durante a incubação e perfusão), a quantidade de ^3H presente no tecido, no início da perfusão, foi de $0,64 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ ($n=3$) distribuída pelas seguintes fracções: OMDA $46,6 \pm 7,5 \%$; NA $41,1 \pm 6,8 \%$; DOMA $4,7 \pm 0,9 \%$; DOPEG $4,2 \pm 0,7 \%$ e NMN $3,3 \pm 0,5 \%$. Comparando estes valores, com os valores correspondentes nas preparações sem tratamento prévio, verifica-se que a cocaína reduziu a acumulação de ^3H para cerca de 50% ($P < 0,01$). A análise destes resultados permitiu ainda verificar que: 1 — a cocaína reduziu pronunciadamente a acumulação de NA- ^3H ; 2 — a cocaína aumentou a acumulação das fracções OMDA e NMN.

O efluxo da NA- ^3H e seus metabolitos referente às preparações tratadas pela cocaína, está representado na Fig. 9. A observação desta figura, mostra-nos que o efluxo espontâneo nos 215 minutos de perfusão é constituído principalmente pela fracção OMDA, representando esta fracção a partir dos 90 minutos cerca de 76% do efluxo total de ^3H . Poderá ainda observar-se que a partir dos 90 minutos de perfusão o efluxo da fracção OMDA é relativamente estável

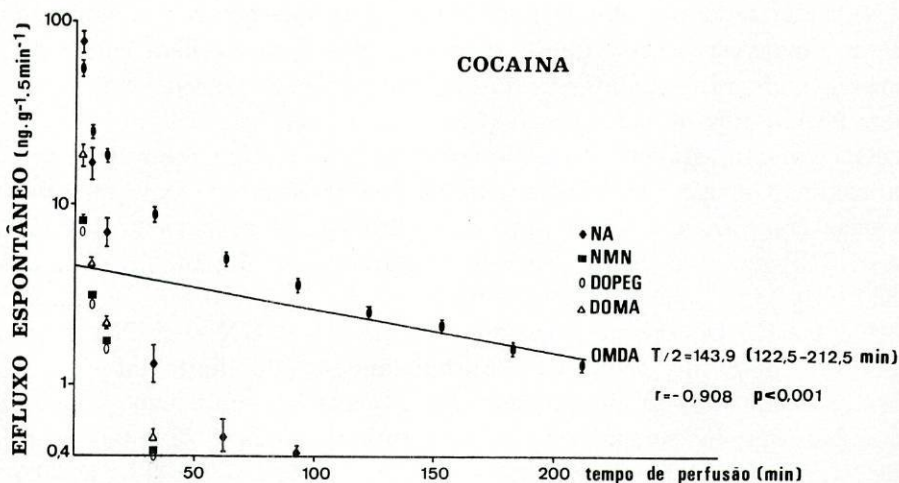


Fig. 9 — Efluxo espontâneo de NA-³H e seus metabolitos, de veias incubadas e perfundidas na presença de cocaína (4×10^{-5} M). Os períodos de colheita, foram os mesmos da Fig. 7. $T/2$ = semi-vida em minutos.

(semi-vida 144 minutos). Para o período de perfusão entre os 120 e os 215 minutos o efluxo das restantes fracções é muito modesto, aproximando-se bastante do limite inferior de sensibilidade do método utilizado para a sua determinação.

Comparando o efluxo das várias fracções, nas preparações sem tratamento pela cocaína, com as preparações tratadas por este inibidor da captação neuronal, verificou-se que a cocaína reduziu acentuadamente o efluxo da fracção DOPEG ao longo de toda a perfusão e aumentou o efluxo da fracção OMDA (embora só significativamente nos 15 minutos iniciais de perfusão). O efluxo da fracção DOMA foi reduzido pela cocaína, principalmente a partir dos 60 minutos de perfusão. O efluxo da NMN foi aumentado pela cocaína apenas nos 35 minutos iniciais da perfusão. O efluxo da NA-³H não foi modificado significativamente pela cocaína, durante os 90 minutos iniciais da perfusão.

No fim da perfusão, as tiras tratadas pela cocaína, continham ainda $0,15 \pm 0,05$ $\mu\text{g/g}$ de ³H assim distribuídos: OMDA $49,8 \pm 6,7$ %; NA $45,5 \pm 6,3$ %; DOMA $3,2 \pm 0,3$ %; DOPEG $1,9 \pm 0,1$ % e NMN $0,6 \pm 0,2$ %. Verificou-se que durante os 215 minutos de perfusão as tiras tratadas pela cocaína perderam cerca de 77 % de ³H valor que é bastante superior ao verificado para as tiras sem cocaína (42 %).

Os resultados destas experiências sugerem que o efluxo, durante a fase «estável», das fracções DOPEG e DOMA tem origem neuronal, mas que o efluxo da fracção OMDA poderá ter origem, pelo menos em parte, extra-neuronal. A origem (neuronal ou extra-neuronal) do efluxo das fracções NA e NMN, durante o período (estável), não pôde ser determinada, dado o seu reduzido valor durante este período.

3.2. Libertação de NA-³H e seus metabolitos, produzida pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena incubadas previamente com NA-³H

3.2.1. Origem do ³H libertado pela estimulação

As preparações incubadas com NA-³H e depois perfundidas, foram regra geral submetidas a dois períodos de estimulação, S₁ e S₂ (ver Métodos). A estimulação eléctrica, produziu um acentuado aumento do efluxo de ³H (Fig. 10); o aumento do efluxo foi máximo

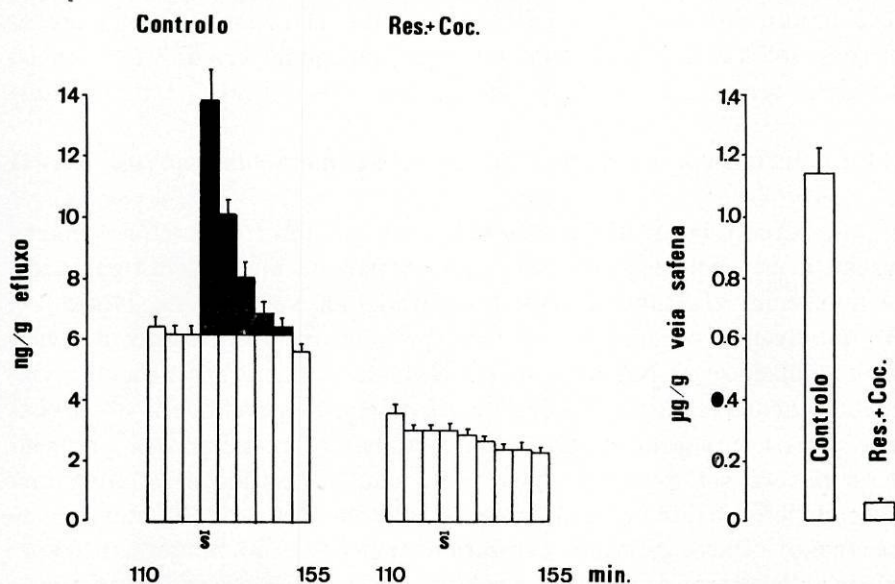


Fig. 10 — Gráfico da esquerda: efluxo de ³H. Controlo — preparações de veia safena incubadas com NA-³H e perfundidas; Res + Coc — preparações de veia safena de animais reserpinizados e tratados pela cocaína (4×10^{-5} M), incubadas com NA-³H e perfundidas; a cocaína foi posta em contacto com a preparação 25 minutos antes da incubação com NA-³H e manteve-se até final da experiência. Ordenadas: ng/g de tecido. Colunas a branco — efluxo espontâneo, correspondendo cada uma a 5 minutos de perfusão; abcissas — tempo de perfusão (perfusão iniciada a partir do fim da incubação). S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. Colunas a preto: libertação produzida pela estimulação.

Gráfico da direita — ³H existente nas preparações anteriores, aos 120 minutos de perfusão (calculado pela adição das perdas de ³H com o ³H existente nas preparações, no fim de cada experiência). Controlo — 15 experiências; Res + Coc — 3 experiências.

durante a estimulação, decaindo depois progressivamente, atingindo-se os valores do efluxo espontâneo (anterior à estimulação), 25 a 30 minutos após o início desta. Como se poderá concluir facilmente da Fig. 10, a libertação de ^3H produzida pela estimulação, representa apenas uma pequena fracção da quantidade de ^3H existente nas preparações no início do período de estimulação.

Tendo por objectivo esclarecer a origem (neuronal ou extra-neuronal) do efluxo de ^3H produzido pela estimulação, utilizaram-se tiras de animais tratados pela reserpina e depois submetidas à acção da cocaína (RES+COC), Fig. 10 (ver Métodos). Os resultados destas experiências mostraram que: a) O conteúdo em ^3H existente nas tiras no início da estimulação é cerca de 10 % do que se encontra nas tiras sem tratamento; b) O efluxo espontâneo de ^3H que precede a estimulação é cerca de 50 % do das tiras sem tratamento; c) A estimulação não liberta ^3H ; d) as preparações RES+COC perdem dos 120 aos 125 minutos de perfusão $3,70 \pm 0,2$ % do ^3H acumulado nas preparações aos 120 minutos, enquanto que em igual período de perfusão as tiras sem tratamento perdem apenas $0,56 \pm 0,04$ % ($P < 0,001$).

3.2.2. Influência de vários fármacos na metabolização da NA- ^3H

O estudo da influência dos fármacos que interferem com a inactivação e metabolização da NA, tinha à partida algumas dificuldades. Assim, num trabalho anterior, realizado na veia safena (Brandão, 1977), tivemos ocasião de verificar, que o efluxo (espontâneo e devido à estimulação) de NA- ^3H e seus metabolitos (em preparações previamente incubadas com NA- ^3H) variava consideravelmente de preparação para preparação. Este comportamento irregular das preparações poderá ser explicado, pelo facto daquele estudo ser feito numa fase de efluxo ainda relativamente instável (60 aos 70 minutos de perfusão). Parecia assim, ser difícil (pelo elevado número de experiências necessárias) estudar a influência de um certo número de fármacos, no efluxo de NA- ^3H e metabolitos, tanto para o efluxo espontâneo como para o efluxo devido à estimulação eléctrica. Estas dificuldades poderiam porém ser ultrapassadas, se fosse possível na mesma preparação apreciar o efeito do fármaco ou fármacos em estudo, não só em relação ao efluxo espontâneo mas também em relação ao efluxo devido à estimulação eléctrica. Com este fim, submetemos cada preparação a dois períodos de estimulação, relativamente curtos (para que a recuperação do efluxo espontâneo se fizesse rapidamente)

e suficientemente afastados um do outro por forma a poder submeter cada preparação à acção de um ou mais fármacos, no intervalo entre as duas estimulações, de modo que a acção destes se pudesse manifestar no efluxo espontâneo que precede S_2 e no efluxo produzido por S_2 . Tinha-se assim a possibilidade de comparar, na mesma preparação, o efluxo espontâneo e o efluxo produzido pela estimulação, na ausência e na presença do fármaco ou fármacos em estudo. Em ensaios preliminares, verificamos que uma estimulação eléctrica com 2,5 minutos de duração (10 Hz, 2 ms e 100 V) e durante a fase de efluxo «estável», produzia um aumento considerável do efluxo de ^3H , recuperando-se o efluxo espontâneo ao fim de 25 a 30 minutos após o início da estimulação (ver Fig. 10). A generalidade dos fármacos, a cuja acção pretendíamos submeter as preparações, necessitavam dum período de contacto de 20 a 25 minutos. Tendo em conta estas duas condicionantes (recuperação do efluxo espontâneo das preparações sujeitas a estimulação e tempo de actuação dos fármacos) decidimos intervalar os dois períodos de estimulação de 60 minutos (S_1 com início aos 125 minutos e S_2 com início aos 185 minutos), conforme se apontou nos Métodos. A generalidade dos fármacos foram postos em contacto com as preparações a partir dos 160 minutos de perfusão.

Numa série de 3 experiências, não se utilizou qualquer fármaco, pretendendo-se apenas avaliar o comportamento do efluxo espontâneo que precede S_1 e S_2 e as fracções de libertação de S_1 e S_2 . Os resultados destas experiências estão resumidos na Fig. 11. Verificou-se que os valores percentuais de $\text{NA-}^3\text{H}$ e seus metabolitos do efluxo espontâneo que precede S_2 , não diferiam significativamente dos valores correspondentes para o efluxo espontâneo que precede S_1 . As fracções de libertação, de S_1 e S_2 , foram para a mesma preparação quase constantes (divisão de S_2 por $S_1 = 0,96 \pm 0,04$; $n=3$). Os valores percentuais de $\text{NA-}^3\text{H}$ e metabolitos correspondentes às fracções de libertação de S_2 não diferiram significativamente dos valores correspondentes para as fracções de libertação de S_1 .

Para dar uma ideia dos valores do efluxo espontâneo dos 110 aos 125 minutos de perfusão e da libertação de $\text{NA-}^3\text{H}$ e seus metabolitos produzida por S_1 , agrupamos os resultados das 3 experiências anteriores e, ainda os resultados das experiências em que se utilizou a cocaína, o U-0521, a hidrocortisona e, associações destes inibidores (recorde-se que estes fármacos foram postos em contacto com as preparações a partir dos 160 minutos de perfusão). Este grupo de

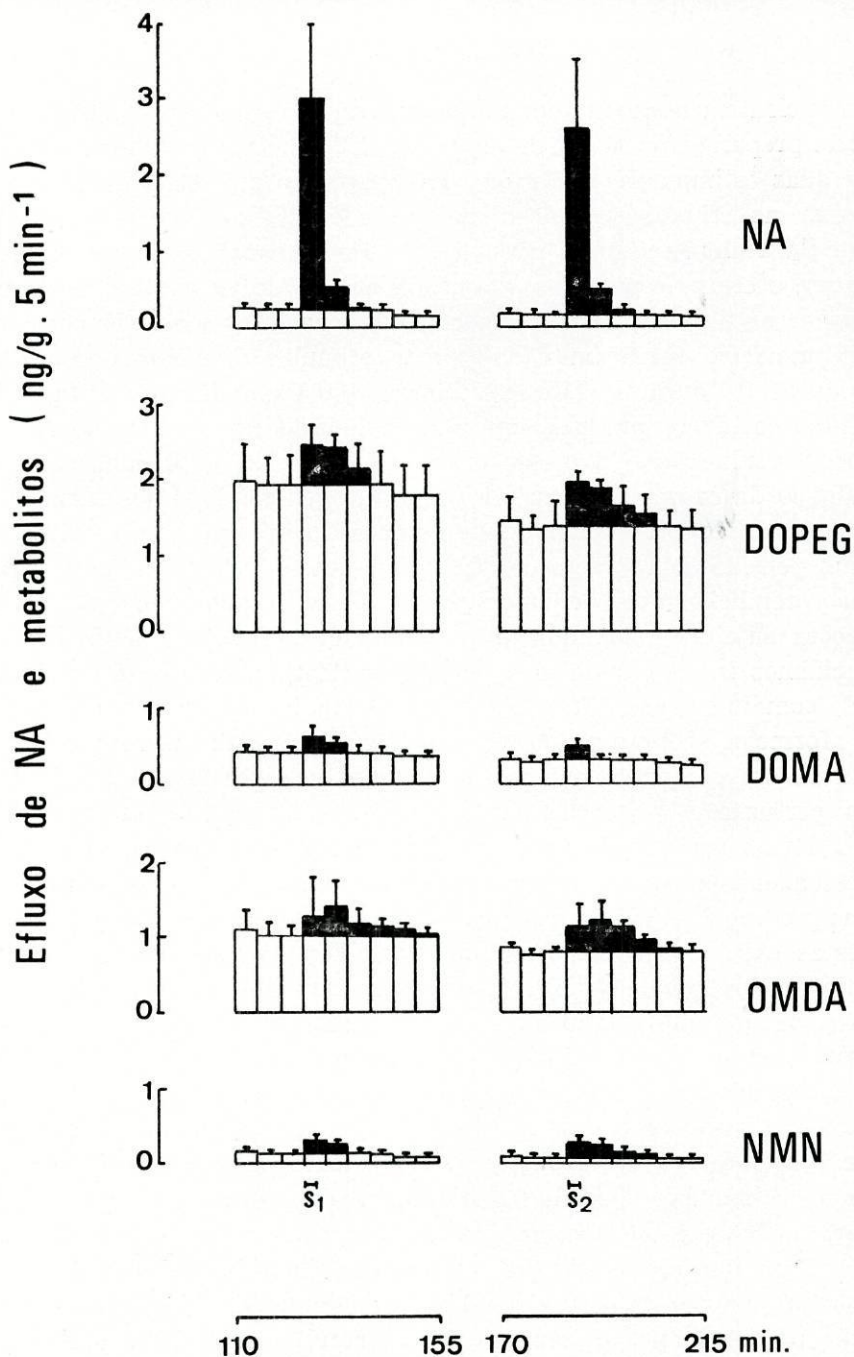


Fig. 11 — Efluxo de NA e metabolitos, de tiras de veia safena incubadas com NA-³H. Após a incubação, as tiras foram perfundidas a fluxo constante de 0,8 ml/min. Ordenadas: ng/g de tecido. Abcissas — tempo após o início da perfusão, Colunas a branco — efluxo espontâneo de 5 minutos. S₁ e S₂ — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V, 2,5 minutos de estimulação). Colunas a preto — aumento do efluxo devido a estimulação (S₁ e S₂). Resultados de 3 experiências.

Tabela 3 — EFLUXO ESPONTÂNEO DE NA E METABOLITOS

Efluxo espontâneo médio nos 5 minutos que precede a estimulação (Controlo e Iproniazida — dos 120 aos 125 minutos de perfusão, restantes grupos experimentais dos 180 aos 185 minutos de perfusão)

Grupo Experimental	n	Efluxo Espontâneo (ng/g. 5 min ⁻¹)	% da radioactividade total (³ H)					NMN
			NA	DOPEG	DOMA	OMDA		
Controlo	20	6,0±0,3	8,2±0,7	44,8±2,3	11,5±0,5	32,6±2,5	3,1±0,2	
U-0521	3	4,7±0,6	10,4±1,5	55,6±0,7	11,1±1,1	20,7±0,5	2,3±0,3	
Hidrocortisona	3	4,8±0,6	8,1±1,7	45,9±5,5	8,9±0,9	32,9±4,1	4,2±1,0	
Iproniazida	6	3,3±0,2 (1)	28,7±1,9 (1)	27,1±2,8 (2)	6,6±0,4 (1)	24,6±3,1	13,1±0,8 (1)	
Cocaína	5	5,5±0,7	10,9±0,7 (3)	45,4±3,4	11,5±0,5	27,8±2,7	4,4±0,5 (4)	
Coc + U-0521	3	4,1±0,7	11,6±2,2	40,9±9,4	11,4±1,9	33,9±12,5	2,2±0,3 (5)	
Coc + U-0521 + Hi-drocortisona	3	4,4±0,8	12,6±2,6	50,7±5,9	15,1±1,1	19,5±4,6	2,0±0,3 (6)	

(1) P < 0,001 quando comparado com o grupo controlo (t — dados não emparelhados)

(2) P < 0,01 quando comparado com o grupo controlo (t — dados não emparelhados)

(3) P < 0,05 quando comparado com o respectivo controlo (t — dados emparelhados)

(4) P < 0,01 quando comparado com o respectivo controlo (t — dados emparelhados)

(5) P < 0,02 quando comparado com cocaína (t — dados não emparelhados)

(6) P < 0,01 quando comparado com cocaína (t — dados não emparelhados)

experiências foi considerado controlo. Para o grupo controlo, o efluxo espontâneo (Tabela 3) é constituído por aproximadamente 92 % de metabolitos de NA-³H assim distribuídos: DOPEG 45 %; OMDA 33 %; DOMA 12 %; NMN 3 %; apenas 8 % do efluxo espontâneo é constituído por NA intacta (o valor do efluxo espontâneo de NMN e NA, está muito próximo do limite inferior de sensibilidade do método utilizado para a sua determinação). A estimulação produziu um acentuado aumento do efluxo de NA-³H e metabolitos (Fig. 12,

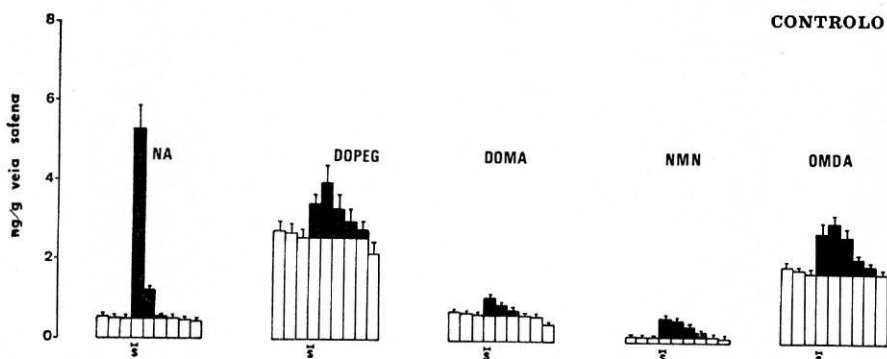


Fig. 12 — Efeito da estimulação eléctrica no efluxo de NA-³H e seus metabolitos, em tiras de veia safena. Ordenadas: ng/g por grama de tecido. Colunas a branco representam o efluxo espontâneo, correspondendo cada coluna ao efluxo do período de colheita de 5 minutos; as colheitas iniciaram-se aos 115 minutos de perfusão, após a incubação com NA-³H. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. Os rectângulos a preto, indicam o aumento do efluxo em relação ao efluxo espontâneo. Resultados de 20 experiências.

