

António Carlos Megre Eugénio Sarmiento

**MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA
BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR
MECANISMOS ADRENÉRGICOS CENTRAIS**

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

Porto, 1992

António Carlos Megre Eugénio Sarmento

**MODULAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA
BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA POR
MECANISMOS ADRENÉRGICOS CENTRAIS**

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

Porto, 1992

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

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

Artº 48º, § 3º

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

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efectivos

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

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

Professores Jubilados

Doutor Abel José da Costa Sampaio Tavares

Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos

Doutor António Fernandes da Fonseca

Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida

Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima

Doutor Casimiro Águeda de Azevedo

Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira

Doutor Francisco de Sousa Lé

Doutor João Costa

Doutor Joaquim José Monteiro Bastos

Doutor José Ruiz de Almeida Garrett

Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz

Doutor Manuel José Bragança Tender

Doutores Honorários

Doutor Maurice Mercadier

Doutor Ullrich Georg Trendelenburg

Doutor Victor António Augusto de Sá Machado

Aos Meus Pais

À Minha Mulher

Às Minhas Filhas

Aos Professores

Walter Friedrich Alfred Osswald

Maria Isabel Amorim Azevedo

No final do ano de 1987 comecei o trabalho experimental que conduziu à elaboração da dissertação de doutoramento.

No entanto o acontecimento decisivo para levar a cabo este empreendimento ocorreu uns anos antes, quando, ainda no sexto ano do meu curso e poucos meses após ter iniciado as minhas funções de monitor de Terapêutica Geral, a Prof. Doutora Isabel Azevedo me transmitiu a proposta do Prof. Doutor Walter Osswald, e também sua, de passar a colaborar na actividade de investigação, trabalhando num projecto sob orientação da Prof. Doutora Isabel Azevedo.

Ainda hoje, ao relembrar esse dia, volto a experimentar, em parte, a sensação que então me invadiu. Senti uma imensa alegria e gratidão misturadas com uma certa vaidade, mas também com algum receio de desiludir quem tanta confiança depositara em mim. Pareceu-me um sonho.

Seguiram-se tempos felizes e proveitosos. Tive a sorte excepcional de encontrar como companheiros de trabalho pessoas que, ao fim de algum tempo, estavam entre aquelas que considerava como sendo os meus amigos.

Permanecer no Laboratório de Farmacologia tem sido desde essa altura, para mim, muito mais que uma honra ou privilégio profissional, um verdadeiro prazer.

Quase sem dar pela passagem do tempo, fui aprendendo algumas das técnicas utilizadas na investigação fisio-farmacológica levada a cabo no Laboratório de Farmacologia. Foram também anos de maturação. Não só adquiri conhecimentos importantes como, e principalmente, desenvolvi alguma capacidade de encarar, sob uma perspectiva científica, algumas das questões que se me deparam na minha actividade de médico, quer clínica quer académica.

O início do Internato de Especialidade de Doenças Infecciosas foi a causa próxima do nascimento do projecto que culminou no trabalho que agora apresento.

As implicações fisiopatológicas e terapêuticas da barreira hematoencefálica nas infecções do sistema nervoso central, patologia tão frequente na rotina do meu trabalho de enfermagem do Serviço de Doenças Infecciosas, despertaram vivamente o meu interesse. Comecei uma pesquisa bibliográfica sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Depressa me apercebi de que a permeabilidade desta barreira não era estática e de que, de acordo com alguns autores, poderá estar sujeita à influência de mecanismos neuro-humorais entre os quais os adrenérgicos.

Mecanismos adrenérgicos nos vasos sanguíneos e, ulteriormente, patologia do sistema nervoso central, faziam parte do meu trabalho do dia a dia.

A minha vivência como “farmacologista” associada à minha actividade de “infecciólogista” poderia dar-me algumas condições para o estudo de uma questão que me entusiasmava: a das possíveis implicações de mecanismos adrenérgicos centrais no controlo da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Por outro lado, a minha prática clínica hospitalar poderia contribuir para a minha formação como farmacologista e, particularmente, como docente de Terapêutica Geral.

Pensei pois que não estava perante uma ambivalência, mas bem pelo contrário, a simbiose da farmacologia e da infecciologia poderia, nestas circunstâncias, ser uma realidade.

Entusiasmadamente, elaborei um projecto de trabalho.

A total disponibilidade e interesse com que os Prof. Doutor Walter Osswald e Prof. Doutora Isabel Azevedo acolheram e apoiaram a minha ideia foram para mim a quase certeza de que ia levar o meu projecto a bom termo.

Cheguei, sem dúvida, à parte para mim mais difícil da elaboração deste texto: o exprimir, por escrito, a minha gratidão a quem tanto me deu. Nem por palavras o conseguiria fazer. Espero demonstrá-la, embora com as limitações que me caracterizam, pelas minhas atitudes ao longo da vida.

É-me difícil agradecer ao Prof. Doutor Walter Osswald sem o fazer em simultâneo à Prof. Doutora Isabel Azevedo. A eles devo tudo o que de bom possa ter tido a minha carreira profissional no Laboratório de Farmacologia. No entanto gostaria de deixar muito bem vincado que, por maior que tenha sido a ajuda que me deram no campo profissional, e esta foi realmente inexcelsível, o meu maior agradecimento é pela amizade que me dispensaram e através dela, pelos valores que me transmitiram e que tanto influenciaram aquilo que de mais importante está contido no meu projecto pessoal de vida.

O Prof. Doutor Walter Osswald, ao longo destes anos em que, de forma constante e paciente, orientou o meu trabalho, ensinou-me e corrigiu-me, conseguindo, simultaneamente, inculcar-me confiança. Esta maneira de estar foi mais uma das suas lições, talvez das mais importantes.

Embora a lei não contemple a possibilidade do doutorando ter dois orientadores, tive no entanto a sorte de, na prática, os ter tido. Não houve dia de presença no Laboratório em que não conversasse com a Prof. Doutora Isabel Azevedo àcerca do nosso trabalho. Deste seu interesse profundo e permanente resultaram, além dos passos e de algumas das hipóteses interpretativas que considero mais importantes neste estudo, grande parte do entusiasmo que hoje sinto pela investigação e muito particularmente pela que se refere a mecanismos adrenérgicos e barreira hematoencefálica.

Gostaria de lembrar também o Prof. Doutor José Garrett um dos principais criadores da “escola de humanidade” que é o Laboratório de Farmacologia e a quem muito devem todos os que nele agora trabalham.

Quando manifestei os meus anseios profissionais ao Prof. Doutor Henrique Lecour deparei com uma atitude de total compreensão e apoio. Esta atitude manteve-a sempre desde então, inteirando-se regularmente da evolução do meu trabalho. Ao Prof. Doutor Henrique Lecour devo também a sugestão do tema para a minha prova complementar e ainda o facto de me ter facultado o acesso a todo material necessário à sua execução. As suas

atitudes são uma demonstração constante da amizade com que me tem honrado.

Encontrei nos Prof. Doutores Rodrigues Pereira, Serafim Guimães, Jorge Tavares e Fernando Brandão mestres sempre disponíveis para me ouvirem e ajudarem, o que muito contribuiu para a minha formação.

Para além da Prof. Doutora Isabel Azevedo, tiveram a paciência de me ensinar normas básicas e algumas técnicas de trabalho laboratorial a Doutora Maria Quitéria Paiva, a Sr^a D. Maria Luisa Vasques e a Sr^a D. Domingas Branco às quais manifesto a minha gratidão.

Agradeço à Prof. Doutora Deolinda Lima a forma tão pronta como em tantas ocasiões me ajudou. A ela devo, entre outras, a aprendizagem da técnica de estereotaxia.

A sensação de bem estar que experimento diariamente no Laboratório muito se deve à amizade, ajuda e disponibilidade constante dos Prof. Doutores Daniel Moura, Patrício Soares da Silva, Jorge Polónia e Maria Helena Fernandes, dos Doutores José Guilherme Monteiro e Maria Quitéria Paiva e dos Drs. Afonso Esteves, Alberto Mota, António Dinis, Alexandra Matias, António Albino Teixeira, Carlos Amaro Neves, Domingos Araújo, Fátima Martel, Manuel Matos, Manuel Pestana, Manuel Vaz da Silva, Nuno Borges, Pedro Nunes, Rosa Begonha e Tiago Guimarães.