Tabela 4). A fracção de libertação por estímulo foi igual a $1,0 \times 10^{-5}$. Calculando-se a libertação produzida pelo período de estimulação de 2,5 minutos, verificou-se que corresponde apenas a 1,5 % do ³H existente nas preparações no início de estimulação. A libertação era constituída por NA 39 %, OMDA 25 %, DOPEG 24 %, NMN 7 % e DOMA 6 %. Como se poderá ver facilmente na Fig. 12, o efluxo de NA produzido pela estimulação ocorreu quase só no período de colheita em que se procedeu à estimulação, enquanto que o efluxo dos metabolitos deu-se não só durante este período, mas principalmente nos períodos de colheita seguintes. A recuperação do efluxo espontâneo era portanto mais rápida para a NA que para os metabolitos, principalmente para as fracções DOPEG e OMDA. Em relação ao efluxo total de NA libertado pela estimulação, 84 % era reco-

lhido durante os 5 minutos após o início da estimulação, 14 % nos 5 minutos seguintes e apenas 2 % nos 5 minutos seguintes.

As tabelas 3 e 4 e a Fig. 13 resumem os valores do efluxo espontâneo e do efluxo produzido pela estimulação (S_2), nas experiências com inibição da COMT (tratamento com U-0521 a partir dos 160 minutos de perfusão). Verificou-se (Tabela 3) que os valores percentuais das várias fracções do efluxo espontâneo não foram alterados

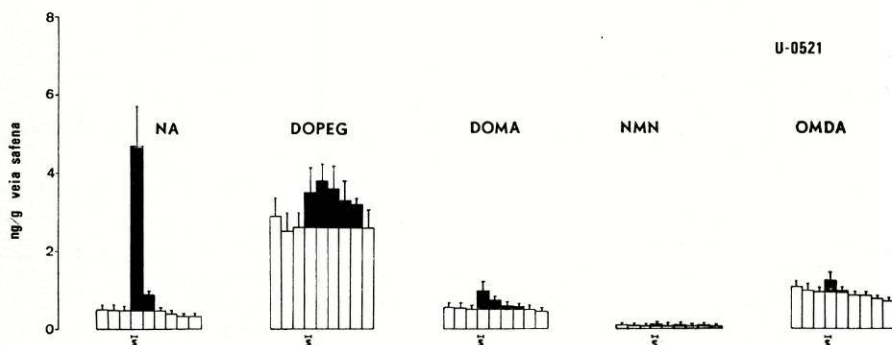


Fig. 13 — Efeito do U-0521, no efluxo de NA e metabolitos em tiras de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. As colunas a branco representam o efluxo espontâneo correspondendo a 5 minutos de perfusão; as colheitas iniciavam-se aos 170 minutos de perfusão, depois do fim da incubação com $NA\text{-}^3H$. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. As colunas a preto representam o efluxo produzido pela estimulação. O U-0521 ($10^{-4}M$) foi posto em contacto com a preparação a partir dos 160 minutos de perfusão e mantido até final da experiência. Resultados de 3 experiências.

significativamente pela inibição da COMT. A fracção de libertação foi para estas experiências de $0,8 \times 10^{-5}$, valor que não difere significativamente do verificado para a libertação na ausência de tratamento. A composição da fracção de libertação das experiências com inibição da COMT é constituída por (valores percentuais): NA 46, DOPEG 43, DOMA 8, OMDA 3, NMN 0. Constatou-se assim, que a inibição da COMT, aumentou discretamente o efluxo de NA, reduziu acentuadamente o efluxo das fracções metiladas e aumentou o efluxo de DOPEG. A Fig. 13 mostra que o efluxo de NA, libertada pela estimulação, decaiu de forma muito parecida com o que se verificou para o efluxo de NA nas experiências sem tratamento.

O resultado da inibição da captação extra-neuronal (efectuada pela hidrocortisona) no efluxo espontâneo e na libertação das várias

fracções está condensado nas Tabelas 3 e 4 e Fig. 14. Tal como verificamos para as experiências com inibição da COMT, a inibição do sistema extra-neuronal não alterou de forma significativa o efluxo espontâneo das várias fracções. O valor da libertação de ^3H nas expe-

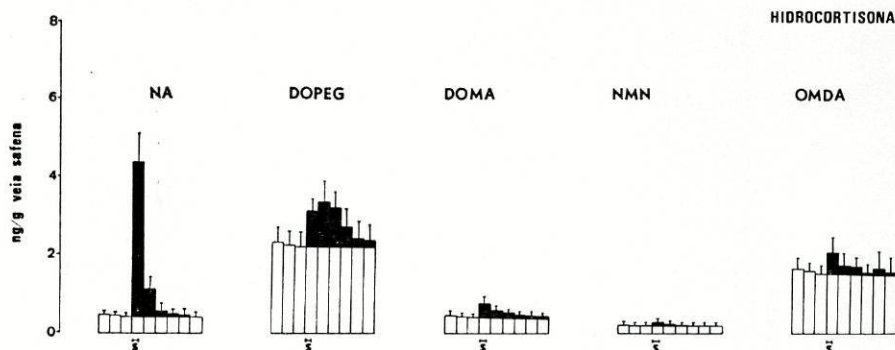


Fig. 14 — Efeito da hidrocortisona, no efluxo da NA e metabolitos em tiras de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. As colunas a branco, representam o efluxo espontâneo durante 5 minutos de perfusão; a colheita das amostras do líquido de perfusão iniciou-se aos 170 minutos, após o fim da incubação com $\text{NA-}^3\text{H}$. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V.) de 2,5 minutos. As colunas a preto, representam o efluxo produzido pela estimulação. A hidrocortisona ($2,8 \times 10^{-5}\text{M}$), foi posta em contacto com a preparação, a partir dos 160 minutos de perfusão e mantida até final da experiência. Resultado de 3 experiências.

riências com hidrocortisona foi sobreponível ao verificado nas experiências com U-0521, isto é, $0,8 \times 10^{-5}$. Tal como referimos para a inibição da COMT, a inibição do sistema extra-neuronal reduziu o efluxo das fracções metiladas produzido pela estimulação. Contudo, a inibição da formação da fracção OMDA foi maior nas experiências com U-0521 do que nas experiências com hidrocortisona ($P < 0,01$). Uma outra semelhança nos resultados das experiências com U-0521 e com hidrocortisona diz respeito à forma como decresce o efluxo de NA produzido pela estimulação: nem o U-0521 nem a hidrocortisona atrasaram a recuperação do efluxo espontâneo da NA.

Os resultados das experiências com cocaína estão resumidos na Fig. 15 e Tabelas 3 e 4. Verifica-se, pela consulta da Tabela 3, que a inibição da captação neuronal não alterou sensivelmente os valores percentuais das várias fracções relativamente ao efluxo espontâneo (houve apenas, um discreto aumento do efluxo da NMN). A fracção de libertação foi, nas experiências com cocaína de $1,2 \times 10^{-5}$, valor

Tabela 4 — LIBERTAÇÃO PELA ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA

Efluxo de NA e metabolitos libertado pela estimulação eléctrica (10Hz, 2 ms, 100 V).
 Controlo e Iproniazida S., restantes grupos experimentais S.

Grupo Experimental	n	F.L. × 10 ⁵ (a)	% da radioactividade total (³ H)				NMN
			NA	DOPEG	DOMA	OMDA	
Controlo	20	1,0 ± 0,1	39,0 ± 1,6	24,0 ± 2,4	5,9 ± 0,5	25,0 ± 2,0	6,7 ± 0,8
U-0521	3	0,8 ± 0,1	45,5 ± 5,4 (1)	43,4 ± 4,9 (1)	8,1 ± 0,9	2,6 ± 0,3 (1)	0,4 ± 0,3 (2)
Hidrocortisona	3	0,8 ± 0,2	47,6 ± 2,3	33,4 ± 3,8	6,4 ± 0,9	10,7 ± 1,7 (1)	1,9 ± 0,6 (1)
Iproniazida	6	0,8 ± 0,2	63,1 ± 1,7 (3)	3,3 ± 0,8 (3)	2,6 ± 0,5 (4)	12,5 ± 1,6 (4)	18,7 ± 2,4 (3)
Cocaína	5	1,2 ± 0,3	53,2 ± 2,5 (1)	0,9 ± 0,6 (2)	5,5 ± 0,9	28,1 ± 1,9 (2)	12,3 ± 0,9 (5)
Cocaína + U-0521	3	1,2 ± 0,3	62,3 ± 3,5 (6)	27,7 ± 3,1 (7)	5,3 ± 0,2	3,8 ± 0,8 (7)	0,9 ± 0,2 (7)
Cocaína + U-0521 + +Hidrocortisona	3	1,3 ± 0,3	76,6 ± 2,2 (8)	8,0 ± 1,9 (9)	7,0 ± 1,0	7,6 ± 4,1	0,6 ± 0,4

(a) F.L.: Fração de Libertação por estímulo-³H libertado por estímulo dividido pelo ³H existente no tecido, no início da estimulação.

- (1) P < 0,05 quando comparado com respectivo controlo (t — dados emparelhados)
 (2) P < 0,02 quando comparado com respectivo controlo (t — dados emparelhados)
 (3) P < 0,001 quando comparado com grupo controlo (t — dados não emparelhados)
 (4) P < 0,01 quando comparado com grupo controlo (t — dados não emparelhados)
 (5) P < 0,01 quando comparado com respectivo controlo (t — dados emparelhados)
 (6) P < 0,01 quando comparado com cocaína (t — dados não emparelhados)
 (7) P < 0,001 quando comparado com cocaína (t — dados não emparelhados)
 (8) P < 0,05 quando comparado com cocaína + U-0521 (t — dados não emparelhados)
 (9) P < 0,01 quando comparado com cocaína + U-0521 (t — dados não emparelhados)

um pouco superior ao verificado para o grupo controlo, mas que não difere significativamente dele.

A cocaína modificou porém profundamente os valores percentuais das fracções libertadas: supressão quase completa do efluxo de

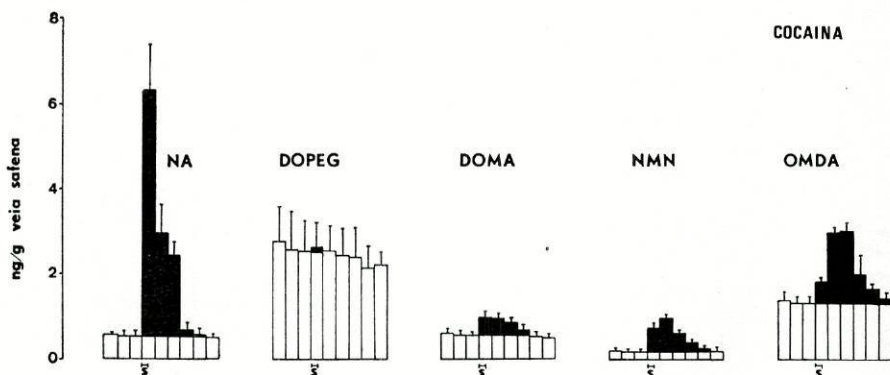


Fig. 15 — Efeito da cocaína no efluxo da NA e metabolitos em tiras de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. As colunas a branco representam o efluxo espontâneo, correspondente a 5 minutos de perfusão; a colheita das amostras do líquido de perfusão iniciou-se aos 170 minutos de perfusão, após o fim da incubação com NA-³H. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. As colunas a preto, representam o aumento do efluxo produzido pela estimulação, relativamente ao efluxo espontâneo. A cocaína (10⁻⁵ M), foi posta em contacto com a preparação, a partir dos 160 minutos de perfusão e mantida até ao fim da experiência. Resultados de 5 experiências.

DOPEG, aumento do efluxo da NA e fracções metiladas. Em relação ao efluxo da NA produzida pela estimulação, a cocaína não só o intensificou como o prolongou cerca de 10 a 15 minutos, isto é, a recuperação do efluxo espontâneo da NA deu-se mais tardiamente (comparar Fig. 15 com Fig. 12).

Os resultados das experiências com cocaína + U-0521 (Tabelas 3 e 4 e Fig. 16) diferem dos das experiências anteriores (cocaína) no seguinte: a) o efluxo espontâneo de NMN está diminuído; b) há diminuição pronunciada do efluxo das fracções metiladas produzido pela estimulação; c) verifica-se um aumento do efluxo de NA e DOPEG, produzido pela estimulação.

A hidrocortisona quando associada à cocaína e U-0521 (ver Tabela 4 e Fig. 17) reduziu a formação do DOPEG e aumentou o efluxo da NA, devidos à estimulação.

A observação das Figs. 16 e 17, mostra-nos que a recuperação do efluxo espontâneo da NA, nas experiências com COC + U-0521 e COC + U-0521 + hidrocortisona, após a estimulação está atrasada.

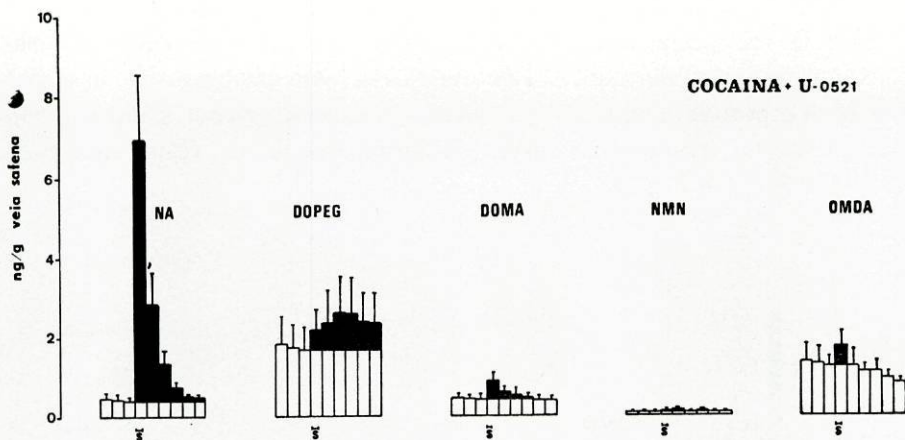


Fig. 16 — Efeito da cocaína + U-0521, no efluxo de NA-³H e metabolitos de preparações de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. Colunas a branco — efluxo espontâneo correspondente a 5 minutos de perfusão; a colheita das amostras iniciou-se aos 170 minutos de perfusão. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. Colunas a preto — efluxo devido à estimulação. A cocaína (10⁻⁶ M) e o U-0521 (10⁻⁴ M), foram postas em contacto com a preparação a partir dos 160 minutos de perfusão, e mantidas até ao fim da experiência. Resultados de 3 experiências.

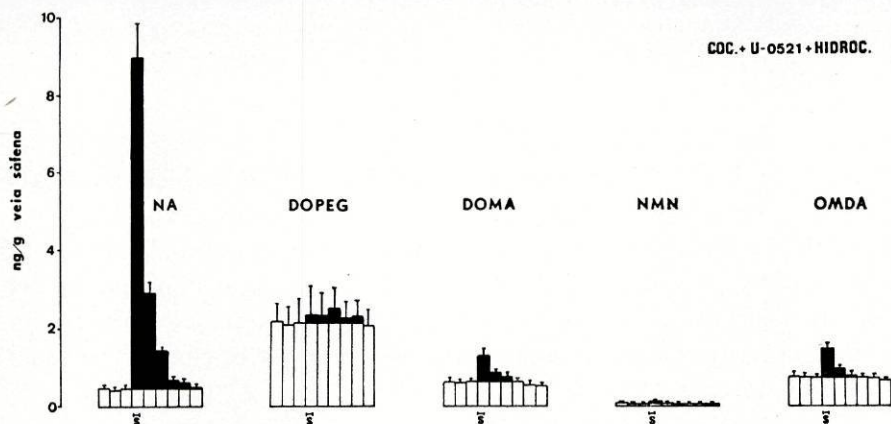


Fig. 17 — Efeito da cocaína + U-0521 + hidrocortisona no efluxo da NA e metabolitos em preparação de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. Colunas a branco: efluxo espontâneo de 5 minutos de perfusão; as colheitas iniciaram-se aos 170 minutos de perfusão. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. Colunas a preto — efluxo produzido pela estimulação. A cocaína (10⁻⁶ M), o U-0521 (10⁻⁴ M) e a hidrocortisona (2,8 × 10⁻⁵ M), foram postas em contacto com a preparação a partir dos 160 minutos de perfusão e foram mantidas até ao fim da experiência. Resultados de 3 experiências.

A influência da inibição da MAO na metabolização da NA, foi estudada em preparações de veia safena de animais tratados pela iproniazida (ver Métodos). Recorreu-se a este processo de inibição da MAO, porque a inibição «in vitro» exigia experiências muito prolongadas. Os resultados destas experiências estão resumidos nas Tabelas 3 e 4 e Fig. 18. A análise da Tabela 3, mostra que o efluxo

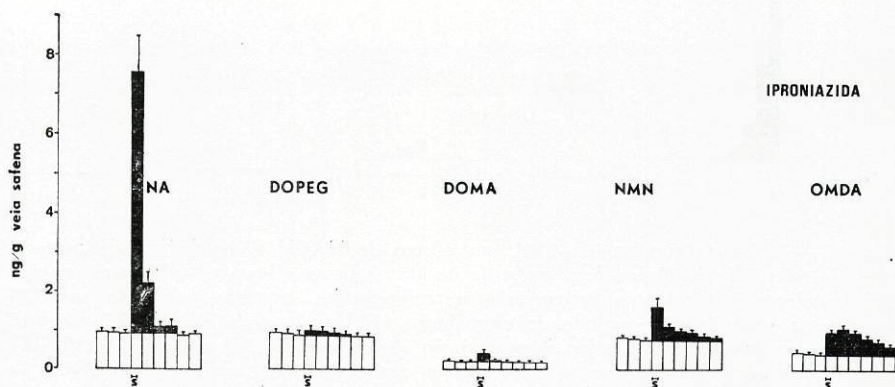


Fig. 18 — Efeito da iproniazida no efluxo da NA e metabolitos em preparações de veia safena. Ordenadas: ng/g de tecido. As colunas a branco, representam o efluxo espontâneo correspondente a 5 minutos de perfusão; as amostras do líquido de perfusão iniciaram-se aos 115 minutos, após o fim da incubação com NA-³H. S — período de estimulação (10 Hz, 2 ms, 100 V) de 2,5 minutos. As colunas a preto, representam o efluxo produzido pela estimulação. As tiras foram obtidas de animais tratados pela iproniazida (60 mg/kg 48 horas antes + 180 mg/kg, 24 horas antes). Resultados de 6 experiências (6 animais).

espontâneo de ³H foi reduzido nas experiências com inibição da MAO para cerca de 50 % do efluxo das experiências do grupo controlo. A diminuição do efluxo deve-se a uma menor capacidade de perda das preparações com inibição da MAO, pois que a acumulação de ³H nas preparações aos 120 minutos foi um pouco maior que a verificada para igual período de perfusão nas preparações do grupo controlo (preparação com MAO inibida — $1,21 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$; preparação com a MAO intacta — $1,08 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$; $P > 0,4$). Como era de esperar, a inibição da MAO reduziu o efluxo espontâneo dos metabolitos desaminados (DOPEG e DOMA) e aumentou o efluxo da NA e da NMN. A fracção de libertação verificada para este grupo de experiências foi de $0,8 \times 10^{-5}$, valor que se aproxima do referido para o grupo controlo. Os valores percentuais das fracções libertadas foram, como seria de esperar, profundamente alterados pela inibição da MAO:

aumento do efluxo da NA e NMN e redução do efluxo das restantes fracções. É de salientar que a inibição da formação de DOPEG, foi maior no efluxo produzido pela estimulação que no efluxo espontâneo. Curiosamente, apesar do efluxo da NA devido à estimulação ser maior nas experiências com inibição da MAO do que no grupo controlo, a recuperação do efluxo base, fez-se de forma semelhante à verificada no grupo controlo (compare-se Fig. 18 com Fig. 12) e diferentemente do que referimos para as experiências com cocaína (isolada ou associada a outros fármacos).