Gostaria de salientar o meu agradecimento ao Dr. Nuno Borges, amigo com quem nos últimos dois anos trabalhei e que tanto me ajudou. Recordo as tardes de trabalho experimental no Laboratório e as longas conversas que então tivemos e que foram para mim fonte de enriquecimento humano e científico.

À Sr^a D. Maria Luísa Vasques agradeço a ajuda técnica sempre tão competente. A boa vontade e entusiasmo, que demonstrou quando solicitada a colaborar na execução de trabalhos experimentais, serão sempre para mim uma grata recordação.

A prontidão e perfeição com que as Senhoras D. Manuela Moura, D. Prazeres Cleto e D. Paula Serrão me ajudaram no trabalho de laboratório é motivo do meu reconhecimento.

Às Senhoras D. Aida Camarinha e D. Eva Abrantes e ao Senhor José Martins agradeço o trabalho competente de secretariado.

Aos Senhores Aldovino Sousa, Abílio Nunes, D. Mabilde Gomes, D. Maria Irene e D. Deolinda Martins manifesto o meu agradecimento, pois, pelo desempenho correcto das suas funções, tornaram mais fácil e mais agradável o trabalho no Laboratório de Farmacologia.

Aos companheiros do Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de S. João, médicos, enfermeiros e pessoal administrativo, agradeço a forma interessada com que sempre seguiram o evoluir do meu trabalho.

Ao colega e amigo, Dr. Luís Almeida, agradeço toda a ajuda e facilidades concedidas na preparação gráfica desta dissertação.

Finalizo com o testemunho de gratidão a quem para mim, de forma mais importante, tornou possível e é simultaneamente razão de ser deste trabalho: os meus pais, a minha mulher, as minhas filhas. A eles dedico esta dissertação.

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

- I – Sarmiento A, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1988) Increase in blood-brain barrier permeability due to amitriptyline is accompanied by augmented pinocytosis in cerebral capillaries. *British J Pharmacol*, 95:838P
- II – Sarmiento A, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1989) Increase in blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein induced by amitriptyline. *J Neurochem*, 52:S119C
- III – Sarmiento A, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1990) Alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina- I^{131} induzidas pela amitriptilina. *Arq Med*, 3:233-235
- IV – Sarmiento A, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1990) Morphological alterations induced by amitriptyline on the rat blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol*, 176:69-74
- V – Sarmiento A, Borges N, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1990) Effects of intracerebroventricular noradrenaline on the rat blood-brain barrier morphology and permeability to sodium fluorescein. *J Autonom Pharmacol*, 10:50
- VI – Sarmiento A, Borges N, Azevedo I (1991) Adrenergic influences on the control of blood-brain barrier permeability. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*, 343:633-637
- VII – Sarmiento A, Borges N, Lima D (1992) Influence of electrical stimulation of *locus coeruleus* on the rat blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein. Enviado para publicação.

INDICE

INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	31
Introdução	31
I - Método de estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica	31
II - Estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina-¹³¹I	34
III - Estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica	34
1. Estudo do efeito da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica	34
2. Estudo dos efeitos da administração intracerebroventricular de fármacos na permeabilidade da barreira hematoencefálica	35
3. Estudo dos efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> na permeabilidade da barreira hematoencefálica	35
4. Doseamento da fluoresceína sódica	36
IV - Injecção estereotáxica intracerebroventricular	39
V - Estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i>	40
VI - Estudo morfológico ultrastrutural	41
1. Estudo morfológico ultrastrutural dos efeitos da amitriptilina na barreira hematoencefálica	41
2. Estudo morfológico ultrastrutural dos efeitos de administração intracerebroventricular de noradrenalina e de isoprenalina na barreira hematoencefálica	41
3. Estudo morfológico ultrastrutural dos efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> na barreira hematoencefálica	42
4. Fixador de Karnovsky	42
5. Processamento para microscopia electrónica	42
6. Microscópio electrónico utilizado	43
7. Quantificação da pinocitose	43
VII - Perfusão vascular cerebral	44
VIII - Medição da pressão arterial	44
IX - Ventilação controlada	45
X - Medição da PaO₂, PaCO₂ e pH no sangue arterial	45
XI - Descrição e análise estatística dos resultados	45
XII - Fármacos e outras substâncias utilizadas	46

RESULTADOS	47
I - Efeitos da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica e à albumina- I^{131}	47
1. Fluoresceína sódica	47
2. Albumina- I^{131}	48
II - Efeitos da amitriptilina na morfologia ultrastrutural da barreira hematoencefálica	48
III - Efeitos da amitriptilina na pressão arterial, PaO_2 , $PaCO_2$ e pH	51
IV - Efeitos da administração intracerebroventricular de aminas simpaticomiméticas sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica	51
V - Efeitos da injeção intracerebroventricular de 150 μ g de noradrenalina na pressão arterial, PaO_2 , $PaCO_2$ e pH	55
VI - Efeitos da injeção intracerebroventricular de prostaglandina $F2\alpha$ na permeabilidade da barreira hematoencefálica	56
VII - Efeitos da fenoxibenzamina nas alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica induzidas pela noradrenalina	57
VIII - Efeitos da administração intracerebroventricular de noradrenalina com e sem administração prévia de fenoxibenzamina na morfologia ultrastrutural da barreira hematoencefálica	58
IX - Efeitos da administração intracerebroventricular de isoprenalina na morfologia ultrastrutural da barreira hematoencefálica	61
X - Efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica	63
XI - Efeitos do pindolol sobre a alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pela estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i>	65
XII - Efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> (15 Hz) sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, pH e gases de sangue	66
XIII - Efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> (15 Hz) sobre a morfologia ultrastrutural da barreira hematoencefálica	68
XIV - Controlo morfológico das injeções no ventrículo cerebral lateral direito e da colocação do eléctrodo no <i>locus coeruleus</i>	71

DISCUSSÃO	73
I - Introdução	73
II - Aspectos metodológicos gerais	73
1. Fluoresceína sódica	73
2. Método de estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica	74
3. Produto permeabilidade•superfície (PS) e fluxo sanguíneo cerebral	78
III - Discussão dos resultados	80
1. Efeitos da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica	80
2. Efeitos da administração intracerebroventricular de aminas simpaticomiméticas na permeabilidade da barreira hematoencefálica	83
3. Efeitos da estimulação eléctrica do <i>locus coeruleus</i> sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica	88
4. Estudo morfológico ultrastrutural	92
5. Possibilidade da implicação de mecanismos adrenérgicos centrais nas alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica que acompanham determinadas patologias	96
Meningite bacteriana	97
Convulsões	99
Isquemia e traumatismo cerebral	99
Hipertensão arterial	100
COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES	103
RESUMO	107
SUMMARY	109
BIBLIOGRAFIA	111

INTRODUÇÃO

No final do século dezanove, Ehrlich, um microbiologista alemão, num estudo que visava a descoberta de substâncias com efeito antimicrobiano, verificou que alguns corantes vitais administrados endovenosamente se localizavam em todos os tecidos do organismo exceptuando o sistema nervoso central (Ehrlich 1895). Esta observação, embora de enorme importância, não foi correctamente interpretada pelo seu autor que atribuiu o facto a uma ausência de afinidade dos corantes utilizados para o tecido nervoso (ver Goldstein e Betz 1986).

Foi, no entanto, a partir deste estudo que pela primeira vez se admitiu a possibilidade da existência de uma barreira entre o cérebro e o sangue. A interpretação correcta dos resultados obtidos por Ehrlich foi feita em 1913 por Goldmann, seu discípulo, ao verificar que obtinha uma coloração densa de todo o cérebro quando administrava directamente no líquor os corantes que endovenosamente não provocavam qualquer marcação do tecido nervoso (ver Goldstein e Betz 1986).

Stern e Gautier (1922a) fizeram o primeiro estudo sistemático da passagem de uma série de substâncias injectadas no sangue para o sistema nervoso central, fazendo o seu doseamento no líquor. Estes autores concluíram que o brometo, a estriçnina, a morfina, a atropina e os sais biliares passavam para o sistema nervoso central, o que não acontecia com o curare, os pigmentos biliares, o iodo, a eosina ou a fluoresceína (ver Davson 1989). Em estudo subsequente, Stern e Gautier (1922b) verificaram que só as substâncias que passavam para o sistema nervoso central tinham efeitos neurológicos. No entanto, quando injectavam intratecalmente substâncias que administradas por via endovenosa não passavam para o cérebro, os efeitos neurológicos tornavam-se evidentes. Destes estudos, Stern e Gautier concluíram que havia

uma barreira selectiva para determinadas substâncias entre o cérebro e o sangue à qual chamaram *Barrière Hématoencéphalique* (ver Davson 1989).