DISCUSSÃO

Natureza do mediador responsável pela contracção produzida pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena

Como tivemos ocasião de referir nos Resultados, a estimulação eléctrica de tiras de veia safena produz uma contracção que é proporcional à duração do período de estimulação, sendo justa-máxima quando esse período atinge 5 a 6 minutos. Uma contracção assim obtida poderá, em princípio, ser desencadeada por três mecanismos: estimulação das fibras nervosas, estimulação directa das fibras musculares lisas ou ambos os processos. Furchgott em 1952 verificou que a estimulação por corrente alterna, aplicada directamente à aorta de Coelho, produzia uma resposta contráctil bifásica: a uma contracção inicial rápida, que surgia durante a estimulação, seguia-se uma contracção gradual que se estabelecia logo que a estimulação era interrompida. O bloqueio adrenérgico pela dibenammina inibia a segunda fase da resposta, sem contudo modificar a contracção inicial. Yates & Gillis (1963), utilizando a mesma preparação e a mesma técnica de estimulação eléctrica, confirmaram os resultados de Furchgott e concluíram que a segunda fase da resposta era devida à libertação de NA, podendo a fase inicial resultar da despolarização directa das fibras musculares. Contudo, este tipo de resposta à estimulação eléctrica, poderá depender das condições metodológicas utilizadas por aqueles investigadores, nomeadamente da duração prolongada dos estímulos. De facto, Paterson (1965), Urquilla et al. (1970), Wyse & Beck (1973) e Brandão (1976), verificaram que a estimulação eléctrica da aorta de Coelho, com estímulos de curta duração, produz despolarização selectiva dos terminais simpáticos, sem que haja despolarização directa das fibras musculares.

Nas presentes experiências realizadas com a veia safena, nunca observamos uma resposta bifásica à estimulação eléctrica; sempre

que se interrompe a estimulação assiste-se, sistematicamente, a um relaxamento rápido da preparação.

Outros factos demonstram que as contracções são desencadeadas pela libertação de NA dos terminais simpáticos: 1) potenciação da resposta pela cocaína; 2) antagonismo da contracção pela fentolamina, fenoxibenzamina e guanetidina; 3) redução da amplitude da resposta em preparações depletadas de NA, e restabelecimento da resposta pela incubação destas preparações com NA; 4) fraca amplitude das contracções provocadas pela estimulação de tiras de veias de animais simpaticectomizados; 5) aumento do efluxo de NA-³H (em tiras incubadas com NA-³H) produzido pela estimulação.

1) **Potenciação da resposta pela cocaína**

Embora esteja referida em algumas preparações a possibilidade da cocaína sensibilizar directamente as fibras musculares lisas à NA (efeito pós-sináptico) (Kasuya & Goto, 1968; Kalsner & Nickerson, 1969 b; Guimarães & Brandão, 1973), a generalidade dos dados experimentais sugere que a potenciação da resposta à NA pela cocaína resulta da inibição da captação neuronal (veja-se por exemplo revisão de Trendelenburg, 1972). Estudos efectuados no nosso laboratório com a veia safena, sugerem que a potenciação da resposta à NA pela cocaína resulta da inibição da captação neuronal (Guimarães *et al.*, 1971). A cocaína pode, em determinadas condições experimentais, potenciar também a resposta à estimulação dos nervos simpáticos (Trendelenburg, 1959; Haefely *et al.*, 1964; de la Lande, 1967). A potenciação da resposta pela cocaína é geralmente mais marcada para a NA que para a estimulação simpática (Haefely *et al.*, 1964; Benteley, 1966; de la Lande, 1967; Kauman, 1970). Contudo, a intensidade da potenciação da resposta à estimulação pode depender das condições experimentais (Trendelenburg, 1959; Haefely *et al.*, 1964; de la Lande, 1967). Na veia safena verificamos também que a potenciação da resposta pela cocaína, é mais marcada para a NA que para a estimulação eléctrica (ver Resultados). Admitindo-se a hipótese de que a mediação da resposta à estimulação eléctrica, é feita pela NA, estranhar-se-á que a potenciação dessa resposta seja mais marcada quando ela é devida à própria NA do que à estimulação eléctrica. Várias hipóteses têm sido invocadas para explicar esta discrepância, observada não só em relação à veia safena como também em outras preparações: a) É bem conhecida a acção

anestésica local da cocaína. Segundo Hukovic & Muscholl (1962) esta acção anestésica local sobre os nervos simpáticos poderia originar uma redução da libertação do mediador produzida pela estimulação. Contudo, as concentrações de cocaína que utilizamos na veia safena, não determinaram qualquer redução na libertação de ^3H produzida pela estimulação eléctrica. Pelo contrário, a fracção de libertação das preparações sujeitas à cocaína, foi um pouco superior à que se observou nas preparações sem cocaína; este dado experimental não é portanto favorável à hipótese de a cocaína reduzir a libertação do mediador. Apesar disso, talvez essa hipótese não se possa excluir. De facto, Langer (1970), verificou que na membrana nictitante previamente incubada com $\text{NA-}^3\text{H}$, a fracção de libertação de ^3H produzida pela estimulação simpática poderia ser aumentada por concentrações baixas de cocaína e diminuída por concentrações elevadas. Verificação semelhante foi feita no coração de Coelho (Starke et al., 1972). Estes dados experimentais são compatíveis com a hipótese de, em situação normal, parte da NA libertada pela estimulação ser captada e subsequentemente armazenada nas vesículas adrenérgicas. Sendo assim, não poderemos saber exactamente qual a fracção de ^3H realmente libertada para a biofase nas condições em que o terminal simpático conserva a possibilidade de captar a NA libertada. Ignorando-se este parâmetro, não poderemos afirmar ou excluir a possibilidade da acção anestésica local da cocaína sobre os terminais simpáticos, na concentração em que a utilizamos. b) Recentemente foi descrita a existência de receptores adrenérgicos alfa no terminal simpático, em numerosas preparações (Häggendal, 1970; vejam-se revisões de Langer, 1977 e Starke, 1977). A activação destes receptores reduziria a quantidade de NA libertada por estímulo, enquanto que o bloqueio destes receptores produziria o efeito contrário. A cocaína, diminuindo a recaptação da NA pela estimulação, aumentaria a sua concentração ao nível destes sistemas pré-sinápticos o que condicionaria, pelo mecanismo referido, uma redução da libertação do mediador. Nas nossas condições experimentais, verificamos que a cocaína aumenta o efluxo de $\text{NA-}^3\text{H}$ libertado pela estimulação, sendo de aceitar que haja um aumento da concentração da NA a nível da biofase (potenciação da resposta à estimulação). Pelas razões apontadas em a), não poderemos afirmar ou excluir este mecanismo de acção da cocaína. c) Segundo um terceiro ponto de vista, a redução da recaptação neuronal da NA, tem sido verificada sempre que o terminal simpático se encontra despolarizado (Trendelenburg, 1966,

Häggendal & Malmfors, 1969; Palaic & Panisset, 1969; Lorenz & Vanhoutte, 1975; Dubocovich & Langer, 1976). Se admitirmos esta possibilidade, teríamos os terminais simpáticos despolarizados durante parte do período de estimulação eléctrica; durante o período de despolarização a recaptção neuronal da NA libertada estaria reduzida. Assim a cocaína, durante o período de despolarização, poderia não reforçar o efeito da estimulação eléctrica. Este argumento, poderá explicar uma potenciação da resposta pela cocaína menor à estimulação eléctrica do que à NA. d) Um outro argumento que poderá explicar também a menor potenciação da resposta pela cocaína à estimulação eléctrica do que à NA, poderá ser a diferença do trajecto percorrido pela NA quando é libertada ou quando é adicionada ao banho de órgãos isolados. Quando se adiciona a NA a um banho de órgãos isolados em que se encontra mergulhada uma tira de veia safena é preciso, para que surja resposta, que a amina difunda até à camada média, onde se encontram as fibras musculares. Sucede que na veia safena as fibras simpáticas distribuem-se pela adventícia e pela camada média (Coimbra *et al.*, 1974). Nestas circunstâncias a NA, ao penetrar na parede da veia safena, vai sendo progressivamente inactivada pelas estruturas (neurais e extra-neurais) que vai atravessando. Assim, é admissível que as fibras musculares mais afastadas da superfície de contacto com o líquido nutritivo fiquem expostas a uma menor concentração da amina. Dados auto-radiográficos com NA-³H, obtidos na veia safena (Osswald *et al.*, 1971), são compatíveis com esta interpretação. A inibição da captação neuronal efectuada pela cocaína, condiciona uma diminuição da perda da amina ao longo do seu percurso na parede da veia, permitindo um aumento mais acentuado da concentração da NA junto das fibras musculares de mais difícil acesso do que na vizinhança das fibras mais superficiais. Quando se estimula electricamente a veia safena, a NA é libertada junto das fibras musculares (tenha-se em conta o tipo de inervação simpática e a reduzida distância neuro-muscular). Nestas circunstâncias, a NA libertada tem um acesso mais fácil às fibras musculares do que a NA exógena. Compreender-se-á portanto que a captação neuronal seja um mecanismo de perda mais importante para a NA exógena do que para a NA libertada e daí que a potenciação da resposta pela cocaína seja mais marcada para aquela do que para esta. As experiências realizadas na artéria central da orelha de Coelho (de la Lande, 1967) apoiam esta interpretação. De facto, neste vaso, em que os terminais simpáticos se distribuem exclusivamente

à adventícia, a potenciação da resposta pela cocaína à NA é muito mais marcada quando esta é administrada através da adventícia do que quando é administrada através da íntima. e) Por fim, poder-se-á admitir a possibilidade da resposta à estimulação eléctrica ser devida não só à libertação de NA mas também à libertação de outro mediador ou à estimulação directa das fibras musculares. Admitindo-se esta possibilidade, a potenciação pela cocaína sobre a resposta à NA exógena seria maior do que a verificada sobre a resposta à estimulação eléctrica.

Do exposto concluir-se-á que o efeito sensibilizante da cocaína sobre a resposta à estimulação eléctrica da veia safena indica que a resposta à estimulação é devida à libertação de NA, não permitindo contudo, por si só, excluir a possibilidade da participação na resposta de outros mecanismos.

2) Antagonismo, pela fentolamina, fenoxibenzamina e guanetidina, da contracção provocada pela estimulação

Vários dados experimentais mostram que os bloqueadores adrenérgicos alfa reduzem mais facilmente a resposta à NA do que à estimulação simpática (Dale, 1906; Cannon & Rosenblueth, 1937; Burtley & Smith, 1967; Bevan et al., 1973). Também na veia safena verificamos que, para a mesma concentração, a fentolamina reduz mais intensamente a resposta à NA que à estimulação eléctrica. Contudo, na aorta de Coelho, é mais fácil inibir a resposta à estimulação nervosa do que à NA (Urquilla et al., 1970; Wyse & Beck, 1972). A fácil inibição da resposta à estimulação da aorta pelos bloqueadores adrenérgicos parece residir no tipo de inervação simpática deste vaso (Urquilla et al., 1970). A concentração da NA libertada junto do órgão efector parece relacionar-se inversamente com a distância neuro-muscular (Bevan & Su, 1974). Assim, na veia safena, atingir-se-iam concentrações de NA muito elevadas junto das fibras musculares, durante o período de estimulação; para antagonizar os efeitos da libertação seriam obviamente necessárias concentrações elevadas de bloqueadores adrenérgicos. Por exemplo, na membrana nictitante, em que a distância neuro-muscular é pequena (Van Orden et al., 1967; Esterhuizen et al., 1968), são necessárias concentrações elevadas (31 μ M) de fentolamina para se obter uma supressão quase completa da resposta à estimulação nervosa (Langer & Pinto, 1976).

Quanto à guanetidina é bem conhecida a sua propriedade de

bloquear a resposta à estimulação dos nervos simpáticos (Maxwell et al., 1960; Garrett & Sousa, 1963; Haeusler et al., 1969). Admite-se que fármacos como a guanetidina e o bretílio antagonizem a resposta à estimulação dos nervos simpáticos por uma redução da libertação da NA, possivelmente por efeito anestésico local (Haeusler et al., 1969). Nas nossas experiências com a veia safena, verificamos que a resposta contráctil à estimulação eléctrica era reduzida pelo contacto da preparação com a guanetidina; contudo só obtivemos uma redução franca da resposta para concentrações elevadas desta substância. Blinks (1966) verificou, na aurícula isolada, que eram necessárias concentrações mais altas de bretílio para suprimir a resposta à estimulação de campo do que à estimulação dos nervos simpáticos. Quando se estimulam os nervos simpáticos, o influxo nervoso terá de ser conduzido até aos terminais, local em que ocorre a libertação do mediador. A condução nervosa parece ser facilmente bloqueável pelos fármacos do tipo do bretílio. Quando se procede à estimulação de campo, os terminais simpáticos são despolarizados, sem que haja necessidade de haver condução do impulso nervoso. É de admitir portanto, que a despolarização dos terminais produzida pela estimulação de campo seja de difícil bloqueio pelo bretílio ou pela guanetidina.

Assim, o facto de os bloqueadores alfa e a guanetidina reduzirem intensamente a amplitude da resposta à estimulação eléctrica, indica que a resposta é devida fundamentalmente à libertação da NA. A resposta residual à estimulação eléctrica verificada em preparações expostas a altas concentrações de bloqueadores alfa ou de guanetidina, poderá ser devida à NA ou a outro mecanismo (libertação de outro tipo de mediador ou à estimulação directa das fibras musculares).

3) Redução da amplitude da resposta provocada pela depleção de NA e seu restabelecimento pela incubação com NA

Está ainda por esclarecer a relação entre a quantidade do mediador existente nos neurónios adrenérgicos e a sua capacidade funcional (Antonaccio & Smith, 1974). A reserpina produz, quando administrada a animais de experiência, uma depleção da NA nos terminais simpáticos e a perda simultânea da mediação adrenérgica (Carlsson et al., 1957). Contudo só se verifica uma redução da resposta à estimulação dos neurónios adrenérgicos para depleções intensas do mediador. Por exemplo, Lee (1967), apenas verificou uma redução das res-

postas à estimulação dos nervos simpáticos, na aurícula e na membrana nictitante, para depleções superiores a 50 %. Foram observadas respostas à estimulação dos nervos simpáticos, em órgãos de animais reserpinizados, em que a depleção da NA era superior a 90 % (Andén et al., 1964; Andén & Henning, 1966). Na aurícula de Cobaia, Antonaccio & Smith (1974) verificaram que as respostas (à estimulação de campo ou à estimulação dos nervos simpáticos) estão preservadas mesmo com depleções de NA superiores a 91 %. É de admitir portanto que a transmissão adrenérgica possa funcionar normalmente com pequenas quantidades de NA existentes nos terminais simpáticos (Antonaccio & Smith, 1974). Langer & Pinto (1976), verificaram que na membrana nictitante de animais reserpinizados era possível obter uma resposta à estimulação dos nervos simpáticos de cerca de 50 % da máxima, com depleção quase completa da NA. A resposta residual era resistente ao bloqueio adrenérgico alfa. Como em animais normais o bloqueio adrenérgico alfa suprimia praticamente a resposta da membrana nictitante à estimulação dos nervos simpáticos, aqueles autores concluíram que sob o efeito da reserpina a mediação simpática pode modificar-se não só quantitativamente mas na natureza do mediador libertado. Não sabemos até que ponto estas conclusões baseadas em experiências da membrana nictitante se podem generalizar para outros órgãos da mesma espécie animal ou para os órgãos de espécies diferentes.

Na veia safena de animais reserpinizados, verificamos que era possível obter praticamente o desaparecimento da resposta à estimulação eléctrica sempre que a depleção de NA era muito intensa. Contudo, mesmo para depleções muito acentuadas, havia sistematicamente uma pequena resposta residual. Dado que a depleção de NA obtida pelo tratamento com reserpina nunca foi completa, não se poderá excluir a possibilidade da resposta residual resultar da libertação de NA. Verificamos também, na veia safena de animais reserpinizados, que a resposta à estimulação eléctrica podia ser parcialmente restabelecida pela incubação das preparações com NA. Contudo, o restabelecimento da resposta desaparecia rapidamente à medida que se repetiam as estimulações. Resultados semelhantes tinham já sido obtidos no intestino por Gillespie & Mackenna (1961). Os resultados obtidos na veia safena e no intestino de animais reserpinizados sugerem que a captação para depósitos específicos é muito limitada, ou ocorre só para um pequeno compartimento.

Para além dos efeitos pré-sinápticos, a reserpina pode condicio-

nar, para doses elevadas, alterações estruturais e funcionais do órgão efector e através delas modificar a resposta a vários agonistas (veja-se por exemplo revisão de Stitzel, 1976). Contudo, na veia safena de animais tratados pela reserpina, a NA, nas concentrações geralmente utilizadas, produziu uma resposta aparentemente normal. Esta constatação experimental, não apoia por conseguinte a hipótese de a reserpina deprimir a resposta à estimulação da veia safena por um mecanismo pós-sináptico.

Parece-nos que os dados que obtivemos em animais reserpinizados, dão apoio à hipótese que admitimos de que a resposta contráctil à estimulação eléctrica da veia safena resulte da libertação de NA.

4) **Fraca amplitude das contracções provocadas pela estimulação de tiras de animais simpaticectomizados**

A interrupção cirúrgica das fibras simpáticas pós-ganglionares condiciona uma degenerescência progressiva dos terminais simpáticos e redução do conteúdo em NA dos órgãos inervados (ver revisão de Thoenen, 1972). No Cão, a interrupção unilateral do simpático lombar juntamente com a periarteriectomia femoral homolateral, resulta na desnervação quase completa da veia safena da pata do mesmo lado, ao fim de 8 a 10 dias após a intervenção cirúrgica (Guimarães, et al., 1971). Verificaram também estes investigadores, que o grau de depleção em NA de veias de animais simpaticectomizados, se correlacionava directamente com a sensibilidade à NA e com o prolongamento do efeito contráctil (observado em óleo) produzido pela NA. Nas nossas experiências, com veias safenas desnervadas pela mesma técnica, sempre que a depleção em NA era muito intensa, a sensibilidade à NA era grande e o relaxamento de tiras contraídas por esta amina era lento e a resposta à estimulação eléctrica era muito reduzida, embora nunca tivesse sido nula. Como o teor em NA das veias nestas condições era superior ao limite inferior da sensibilidade do método utilizado para o seu doseamento, é admissível que a desnervação não fosse completa. Nestas circunstâncias, a resposta residual à estimulação eléctrica poderia resultar da libertação de NA de alguns terminais que não sofreram degenerescência.

Embora seja plausível esta explicação, não podemos evidentemente afastar a possibilidade de a resposta residual à estimulação resultar da excitação directa das fibras musculares lisas.

5) Libertação de NA-³H (de veias previamente incubadas com NA-³H) produzida pela estimulação eléctrica.

Como se referiu nos resultados, a estimulação eléctrica de preparações carregadas com NA-³H, dá origem ao aparecimento dum efluxo constituído por apreciáveis quantidades de NA-³H. A discussão acerca da origem da NA-³H libertada, será contudo feita posteriormente.

Para finalizar, a série de factos apontados, leva a concluir que a resposta à estimulação eléctrica efectuada nas nossas condições experimentais, é fundamentalmente devida à libertação de NA. Todavia, não é possível excluir completamente a possibilidade da participação de outros mecanismos, tais como a libertação doutros mediadores ou a estimulação directa das fibras musculares, embora se não tenham aduzido provas para a intervenção de tais mecanismos.

Inactivação do mediador libertado por estimulação eléctrica da veia safena

Como não dispomos de métodos que nos permitam determinar directamente a concentração de NA existente na biofase, o estudo da inactivação do mediador simpático, libertado por estimulação nervosa, terá de se basear necessariamente em métodos indirectos. A «imersão em óleo» descrita por Kalsner & Nickerson (1968 a), tem sido um método largamente utilizado para o estudo da inactivação de várias aminas simpaticomiméticas. A inactivação da NA tem sido estudada em variadas preparações: aorta de Coelho (Kalsner & Nickerson, 1968 b, 1969 a, b e c, Wyse 1974); veia safena de Cão (Osswald et al., 1971; Guimarães et al., 1971; Guimarães & Brandão, 1972); cápsula de baço de Gato (Brandão & Guimarães, 1972); artéria da cauda do Rato (Wyse, 1976); artéria mesentérica de Cão (Guimarães & Paiva, 1977). A adaptação desta técnica ao estudo da inactivação do mediador simpático libertado por estimulação nervosa, foi mais recentemente ensaiada (Brandão & Guimarães, 1974; Wyse, 1974). Como qualquer método indirecto, a técnica de «imersão em óleo» adaptada ao estudo da inactivação do mediador simpático, baseia-se num certo número de pressupostos: 1) que na mesma preparação, à mesma amplitude de resposta produzida pela estimulação eléctrica (e inferior à resposta máxima) corresponde a mesma concentração de mediador existente na biofase; 2) que os inibidores «selectivos» dos mecanismos de inactivação, não interferem

com a contracção (efeito pós-sináptico) nem com o mecanismo de libertação do mediador; 3) que os metabolitos do mediador simpático, acumulados na preparação, não interferem directa ou indirectamente com o relaxamento, nem com os mecanismos de libertação; 4) que o tempo de relaxamento em óleo, calculado para 50 % do relaxamento após a estimulação, possa ser tomado como a medida directa da actividade dos mecanismos intrínsecos de inactivação do mediador; 5) que o prolongamento do relaxamento observado após a inibição de cada via de inactivação constitua a medida da participação desse mecanismo.

Foram utilizados os seguintes inibidores selectivos: cocaína para a captação neuronal; iproniazida para a MAO (Kalsner & Nickerson, 1969 a); U-0521 para a COMT (Gillis & Miller, 1967); cortexona para a captação extra-neuronal (Iversen & Salt, 1970).

Como nas nossas experiências a mesma preparação foi submetida a vários períodos de estimulação de 6 minutos (geralmente 3), poderia suceder que a quantidade de NA libertada em cada período de estimulação, diminuísse gradualmente. É de notar porém, que para a mesma preparação e na ausência do emprego daqueles inibidores, a amplitude de resposta, para cada período de estimulação, se manteve quase constante. Estes resultados sugerem que a concentração de NA na biofase, no fim de cada período de estimulação, tenha sido sensivelmente constante, para os vários períodos a que as preparações foram sujeitas.

Como será analisado mais adiante, as fracções de libertação de ^3H também não foram modificadas pela cocaína ou U-0521, nas concentrações utilizadas nas experiências de relaxamento, o que sugere que estes inibidores não interferiram com os mecanismos de libertação de NA. Também a cortexona não parece interferir com os mecanismos de libertação do mediador (Brandão, 1977). Nas preparações de veia safena de animais tratados com iproniazida, a fracção de libertação de ^3H foi sensivelmente semelhante à dos animais não tratados, o que sugere que também este inibidor não interfere com a libertação do mediador simpático.

Em relação à possibilidade de os metabolitos da NA formados na própria preparação poderem interferir com a libertação do mediador ou na sua inactivação, trata-se de um problema que não está esclarecido, como não está esclarecida a possibilidade da sua interferência com a resposta contráctil à NA. É sabido que a NMN pode impedir a captação da NA pelo sistema extra-neuronal (Bürgen &

Iversen, 1965). Contudo, se a velocidade de relaxamento após a estimulação, dependesse da formação da NMN, a inibição da COMT deveria aumentar a velocidade de relaxamento. Porém, os resultados das nossas experiências (ver Resultados), não apoiam essa possibilidade pois que a inibição da COMT, isoladamente, não alterou o T_{50} , e pelo contrário prolongou o relaxamento das preparações tratadas pela cocaína.

Quanto ao mecanismo, pelo qual a inibição da COMT, ou da MAO, podem prolongar o relaxamento, é questão em debate. Para Kalsner & Nickerson (1969 a, b e c), a inibição da COMT ou da MAO, prolongam o relaxamento em óleo, de aortas contraídas previamente pela NA, por impedirem a remoção da amina da biofase. Para Trendelenburg (1974), a inibição daquelas enzimas, prolonga o relaxamento em líquido nutritivo, de aortas contraídas previamente pela NA, porque nessas circunstâncias (com as enzimas inibidas), haverá acumulação da NA (durante a exposição à amina) em compartimentos neuronais e extra-neuronais e, durante o relaxamento, a amina abandona estes compartimentos, passando para a biofase e prolongando assim a resposta. Isto é, para Kalsner & Nickerson, os sistemas neuronal e extra-neuronal, funcionariam apenas como locais de perda da amina; para Trendelenburg, estes sistemas, poderiam funcionar (principalmente quando as enzimas estão inibidas) como locais de origem de efluxo. Mais recentemente, Kalsner (1975), em experiências de relaxamento em solução de Krebs-Henseleit, obteve evidência de que quando as enzimas (MAO e COMT) estão intactas, o sistema extra-neuronal se comporta apenas como local de perda de NA; porém, quando aquelas enzimas estão inibidas, o sistema extra-neuronal pode funcionar como local de origem de efluxo, o que confirma as conclusões de Trendelenburg (1974). Também, na veia safena, em experiências de relaxamento em líquido nutritivo, Guimarães & Paiva (1977) verificaram que o sistema extra-neuronal, pode funcionar como local de origem de efluxo de NA. Resta porém, demonstrar se os sistemas neuronal e extra-neuronal, funcionam do mesmo modo, quando a difusão está inibida pela imersão em óleo. Independentemente da interpretação apresentada, quanto ao mecanismo pelo qual a inibição enzimática pode prolongar o relaxamento, o certo é que esse prolongamento traduz a participação desses mecanismos na inativação da NA. Por isso, pensamos que a técnica de imersão em óleo continua a ser um meio válido para o estudo dos mecanismos da inativação do mediador simpático.

As nossas experiências de relaxamento em óleo de preparações de veia safena previamente contraídas pela estimulação eléctrica mostraram o seguinte: 1) a resposta contráctil desaparece rapidamente, quando os mecanismos de inactivação estão intactos (T_{50} — cerca de 1 min); 2) considerando isoladamente as várias vias de inactivação (captação neuronal, captação extra-neuronal, metilação e desaminação), apenas a captação neuronal parece desempenhar um papel importante na terminação da resposta à estimulação; 3) a inibição simultânea da captação neuronal e extra-neuronal, suprime praticamente a inactivação do mediador simpático; 4) a inibição da metilação reforça os efeitos da inibição da captação neuronal; 5) a inibição da MAO não modificou sensivelmente os efeitos da cocaína no relaxamento.

Os estudos de histoquímica e de morfologia ultra-estrutural mostraram que a inervação adrenérgica difere muito de órgão para órgão, existindo pelo menos três tipos de diferenças importantes: densidade, disposição e distância neuro-muscular. Embora não haja dúvidas quanto à existência destas diferenças, não é ainda possível afirmar com certeza, qual delas é a mais importante, como parâmetro que condicione a concentração de NA nos receptores (Trendelenburg, 1972). A veia safena é um vaso ricamente inervado com as fibras simpáticas distribuídas por toda a camada média, e em que a distância entre o terminal adrenérgico e as fibras lisas é bastante pequena (Coimbra et al., 1974). Tendo em conta estes parâmetros de tipo morfológico poderemos analisar os mecanismos de inactivação do mediador simpático. Dadas as relações de grande proximidade entre o terminal simpático e as fibras musculares, compreender-se-á não só o papel relevante da captação neuronal na terminação da resposta à estimulação, como a fugacidade dessa resposta. É conhecida a grande ayidez do sistema de transporte da NA pelo terminal simpático (Iversen 1971); a captação neuronal é pois um mecanismo de inactivação extremamente eficiente. As relações de proximidade entre o terminal simpático e as fibras musculares explicam que a resposta à estimulação ocorra poucos segundos após o início da estimulação. Em órgãos em que a distância neuro-muscular é maior que na veia safena, o período de latência (entre o início da estimulação e o início da resposta) é também maior, como sucede na aorta (Brandão, 1976).

Embora a inibição da captação extra-neuronal ou da COMT não prolonguem na veia safena o relaxamento da contracção devida à estimulação eléctrica, os nossos dados não permitem excluir a sua

participação na inactivação do mediador. De facto, pode suceder que o papel destas vias de inactivação possa ser desempenhado vicariamente pela captação neuronal, quando estas vias se encontram inibidas. Contudo, se algum papel estas vias desempenham, ele não parece ser de relevo comparável ao do sistema neuronal.

Quando o sistema neuronal está inibido, o sistema extra-neuronal é responsável pela inactivação do mediador. A inactivação pelo sistema extra-neuronal parece exercer-se fundamentalmente através da COMT. De facto, a inibição da inactivação causada pela cocaína+cortexona foi apenas levemente superior à obtida com cocaína+U-0521. Esta pequena diferença (cerca de 7%), poderá ser atribuída a uma inibição incompleta da COMT ou à participação de outro ou outros mecanismos. Na veia safena, Osswald et al. (1971), verificaram que a iproniazida prolonga o relaxamento de preparações contraídas pela NA exógena e tratadas pela cocaína; também em preparações de veia safena desnervadas cirurgicamente, a iproniazida prolonga o relaxamento destas preparações contraídas pela NA exógena (Guimarães & Brandão, 1972). Há assim evidência da participação da MAO extra-neuronal, na inactivação da NA exógena. Contudo, para a estimulação eléctrica, a iproniazida não reforça os efeitos da cocaína no relaxamento. Não obtivemos portanto, evidência da participação da MAO extra-neuronal na inactivação do mediador libertado por estimulação nervosa. Um outro mecanismo não neuronal, de inactivação, poderia ser a ligação do mediador a fibras elásticas e de colagénio (Powis, 1973). A ligação da NA a estas fibras parece ser impedida pela oxitetraciclina (Powis, 1973). Contudo, na veia safena, verificamos que a oxitetraciclina não altera a resposta à estimulação eléctrica nem o relaxamento de preparações tratadas previamente pela cocaína e contraídas pela estimulação eléctrica (resultados ainda não publicados). Também Kalsner (1976) não conseguiu reproduzir na artéria central da orelha do Coelho os resultados obtidos nesta preparação por Powis (1973). Existem portanto dúvidas quanto à importância da ligação do mediador simpático às fibras de colagénio ou de elastina, como via de inactivação.

O tratamento com iproniazida apenas reduziu discretamente a capacidade de inactivação da veia safena em relação à NA libertada por estimulação nervosa. Como já foi referido, o tratamento com iproniazida não reforçou o efeito da cocaína sobre o relaxamento, o que indica que a MAO extra-neuronal não parece desempenhar qualquer papel na terminação da resposta à estimulação nervosa. Assim,

o discreto prolongamento do relaxamento observado nas preparações tratadas com iproniazida (e sem qualquer outro tratamento adicional) parece dever-se à inibição da MAO intra-neuronal. Por outro lado, não é de admitir que essa falta do prolongamento do T_{50} seja devida a uma modesta inibição da MAO pela iproniazida; de facto a iproniazida prolonga intensamente a resposta à NA exógena (Osswald *et al.*, 1971) e inibe intensamente a desaminação da NA-³H libertada pela estimulação eléctrica (ver Resultados). O que parece suceder é que apesar da inibição da MAO intra-neuronal, a NA libertada para a biofase pode continuar a ser removida por captação neuronal acumulando-se no axoplasma do terminal simpático e do qual pode regressar lentamente à fenda sináptica (Furchgott & Sanchez-Garcia, 1968), prolongando o relaxamento. Para a generalidade dos vasos sanguíneos, a desaminação não parece ser importante na terminação das respostas à estimulação dos nervos simpáticos (Gillis, 1971; Brandão & Guimarães, 1974; Wyse, 1974; Wyse, 1976). A terminação da resposta à estimulação eléctrica depende principalmente da captação neuronal e da metilação (Gillis, 1971; Brandão & Guimarães, 1974; Wyse, 1974; Brandão, 1976; Wyse, 1976).

Os resultados da inactivação da NA exógena não deverão ser extrapolados para o caso da terminação da resposta à estimulação nervosa.. De facto se compararmos os nossos resultados referentes à terminação da resposta à estimulação eléctrica com os resultados da inactivação da NA exógena (Osswald *et al.*, 1971), facilmente damos conta da existência de algumas diferenças importantes. Deverá salientar-se que ambos os estudos foram feitos na veia safena, a partir de respostas justa-máximas (quer para a estimulação eléctrica quer para a NA exógena) e com a técnica de «imersão em óleo». As principais diferenças parecem ser as seguintes:

- a) A terminação da resposta à NA exógena faz-se cerca de 10 vezes mais lentamente do que após a estimulação eléctrica.
- b) A desaminação é o mecanismo mais importante na inactivação da NA exógena, sendo contudo de reduzida importância para o desaparecimento da contracção devida à estimulação.
- c) A inibição da metilação prolonga o relaxamento da resposta à NA exógena, não modificando contudo o relaxamento das tiras contraídas pela estimulação eléctrica (na ausência de inibição da captação neuronal).

- d) Há a evidência da participação da MAO extra-neuronal apenas na inactivação da NA exógena.

Torna-se difícil interpretar a razão de ser destas diferenças, dado que não sabemos se as respostas contrácteis à NA exógena ou à estimulação resultam da contracção das mesmas fibras musculares. No caso de não serem as mesmas, a explicação das diferenças poderá ser feita pelas variações de estrutura (por exemplo diferenças de proximidade entre os terminais adrenérgicos e as fibras musculares) ou de actividade enzimática, ou de sistemas de transportes da amina. Tendo em conta que, na veia safena, os terminais adrenérgicos se distribuem a toda a camada média, é de admitir que o mediador simpático possa ser libertado em toda a parede do vaso; pode contudo ser libertado mais intensamente numas regiões do que noutras. Para a NA exógena, a distribuição da amina na parede do vaso pode fazer-se de forma heterogénea (Török & Bevan, 1971; Osswald et al., 1971; Kalsner 1972). Reduzindo porém o modelo experimental à sua forma mais simples, poderemos admitir que as fibras musculares responsáveis pelas respostas à estimulação simpática e à NA exógena sejam as mesmas e que, em ambos os casos, a concentração da amina na biofase, no início do relaxamento, seja também a mesma. Como o relaxamento é mais lento para a NA exógena do que para a estimulação, teremos de admitir que a quantidade de amina a inactivar é maior no primeiro caso do que no segundo. Isto leva-nos a admitir que, durante a contracção, a amina libertada por estimulação ou pela adição de NA possa acumular-se na biofase e em compartimentos fora da biofase (neuronaes e extra-neuronaes). Durante o relaxamento, a amina acumulada nos compartimentos fora da biofase vai sendo progressivamente metabolizada (pela MAO e pela COMT) ou acumulada nas vesículas adrenérgicas; à medida que a concentração da amina nos compartimentos neuronaes e extra-neuronaes se for reduzindo, a NA existente na biofase vai sendo progressivamente removida para estes compartimentos, resultando assim o relaxamento. Sendo assim, a quantidade de amina acumulada fora da biofase, no fim da contracção, será maior no caso de se usar NA exógena do que no caso de se proceder à estimulação. Como consequência, o relaxamento será mais rápido no primeiro do que no segundo caso. Por outro lado, a inibição enzimática poderá permitir uma maior acumulação da amina fora da biofase no caso da NA exógena do que no caso da estimulação, o que implica

uma resposta mais prolongada para a NA exógena do que para a estimulação.

Alguns dados experimentais são compatíveis com a interpretação que acabamos de dar a respeito das diferenças na terminação das respostas à NA exógena e à estimulação. Assim, na veia safena verifica-se que a importância da desaminação como via de inativação de NA exógena aumenta à medida que se elevam as concentrações de NA (resultados ainda não publicados); na aorta, Kalsner & Nickerson (1969 a) verificaram também que a desaminação é mais importante para concentrações altas de NA do que para concentrações baixas. Wyse (1974) verificou que, para baixas concentrações de NA exógena, o valor relativo dos vários mecanismos de inativação é semelhante aos verificados para a estimulação eléctrica, embora a metilação e a desaminação fossem um pouco menos importantes para o caso da NA libertada.

Considerámos a participação dos mecanismos intrínsecos da preparação, responsáveis pela terminação da resposta à estimulação eléctrica. Contudo, em condições fisiológicas, além da participação dos mecanismos intrínsecos, a difusão deverá ser também tomada em conta. Por isso, em algumas das nossas experiências, as preparações de veia safena foram contraídas em óleo, mas o relaxamento foi feito em líquido nutritivo (ver Métodos). Os resultados obtidos (Tabela 2), mostraram que, em certas circunstâncias, a difusão pode participar na terminação da resposta à estimulação. Na situação de controlo, e mesmo quando a captação neuronal está impedida pela cocaína, a difusão praticamente não participa na terminação da resposta. Contudo, quando a captação neuronal e extra-neuronal (ou a COMT), estão inibidas, a difusão passa a ter uma certa importância na terminação da resposta à estimulação. Para outras preparações, como a aorta, a difusão pode ser relativamente mais importante na terminação da resposta à estimulação nervosa (Brandão, 1976). Condicionantes de natureza morfológica podem facilitar a difusão na aorta (Török & Bevan, 1971). Também na artéria central da orelha do Coelho, vaso em que os terminais adrenérgicos se distribuem apenas à adventícia (como na aorta), a difusão faz-se sobretudo pela adventícia (Allen et al., 1973. Steinsland et al., 1973). O facto de, na veia safena, os terminais simpáticos existirem na camada média, poderá limitar a difusão do mediador para fora da preparação.

Características do efluxo espontâneo de tiras de veia safena incubadas com NA-³H

Como o objectivo principal das experiências com NA-³H era o estudo da metabolização da NA libertada pela estimulação nervosa, foi necessário estudar o efluxo espontâneo de preparações previamente carregadas com (-)-NA-³H. Era objectivo prioritário definir um período de perfusão, em que o efluxo da NA-³H e dos seus metabolitos se mantivesse estável, por forma a poderem ser determinadas as modificações do efluxo produzidas pela estimulação eléctrica. Secundariamente, importava esclarecer a origem (neuronal, extra-neuronal ou extra-celular), de cada uma das fracções marcadas que aparecia no líquido de perfusão.

Para a concretização destes objectivos, fizeram-se incubações de tiras de veia safena com (-)-NA-³H (1,4 μ M) durante 60 minutos; ao fim da incubação as preparações foram perfundidas durante 215 minutos com solução de Krebs-Henseleit. Determinou-se a acumulação de NA-³H e seus metabolitos, nas preparações, no início e no fim da perfusão. A separação da NA-³H e seus metabolitos nas amostras do líquido de perfusão permitiu-nos traçar o perfil do efluxo espontâneo daquelas substâncias, ao longo da perfusão. Para se estudar a influência da captação neuronal na acumulação e no efluxo espontâneo das várias fracções, fizeram-se experiências em que a cocaína (4×10^{-5} M) esteve presente durante a incubação e a perfusão (ver Métodos).