O carácter selectivo da barreira hematoencefálica foi muito mais tarde confirmado por Becker e Quadbeck (1952), tendo estes autores demonstrado que a principal característica determinante da capacidade de uma substância atravessar a barreira hematoencefálica e sangue-líquido cefalorraquideano é a sua lipossolubilidade (ver Davson 1989).

Actualmente, a designação de barreira hematoencefálica aplica-se a uma das interfaces sangue/sistema nervoso central: o enorme leito capilar existente no parênquima cerebral dos vertebrados. Existe outra superfície de contacto entre o sangue e o sistema nervoso central, também com características de barreira selectiva, de muito menor extensão, designada por barreira sangue-líquido cefalorraquideano e que se situa fundamentalmente a nível dos plexos coroideus/epêndima ventricular (Milhorat et al. 1973).

Após a descoberta da existência de uma barreira funcional entre o sangue e o sistema nervoso central, muitos investigadores se preocuparam com a sua identificação morfológica.

Vistos com o microscópio de luz, os capilares cerebrais são iguais aos existentes noutros órgãos, nomeadamente no músculo, sendo a única particularidade detectada a existência de uma baínha em torno dos vasos intraparenquimatosos cerebrais, constituída por uma invaginação da pia/glia (ver Carpenter e Sutin 1983). Esta observação levou a que fosse aceite o conceito de que este revestimento era o responsável pela menor permeabilidade dos vasos cerebrais em relação aos periféricos.

Foi Spatz (1934) quem primeiro pôs em causa tal conceito invocando os estudos feitos por Goldmann em 1913 que, ao mostrarem que a injeção intracerebroventricular de azul de tripano corava facilmente todo o cérebro, excluíam a hipótese de impermeabilidade da pia/glia (ver Davson 1989).

Com o desenvolvimento das técnicas morfológicas, nomeadamente de microscopia electrónica, Wolff (1963) demonstrou que os capilares cerebrais são envolvidos por uma baínha formada por prolongamentos de astrócitos que contactam com a célula endotelial. Estes prolongamentos astrocitários são revestidos por uma membrana basal, o que dá ao capilar o aspecto de um tubo envolvido por uma membrana protoplasmática. Concluiu-se, pois, a partir destas observações, que a baínha astrocitária era a base morfológica da barreira hematoencefálica.

Entretanto, Brightman (1965a, 1965b) observou que a ferritina injectada no líquor passava através dos podócitos das células da astroglia, indo localizar-se junto à membrana basal endotelial.

Por outro lado, Rodriguez (1965) verificou que os corantes amino-acridínicos coram os núcleos de todas as células do organismo exceptuando os das células do sistema nervoso central nomeadamente os núcleos do endotélio dos capilares cerebrais. No entanto, estes passam a ser corados quando a referida substância é administrada intracerebroventricularmente. Concluiu-se que a barreira hematoencefálica se localiza no lado luminal do endotélio dos capilares cerebrais.

A observação de Reese e Karnovsky (1967) de que as junções entre as células endoteliais dos capilares cerebrais são junções apertadas (tight junctions) veio reforçar a teoria da localização da barreira hematoencefálica no endotélio dos capilares cerebrais.

As células endoteliais dos capilares cerebrais têm diferenças importantes em relação às dos capilares periféricos. Ao contrário do que se passa à periferia, as células endoteliais cerebrais têm um número muito reduzido de vesículas de pinocitose (Wolff 1963; Cervós-Navarro 1963) e as camadas externas das membranas citoplasmáticas adjacentes estão intimamente fundidas (pelas junções apertadas), formando um cinto contínuo de estrutura pentalaminar em torno do vaso (Brightman e Reese 1969). O facto dos capilares cerebrais não serem fenestrados (Lee 1971) determina decisivamente a

sua baixa permeabilidade.

Para além destas características, substrato anatómico da barreira hematoencefálica, as células endoteliais dos capilares cerebrais têm outras particularidades que condicionam aspectos funcionais importantes da referida barreira.

Em 1959 e em 1961, Weil-Malherbe et al. demonstraram pela primeira vez que a adrenalina, noradrenalina, dopamina e 5-hidroxitriptamina não passavam da periferia para o sistema nervoso central. Para além de um grande número de mitocôndrias (Olendorf et al. 1977), as células endoteliais dos capilares cerebrais têm um conteúdo elevado de catecol-o-metil-transferase (COMT), monoaminoxidase (MAO) e dopa-descarboxilase (Mrsulja e Djuricic 1980; Hardebo et al. 1980). O acesso de amins periféricas ao sistema nervoso central está impedido por esta verdadeira barreira enzimática que o protege da interferência que aquelas amins teriam nos mecanismos centrais de neurotransmissão.

Em 1973 Hartman descreveu a existência de varicosidades adrenérgicas em contacto íntimo com a membrana basal de capilares cerebrais no Homem, no Rato e no Macaco. Este facto foi subsequentemente confirmado por outros autores, em estudos em que se usaram diversas técnicas (Edvinsson et al. 1973; Rennels e Nelson 1975; Swansson et al. 1977). Estas varicosidades são as terminações de axónios com origem em núcleos do sistema nervoso central, nomeadamente no *locus coeruleus* (Loizou 1969; Ungerstedt 1971; Hartman 1973), estrutura constituída quase exclusivamente por corpos celulares de neurónios noradrenérgicos (Dahlstrom e Fuxe 1964).

Raichle et al. (1975), ao demonstrarem que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à água, contribuíram para a fundamentação da hipótese de que a relação das varicosidades adrenérgicas com os capilares tem um significado funcional.

Sabe-se já da existência de receptores adrenérgicos alfa e beta no endotélio dos capilares cerebrais (Peroutka et al. 1980; Harik et al. 1980; Kobayashi

et al. 1981, 1982, 1985). Por outro lado, a destruição do *locus coeruleus* ou o tratamento crónico com reserpina provoca um aumento significativo do número de receptores adrenérgicos beta nos microvasos cerebrais (Kalaria et al. 1989), o que veio reforçar significativamente a hipótese destes serem inervados.

No entanto, o significado funcional desta inervação está ainda praticamente por esclarecer. Apesar do trabalho de Preskorn et al. (1980) demonstrando que, no Rato, a administração intraperitoneal de amitriptilina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à água, as várias revisões sobre a barreira hematoencefálica continuam quase sistematicamente a ignorar qualquer relação entre mecanismos adrenérgicos centrais e permeabilidade dos microvasos cerebrais.

Acreditando na possibilidade de podermos, de algum modo, contribuir para o esclarecimento da função da inervação adrenérgica central dos microvasos cerebrais, iniciámos o presente estudo.

A caracterização dos mecanismos envolvidos e a pesquisa de eventual tradução morfológica ultrastrutural destas interacções foram também objecto do nosso estudo.

O modelo de Preskorn et al. (1980), com uso de água tritiada como marcador da permeabilidade da barreira hematoencefálica para estudo dos efeitos da amitriptilina, não nos pareceu o mais adequado. O uso da água tritiada implica o recurso a técnicas complexas, além de ser pouco sensível e específico (Fenstermacher 1984; Rapoport 1985).

Decidimos começar por verificar se o efeito descrito pelos referidos autores em relação à permeabilidade da barreira hematoencefálica à água se verificava para moléculas de características bastante diversas: a fluoresceína sódica e a albumina. Os resultados que obtivemos mostraram que, de facto, a amitriptilina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica a estas substâncias. Tal como Preskorn et al. (1980, 1982a), inferimos provisoriamente que o efeito da amitriptilina seria mediado pelo reforço das acções da

noradrenalina, efeito bem conhecido daquele antidepressor tricíclico (Ross e Reny 1967).

Uma vez que a noradrenalina tem efeitos sobre a actividade de pinocitose no endotélio dos vasos periféricos (Azevedo et al. 1984) e sabendo-se que a quase ausência de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais é uma característica fundamental da barreira hematoencefálica (Cervós-Navarro 1963), pareceu-nos de considerar a hipótese do aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica induzido pela amitriptilina se relacionar com um aumento da pinocitose. Assim, estudámos também os efeitos da amitriptilina sobre a ultraestrutura dos capilares do córtex cerebral do Rato, tendo verificado que a única alteração ultraestrutural consistia num aumento considerável do número de vesículas de pinocitose nos animais tratados com aquele fármaco.