Como referimos nos Resultados, as preparações não submetidas à acção da cocaína acumularam, no fim da incubação, quantidades apreciáveis de ³H, correspondendo quase só a NA-³H (cerca de 80 %) e a uma pequena quantidade de metabolitos (OMDA 9 %; DOMA 7 %; DOPEG 4 %; NMN 1 %). Durante a perfusão estas preparações perderam cerca de 42 % de ³H da quantidade acumulada durante a incubação. Ao fim da perfusão, o ³H ainda acumulado nas preparações estava assim distribuído (valores percentuais): NA 86, OMDA 8, DOMA 5, DOPEG+NMN cerca de 1. Vemos assim que, aparentemente, a perfusão facilitou relativamente mais a perda de DOPEG, do que a das restantes fracções. A saída de ³H para o líquido de perfusão fez-se, aparentemente, em dois períodos distintos: durante os 90 minutos iniciais o efluxo era intenso, mas decrescia rapidamente para se manter relativamente estável durante os 120 minutos finais da perfusão; nesse último período, a semi-vida de ³H foi de 156 minutos (ver Fig. 7).

A Fig. 8 mostra-nos que o efluxo de todas as fracções durante os 90 minutos iniciais decai rapidamente, parecendo, durante este período, a diminuição do efluxo da NA ser mais rápida do que a das restantes fracções. A partir dos 90 minutos de perfusão, o efluxo das várias fracções manteve-se relativamente estável, havendo uma diminuição progressiva do efluxo de todas as fracções, de forma aparentemente paralela. Durante o período «estável», a importância relativa do efluxo de cada uma das fracções, foi por ordem decrescente: DOPEG > DOMA > NA > NMN. A contribuição do efluxo da NA e NMN durante o período «estável», foi muito modesta (inferior a 10 % do efluxo total de ^3H).

Os resultados das experiências com cocaína, mostraram-nos fundamentalmente, as seguintes diferenças em relação aos resultados das experiências sem cocaína:

- 1) A cocaína reduziu, pronunciadamente, a acumulação de NA- ^3H nas preparações, não só no fim do período de incubação, mas também, e mais acentuadamente, no fim da perfusão (sendo nestas apenas 13 % do controlo).
- 2) Aparentemente, a inibição da captação neuronal intensificou a acumulação de OMDA nas preparações (no início e no fim da perfusão) e o efluxo espontâneo desta fracção. Nestas preparações tratadas pela cocaína, o efluxo da fracção OMDA manteve-se relativamente estável dos 120 aos 215 minutos, tendo uma semi-vida de 144 minutos.
- 3) A cocaína intensificou a perda de ^3H durante a perfusão (perda que foi de 80 % nas experiências com cocaína e como já referimos de apenas 42 % nas preparações normais).
- 4) A inibição da captação neuronal reduziu fortemente o efluxo das fracções DOPEG e DOMA.
- 5) O cocaína intensificou o efluxo da NA e da NMN nos 15 minutos iniciais, sendo o efluxo destas fracções quase insignificante a partir dos 90 minutos de perfusão.

Uma vez que nestas experiências de incubação e perfusão se não procedeu à inibição enzimática, teremos de admitir que, durante a perfusão, o efluxo dos metabolitos da NA- ^3H se deve, não só à perda dos metabolitos acumulados nas preparações no início da perfusão, mas à metabolização da NA- ^3H durante este período.

As características do efluxo espontâneo de (-)-NA-³H, foram estudadas na aorta por Henseling *et al.*, (1976). Estes investigadores mostraram que, quando as enzimas estão inibidas (MAO e COMT), a NA pode acumular-se (durante a incubação) em vários compartimentos, os quais durante a perfusão se esvaziam com velocidades diferentes: compartimentos extra-celulares (compartimentos I e II), com semi-vidas inferiores a 1 minuto; compartimentos extra-neuronais III e IV, com semi-vidas respectivamente de 4 e 19 minutos; compartimentos neuronais, IV e V, com semi-vidas de 19 e 249 minutos. Aqueles investigadores mostraram, ainda, que uma parte considerável da NA acumulada não participa no efluxo ao longo dos 240 a 250 minutos de perfusão; esta fracção da NA acumulada («bound fraction») correspondia, muito provavelmente, à amina acumulada nas vesículas adrenérgicas. Também no coração a NA abandona rapidamente os compartimentos extra-celulares e extra-neuronais saindo, contudo, lentamente dos terminais adrenérgicos (Lindmar & Löffelholz, 1974; Holback & Löffelholz, 1975). Portanto, é de admitir que, na veia safena, o efluxo inicial da NA, tenha como proveniência os compartimentos extra-celulares e extra-neuronais; durante o período «estável» o efluxo da amina deverá resultar da perda da NA-³H acumulada nos terminais adrenérgicos. Tendo em conta o facto de, nas nossas experiências não se ter procedido à inibição enzimática, a metabolização da NA em substâncias altamente difusíveis (ver adiante) durante o período de perfusão, pode ter diminuído consideravelmente a semi-vida de ³H durante o período «estável». De facto, no canal deferente, a actividade enzimática reduz a semi-vida do efluxo neuronal durante a fase «estável», de 395 para 230 minutos (Graefe *et al.*, 1977). Estão ainda muito mal definidos os compartimentos de acumulação e as características do efluxo, dos vários metabolitos da NA. Sabe-se que a NMN se acumula no coração em compartimentos extra-celulares e extra-neuronais, os quais se esvaziam rapidamente com a perfusão (Uhlig *et al.*, 1976). Sabe-se, também, que enquanto os metabolitos neutros da NA (DOPEG, NMN e MOPEG) difundem facilmente do tecido para o líquido de incubação ou de perfusão, os metabolitos ácidos (DOMA e VMA) difundem com dificuldade sendo, portanto, retidos no tecido durante muito mais tempo (Henseling *et al.*, 1973; Levin, 1974; Graefe *et al.*, 1977). Assim, o facto de nas nossas experiências o valor percentual do DOPEG no tecido ter diminuído, do início para o fim da perfusão poderá ser explicado pela boa difusibilidade desta substân-

cia. Também o facto do valor percentual da fracção DOMA existente no tecido não ter sido modificado pela perfusão, poderá ser explicado pelo que acabamos de referir, quanto à difusibilidade desta substância. Ainda o facto do valor percentual da fracção OMDA acumulado no tecido não ter sofrido modificação com a perfusão, sugere que esta fracção seja constituída predominantemente por VMA. Admitindo, ainda, que os metabolitos neutros difundem com facilidade do tecido para o líquido de perfusão, teremos de concluir que o efluxo destes metabolitos, exceptuando os minutos iniciais de perfusão, deverá corresponder à metabolização da NA-³H durante a perfusão.

Relativamente ao efluxo dos metabolitos ácidos, DOMA e VMA (que é recolhido na fracção OMDA), torna-se impossível saber, pelas experiências realizadas na veia safena, que parte coresponde à metabolização da NA durante a perfusão e que parte coresponde a metabolitos acumulados no tecido no início da perfusão.

As experiências com cocaína esclareceram os locais de acumulação e a origem do efluxo de algumas das substâncias marcadas. Assim, o facto de a cocaína ter reduzido apreciavelmente a acumulação de NA-³H no tecido, mostra que a NA-³H se acumula nos terminais adrenérgicos. Contudo, o facto de a redução da acumulação da NA-³H no tecido pela cocaína ser maior no fim da perfusão do que no seu início, sugere que a inibição da captação neuronal pode intensificar a acumulação da amina nos compartimentos extra-neuronais e extra-celulares. Esta interpretação explica que a cocaína intensifique o efluxo da NA durante os minutos iniciais de perfusão. Como também, nos minutos iniciais de perfusão, o efluxo de NMN foi reforçado pela cocaína, é de admitir que este metabolito seja formado nos compartimentos extra-neuronais. Contudo, como durante o período «estável» do efluxo, nas experiências sem cocaína, cerca de 3 % do efluxo de ³H coresponde a NMN, não se pode excluir a possibilidade deste metabolito poder ser também formado por COMT neuronal; de facto, na membrana nictitante, existiria COMT nos terminais adrenérgicos (Luchelli-Fortis & Langer, 1975). A possibilidade de o efluxo de NMN, durante o período estável, resultar da metabolização extra-neuronal da NA-³H que sai durante este período dos terminais adrenérgicos, será também uma possibilidade que mais adiante discutiremos.

O facto de a cocaína reduzir acentuadamente o efluxo de DOPEG e DOMA sugere que estas fracções resultam, fundamentalmente da metabolização da NA-³H nos terminais adrenérgicos. Às mesmas

conclusões chegaram outros investigadores (Levin, 1974; Garrett & Branco, 1976).

O facto de a inibição da captação neuronal ter intensificado a acumulação tecidual e o efluxo de OMDA sugere que esta fracção resulta da metabolização da NA-³H em compartimentos extra-neuronais. Tendo em conta que a NA abandona rapidamente os compartimentos extra-neuronais durante a perfusão, teremos de admitir que nas experiências com cocaína o efluxo da fracção OMDA deverá corresponder, em grande parte, à perda desta fracção acumulada no tecido no início da perfusão. A serem verdadeiras estas asserções, teremos de concluir que a fracção OMDA deverá ser constituída principalmente por VMA, substância que, como referimos, abandona lentamente os compartimentos celulares em que se acumula. Contudo, as experiências com cocaína, não nos permitem excluir a possibilidade de, em preparações normais, a fracção OMDA poder ser também formada pelos terminais adrenérgicos, possibilidade de resto sugerida em numerosas publicações (ver revisão de Langer et al., 1975). Este assunto será retomado mais adiante.

Resumindo o que acabamos de discutir, parece-nos terem sido atingidos alguns dos objectivos atrás enunciados: a) definição dum período de perfusão, durante o qual o efluxo das várias fracções se mantém relativamente «estável», quer em valor absoluto, quer principalmente quanto à quantidade relativa dos seus componentes; b) caracterização dos locais de origem do efluxo de algumas das fracções, durante o período «estável» (DOPEG, DOMA e NA-³H). As experiências até aqui realizadas, não nos permitiram caracterizar, em preparações normais, os locais de origem dos efluxos de OMDA e NMN, durante o período «estável».

Origem do efluxo de ³H produzido pela estimulação eléctrica de tiras de veia safena

A estimulação de campo tem sido uma técnica bastante utilizada para obter a despolarização dos terminais adrenérgicos nas preparações em que não é possível estimular, directamente, pela corrente eléctrica, as fibras simpáticas. Como já referimos, nas preparações exclusivamente innervadas pelo simpático, a estimulação de campo condiciona uma despolarização selectiva dos terminais adrenérgicos. A despolarização dos terminais simpáticos acompanha-se da libertação de NA endógena. Contudo, e possivelmente por razões meto-

dológicas, só excepcionalmente se tem conseguido determinar o efluxo de NA endógena produzido pela estimulação de campo (Hughes, 1972). A maior parte das vezes tem-se recorrido à estimulação de campo de preparações em que os depósitos de NA foram marcados previamente com NA-³H. Nestas condições a estimulação condiciona um aumento do efluxo de ³H, que corresponde à libertação de NA-³H e seus metabolitos. Na generalidade das preparações, a libertação de ³H produzida pela estimulação, tem sido bloqueada, pela ausência de iões cálcio do líquido nutritivo, pela guanetidina ou pela tetratodotoxina (Su & Bevan, 1970; Tarlov & Langer, 1971; Allen et al., 1973; Endo et al., 1977). Estes factos sugerem que a estimulação de campo liberta apenas ³H de origem exclusivamente neuronal (Endo et al., 1977). Contudo, em algumas preparações a estimulação de campo pode também libertar ³H de origem extra-neuronal. De facto, Schrold & Nedergaard (1975 e 1977) verificaram que, na artéria pulmonar, a estimulação de campo pode libertar ³H de origem extra-neuronal; é de notar, porém, que Endo et al., (1977) não conseguiram reproduzir estes resultados na mesma preparação. Na aorta de Coelho, Schrold & Nedergaard (1976) verificaram também que a estimulação de campo podia libertar ³H de origem extra-neuronal, não só na camada média como na adventícia. Na artéria pulmonar e na aorta, a libertação de ³H de origem extra-neuronal, parece esgotar-se rapidamente com a primeira estimulação. Porém, a libertação de ³H de origem neuronal tem tendência a manter-se estável, com a repetição dos períodos de estimulação (Schrold & Nedergaard, 1975, 1976, 1977).

Nas nossas experiências, verificamos que a estimulação de campo, iniciada ao fim de 125 minutos após a incubação com NA-³H, produz uma intensa libertação de ³H (ver Fig. 10). Verificamos ainda que na veia safena de animais reserpinizados e em que a incubação com NA-³H fora feita na presença de cocaína (4×10^{-5} M), a estimulação eléctrica não condiciona qualquer libertação de ³H (ver Fig. 10). Por outro lado, e, como referimos nos Resultados, a fracção da libertação de ³H em veias normais manteve-se praticamente constante, em dois períodos de estimulação feitos com um intervalo de 60 minutos.

Em experiências mais recentemente realizadas na veia safena, verificamos que a presença de hidrocortisona durante a incubação com NA-³H, não modifica a fracção de libertação (Brandão et al., 1978).

Estes resultados são, portanto, a favor de que, na veia safena,

como para a generalidade das preparações, a estimulação de campo efectuada nas nossas condições experimentais, apenas condiciona libertação de ^3H de origem neuronal.

Metabolização da NA- ^3H , libertada espontaneamente e por estimulação de tiras de veia safena

Os estudos efectuados em numerosas preparações em que os depósitos de NA foram marcados com NA- ^3H , mostram que o efluxo espontâneo durante o período «estável» é constituído, fundamentalmente, por metabolitos da NA. Para a generalidade das preparações, a fracção DOPEG representa o metabolito principal do efluxo espontâneo: aurícula de Cobaia 30 % (Adler-Graschinsky *et al.*, 1972); membrana nictitante de Gato 42 % (Langer & Enero, 1974; Luchelli-Fortis & Langer, 1975); baço de Gato 67 % (Dubocovich & Langer, 1973); coração de Gato 67 % (Langer *et al.*, 1975); canal deferente de Rato 70 % (Graefe *et al.*, 1973 e 1977); artéria pulmonar de Coelho 20 % (Endo *et al.*, 1977). Nestas preparações, o efluxo espontâneo de NA- ^3H representa menos de 10 % do efluxo total de ^3H . Também na veia safena de Cão, o efluxo espontâneo durante o período «estável» é constituído principalmente por metabolitos de NA: DOPEG 45 %; OMDA 33 %; DOMA 12 %; NMN 3 %; apenas 8 % do efluxo diz respeito a NA intacta (ver Tabela 3).

Numerosos estudos, «in vitro», sugerem que o efluxo espontâneo dos metabolitos da NA é devido à metabolização da amina que sai das vesículas adrenérgicas, pela MAO e COMT do terminal adrenérgico (Adler-Graschinsky *et al.*, 1972; Langer & Enero, 1974; Luchelli-Fortis & Langer, 1975). De facto, a NA- ^3H retida nestas preparações, ao fim das experiências, representa mais de 85 % do ^3H acumulado. Por outro lado, a inibição da captação extra-neuronal, durante o período «estável» de efluxo, não modifica o efluxo espontâneo da NA e dos seus metabolitos (Langer *et al.*, 1972; Luchelli-Fortis & Langer, 1975). Também, em algumas preparações, a MAO e a COMT existem não só em locais extra-neuronais, mas ainda no terminal adrenérgico (Jarrott, 1971 a e b. Jarrott, Langer, 1971). Também na veia safena, verificamos que ao fim de 215 minutos de perfusão cerca de 86 % do trítio acumulado na preparação corresponde a NA- ^3H ; nesta preparação também pudemos verificar que a hidrocortisona, adicionada ao líquido de perfusão, numa concentração que inibe a captação extra-neuronal da NA (Graefe & Trendelenburg, 1974) não modifica

o efluxo espontâneo durante o período de efluxo estável (ver Tabela 3). Verificamos, ainda, que o efluxo das várias fracções decresce de forma aproximadamente paralela dos 120 aos 215 minutos de perfusão (ver Fig. 8). Assim, e por semelhança com o que se passa com as outras preparações, também para a veia safena se poderia admitir que o efluxo espontâneo dos metabolitos durante o período de efluxo «estável», resulta da metabolização pré-sináptica da NA perdida pelas vesículas adrenérgicas. Contudo, outras hipóteses alternativas não poderão ser excluídas. Tal como sucede na membrana nictitante (Luchelli-Fortis & Langer, 1975), também as tiras de veia safena, no fim da perfusão, acumulam uma certa quantidade de metabolitos, principalmente OMDA e DOMA (ver Resultados). Como já foi referido, as fracções VMA e DOMA, abandonam muito lentamente os tecidos em que se formam. Em experiências de incubação de veia safena com NA-³H, Paiva & Guimarães (1978), mostraram que a fracção OMDA pode corresponder fundamentalmente a VMA. Assim, não se pode excluir a possibilidade, de nas nossas experiências durante a incubação com NA-³H, poder haver acumulação de VMA e DOMA; assim, durante a fase «estável» de efluxo, é possível que pelo menos parte do efluxo de OMDA e DOMA seja devido aos metabolitos acumulados no tecido durante a incubação. Aliás, Henseling et al., (1978), mostraram que as semi-vidas de VMA e DOMA são aproximadamente de 160 minutos, valor que é muito próximo do das semi-vidas de OMDA e DOMA na veia safena, durante a fase «estável». Tendo ainda em conta os resultados das nossas experiências de incubação e perfusão de veia safena, efectuadas na presença de cocaína, não se pode excluir a possibilidade do efluxo da fracção OMDA ter origem, pelo menos parcialmente, em locais extra-neuronais, e corresponder fundamentalmente a VMA.

Uma outra possibilidade que também não poderá ser excluída, é de que o efluxo da fracção OMDA resulte da metabolização extra-neuronal do DOPEG formado nos terminais simpáticos. De facto, dada a rapidez com que a fracção DOPEG abandona os locais em que é formada (Levin, 1974), é possível que na sua passagem pelos locais extra-neuronais seja metabolizada em MOPEG. O facto de os inibidores da captação extra-neuronal não modificarem o efluxo espontâneo, não é garantia de que tal não possa suceder. Basta que o DOPEG chegue aos locais extra-neuronais por um mecanismo de difusão simples e não por um processo de transporte activo. Contudo, a admitir esta possibilidade, o efluxo espontâneo de OMDA correspon-

deria a MOPEG, substância que abandona rapidamente o tecido (Henseling et al., 1978). Se isto acontecesse, era de admitir que a adição de U-0521 ao líquido de perfusão, provocasse uma queda rápida do efluxo de OMDA e um correspondente aumento do efluxo de DOPEG. Contudo, nas nossas experiências com U-0521, apenas verificamos uma ligeira modificação embora não significativa, do efluxo espontâneo daquelas fracções, ao fim de 20 minutos após o contacto das preparações com o inibidor da COMT (ver Tabela 3). Este facto apoia a possibilidade do efluxo espontâneo de OMDA corresponder a VMA.

O facto da adição de hidrocortisona ao líquido de perfusão, durante a fase de efluxo «estável», não ter modificado o efluxo espontâneo de NMN é compatível com a hipótese, já referida, de a NMN se formar pré-sinápticamente. Contudo, não se poderá excluir a possibilidade de a NMN se formar em locais extra-neuronais, a partir da NA «perdida» espontaneamente pelo terminal simpático. É possível que a pequena quantidade de NA «perdida» pelo terminal adrenérgico possa utilizar os sistemas de transporte extra-neuronais não bloqueados pela hidrocortisona. Contudo, na membrana nictitante, a hidrocortisona (28 μ M) bloqueia a O-metilação da NA apenas quando esta é utilizada em baixas concentrações (Graefe & Trendelenburg, 1974). Este facto não apoia portanto a hipótese que acabamos de referir, pois assim era de admitir que, na veia safena, a inibição da metilação da NA pela hidrocortisona, fosse mais intensa para o efluxo espontâneo do que para o efluxo produzido pela estimulação, facto que se não verificou (ver Tabelas 3 e 4).