Tendo, através desta primeira fase do trabalho, confirmado a solidez das premissas sobre as quais assentaria o nosso projecto, passámos de imediato ao uso de meios mais directos para o estudo de mecanismos adrenérgicos centrais no controlo da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

A partir daqui o nosso trabalho teve três fases fundamentais:

- O estudo do efeito de agonistas e antagonistas adrenérgicos na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

O objectivo destes estudos era obviamente identificar o envolvimento de receptores adrenérgicos na modulação da permeabilidade daquela barreira e caracterizar o tipo de receptores envolvidos. (Os esclarecimentos provenientes deste estudo poderiam ter utilidade para a interpretação fisiopatológica de situações clínicas com alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica e permitir a sugestão de novos protocolos para a modificação daquelas situações).

- O estudo dos efeitos da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Com este modelo experimental visámos uma aproximação à hipótese das alterações induzidas pelas catecolaminas na permeabilidade da barreira

hematoencefálica terem um significado fisiológico, face à existência de inervação adrenérgica dos microvasos cerebrais a partir do *locus coeruleus*.

- A caracterização das alterações morfológicas ultraestruturais a nível do endotélio dos capilares cerebrais eventualmente induzidas pelas catecolaminas ou pela estimulação do *locus coeruleus*.

A finalidade deste estudo foi a de esclarecer quais os mecanismos envolvidos nas alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzidas pela administração de catecolaminas ou pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus*.

Na primeira fase do nosso trabalho usámos a noradrenalina, fenilefrina e isoprenalina. Procedemos à sua administração intracerebroventricular por estereotaxia, pois nenhuma delas atravessa a barreira hematoencefálica (Weil-Malherbe et al. 1959, 1961; Bertler et al. 1966; Owman e Rosengren 1967; Olendorf 1971; Hardebo et al. 1980; Mrsulja e Djuricic 1980). Na tentativa de verificarmos se o efeito destas aminas era mediado por receptores recorreremos à administração prévia de bloqueadores adrenérgicos.

Influenciados pelos resultados obtidos com o uso de bloqueadores adrenérgicos sobre os efeitos da administração de aminas simpaticomiméticas na permeabilidade e morfologia da barreira hematoencefálica, estudámos também os efeitos de bloqueadores alfa e beta nas alterações induzidas pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus*. Como já foi referido, paralelamente à avaliação dos efeitos das aminas simpaticomiméticas e da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* na permeabilidade, fizemos o estudo morfológico ultraestrutural da barreira hematoencefálica.

Tenho a noção de que fiquei aquém dos objectivos que pretendia ter alcançado. A definição de sub-tipos de receptores adrenérgicos implicados nalguns dos fenómenos por nós observados; o que se passaria com a estimulação eléctrica após destruição das estruturas adrenérgicas centrais com 6-hidroxi dopamina (6-OHDA); a avaliação de possíveis efeitos potenciadores

da estimulação eléctrica ou da noradrenalina pelo tratamento prévio com cocaína ou inibidores da MAO, são algumas das muitas questões que gostaria de ter estudado.

Mesmo considerando que a investigação científica é uma procura constante de resposta para uma nascente interminável de interrogações e portanto inesgotável, uma tarefa vasta, complexa, mas sem dúvida fundamental é a de esclarecer qual o significado, para a homeostasia, da modulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica pelos mecanismos adrenérgicos centrais.

MATERIAL E MÉTODOS

Introdução

O modelo animal que utilizámos na totalidade das experiências foi o Rato Wistar, macho (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal), de peso compreendido entre os 280 e 300 g.

Os animais foram anestesiados com o pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg de peso, administrado por via intraperitoneal (i.p.).

I - MÉTODO DE ESTUDO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

De entre os vários métodos descritos para o estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica optámos pelo método baseado num único doseamento do marcador em apenas uma amostra de sangue e de cérebro, o qual passarei a designar pela sua denominação inglesa de *single-time point analysis* (Rapoport et al. 1979), modalidade do método de “captação contínua, após a administração endovenosa de um marcador”. A sua escolha foi feita depois de uma revisão exaustiva da bibliografia existente sobre este assunto, o qual, pela sua importância, será abordado no capítulo da discussão.

A fórmula geral usada para o cálculo da permeabilidade por este processo é a seguinte:

$$K_{in} = [q(\text{tot})(T) - VB \cdot CB(T)] : \int_0^T c_p dt \text{ ou } \bar{c}_p t \quad (1)$$

K_{in} - coeficiente unidireccional de transferência para o cérebro.

$q(\text{tot})T$ - quantidade de marcador no cérebro ao fim do tempo T .

VB - volume do compartimento vascular intra-cerebral.

CB - concentração do marcador no sangue arterial.

$\int c_p dt$ - produto do integral da concentração do marcador pela derivada do tempo (desde a injeção à colheita).

$\bar{c}_p(T)$ - concentração média do marcador no sangue arterial obtido por colheita contínua, a ritmo constante, durante o tempo T.

O produto VB.CB(T) corresponde à quantidade de marcador que permaneceu no compartimento intravascular cerebral. Quando é possível a lavagem do compartimento intravascular por perfusão, este cálculo é dispensável. É, metodologicamente, correcto proceder à lavagem em situações em que o tempo usado para a captação do marcador seja muito superior ao tempo de lavagem; o ideal é que o tempo de lavagem não exceda um minuto (Bachelard et al. 1973; Smith e Rapoport 1986) e seja igual ou inferior a 5% do tempo utilizado para o processo de captação cerebral do marcador (Smith 1989). Neste caso a fórmula passará a ser:

$$K_{in} = [q_{tot}(T)] : \int c_p dt \text{ ou } \bar{c}_p(T) \quad (2)$$

Consoante o tipo de experiência efectuada, a colheita de sangue para o doseamento do marcador, a fluoresceína sódica, foi feita aos 10, 27 ou 35 minutos, após a sua administração endovenosa.

Para determinação do perfil da curva das concentrações plasmáticas da fluoresceína sódica, utilizámos quatro grupos de animais aos quais foi injectado este marcador na dose de 80 mg/kg, endovenosamente; as medições em cada um dos grupos foram efectuadas aos 5 (1º grupo), 10 (2º grupo), 27 (3º grupo) e 35 (4º grupo) minutos após a injeção de fluoresceína sódica.

A variabilidade das concentrações plasmáticas de fluoresceína sódica, nos diversos animais, obtidas ao fim dos mesmos tempos, é muito pequena (figura 1).

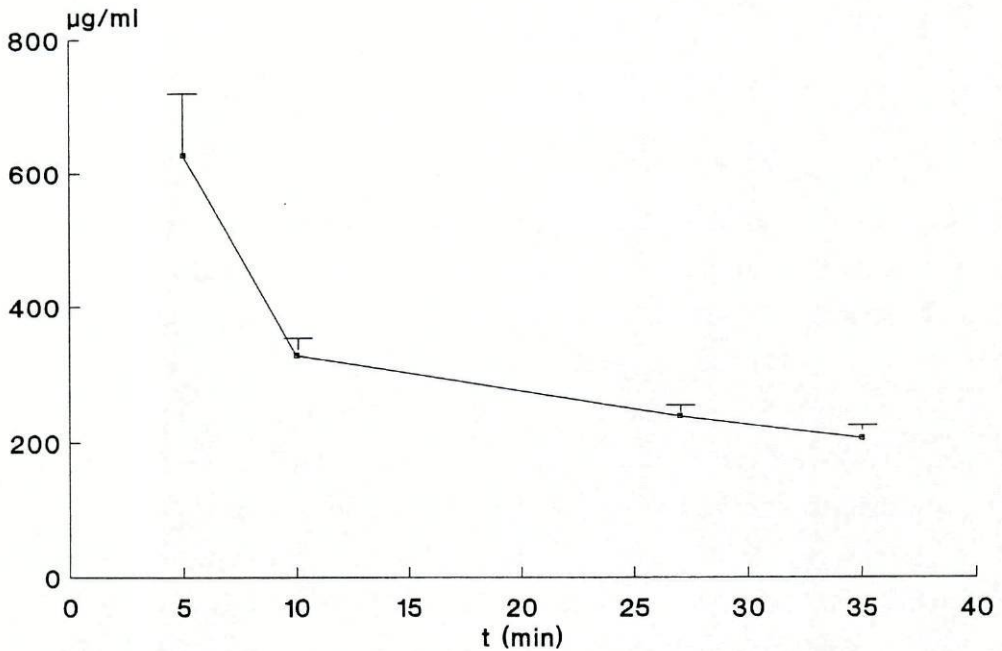


Fig. 1 – Níveis sanguíneos de fluoresceína sódica 5, 10, 27 e 35 minutos após a administração e.v. de uma dose de 80 mg/Kg. Os valores de cada ponto são expressos pela média aritmética e erro padrão dos níveis sanguíneos de fluoresceína determinados em 127 animais.