As experiências em que a cocaína (10 μ M) fora adicionada ao líquido de perfusão da veia safena, durante a fase de efluxo «estável», mostraram-nos que, para este período, a inibição da captação neuronal praticamente não modifica o efluxo espontâneo (ver Tabela 3). A adição de cocaína, apenas condicionou um ligeiro aumento do efluxo espontâneo de NA e de NMN. Estes resultados indicam que durante a fase de efluxo «estável», uma pequena parte da NA perdida pelo terminal adrenérgico é sujeita a recaptação pelo terminal simpático; resultados semelhantes foram referidos para o canal deferente (Graefe et al., 1977).

A inibição da MAO, pela iproniazida administrada «in vivo», reduziu o efluxo espontâneo de 3 H bem como a desaminação da NA (ver Tabela 3). Como referimos nos Resultados, nas experiências com iproniazida o efluxo espontâneo de 3 H durante o período

«estável» foi menor do que na situação de controlo (cerca de metade), não porque houvesse uma menor acumulação de ^3H nas preparações, mas porque a perda foi reduzida. Também no canal deferente, Graefe et al., (1977), mostraram que a actividade enzimática aumenta a perda espontânea de ^3H . É pois de admitir que a perda de NA feita espontaneamente pelas vesículas para o axoplasma seja seguida de desaminação e, quando esta se encontra inibida, a NA tenda a ser retida, havendo uma conseqüente redução do efluxo e prolongamento da semi-vida. Nas experiências com iproniazida o efluxo espontâneo de NMN foi aumentado (ver Tabela 3). O aumento do efluxo de NMN poderia ter resultado ou numa maior oferta de NA à COMT ou numa menor desaminação de NMN; de facto, nas experiências com iproniazida houve um maior efluxo de NA e uma redução do efluxo de OMDA. É curioso notar que, embora a iproniazida tivesse reduzido significativamente a formação espontânea de metabolitos desaminados, continuaram a formar-se quantidades apreciáveis destes metabolitos (DOPEG e OMDA). Também na aorta de Coelho, Eckert et al., (1976) verificaram que nem o tratamento «in vitro» ou «in vivo» com pargilina suprime o efluxo de DOPEG dos 200 aos 215 minutos de perfusão. Porém, nas preparações sujeitas ao duplo tratamento («in vitro»+«in vivo»), o efluxo de DOPEG foi consideravelmente reduzido, relativamente às preparações submetidas apenas a um tratamento. Assim, na aorta, não se conseguiu evidenciar MAO resistente à pargilina. É pois possível que na veia safena, o tratamento duplo com iproniazida conseguisse suprimir praticamente a formação espontânea de metabolitos desaminados. Como este tipo de experiências não foi realizado na veia safena, não se poderá excluir portanto a possibilidade da existência de MAO resistente à iproniazida.

É geralmente aceite que a estimulação eléctrica, quando aplicada directamente aos nervos simpáticos ou pela técnica de estimulação de campo, produz uma libertação de NA por um mecanismo de tipo excitatório. Segundo este mecanismo de libertação, a NA é lançada intacta na fenda sináptica, e a metabolização da amina só se verifica depois de ter sido libertada. Os nossos resultados de estimulação de veias previamente incubadas com $\text{NA-}^3\text{H}$, são compatíveis com este tipo de libertação: a) O ^3H libertado por estimulação tem origem exclusivamente neuronal; b) os inibidores da captação neuronal e extra-neuronal modificam a metabolização da $\text{NA-}^3\text{H}$ libertada, o que indica que a metabolização da amina ocorre após ter sido sujeita

à captação neuronal e extra-neuronal (ver Tabela 4). Cada período de estimulação (de 2,5 minutos de duração, 10 Hz, 100 V e com 2 ms de duração por estímulo) produziu uma libertação de ^3H , dependente do ^3H existente na preparação no momento em que decorreu a estimulação; de facto, para a mesma preparação, a fracção de libertação por estímulo (ver Métodos), manteve-se praticamente constante em dois períodos de estimulação (S_1 e S_2), afastados 60 minutos um do outro (ver Resultados). Também para a mesma preparação, o valor relativo do efluxo das várias fracções, produzidos por S_1 e S_2 , foi semelhante (ver Fig. 11). Assim, e com excepção da iproniazida, o estudo da influência dos vários inibidores (U-O521, hidrocortisona, cocaína e combinações destas substâncias) na metabolização da NA- ^3H libertada, foi efectuado pela comparação de S_2 com S_1 (fracção de libertação e valor percentual das várias fracções), sendo S_2 efectuada após a exposição das preparações àqueles fármacos (ver Métodos). A influência da inibição da MAO na metabolização da NA- ^3H foi estudada em preparações de animais tratados com iproniazida, dado que a inibição «in vitro» daquela enzima, exigiria demasiado tempo (ver Métodos).

Nas nossas condições experimentais, a fracção de libertação por estímulo foi de 10^{-5} , valor que não foi modificado significativamente pela utilização dos inibidores das captações neuronal ou extra-neuronal, da MAO ou da COMT (ver Tabela 4). O valor da fracção de libertação que varia, consideravelmente, de umas preparações para outras, depende da frequência de estimulação, e é possivelmente condicionado também pela técnica utilizada para a estimulação (estimulação directa dos nervos ou de campo) (Luchelli-Fortis & Langer, 1975; McCulloch et al., 1975; Dubocovich & Langer, 1976; Endo et al., 1977). Por exemplo, para a estimulação directa dos nervos a 10 Hz, a fracção de libertação é cerca de 10^{-4} no baço (Dubocovich & Langer, 1976), sendo apenas de 10^{-5} na membrana nictitante (Luchelli-Fortis & Langer, 1975). O facto de na veia safena o tratamento pela cocaína, hidrocortisona, U-O521 ou iproniazida, não modificar significativamente a fracção de libertação, indica que nas nossas condições experimentais aqueles inibidores não interferiram com os mecanismos de libertação. Também na membrana nictitante a hidrocortisona, na concentração de $28 \mu\text{M}$, não modificou a fracção de libertação (Luchelli-Fortis & Langer, 1975). Contudo, a cocaína, por um efeito anestésico local, pode reduzir a libertação, desde que utilizada em concentrações elevadas; no coração, Starke et al., (1972), apenas

verificaram uma redução de libertação de NA pela cocaína para uma concentração de 200 μ M (concentração 20 vezes superior àquela que utilizamos). Para a veia safena verificamos que o efluxo produzido pela estimulação (durante e após o período de estimulação — ver Métodos) é constituído por 39 % de NA-³H intacta e o restante por metabolitos: DOPEG 24 %, OMDA 25 %, NMN 7 % e DOMA 6 % (ver Tabela 4). Mostramos nos Resultados que, enquanto o efluxo da NA-³H ocorre principalmente durante o período de colheita correspondente à estimulação, o efluxo dos metabolitos verificou-se sobretudo nos períodos seguintes.

Os estudos efectuados sobre a metabolização da NA-³H libertada por estimulação mostram que o padrão da metabolização (valor percentual de cada uma das fracções) depende, entre outros factores, do método de separação da NA e dos seus metabolitos, de certas condições experimentais e das preparações utilizadas. Por exemplo, para a membrana nictitante, a NA representa 75 % e o DOPEG menos de 10 % do ³H libertado (Enero et al., 1972; Langer et al., 1972). Em contraste com estes resultados, em experiências realizadas mais recentemente com esta preparação e, utilizando uma técnica mais avançada de cromatografia (Graefe et al., 1973), o valor da NA é apenas de 31 % enquanto o do DOPEG é muito mais elevado, 45 % (Luchelli-Fortis & Langer, 1975). A metabolização da NA é também condicionada pelo tempo de contacto desta amina com as estruturas capazes de a metabolizar, sendo mais intensa a metabolização para períodos mais prolongados de exposição. Por exemplo, no baço a percentagem da metabolização da NA-³H aumenta com a interrupção do fluxo de perfusão (Dubocovich & Langer, 1973). Daí que, quando se pretende comparar padrões de metabolização de NA em diversas preparações, deveremos ter em conta as condições de perfusão ou de incubação. O efluxo da NA e dos seus metabolitos modifica-se do período de estimulação para os períodos pós-estimulação: o efluxo da NA ocorre principalmente durante o período de estimulação, enquanto o efluxo dos metabolitos se verifica nos períodos seguintes (Dubocovich & Langer, 1976), como verificamos também na veia safena. O cálculo comumente utilizado para a determinação do efluxo da NA-³H e seus metabolitos produzido pela estimulação eléctrica, é feito pela diferença entre o efluxo durante e após o período de estimulação e o efluxo espontâneo que precede a estimulação (ver Métodos; Dubocovich & Langer, 1973; Graefe et al., 1973; Cubeddu et al., 1974; Langer & Enero, 1974; Luchelli-Fortis & Langer, 1975; Dubo-

covich & Langer, 1976; Endo et al., 1977). Esta determinação só poderá ser correcta, se o efluxo espontâneo se mantiver constante durante e após o período de estimulação e se for recolhido todo o efluxo após o início de estimulação, até ser recuperado o efluxo espontâneo. Afim de se evitar erros grosseiros nestas determinações, importa que a estimulação se faça durante uma fase de efluxo «estável» e que o período de estimulação seja o mais breve possível. Uma outra razão a aconselhar períodos curtos de estimulação deriva da possibilidade de durante a estimulação o efluxo espontâneo se poder modificar. De facto, Cubeddu & Weiner (1975) mostraram que a cocaína ($3 \mu\text{M}$) pode reduzir o efluxo espontâneo de DOPEG durante e imediatamente depois do período de estimulação. Se forem confirmados estes resultados o valor do DOPEG libertado pela estimulação é sub-estimado. É de salientar que nas nossas experiências a estimulação decorreu durante a fase de efluxo «estável» (semi-vida aproximadamente de 160 minutos) e os períodos de estimulação foram apenas de 2,5 minutos. O facto de na veia safena o efluxo de DOPEG e OMDA ocorrer principalmente depois do período de estimulação (ver Fig. 12), merece que nos detenhamos um pouco mais. Dubocovich & Langer (1976) mostraram que, no baço, o efluxo de DOPEG se eleva abruptamente depois dos períodos de estimulação nervosa de duração entre 10 a 600 segundos. Segundo estes investigadores este fenómeno pode ser relacionado com as seguintes possibilidades: a) a inibição da captação neuronal durante a estimulação cessa logo que esta é interrompida; b) imediatamente após a estimulação nervosa a captação neuronal está intensificada. Qualquer daquelas interpretações é susceptível de explicar os nossos resultados em relação ao aumento do efluxo de DOPEG e DOPA verificado após a estimulação da veia safena, desde que se admita que estas fracções são formadas exclusivamente pelo terminal simpático a partir da NA recaptada, ou, no caso da fracção OMDA, por metilação extra-neuronal do DOPEG formado no terminal simpático. Contudo, nas experiências com cocaína, o mesmo fenómeno se verificou para o efluxo de OMDA e NMN, embora nestas condições estivesse praticamente suprimido o aumento do efluxo de DOPEG (ver Fig. 15). Como nestas condições as fracções OMDA e NMN devem ser formadas em locais extra-neuronais, estes resultados parecem indicar que aquele fenómeno não é específico dos metabolitos de origem neuronal.

Para a generalidade das preparações a fracção DOPEG repre-

senta o metabolito mais abundante da NA libertada: 20 % para o baço (Dubocovich & Langer, 1976), 45 % para a membrana nictitante (Luchelli-Fortis & Langer, 1975), 22 % para a artéria pulmonar (Endo *et al.*, 1977) e 24 % para a veia safena (ver Tabela 4). Em todas estas preparações a fracção DOMA é o metabolito que se forma em menor quantidade. A fracção OMDA forma-se em quantidades apreciáveis na artéria pulmonar (19 %) e na veia safena (25 %), mas em menor quantidade nas restantes. A NMN é um metabolito de relativa importância na membrana nictitante, mas de menor valor para as restantes preparações. O valor percentual da NA-³H que se escapa das preparações, sem sofrer metabolização, é máximo no baço (70 %) e mínimo na membrana nictitante (29 %), situando-se a veia safena e a artéria pulmonar numa posição intermédia, com respectivamente 39 % e 49 %. As diferenças na intensidade com que a NA-³H libertada sofre metabolização podem ser condicionadas por diferenças nos esquemas experimentais usados e ainda por diferenças estruturais destas preparações. Repare-se que no baço se faz a perfusão através do sistema vascular, enquanto que na membrana nictitante se procedeu à incubação. Não sabemos até que ponto a perfusão do baço facilitou a remoção da amina libertada e assim se impediu a metabolização; inversamente, com a incubação da membrana nictitante, poder-se-ia ter facilitado a metabolização da NA-³H. Para o caso da veia safena e da artéria pulmonar, foi utilizada a perfusão a fluxo constante, mas com débito diferente (respectivamente 0,8 e 6 ml/minuto); a diferença no débito pode ter contribuído para que nestes dois vasos a intensidade da metabolização fosse um pouco diferente. Embora a frequência da estimulação não pareça condicionar por si modificações significativas no padrão da metabolização (Dubocovich & Langer, 1976), é de notar que as características da estimulação utilizadas não foram sempre as mesmas, nestas experiências. As diferenças apontadas quanto à intensidade com que é metabolizada a NA-³H podem ser também explicadas através das características morfológicas das preparações. Para o caso da membrana nictitante, a localização dos terminais em pontos afastados da superfície bem como relações íntimas de proximidade entre os terminais e as fibras lisas (van Orden *et al.*, 1967; Esterhuizen *et al.*, 1968), tornarão mais acessível a amina às estruturas capazes de a metabolizar. Pelo contrário, na artéria pulmonar, a NA-³H pode ser libertada em locais mais próximos da superfície, dado que neste vaso os terminais adrenérgicos apenas se circunscrevem à adventícia (Verity & Bevan,

1968), o que pode facilitar a difusão da amina intacta para o líquido nutritivo; aliás, Steinsland *et al.*, (1973), mostraram que na artéria central da orelha do Coelho (que possui uma inervação do tipo referido para a artéria pulmonar) previamente incubada com NA-³H, a estimulação nervosa liberta ³H, que abandona a preparação mais intensamente pela adventícia que pela íntima. As diferenças na intensidade da metabolização da NA-³H entre a artéria pulmonar e a veia safena poderão ser explicadas pelas características de inervação deste último vaso (Coimbra *et al.*, 1974).

A inibição da captação neuronal pela cocaína reduz a formação de DOPEG devida à estimulação nervosa em várias preparações: baço (Dubocovich & Langer, 1973, 1976; Cubeddu *et al.*, 1974), membrana nictitante (Langer & Enero, 1974) e na artéria pulmonar (Endo *et al.*, 1977). Estes resultados sugerem que o DOPEG se forma a partir da NA recaptada, pela actividade da MAO e da reductase aldeídica do terminal simpático (Dubocovich & Langer, 1973, 1976; Cubeddu *et al.*, 1974; Langer & Enero, 1974). Contudo, ainda não é possível indicar a origem exacta da sua formação — por metabolização directa da NA recaptada ou em alternativa por metabolização da NA deslocada das vesículas pela NA recaptada (Cubeddu *et al.*, 1974). Os nossos resultados mostram também, que, para a veia safena, o DOPEG formado normalmente em consequência da estimulação nervosa, é inteiramente neuronal (ver Tabela 4). O facto de o efluxo da NMN devido à estimulação nervosa ser aumentado pela cocaína e reduzido pela hidrocortisona sugere que este metabolito se forma na veia safena em locais extra-neuronais a partir da NA-³H libertada (ver Tabela 4). As conclusões semelhantes chegaram outros investigadores: na membrana nictitante (Langer & Enero, 1974; Luchelli-Fortis & Langer, 1975); no baço (Cubeddu *et al.*, 1974); na artéria pulmonar (Endo *et al.*, 1977).

Para a generalidade das preparações, a fracção DOMA corresponde apenas a uma pequena quantidade do ³H libertado (Langer & Enero, 1974; Luchelli-Fortis & Langer, 1975; Dubocovich & Langer, 1976; Endo *et al.*, 1977). O facto de na membrana nictitante a cocaína reduzir a formação de DOMA, sugere que este metabolito seja formado, pelo menos parcialmente, no terminal simpático, a partir da NA recaptada (Langer & Enero, 1974). Na veia safena, a fracção DOMA correspondeu a cerca de 6 % do ³H libertado. Contudo, nesta preparação, as experiências com cocaína ou com hidrocortisona não permitiram esclarecer o local de origem, na medida em que nenhum

destes inibidores (da captação neuronal e extra-neuronal) interferiu significativamente com a sua formação (ver Tabela 4); resultados semelhantes foram obtidos na artéria pulmonar por Endo *et al.*, (1977). Tendo em conta que na separação de OMDA pode haver inquinação pela NA e DOPEG, é possível que o valor deste metabolito tenha sido sobre-estimado nas nossas determinações (ver Métodos).

Na membrana nictitante e no baço, a cocaína reduziu parcialmente a formação de OMDA (Langer & Enero, 1974; Dubocovich & Langer, 1976); a hidrocortisona não modificou significativamente o efluxo de OMDA produzido pela estimulação nervosa na membrana nictitante (Luchelli-Fortis & Langer, 1975). Assim, para estas preparações a fracção OMDA parece ser formada, pelo menos parcialmente, no terminal simpático a partir da NA recaptada, ou em alternativa por metilação extra-neuronal dos metabolitos desaminados provenientes do terminal simpático. Na artéria pulmonar a cocaína não reduziu o efluxo de OMDA, havendo contudo uma redução nítida da formação desta fracção nas preparações submetidas a acção conjunta da cocaína e corticosterona (Endo *et al.*, 1977). Estes resultados indicam que, na artéria pulmonar, a fracção OMDA resulta da metabolização da NA pela COMT e MAO extra-neuronais. Como se poderá constatar na Tabela 4, na veia safena o efluxo da fracção OMDA foi incrementado pela cocaína e reduzido pela hidrocortisona. Estes resultados indicam pois que na veia safena a fracção OMDA resulta da metabolização extra-neuronal (pela MAO e COMT) da NA-³H libertada. Sendo a fracção OMDA, devida à actividade da MAO e da COMT, tanto pode resultar da desaminação da NA-³H seguida de metilação, ou inversamente da metilação da amina seguida de desaminação. Os nossos resultados não nos permitem excluir nenhuma destas possibilidades. De facto, a inibição da COMT pelo U-0521, elevou significativamente a formação de DOPEG, com uma redução da formação de OMDA e de NMN. Inversamente, a inibição da MAO reduziu a formação de DOPEG e OMDA e aumentou a formação de NMN. Estes resultados indicam que o DOPEG pode ser metilado e que a NMN pode ser desaminada. Os resultados das experiências em que se procedeu à inibição da captação neuronal e da COMT (cocaína + U-0521), mostraram que 28 % do efluxo produzido pela estimulação é constituído por DOPEG; que o DOPEG formado nestas condições resulta da desaminação extra-neuronal da amina, é demonstrado pelos resultados das experiências com cocaína + U-0521 + hidrocortisona, em que se verificou uma redução acentuada da formação de DOPEG relativamente às experiências

com cocaína+U-0521. Estes resultados parecem indicar que a fracção OMDA formada nas experiências com cocaína (e que representa 23 % do efluxo de ^3H) resulta inteiramente da metilação do DOPEG.

Se a MAO e a COMT tivessem uma actividade complementar, a inibição de qualquer delas deveria acompanhar-se de um aumento da actividade da restante, de modo que a quantidade da amina metabolizada deveria ser constante. Tal não ocorre na veia safena. A inibição da COMT ou da MAO aumenta o efluxo da NA- ^3H intacta (ver Tabela 4), aumento este muito mais acentuado para a inibição da MAO do que para a inibição da COMT. Por outras palavras, o aumento da actividade da MAO é quase compensado pela diminuição da actividade da COMT, mas o inverso não é verdadeiro. Resultados semelhantes têm sido referidos, em experiências de incubação com NA- ^3H , para a artéria mesentérica (Garrett & Branco, 1977) e na média da aorta (Levin & Wilson, 1977); nenhuma explicação razoável pôde ser adiantada para a falta de aumento compensador da metilação da NA após o bloqueio da MAO pela camada média da aorta. Embora os nossos resultados não nos permitam tirar qualquer conclusão, eles são compatíveis com várias possibilidades: mais fácil acesso da NA aos locais desaminantes do que aos metilantes, ser a NA melhor substracto da MAO do que da COMT ou serem os metabolitos desaminados mais facilmente metilados que a NA.