Isto significa que nos diversos animais, para doses e tempos idênticos, a área sob a curva é sensivelmente a mesma. Este facto possibilita a substituição de $\int cp \cdot dt$ (que mede a área sob a curva) ou $\bar{cp}(T)$ pela determinação da concentração do marcador ao fim de um determinado tempo- $cp(T)$. Para o cálculo da taxa de extracção cerebral da fluoresceína passámos a usar a seguinte fórmula:

$$t.\text{ext. (ou } K_{in}) = \frac{q_{tot}(T)}{cp(T)} \times 100 \quad (3)$$

II – ESTUDO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA À ALBUMINA-I¹³¹

A albumina-I¹³¹ foi um dos marcadores utilizados para estudar os efeitos da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Aos ratos anestesiados injectou-se a amitriptilina na dose de 34 mg/kg i.p.. Imediatamente a seguir administrou-se 30 µCi de albumina-I¹³¹ na veia central da cauda. Procedeu-se de seguida à traquetomia com introdução de cânula para ventilação controlada (ver IX-ventilação controlada). Trinta minutos após, colheu-se sangue do ventrículo esquerdo e sacrificaram-se os animais por decapitação e obteve-se um fragmento de córtex parietal direito.

Procedeu-se depois à medição da radioactividade nas amostras de sangue e cérebro, usando um contador de radiação gama LKB Wallac 1280-Ultrogamma, Suécia). Os resultados foram expressos em cpm/g de cérebro e de sangue, e calculou-se a taxa de extracção cerebral da albumina-I¹³¹ (eq. 3).

III – ESTUDO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATO-ENCEFÁLICA À FLUORESCEÍNA SÓDICA

A fluoresceína sódica foi utilizada em todos os estudos de permeabilidade da barreira hematoencefálica. As razões de tal escolha serão apresentadas e debatidas no capítulo da discussão.

1 - *Estudo do efeito da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica.*

Após a administração, aos animais anestesiados, de amitriptilina, 34 mg/kg, i.p. ou de igual volume do seu dissolvente aos controlos, injectou-se, na veia central da cauda, a fluoresceína sódica na dose de 80 mg/kg. Procedeu-

se de imediato à traqueotomia e introdução de canula traqueal para ventilação controlada. Dez minutos após a administração da amitriptilina obtiveram-se amostras de sangue (ventrículo esquerdo) e de cérebro, para o doseamento da fluoresceína e cálculo da respectiva taxa de extracção. Os fragmentos de cérebro (córtex parietal direito) foram colhidos imediatamente após a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral com com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) (ver VII-Perfusão Vascular Cerebral).

2 - Estudo dos efeitos da administração intracerebroventricular de fármacos na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Imediatamente após a administração intracerebroventricular (ventrículo lateral direito) da substância em estudo ou de igual volume do seu dissolvente (ver IV-Injecção Estereotáxica Intracerebroventricular), injectou-se a fluoresceína sódica, 80mg/kg, na veia jugular externa esquerda.

Procedeu-se de seguida à traqueotomia e introdução de cânula traqueal para ventilação controlada.

Dez minutos após a injecção intracerebroventricular, obtiveram-se amostras de sangue (ventrículo esquerdo) e de cérebro para o doseamento da fluoresceína e cálculo da sua taxa de extracção (ver nº 4 desta secção - Doseamento da Fluoresceína Sódica). Os fragmentos de cérebro (córtex parietal direito) foram colhidos imediatamente após a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral com NaCl a 0,9%.

3 - Estudo dos efeitos da estimulação eléctrica do locus coeruleus na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Imediatamente após a administração de fluoresceína sódica, 80mg/kg, na veia jugular externa esquerda, o animal previamente anestesiado foi colocado

no aparelho de estereotaxia. Nos animais em que se procedeu à estimulação eléctrica, esta teve início 7 minutos após a injeção de fluoresceína. Nos controlos fez-se apenas a colocação do eléctrodo no *locus coeruleus*. O tempo de permanência do eléctrodo com ou sem estimulação, foi de 20 minutos (ver V-Estimulação Eléctrica do *Locus Coeruleus*).

Terminado este período colheram-se amostras de sangue da veia jugular externa direita e fragmentos de córtex parietal direito. Os fragmentos de cérebro foram obtidos imediatamente após a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral com NaCl 0,9%.

4 - Doseamento da fluoresceína sódica.

O doseamento da fluoresceína sódica fez-se por espectrofotofluorimetria, segundo protocolo descrito por Baba et al. (1988).

Os fragmentos de cérebro foram homogeneizados em 4ml de tampão borato, 0,5 mol./l, pH 10 (para preparar 100 ml de tampão borato, a 1,52 g de ácido bórico, 1,84 g de ácido clorídrico e 22 ml de hidróxido de sódio 1N adiciona-se água bidestilada até perfazer um volume final de 100 ml). Centrifugaram-se as amostras de sangue durante 10 minutos a 1200xg, à temperatura ambiente e retiraram-se 100 µl do sobrenadante que se adicionaram a 4ml do tampão borato. Estes e os homogeneizados de cérebro foram centrifugados a 1200xg durante 10 minutos, após o que se retirou 1ml dos sobrenadantes que se adicionou a 4 ml de etanol absoluto, para precipitação de proteínas. Procedeu-se depois a nova centrifugação a 15.000xg durante 20 minutos, após a qual se doseou a fluoresceína nos sobrenadantes, utilizando um espectrofotofluorímetro Aminco Bowman, American Instrument Co., Inc. (E.U.A.).

Fez-se o varrimento da fluorescência nas amostras entre os 400 e os 570 nm, com um comprimento de onda de excitação de 330 nm.

Como se pode ver na figura 2 (curva a cheio), o pico de fluorescência para a fluoresceína sódica foi aos 520 nm. Contudo um pico derivado do ensaio a branco do tecido aparece aos 430 nm (figura 2, curva a tracejado), variando a sua altura com a amostra.

Tendo obtido a equação da curva, foi possível extrapolar a linha tracejada teoricamente correspondente à amostra sem fluoresceína e, por conseguinte, ao ensaio a branco. Optou-se por usar, em todas as amostras, como medida da fluorescência, o valor "h" acima da linha tracejada (figura 2) (Baba et al. 1988).

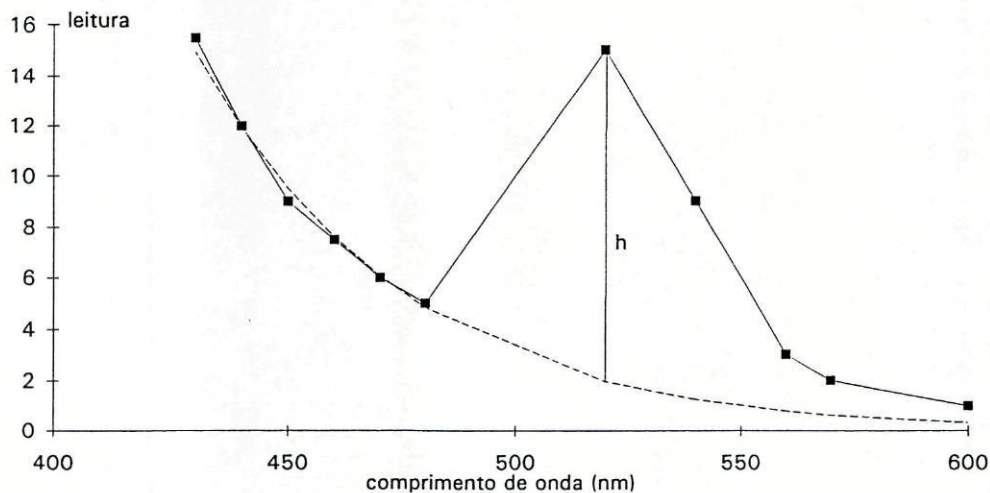


Fig. 2 - Espectro de fluorescência da fluoresceína sódica a um comprimento de onda de excitação de 330 nm. A curva a cheio corresponde a uma amostra de cérebro contendo fluoresceína e a curva a tracejado corresponde a uma amostra sem fluoresceína (ensaio a branco). O valor do segmento de recta h foi usado como medida de fluorescência.