O confronto dos resultados das experiências com NA- ^3H e das experiências de relaxamento, mostra a existência de várias semelhanças e de algumas diferenças. Assim, pudemos demonstrar que a NA- ^3H libertada pela estimulação nervosa é intensamente metabolizada (cerca de 60 %), sendo também rapidamente inactivada a NA endógena libertada pela excitação nervosa. A inibição da COMT ou da captação extra-neuronal só muito discretamente inibem a metabolização da NA- ^3H e também não prolongam o relaxamento das preparações contraídas por estimulação nervosa (ver Tabelas 1, 2 e 4); estes inibidores também não modificam sensivelmente a velocidade com que diminui o efluxo da NA- ^3H libertada (ver Figs. 13 e 14). A cocaína, que prolonga intensamente o relaxamento das preparações, inibe também acentuadamente a metabolização da NA- ^3H libertada; as inibições da COMT ou da captação extra-neuronal, que reforçam o efeito da cocaína no relaxamento, também intensificam a inibição da metabolização produzida pela cocaína. Verificamos também, nas experiências com cocaína (cocaína, cocaína+U-0521 e cocaína+U-0521+hidrocortisona), que o efluxo da NA- ^3H produ-

zido pela estimulação é mais prolongado (ver Figs. 15, 16 e 17). Contudo, é de notar que enquanto a iproniazida quase não prolonga o relaxamento das preparações contraídas pela estimulação eléctrica, reduz intensamente a metabolização da NA-³H libertada por estimulação nervosa. Estes dados, aparentemente contraditórios, poderão ser explicados pelo que se disse quanto à localização da MAO e dos mecanismos de remoção da NA da biofase: a NA para ser desaminada terá que abandonar a biofase e, nessa altura, deixa de ter efeito. Mas se a NA, apesar da inibição da MAO, continua a ser removida normalmente da biofase, pôr-se-á a questão do seu destino final. Já vimos, que com a inibição da MAO, a NA captada extra-neuronalmente é mais intensamente metilada em NMN do que normalmente; a parte da NA que é captada extra-neuronalmente mas que não vier a ser metilada, pode ser lentamente perdida para o espaço extra-celular, não modificando porém o relaxamento das preparações. Quanto à NA recaptada pelo terminal simpático, e que normalmente é desaminada, a inibição da MAO pode permitir que a amina venha a ser retida nas vesículas adrenérgicas. Assim, com a inibição da MAO, a NA recaptada pelo terminal simpático não participará no efluxo da amina libertada por estimulação nervosa. Os nossos resultados apoiam esta interpretação, pois que a inibição da MAO aparentemente não modificou a velocidade com que diminui o efluxo da NA após a estimulação. Contudo, a admitir-se esta possibilidade (de recaptação vesicular da NA libertada), a inibição da MAO deveria reduzir a fracção de libertação (por diminuir o efluxo de ³H libertado e aumentar o ³H retido nas preparações). Embora a fracção de libertação destas experiências fosse um pouco menor do que a verificada normalmente, as diferenças contudo não foram significativas, o que não permite confirmar a hipótese formulada.

Apesar de haver algumas razões para duvidar da possibilidade duma mistura homogénea da NA-³H com NA endógena (Hughes, 1972; Hughes & Roth, 1974), as semelhanças apontadas sugerem que em relação à libertação a NA-³H se comporta como a NA endógena.

RESUMO E CONCLUSÕES

Descreve-se neste trabalho um novo método de «imersão em óleo», que permite estudar os mecanismos de que depende a terminação da resposta à estimulação simpática. Este método apenas dá informação àcerca dos mecanismos de remoção do mediador do espaço extra-celular e na imediata vizinhança dos receptores, não permitindo estudar o seu destino final. Para este objectivo recorreu-se à $NA\text{-}^3H$, como processo de marcação do mediador, estudando-se a cinética da amina libertada espontaneamente ou por estimulação nervosa.

Estes estudos foram realizados exclusivamente em preparação de veia safena de Cão e permitiram-nos retirar as seguintes conclusões:

1) Quando se procede à estimulação eléctrica de preparações de veia safena mergulhadas em óleo mineral, estas iniciam a sua contracção ao fim de escassos segundos, atingindo-se uma resposta justa-máxima ao fim de 5-6 minutos de estimulação. Com a interrupção do estímulo eléctrico a resposta contráctil desaparece rapidamente (cerca de 1-3 minutos).

2) A análise farmacológica indica que a resposta contráctil, obtida nas nossas condições experimentais, resulta da libertação de NA.

3) A terminação da resposta depende fundamentalmente da recaptação neuronal do mediador libertado. A captação extra-neuronal, a metabolização (pela MAO e pela COMT), ou a difusão do mediador, não parecem intervir na terminação da resposta.

4) A captação extra-neuronal, a metilação e a difusão do mediador, são responsáveis pela terminação da resposta apenas quando está impedida a recaptação neuronal do mediador. Assim, estes mecanismos de inactivação comportaram-se como supletivos da recaptação neuronal.

5) O tipo de resposta à estimulação (brevidade do período de

latência, velocidade com que se estabelece, amplitude máxima e rápida terminação da resposta), bem como a importância relativa dos mecanismos de inactivação, são explicados pelas características das relações neuro-efectoras existentes na veia safena.

6) Durante a perfusão de 215 minutos de preparações carregadas com NA-³H, verificou-se uma perda de substâncias marcadas correspondente a 42 % do ³H acumulado nas preparações antes da perfusão. A perda de ³H fez-se em dois períodos, um inicial em que o efluxo decai rapidamente e outro final, dos 120 aos 215 minutos, em que o efluxo se manteve «estável» ($T/2=156$ minutos).

7) Durante a fase de efluxo estável, mais de 90 % do ³H libertado é constituído por metabolitos da NA-³H (sobretudo DOPEG e OMDA). Durante este período manteve-se constante o valor percentual das várias fracções do efluxo.

8) As fracções DOPEG e DOPA do efluxo espontâneo formam-se no axoplasma neuronal a partir da NA-³H. O efluxo da fracção OMDA poderá corresponder a VMA, formado em compartimentos extra-neuronais.

9) Durante a fase de efluxo «estável», a estimulação eléctrica libertou quantidades apreciáveis de ³H, as quais têm origem exclusivamente neuronal.

10) 40 % da amina libertada pela estimulação eléctrica corresponde a NA-³H intacta, sendo o restante representado por metabolitos, sobretudo DOPEG e OMDA.

11) A fracção DOPEG libertada pela estimulação, resulta da desaminação axoplasmática da NA-³H recaptada pelo terminal simpático após ter sido libertada para o espaço extra-celular. O efluxo de OMDA e NMN produzido pela estimulação resulta da metabolização extra-neuronal da NA-³H libertada.

12) Os nossos resultados suportam a ideia, geralmente aceite, de que o mediador é libertado na forma intacta pela estimulação nervosa, ocorrendo a sua biotransformação após recaptação neuronal e captação extra-neuronal.

13) Quando a COMT está inibida e a recaptação neuronal está bloqueada, a NA-³H libertada é em grande parte desaminada em DOPEG pela MAO extra-neuronal.

14) Quando a MAO está inibida, verifica-se apenas um ligeiro aumento da metilação da NA-³H libertada.

15) As conclusões 13 e 14 apoiam a ideia de que normalmente a fracção OMDA libertada pela estimulação resulta em grande parte

da desaminação extra-neuronal da NA-³H em DOPEG e ulterior metilação em MOPEG.

16) O facto da inibição da COMT prolongar o relaxamento apenas quando a recaptção neuronal está inibida (sabendo-se que a NA-³H é intensamente desaminada e metilada extra-neuronalmente) sugere que a metilação do mediador ocorre mais próxima dos receptores do que a desaminação.

17) Quando se compara a influência de vários fármacos, na duração do efluxo da NA-³H libertada e no relaxamento de preparações contraídas pela estimulação, verifica-se uma boa concordância de resultados: apenas nas experiências em que se inibiu a recaptção neuronal se assistiu a um prolongamento do efluxo e do relaxamento. Estes resultados sugerem que a NA-³H se comporta como o mediador libertado.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

This work presents a new technique which, through oil immersion, makes it possible to study the mechanisms on which, in sympathetic nerve endings, depends the termination of a response to a stimulus. This method, however, only provides us with information regarding the mechanism which releases the transmitter into the extracellular space in the immediate vicinity of the receptor, but not the final fate of the transmitter. For this purpose, NA-³H was used as a transmitter and the kinetics of the amine released, either spontaneously or through nervous stimulation, were studied.

These studies were exclusively done on preparations of the saphenous vein of the Dog, the results of which permitted us to come to the following conclusions:

(1) When preparations of the saphenous vein are immersed in mineral oil and subjected to an electrical stimulus, these begin to contract within a few seconds, attaining their peak response in 5-6 minutes of continued stimulation. When this stimulus is interrupted, the contractile response rapidly disappears (within 1-3 minutes).

(2) Pharmacological analysis indicates that the contractile response obtained under our experimental conditions, depends on the release of NA.

(3) Termination of a response depends basically on the neuronal uptake of the released transmitter. Extraneuronal uptake metabolism (by MAO and COMT), or diffusion of the transmitter, did not appear to intervene in the termination of the response.

(4) Extraneuronal uptake, methylation and diffusion of the transmitter are only responsible for the termination of the response when neuronal uptake is blocked. Thus, these inactivation mechanisms behave as supplements to neuronal uptake.

(5) The type of response to a stimulus (brief latency period,

speed at which response takes place, maximum amplitude, and rapid termination of response), as well as the relative importance of the inactivation mechanisms, are explained by the characteristics of the neuronal-effector relationships extant in the saphenous vein.

(6) During the 215-minute-long perfusion of the preparations charged with NA-³H, a loss of tritiated substances was observed which corresponded to 42 % of the accumulated ³H in the preparation, prior to perfusion. This loss of ³H took place in two phases: an initial phase in which the outflow was rapid and a final phase from 120 to 215 minutes in which the rate of outflow was «stable» ($T/2=156$ minutes).

(7) During the «stable» phase, more than 90 % of the ³H released was composed of NA-³H metabolites (especially DOPEG and OMDA). The percentile value of the various fractions of the outflow also remained constant at this time.

(8) DOPEG and DOMA fractions of the spontaneous outflow are formed in the neuronal axoplasm from NA-³H. The OMDA fraction could correspond to VMA, which is formed in the extraneuronal compartments.

(9) During the «stable» phase, electrical stimulation released appreciable amounts of ³H, which are of an exclusively neuronal origin.

(10) 40 % of the amine released by electrical stimulation corresponded to intact NA-³H, the remainder consisting of metabolites, particularly DOPEG and OMDA.

(11) The DOPEG released by stimulation was a result of axoplasmatic deamination of NA-³H taken up by the sympathetic terminal following release into the extracellular space. The OMDA and NMN produced by stimulation was a result of the extraneuronal metabolization of the released NA-³H.

(12) Our findings support the generally accepted hypothesis that the transmitter is released intact as a result of nervous stimulation, and that biotransformation occurs following neuronal and extraneuronal uptake.

(13) When COMT was inhibited and neuronal uptake was blocked, released NA-³H was in great part deaminated to DOPEG by extraneuronal MAO.

(14) When MAO was inhibited, a small increase in the methylation of released NA-³H was noted.

(15) Conclusions 13 and 14 support the idea that usually, the OMDA fraction released by stimulation is, in a great part, a result

of extra-neuronal deamination of NA-³H to DOPEG and subsequent methylation to MOPEG.

(16) The fact that inhibition of COMT prolonged relaxation when neuronal uptake only, was inhibited (knowing that NA-³H had been intensively deaminated and methylated extraneuronally) suggest that methylation of the transmitter occurs at a point closer to the receptors than deamination.

(17) When the effect of various drugs on the outflow of released NA-³H is compared to the relaxation of the preparations contracted through stimulation, we verify compatible results. Only in those experiments where neuronal uptake was inhibited, was there a prolonged outflow and relaxation. These findings suggest that NA-³H behaved like released endogenous transmitter.

BIBLIOGRAFIA

- Adler-Graschinsky, E., Langer, S.Z. and Rubio, M.C. — Release and metabolism of norepinephrine by phenoxybenzamine in isolated guinea-pig atria. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **180**: 286-301 (1972).
- Allen G.S., Rand, M.J. and Story, D. F. — Techniques for studying adrenergic transmitter release in an isolated perfused artery. *Cardiovasc. Res.* **7**: 423-428 (1973).
- Andén, N.-E. and Henning, M. — Adrenergic nerve function, noradrenaline levels and noradrenaline uptake in cat nictitating membrane after reserpine treatment. *Acta physiol. scand.* **67**: 498-504 (1966).
- Andén, N.-E., Magnusson, T. and Waldeck, B. — Correlation between noradrenaline uptake and adrenergic nerve function after reserpine treatment. *Life Sci.* **3**: 19-25 (1964).
- Antonaccio, M.J. and Smith, C.B. — Effects of chronic pretreatment with small doses of reserpine upon adrenergic nerve function. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **188**: 654-667 (1974).
- Armstrong, M.D., McMillan, A., Show, K.F. — 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **25**: 422-423 (1957).
- Axelrod, J. — O-methylation of epinephrine and other catechols **in vitro** and **in vivo**. *Science* **126**:400-401 (1957).
- Axelrod, J., Hertting, G. and Patrick, R.W. — Inhibition of H³-norepinephrine release by monamine oxidase inhibitors. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **134**: 325-328 (1961).
- Baltzer, H. and Holtz, P. — Beeinflussung der Wirkung biogener amine durch Hemmung der aminoxydase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **227**: 547-558 (1956).
- Barger, G. and Dale, H.H. — Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *J. Physiol. (Lond.)* **41**: 19-59 (1910).
- Bentley, G.A. and Smith G. — Effects of alpha-adrenergic receptor

- blocking drugs on the response of vas deferens and arterial muscle to sympathetic drug and stimulation. *Cir. Res.* **20**: suppl. **3**: 101-110 (1967).
- Bevan, J.A. and Su, C. — Variation of intra- and perisynaptic adrenergic transmitter concentrations with width of synaptic cleft in vascular tissue. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **190**: 30-38 (1974).
- Bevan, J.A., Su, C. and Ljung, B. — On the blockade of neuronal and exogenous noradrenaline. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**: 78-79 (1973).
- Blaschko, H., Richter, D., Schlossman, H. — The inactivation of adrenaline. *J. Physiol. (Lond.)* **90**: 1-19 (1937 a).
- Blaschko, H., Richter, D., Schlossman, H. — The oxidation of adrenaline and other amines. *Biochem. J.* **31**: 2187-2196 (1937 b).
- Blinks, J.R. — Field stimulation as a means of effecting the graded release of autonomic transmitters in isolated muscle. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **151**: 221-235 (1966).
- Brandão, F. — A comparative study of the role played by some inactivation pathways in the disposition of the transmitter in the rabbit aorta and the saphenous vein of the dog. *Blood Vessels* **13**: 309-318 (1976).
- Brandão, F. — Inactivation of norepinephrine in an isolated vein. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **203**: 23-29 (1977).
- Brandão, F., Guilherme Monteiro, J. and Osswald, W. — Differences in the metabolic fate of noradrenaline released by electrical stimulation or by tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **305**: 37-40 (1978).
- Brandão, F. and Guimarães, S. — The termination of action of exogenous noradrenaline in the isolated cat spleen tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **275**: 119-123 (1972).
- Brandão, F. and Guimarães, S. — Inactivation of endogenous noradrenaline released by electric stimulation *in vitro* of the dog saphenous vein. *Blood Vessels* **11**: 45-54 (1974).
- Brown, G.L. and Gillespie, J.S. — The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* **138**: 81-102 (1957).
- Burgen, A.S.V. and Iversen, L.L. — The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. *Brit. J. Pharmacol.* **25**: 34-49 (1965).
- Burn, J.H. — The enzyme at sympathetic nerve endings. *Brit. Med. J.* **1**: 784-787 (1952).
- Burn, J.H., Philpot, F.J. and Trendelenburg, U. — Effect of dener-

- vation on enzymes in iris and blood vessels. *Brit. J. Pharmacol.* **9**: 423-428 (1954).
- Burn, J.H. and Robinson, J. — Effect of denervation on amine oxidase in structures innervated by the sympathetic. *Brit. J. Pharmacol.* **7**: 304-318 (1952).
- Cannon, W.B. and Rosenblueth, A. — *Autonomic Neuroeffector Systems*. New York: The Macmillan Company, 1937.
- Carlsson, A., Rosengren, E., Butler, A. and Nilsson, J. — Effect of reserpine on the metabolism of catecholamines. In: *Psychotropic Drugs* (S. Garattini and V. Getti, eds), pp. 363-372. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1957.
- Coimbra, A., Ribeiro-Silva, A. and Osswald, W. — Fine structural and autoradiographic study of the adrenergic innervation of the dog lateral saphenous vein. *Blood Vessels* **11**: 128-144 (1974).
- Crips, H. and Dearnaley, D.P. — Vascular responses and noradrenaline overflow in the isolated blood-perfused cat spleen: some effects of cocaine, normetanephrine and α -blocking agents. *J. Physiol. (Lond.)* **227**: 647-664 (1972).
- Crout, J.R. — In: *Standard Methods of Clinical Chemistry*. (D. Seligson, ed.) Vol. 3, pp 62-80. New York: Academic Press 1961.
- Cubeddu, L., Barnes, E.M., Langer, S.Z. and Weiner, N. — Release of norepinephrine and dopamine- β -hydroxylase by nerve stimulation. I. Role of neuronal and extraneuronal uptake and alpha presynaptic receptors. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **190**: 431-450 (1974).
- Cubeddu, L. and Weiner, N. — Release of norepinephrine and dopamine- β -hydroxylase by nerve stimulation. V. Enhanced release associated with a granular effect of a benzoquinolizine derivative with reserpine-like properties. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **193**: 757-774 (1975).
- Dale, H.H. — On some physiological actions of ergot. *J. Physiol. (Lond.)* **34**: 163-206 (1906).
- de la Lande, I.S., Frewin, D. and Waterson, J.G. — The influence of sympathetic innervation on vascular sensitivity to noradrenaline. *Brit. J. Pharmacol.* **31**: 82-93 (1967).
- Dixon, W.E. — Vagus inhibition. *Brit. Med. J.* **2**: 1807 (1906) (*).
- Dubocovich, M. and Langer, S.Z. — Effects of flowstop on the metabolism of noradrenaline released by nerve stimulation in the perfused spleen. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **278**: 179-194 (1973).

- Dubocovich, M. and Langer, S.Z. — Influence of the frequency of nerve stimulation on the metabolism of ^3H -norepinephrine released from the perfused cat spleen: differences observed during and after the period of stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **198**: 83-101 (1976).
- Eckert, E., Henseling, M., Gescher, A. and Trendelenburg, U. — Stereoselectivity of the distribution of labelled noradrenaline in rabbit aortic strips after inhibition of the noradrenaline-metabolizing enzymes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **292**: 219-229 (1976).
- Elliott, T.R. — The action of adrenaline. *J. Physiol. (Lond.)* **32**: 401-467 (1905).
- Endo, T., Starke, K., Bangerter, A. and Taube, H.D. — Presynaptic receptor system on the noradrenergic neurons of the rabbit pulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **296**: 229-247 (1977).
- Esterhuizen, A.C., Graham, J.D.P., Lever, J.D. Spriggs, T.L.B. — Catecholamine and acetylcholinesterase distribution in relation to noradrenaline release. An enzyme histochemical and autoradiographic study on the innervation of the cat nictitating membrane. *Brit. J. Pharmacol.* **32**: 46-56 (1968).
- Euler, U.S. v. — A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta physiol. scand.* **12**: 73-98 (1946).
- Euler, U.S. v. and Floding, J. — A fluorimetric micromethod for differential estimation of adrenaline and noradrenaline. *Acta physiol. scand.* **33**, suppl. 118: 45-56 (1955).
- Ewins, A.J. — Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem. J.* **8**: 44-49 (1914) (*).
- Farnebo, L.O. and Malmfors, T. — ^3H -noradrenaline release and mechanical response in the field stimulated mouse vas deferens. *Acta physiol. scand. suppl.* **371**: 1-18 (1971).
- Furchgott, R.F. — Effect of dibenamine on aorta responses to noradrenaline, electrical stimulation and anoxia. *Fed. Proc.* **11**: 217 (1952).
- Furchgott, R.F. — The pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* **7**: 183-265 (1955).
- Furchgott, R.F. and Sanchez-Garcia, P. — Effects of inhibition of monoamine oxidase on the actions and interactions of norepi-

- nephrine, tyramine and other drugs on guinea-pig left atrium. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **163**: 98-122 (1968).
- Garrett, J. and Branco, D.—Uptake and metabolism of noradrenaline by the mesenteric arteries of the dog. *Blood Vessels* **14**: 43-54 (1977).
- Garrett, J. and Sousa, C.—Effect of guanethidine on smooth muscles. *Arzneim. Forsch.* **13**: 125-130 (1963).
- Giles, R.E. and Miller, J.W.—Studies on the potentiation of the inotropic actions of certain catecholamines by U-0521 (3'-4'-dihydroxy- α -methyl propiophenone). *J. Pharmacol. exp. Ther.* **157**: 55-61 (1967).
- Gillespie, J.S.—Extraneuronal uptake of catecholamines in smooth muscle and connective tissue. In: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines* (D.M. Paton, ed.), pp. 325-354. New York: Raven Press, 1976.
- Gillespie, J.S. and Hamilton, D.N.H.—Binding of noradrenaline to smooth muscle cells in the spleen. *Nature*, **212**: 524-525 (1966).
- Gillespie, J.S., and Mackenna, B.R.—The inhibitory action of the sympathetic nerves on the smooth muscle of the rabbit gut, its reversal by reserpine and restoration by catechol amines and by dopa. *J. Physiol. (Lond.)* **156**: 17-34 (1961).
- Gillis, C.N.—Inactivation of norepinephrine released by electrical stimulation of rabbit aorta in a gaseous medium. In: *Proc. Symp. Physiol. Pharmacol. Vasc. Neuroeffector Systems.* (Bevan, Furchgott, Maxwell and Somlyo, eds.); pp 47-52. Basel: Karger, 1971.
- Graefe, K.-H., Stefano, F.J.E. and Langer, S.Z.—Preferential metabolism of (-)- ^3H -norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 1147-1160 (1973).
- Graefe, K.-H., Stefano, F.J.E. and Langer, S.Z.—Stereoselectivity in the metabolism of ^3H -noradrenaline during uptake into and efflux from the isolated rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **299**: 225-238 (1977).
- Graefe, K.-H. and Trendelenburg, U.—The effect of hydrocortisone on the sensitivity of the isolated nictitating membrane to catecholamines: relationship to extra-neuronal uptake and metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **286**: 1-48 (1974).
- Guimarães, S.—The slope of cumulative and non-cumulative dose-

- response curves for noradrenaline and isoprenaline. *Eur. J. Pharmacol.* **17**: 44-49 (1972).
- Guimarães, S., Azevedo, I., Cardoso, W. and Oliveira, M.C. — Relation between the amount of smooth muscle of venous tissue and the degree of super-sensitivity to isoprenaline caused by inhibition of catechol-O-methyl transferase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **286**: 401-412 (1975).
- Guimarães, S. and Brandão, F. — The role of monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase in normal and denervated preparations. Abstracts of Fifth International Cong. Pharmacol. (S. Francisco) 1972.
- Guimarães, S. and Brandão, F. — Comparison between the effects produced by chronic denervation and by cocaine on the sensitivity to, and on the disposition of, noradrenaline in isolated spleen strips. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **227**: 163-174 (1973).
- Guimarães, S. and Osswald, W. — Adrenergic receptors in the veins of the dog. *Eur. J. Pharmacol.* **5**: 133-140 (1969).
- Guimarães, S., Osswald, W., Cardoso, W. and Branco, D. — The effects of cocaine and denervation on the sensitivity to noradrenaline, its uptake and termination of its action in isolated venous tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **271**: 262-273 (1971).
- Guimarães, S. and Paiva, M. Q. — The role played by the extraneuronal system in the disposition of noradrenaline and adrenaline in vessels. *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.* **296**: 279-287 (1977).
- Haefely, W., Hüerlimann, A. and Thoenen, H. — A quantitative study of the effect of cocaine on the response of the cat nictitating membrane to nerve stimulation and to injected noradrenaline. *Brit. J. Pharmacol.* **22**: 5-21 (1964).
- Haeusler, G., Haefely, W. und Hüerlimann, A. Zum mechanismus der adrenerg blockierenden Wirkung von Bretylium und Guanethin. *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.* **264**: 241-243 (1969).
- Häggendal, J. — Some further aspects on the release of the adrenergic transmitter. In: *New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines* (H.J. Schumann and G. Kronenberg, eds) pp. 100-109. Berlin-Heideleberg-New York: Springer, 1970.

- Häggendal, J. and Malmfors, T. — The effect of nerve stimulation on the uptake of noradrenaline into the adrenergic nerve terminals. *Acta physiol. scand.* **75**: 28-32 (1969).
- Henseling, M., Eckert, E., Graefe, K.-H., Trendelenburg, U. — Differences in retention and efflux of ^3H -DOMA (dihydroxymandelic acid) and ^3H -DOPEG (dihydroxy-phenylglycol) during washout of rabbit aortic strips preloaded with ^3H -(\pm) noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **279**: R 16 (1973).
- Henseling, M., Eckert, E. and Trendelenburg, U. — The distribution of ^3H (\pm) noradrenaline in rabbit aortic strips after inhibition of the noradrenaline-metabolizing enzymes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **292**: 205-217 (1976).
- Henseling, M., Graefe, K.-H. and Trendelenburg, U. — The rate constants for the efflux of the metabolites of noradrenaline from rabbit aortic strips. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **302**: 207-215 (1978).
- Hertting, G., and Axelrod, J. — Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve endings. *Nature* **192**: 172-173 (1961).
- Hertting, G., Axelrod, J. and Whitby, L. G. — Effect of drugs on the uptake and metabolism of H^3 -norepineprine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **134**: 146-153 (1961).
- Holbach, H.-J., Löffelholz, K. — Differences between noradrenaline release and enhancement of noradrenaline efflux evoked by DMPP in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **287**: R6 (1975).
- Hughes, J. — Evaluation of mechanisms controlling the release and inactivation of the adrenergic transmitter in the rabbit portal vein and vas deferens. *Brit. J. Pharmacol.* **44**: 472-491 (1972).
- Hughes, J. — Differential labelling of intraneuronal noradrenaline stores with different concentrations of (-)- ^3H -noradrenaline. *Brit. J. Pharmacol.* **47**: 428-430 (1973).
- Hughes, J., Roth, R.H. — Variation in noradrenaline output with changes in stimulus frequency and train length: role of different noradrenaline pools. *Brit. J. Pharmacol.* **51**: 373-381 (1974).
- Hukovic, S. and Muscholl, E. — Die Noradrenalin-Abgabe aus dem isolierten Kaninchenherzen bei sympathischer Nervenreizung und ihre pharmakologische Beeinflussung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **244**: 81-96 (1962).
- Iversen, L.L. — The uptake of catecholamines at high perfusion con-

- centrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Brit. J. Pharmacol.* **25**: 18-33 (1965).
- Iversen, L.L. — Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission — Third Gaddum Memorial Lecture. *Brit. J. Pharmacol.* **41**: 571-591 (1971).
- Iversen, L.L. and Salt, J. — Inhibition of catecholamine «uptake» by steroids in the isolated rat heart. *Brit. J. Pharmacol.* **40**: 528-530 (1970).
- Jarrott, B. — Occurrence and properties of monoamine oxidase in adrenergic neurons. *J. Neurochem.* **18**: 7-16 (1971 a).
- Jarrott, B. — Occurrence and properties of catechol-O-methyl transferase in adrenergic neurons. *J. Neurochem.* **18**: 17-27 (1971 b).
- Jarrott, B., Langer, S.Z. — Changes in monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities after denervation of the nictitating membrane of the cat. *J. Physiol. (Lond.)* **212**: 549-559 (1971).
- Kalsner, S. — Differential activation of the inner and outer muscle cell layer of the rabbit ear artery. *Eur. J. Pharmacol.* **20**: 122-124 (1972).
- Kalsner, S. — Role of extraneuronal mechanisms in the termination of contractile responses to amines in the vascular tissue. *Brit. J. Pharmacol.* **53**: 267-277 (1975).
- Kalsner, S. — The lack of effect of oxytetracycline on responses to sympathetic nerve stimulation and catecholamines in vascular tissues. *Brit. J. Pharmacol.* **58**: 261-266 (1976).
- Kalsner, S. and Nickerson, M. — A method for the study of mechanisms of drug disposition in smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **46**: 719-730 (1968 a).
- Kalsner, S. and Nickerson, M. — Disposition of phenylephrine in vascular tissue, determined by the oil-immersion technique. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **163**: 1-10 (1968 b).
- Kalsner, S. and Nickerson, M. — Disposition of norepinephrine and epinephrine in vascular tissue, determined by the technique of oil immersion. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **165**: 152-165 (1969 a).
- Kalsner, S. and Nickerson, M. — Mechanism of cocaine potentiation of responses to amines. *Brit. J. Pharmacol.* **35**: 428-439 (1969 b).
- Kalsner, S. and Nickerson, M. — Effect of reserpine on the disposition of sympathomimetic amines in vascular tissue. *Brit. J. Pharmacol.* **35**: 394-405 (1969 c).
- Kasuya, Y. and Goto, K. — The mechanism of supersensitivity to nore-

- pinephrine induced by cocaine in rat isolated vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **4**: 355-362 (1968).
- Kaumann, A.J. — Adrenergic receptors in heart muscle: relation among factors influencing the sensitivity of the cat papillary muscle to catecholamines. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **173**: 383-398 (1970).
- Kopin, I.J., Hertting, G. and Gordon, E.K. — Fate of norepinephrine- H^3 in the isolated perfused rat heart. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **138**: 34-40 (1962).
- Langer, S.Z. — The metabolism of H^3 -noradrenaline released by electrical stimulation from the isolated nictitating membrane of the cat and from the vas deferens of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* **208**: 515-546 (1970).
- Langer, S.Z. — Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release — Sixth Gaddum Memorial Lecture. *Brit. J. Pharmacol.* **60**: 481-497 (1977).
- Langer, S.Z. and Enero, M. — The potentiation of responses to adrenergic nerve stimulation in the presence of cocaine: its relationship to the metabolic fate of released norepinephrine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **191**: 431-443 (1974).
- Langer, S.Z., Farah, M.B., Luchelli-Fortis, M.A., Adler-Graschinsky, E. and Filinger, E.J. — Metabolism of endogenous noradrenaline. *Proceedings of Sixth International Congress of Pharmacology, (Helsinki) Vol. 2*: 17-31 (1975).
- Langer, S.Z. and Pinto, E.B. — Possible involvement of a transmitter different from norepinephrine in the residual responses to nerve stimulation of the cat nictitating membrane after pretreatment with reserpine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **196**: 697-713 (1976).
- Langer, S.Z., Stefano, F.J.E., Enero, M.A. — Pre- and postsynaptic origin of the norepinephrine metabolites formed during transmitter release elicited by nerve stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **183**: 90-102 (1972).
- Lee, F.L. — The relation between norepinephrine content and response to sympathetic nerve stimulation of various organs of cats pretreated with reserpine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **156**: 137-141 (1967).
- Levin, J.A. — The uptake and metabolism of 3H -l and 3H -dl-norepinephrine by intact rabbit aorta and by isolated adventitia and media. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **190**: 210-226 (1974).
- Levin, J.A. and Wilson, S.E. — The effect of monoamine oxidase

- and catechol-O-methyl transferase inhibitors on the accumulation and metabolism of (1-³H) norepinephrine by the adventitia and media of rabbit aorta. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **203**: 598-609 (1977).
- Lindmar, R. and Löffelholz, K. — Neuronal and extra-neuronal uptake and efflux of catecholamines in the isolated rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **284**: 63-92 (1974).
- Loewi, O. — Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Arch. Ges. Physiol.* **189**: 239-242 (1921). *
- Lorenz, R.R. and Vanhoutte, P.M. — Inhibition of adrenergic neurotransmission in isolated veins of the dog by potassium ions. *J. Physiol. (Lond.)* **246**: 479-509 (1975).
- Luchelli-Fortis, M.A. and Langer, S.Z. — Selective inhibition by hydrocortisone of ³H-normetanephrine formation during ³H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **287**: 261-275 (1975).
- MacMillan, W.H. — A hypothesis concerning the effects of cocaine on the action of sympathomimetic amines. *Brit. J. Pharmacol.* **14**: 385-391 (1959).
- Maxwell, R.A., Plummer, A.J., Schneider, F., Povalski, H. and Daniel, A.I. — Pharmacology of (2-(octahydro-1-azocinyl)-ethyl) Guanidine sulfate (SU-5864). *J. Pharmacol. exp. Ther.* **129**: 22-29 (1960).
- McCulloch, M.W., Bevan, J.A. and Su, C. — Effects of phenoxybenzamine and norepinephrine on transmitter release in the pulmonary artery of the rabbit. *Blood Vessels*, **12**: 122-133 (1975).
- Paiva, M.Q. and Guimarães, S. — A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **303**: 221-228 (1978).
- Palaic, D. and Panisset, J.C. — Inhibition of the noradrenaline uptake in guinea-pig vas deferens by continuous nerve stimulation. *J. Pharm. Pharmacol.* **21**: 328-329 (1969).
- Palmer, J.F. — The use β -thiopropionic acid for the analysis of adrenaline and noradrenaline in plasma by fluorimetric trihydroxindol method. *W. Indian. Med. J.* **13**: 55-65 (1964).
- Paterson, G. — The response to transmural stimulation of isolated arterial strips and its modification by drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **17**: 341-349 (1965).

- Paton, W.D.M. — Discussion. In: Ciba Foundation Symposium (J.R. Vane, G.E.W. Walstenholme and M. O'Connor, eds), pp. 124-127. London: Churchill, 1960.
- Peart, W.S. — The nature of splenic sympathin. *J. Physiol. (Lond.)* **108**: 491-501 (1949).
- Powis, G. — Binding of catecholamines to connective tissue and the effect upon the responses of blood vessels to noradrenaline and to nerve stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* **234**: 145-162 (1973).
- Schrold, J., Nedergaard, O.A. — Neuronal selectivity of ^3H -noradrenaline outflow induced by electrical-field stimulation of an isolated blood vessel. *Blood Vessels* **12**: 374-375 (1975).
- Schrold, J. and Nedergaard, O.A. — ^3H -noradrenaline outflow induced from isolated adventitia and intima-media of rabbit aorta by electrical field stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* **39**: 423-427 (1976).
- Schrold, J. and Nedergaard, O.A. — Neuronal and extraneuronal outflow of ^3H -noradrenaline induced by electrical-field stimulation of an isolated blood vessel. *Acta physiol. scand.* **101**: 129-143 (1977).
- Starke, K. — Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptors systems. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **77**: 1-124 (1977).
- Stark, K., Wagner, J., Schumann, H.J. — Adrenergic neuron blockade by clonidine: comparison with guanethidine and local anesthetics. *Arch. int. Pharmacodyn.* **195**: 291-308 (1972).
- Steinsland, O.S., Furchgott, R.F. and Kirpekar, S.M. — Inhibition of adrenergic neurotransmission by parasympathomimetics in the rabbit ear artery. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **184**: 346-356 (1973).
- Stitzel, R. — The biological fate of reserpine. *Pharmacol. Rev.* **28**: 179-205 (1976).
- Stolz, F. — Über adrenalin und alkylaminoacetobrenz-catechin. *Ber. Deut. Chem. Ges.* **37**: 4149-4154 (1904). *
- Strömblad, B.C.R. and Nickerson, M. — Accumulation of epinephrine and norepinephrine by rat tissues. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **134**: 154-159 (1961).
- Su, C., Bevan, J.A. — The release of ^3H -norepinephrine in arterial strips studied by the techniques of superfusion and transmural stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **172**: 62-68 (1970).
- Tarlov, S.R. and Langer, S.Z. — The fate of ^3H -norepinephrine released from isolated atria and vas-deferens: effect of field stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **179**: 186-197 (1971).

- Thoenen, H. — Surgical, immunological and chemical sympathectomy: their application in the investigation of the physiology and pharmacology of the sympathetic nervous system. In: *Handb. der experimentellen Pharmakologie* (H. Blaschko and E. Muscholl, eds.), Vol. XXXIII, pp. 813-844. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972.
- Thoenen, H., Hüerlimann, A.F., Haefely, W. — The effect of sympathetic nerve stimulation on volume, vascular resistance, and norepinephrine output in the isolated perfused spleen of the cat, and its modification by cocaine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **143**: 57-63 (1964).
- Török, J. and Bevan, J. — Entry of ^3H -norepinephrine into the arterial wall. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **177**: 613-620 (1971).
- Trendelenburg, U. — The supersensitivity caused by cocaine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **125**: 55-65 (1959).
- Trendelenburg, U. — Supersensitivity to norepinephrine induced by continuous nerve stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **151**: 95-102 (1966).
- Trendelenburg, U. — Factors influencing the concentration of catecholamines at the receptors. In: *Handb. der experimentellen Pharmakologie* (H. Blaschko and E. Muscholl, eds), Vol. XXXIII, pp. 726-761. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972.
- Trendelenburg, U. — The relaxation of rabbit aortic strips after a preceding exposure to sympathomimetic amines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **281**: 13-46 (1974).
- Uhlig, W., Fiebig, R. and Trendelenburg, U. — The effect of corticosterone on the fluxes of ^3H -normetanephrine into and out of the extra-neuronal compartments of the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **295**: 45-50 (1976).
- Urquilla, P.R., Stitzel, R.E. and Fleming, W.W. — The antagonism of phentolamine against exogenously administered and endogenous released norepinephrine in rabbit aortic strips. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **172**: 310-319 (1970).
- Van Orden, L.S., III, Bensch, K.G., Langer, S.Z., and Trendelenburg, U. — Histochemical and fine structural aspects of the onset of denervation supersensitivity in the nictitating membrane of the spinal cat. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **157**: 274-283 (1967).
- Verity, M.A., Bevan, J.A. — Fine structural study of the terminal effector plexus, neuromuscular and intermuscular relationships in the pulmonary artery. *J. Anat. (Lond.)* **103**: 49-63 (1968).

- Wyse, D.G. — On the role of neuronal uptake (uptake₁) in the inactivation of noradrenaline by aortic strips. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **52**: 1102-1109 (1974).
- Wyse, D.G. — Inactivation of neuronal and exogenous norepinephrine in rat tail artery studied by the oil immersion technique. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **198**: 102-121 (1976).
- Wyse, D.G. and Beck, L. — Phenoxybenzamine blockade of neuronal and exogenous noradrenaline. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**: 478-481 (1972).
- Wyse, D.G. and Beck, L. — More on blockade of neuronal and exogenous noradrenaline in vascular tissue. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**: 837-840 (1973).
- Yates, C.M. and Gillis, C.N. — The response of rabbit vascular tissue to electrical and drug stimulation. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **140**: 52-59 (1963).
- Zeller, E.A., Barsky, J., Berman, E.R., Fouts, J.R. — Action of isonicotinic acid hydrazide and related compounds on enzymes of brain and other tissues. *J. Lab. clin. Med.* **40**: 965-966 (1952).

* Trabalho citado em Geffen, L.B. and Livett, B.G. — Synaptic Vesicles in Sympathetic neurons. *Physiol. Rev.* **51**: 98-157 (1971).

TIPOGRAFIA DO CARVALHIDO
Rua de Francos 445 . Tel. 61601
4200 PORTO