O valor do ensaio a branco do sangue foi praticamente nulo.

A recuperação total, após adição ao homogeneizado de cérebro e às amostras de sangue de 0,5 µg de fluoresceína, foi superior a 90%. Como se pode ver na figura 3, há uma correlação linear entre a quantidade de fluoresceína e a respectiva fluorescência. Embora dispondo desta curva de calibração, fizemos em todas as experiências um padrão para o cálculo do teor de fluoresceína no cérebro e no sangue.

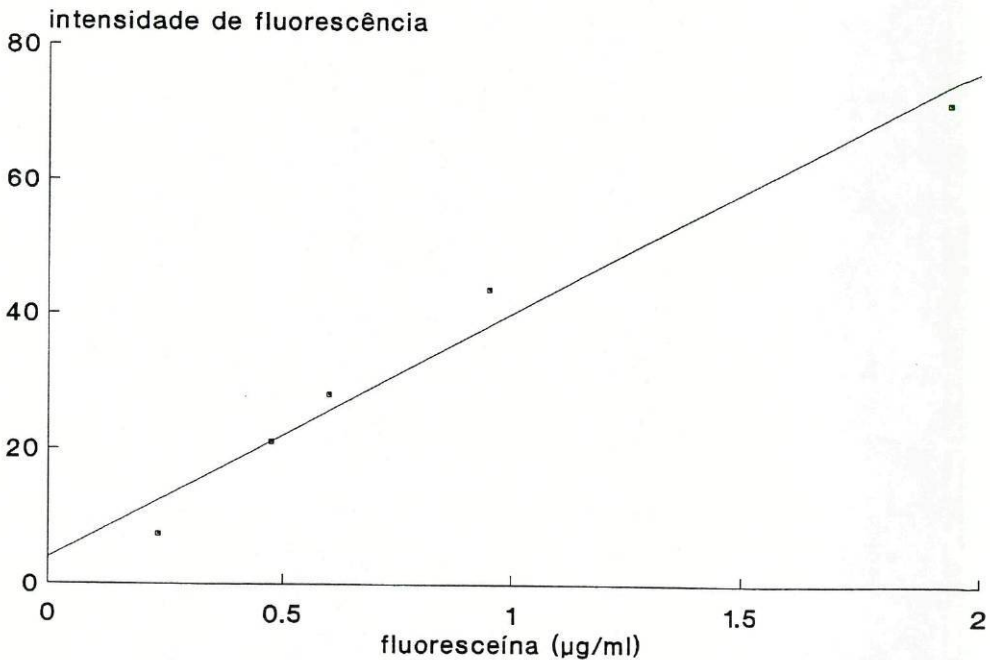


Fig. 3 - Relação entre a concentração de fluoresceína nos homogeneizados de cérebro e a respectiva intensidade de fluorescência (n=15) (r=0,992185).

IV – INJEÇÃO ESTEREOTÁXICA INTRACEREBROVENTRICULAR

Para estudar o efeito de substâncias que não atravessam a barreira hematoencefálica procedemos à sua administração directa no ventrículo cerebral lateral direito.

Por este processo foram estudados os efeitos da noradrenalina 37,5, 75, 150 e 300 µg, da fenilefrina 200, 400, 800 e 1600 µg e da isoprenalina 10 µg e ainda da prostaglandina F2α 50 e 100 µg, na permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína. Aos animais controlo fez-se a administração de volume igual, 10 µl, do dissolvente do fármaco usado.

A um grupo de animais administrou-se, 24 h antes da injeção intracerebroventricular de 150 µg de noradrenalina ou de volume igual do seu veículo, a fenoxibenzamina na dose de 25mg/kg, i.p.. Para a injeção intracerebroventricular usou-se uma mesa de estereotaxia David Kopf Instruments, (E.U.A.). As coordenadas do ventrículo lateral direito, obtidas do atlas de estereotaxia de Paxinos e Watson (1986) foram as seguintes: dorsoventral +6,4 mm, lateromedial -1,4 mm e rostrocaudal +8,2 mm.

Depois de se colocar e fixar correctamente o animal fez-se uma pequena craneotomia, com recurso a uma broca de dentista. A substância a estudar ou igual volume do seu excipiente, 10 µl, foi então injectada.

Finalizada a injeção administrou-se a fluoresceína na veia jugular externa esquerda e iniciou-se a ventilação controlada. Dez minutos após a injeção intracerebroventricular, colheu-se o sangue do ventrículo esquerdo e retirou-se uma amostra de cérebro para doseamento da fluoresceína. Os fragmentos de cérebro foram obtidos imediatamente após a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral com NaCl 0.9%. A técnica da injeção intracerebroventricular foi também usada para o estudo morfológico ultrastutural dos efeitos da noradrenalina e da isoprenalina.

O controlo da técnica de injeção intracerebroventricular foi feito pela injeção estereotáxica de 10µl de azul de toluidina a 2%, a dez animais, usando as coordenadas descritas para o ventrículo cerebral lateral direito.

V - ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA DO *LOCUS COERULEUS*

Recorrendo a um estimulador Hugo Sachs (tipo 215 II) estudámos os efeitos da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* na permeabilidade e morfologia da barreira hematoencefálica.

Após anestesia, injectou-se a fluoresceína na veia jugular externa esquerda dos animais, que foram de imediato colocados no aparelho de estereotaxia. Utilizaram-se eléctrodos bipolares, coaxiais (NE-100, Kopf Instruments, E.U.A.), que se introduziram de modo a que a ponta ficasse junto ao limite dorsal do *locus coeruleus*. As coordenadas correspondentes a esta localização, obtidos do atlas de estereotaxia de Paxinos e Watson (1986), foram os seguintes: dorsoventral -1,3 mm, lateromedial -0,8 mm e rostrocaudal +3,2 mm. Sete minutos após a injeção de fluoresceína iniciou-se a estimulação eléctrica com salvas de pulsos monofásicos de 1,5 ms de duração e intensidade de 50 µA, com períodos de 15 segundos "on" e 15 segundos "off". A duração da estimulação foi de 20 minutos. Foram feitos estudos com três frequências, 5, 15 e 30 Hz. Nos controlos os procedimentos foram os mesmos exceptuando o facto de não se ter feito a estimulação. Ao fim dos 20 minutos o animal era retirado da mesa de estereotaxia e colhia-se sangue da veia jugular externa direita e a amostra de cérebro, (após a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral com NaCl a 0,9%), para o doseamento de fluoresceína sódica.

Fez-se em todos os animais o controlo histológico do local de colocação do eléctrodo. Quando se retirou o cérebro separou-se a parte correspondente à localização do *locus coeruleus*. Esta foi imersa em formol a 10% durante três

a quatro dias e durante mais quatro dias em sacarose a 30% em tampão fosfato, 0,1 M, pH 7,4. Destes tecidos fizeram-se crio-cortes de 50 µm de espessura que foram corados com formol-tionina (Donovick 1974) e observados em microscopia de luz. A extremidade ventral do trajecto aberto pelo eléctrodo foi considerada como sendo o local em que foi efectuada a estimulação. Foram rejeitadas as experiências em que o eléctrodo não estava correctamente colocado.

VI - ESTUDO MORFOLÓGICO ULTRASTRUTURAL

Este estudo foi feito nas várias situações em que se induziram alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica. A zona observada foi o córtex parietal direito.

1 - Estudo morfológico ultraestrutural dos efeitos da amitriptilina na barreira hematoencefálica.

Anestesiaram-se os animais e injectou-se a amitriptilina i.p., 34 mg/kg. Iniciou-se a ventilação controlada. Aos 9 minutos e após abertura do tórax pinçou-se a aorta descendente e aos dez minutos iniciou-se a perfusão cerebral com 1000 ml de fixador de Karnovsky (Karnovsky 1965). No fim desta fez-se a imersão do tecido durante 120 minutos no mesmo fixador. O tecido foi subsequentemente processado para microscopia electrónica.

2 - Estudo morfológico ultraestrutural dos efeitos da administração intracerebroventricular de noradrenalina e de isoprenalina na barreira hematoencefálica.

A noradrenalina (150 µg), a isoprenalina (10 µg) ou igual volume dos

respectivos dissolventes, foram injectados por estereotaxia no ventrículo cerebral lateral direito do Rato, após anestesia. A outro grupo de animais administrou-se 24 horas antes da noradrenalina (150 µg), a fenoxibenzamina, 25 mg/kg i.p.. Terminada a injeção intracerebroventricular, iniciou-se a ventilação controlada e ao fim de 9 minutos, após abertura do tórax, pinçou-se a aorta descendente; aos dez minutos iniciou-se a perfusão cerebral com 1000ml de fixador de Karnovsky. Finda a perfusão retirou-se o cérebro que foi imerso durante duas horas no mesmo fixador. O tecido foi subsequentemente processado para microscopia electrónica.

3 - *Estudo morfológico ultraestrutural dos efeitos da estimulação eléctrica do locus coeruleus na barreira hematoencefálica.*

Introduziu-se por estereotaxia o eléctrodo no *locus coeruleus* e iniciou-se a estimulação eléctrica com corrente de 15 Hz e de restantes características conforme o descrito. Ao fim de 20 minutos de estimulação ou no caso dos controlos, sem estimulação, retirou-se o animal do aparelho de estereotaxia e, depois de pinçada a aorta descendente, iniciou-se a perfusão cerebral com o fixador de Karnovsky. Finda a perfusão retirou-se o cérebro que foi imerso durante duas horas no mesmo fixador. O tecido foi subsequentemente processado para microscopia electrónica.

4 - *Fixador de Karnovsky.*

Este fixador contém 1,25% de glutaraldeído e 1% de paraformaldeído num tampão fosfato (0,12M, pH 7,4) (Karnovsky 1965).

5 - *Processamento para microscopia electrónica*

Depois de terem sido retirados do fixador de Karnovsky, os fragmentos

de tecido foram lavados num tampão fosfato+sacarose 0,6 M, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a 4°C durante 1 h, desidratados por passagem por soluções de etanol progressivamente mais concentradas, passados por óxido de propileno e incluídos em Epon 812 (Azevedo et al. 1981).

Fizeram-se cortes ultrafinos (600 Å a 700 Å) num ultramicrotomo Ultratome III (LKB, Suécia).

Os cortes foram sequencialmente corados com acetato de uranilo (a 2%) e citrato de chumbo (a 2,6%), permanecendo durante 10 minutos em contacto com cada um dos corantes.

6 - Microscópio electrónico utilizado.

O microscópio utilizado foi um Siemens Elmiskop 101 (Siemens, Karlsruhe, Alemanha) a 80 Kv.

7 - Quantificação da pinocitose.

Todos os capilares observados foram fotografados a uma ampliação constante e contou-se o número de vesículas de pinocitose presentes nas células endoteliais dos capilares.

Só foram consideradas as vesículas intracitoplasmáticas de membrana intacta (70-180 nm); não foram consideradas as incompletamente formadas quer no lado luminal quer abluminal da membrana. A superfície das células endoteliais foi medida usando uma grelha transparente com 122 pontos que foi sobreposta às fotografias. Uma vez conhecida a área total coberta pela grelha, o número de pontos que coincidem com a célula endotelial permite calcular a área correspondente (Weibel 1973). Foi então calculada a densidade de vesículas de pinocitose- número de vesículas por μm^2 de endotélio. O observador que fez a quantificação das vesículas foi sempre o mesmo e não teve acesso ao código de identificação das microfotografias.

VII - PERFUSÃO VASCULAR CEREBRAL

A perfusão cerebral teve duas finalidades: a remoção do marcador intravascular no caso das experiências destinadas ao estudo da permeabilidade da barreira ou a fixação dos tecidos nas experiências de morfologia. Nas primeiras, a perfusão foi feita com NaCl a 0,9% durante 60 segundos (sendo o volume total perfundido de cerca de 50 ml) e nas segundas com o fixador de Karnovsky, 1000 ml. Em ambos os casos a pressão de perfusão foi de 150 cm de água.

Com o fim de evitar trombos que dificultariam a lavagem ou a fixação correcta de todo o leito vascular, antes do início da perfusão foram injectados no ventrículo esquerdo 0,2 ml de uma solução de heparina sódica a 5000 U.I./ml. A cânula foi introduzida na porção inicial da aorta através do ventrículo esquerdo. Após ser fixada nesta posição pinçou-se a aorta descendente e fez-se uma incisão na parede da aurícula direita. Só então se abriu o sistema, dando início à perfusão.

VIII - MEDIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Nas situações experimentais em que não foi necessária a colocação do animal no aparelho de estereotaxia (caso das experiências com a amitriptilina) mediu-se a pressão arterial através da colocação de um cateter heparinizado na artéria carótida comum, ligado a um manómetro de mercúrio.

A pressão arterial foi medida durante os dez minutos que precederam a administração i.p. de amitriptilina e nos dez minutos subsequentes.

Quando foram empregues técnicas de estereotaxia a pressão arterial foi medida por método esfigmomanométrico, com sensor de pulso e pressão colocado na cauda do animal, tendo sido usado um aparelho Letica Digital Pressure Meter LE 5000 Barcelona, Espanha).

As pressões foram medidas em situações de controlo em que se fazia a injeção intracerebroventricular de 10 µl de soro fisiológico ou se aplicou um eléctrodo no *locus coeruleus* não fazendo qualquer tipo de estimulação. Estes valores foram confrontados, respectivamente, com os obtidos durante os mesmos tempos, em animais aos quais se injectavam no ventrículo lateral cerebral 150 µg de noradrenalina ou em que se fazia a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* com correntes de 15 Hz.

IX - VENTILAÇÃO CONTROLADA

Nas experiências de cujo protocolo fez parte a ventilação controlada, esta fez-se após a traqueotomia e introdução de uma cânula na traqueia, através da qual foi fornecida ao animal uma mistura de oxigénio com ar, a 28%, sendo a frequência respiratória utilizada a de 60 ciclos por minuto.

X - MEDIÇÃO DA PaO₂, PaCO₂ E pH NO SANGUE ARTERIAL

A avaliação da PaO₂, PaCO₂ e pH no sangue arterial foi feita no final das experiências, nas situações de controlo e experimental. O sangue foi colhido em seringas heparinizadas. O aparelho utilizado foi um ABL 2 Acid-Base Laboratory (Dinamarca).

XI - DESCRIÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados das experiências são expressos pelas médias aritméticas e erros padrão da média.

Para dedução estatística das diferenças entre dois grupos utilizou-se o teste t de Student para valores emparelhados ou independentes. O nível de significância estatística foi colocado em 5%. Para comparações múltiplas utilizou-se o teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf 1981).

XII - FÁRMACOS E OUTRAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Albumina-I¹³¹ (Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Experimental, Sacavém, Portugal), Cloridrato de amitriptilina (Merck e Co., Inc. Rahway, N.J., EUA), Bitartarato de (-)-noradrenalina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, EUA), Cloridrato de (-)-fenilefrina (Boehringer Mannheim, Alemanha), Cloridrato de fenoxibenzamina (Smith, Klein and French, Philadelphia, Pa, E.U.A.), Fluoresceína sódica (Merck-Schuchardt, Darmstadt, Alemanha), Bitartarato de (-)-Isoprenalina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, EUA), Pentobarbital sódico (Abott, Lisboa, Portugal), Pindolol (Sandoz Pharma, Basel, Suíça), Prostaglandina F₂α (Upjohn, Kalamazoo, Mich, EUA).

RESULTADOS

I - EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA À FLUORESCEÍNA SÓDICA E À ALBUMINA- I^{131}

1 - *Fluoresceína sódica*

Estudámos o efeito da administração i.p. de amitriptilina na taxa de extracção cerebral da fluoresceína. Verificámos que, em relação ao controlo, em que a taxa de extracção foi de $0,33 \pm 0,05\%$, a amitriptilina aumentou significativamente a passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central, atingindo a taxa de extracção o valor de $0,61 \pm 0,17\%$ (tabela 1). Este efeito foi avaliado dez minutos após a administração da amitriptilina.

		Fluoresceína sódica		Albumina- I^{131}	
	<i>n</i>	<i>Taxa de extração (%)</i>	<i>n</i>	<i>Taxa de extração (%)</i>	
CONT.	5	$0,33 (\pm 0,05\%)$	6	$1,16 (\pm 0,06\%)$	
AMI.	5	$0,61 (\pm 0,17\%)*$	6	$1,40 (\pm 0,10\%)*$	

Tabela 1 - Efeito da amitriptilina (AMI), 34 mg/kg, i.p., sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica e à albumina- I^{131} . Apresentam-se as médias aritméticas e erros padrão.

* Significativamente diferente do controlo (CONT), $p < 0,05$ (t independente).

2 - Albumina-I¹³¹

Para verificarmos quais os efeitos da amitriptilina sobre moléculas de maiores dimensões, usámos como marcador a albumina-I¹³¹ (30 µCi). Calculou-se a taxa de extracção aos trinta minutos. Esta foi significativamente mais alta nos animais tratados, $1,40 \pm 0,10\%$, do que nos controlos, $1,16 \pm 0,06\%$ (tabela 1).

II – EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA MORFOLOGIA ULTRASTRUTURAL DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Com o objectivo de investigar uma possível alteração morfológica da barreira hematoencefálica, subjacente ao aumento de permeabilidade verificado quer para a fluoresceína quer para a albumina I¹³¹, procedemos ao estudo morfológico ultrastrutural do endotélio dos capilares do córtex cerebral em animais controlo e animais tratados com a amitriptilina (34 mg/kg i.p.).

O efeito da amitriptilina foi avaliado dez minutos após ter sido administrada.

Verificou-se que o número de vesículas de pinocitose foi de $1,39 \pm 0,30/\mu\text{m}^2$ nos animais controlo e de $5,55 \pm 0,70/\mu\text{m}^2$ nos tratados com a amitriptilina (figuras 4 e 5).

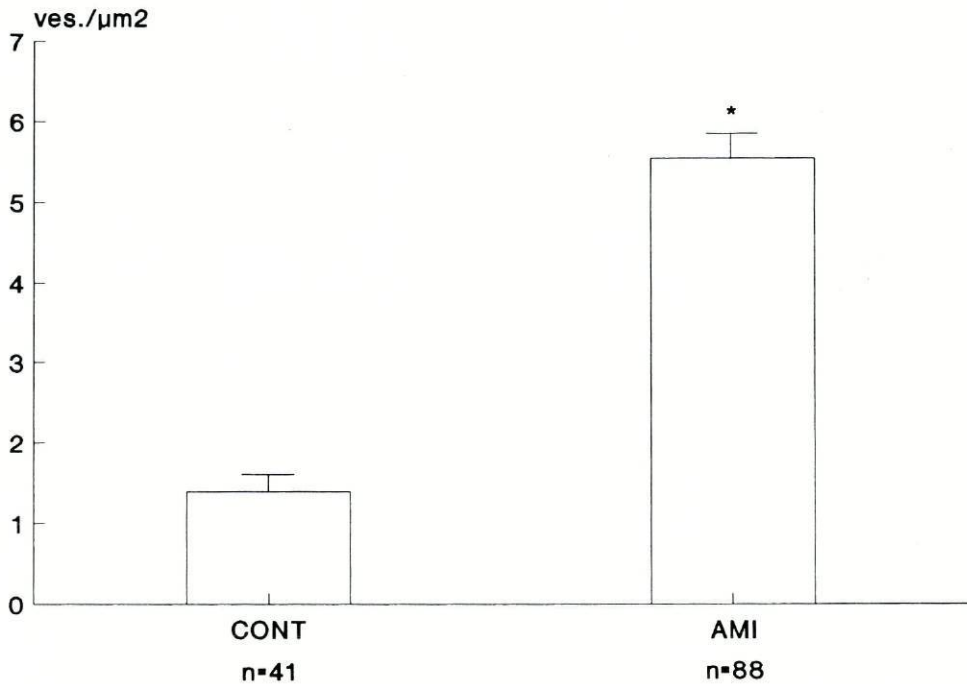


Fig. 4 - Efeito da amitriptilina (AMI), 34 mg/kg, i.p., sobre o número de vesículas de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão do número de vesículas de pinocitose quantificadas em 129 capilares de 6 ratos.

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

À excepção do número de vesículas de pinocitose, o aspecto do endotélio em ambos os grupos experimentais foi semelhante, não se tendo verificado alterações de continuidade entre células vizinhas, sendo o aspecto dos espaços interendoteliais perfeitamente normal. As junções apertadas, características do endotélio dos capilares cerebrais, estavam presentes, mantendo o aspecto habitual (figura 5).

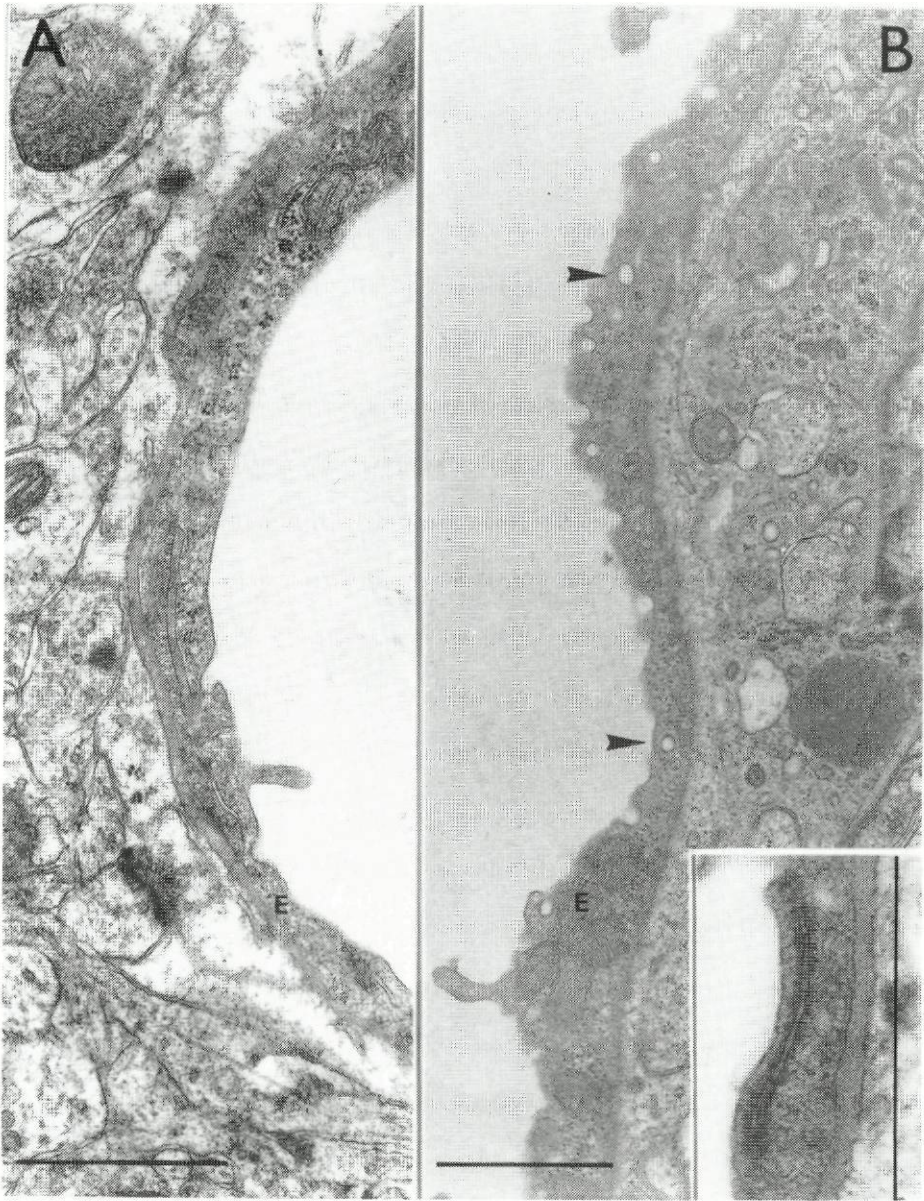


Fig. 5 A e B – Fotografias ultraestruturais de capilares cerebrais de um animal controlo, A, e de um animal tratado com amitriptilina, 34 mg/kg, i.p., B. As vesículas de pinocitose são escassas em A e abundantes em B (setas). Na fotografia B inseriu-se em maior ampliação uma junção apertada. E-célula endotelial. As barras correspondem a 1 μ m.

III – EFEITOS DA AMITRIPTILINA NA PRESSÃO ARTERIAL, PaO₂, PaCO₂ E pH

Não se verificaram alterações significativas em relação à situação de controlo na PaO₂, PaCO₂ e pH do sangue arterial 10 minutos após a administração da amitriptilina. Houve, no entanto, uma redução discreta (11%), embora estatisticamente significativa, da pressão arterial média após a administração da amitriptilina (tabela 2).

	<i>n</i>	<i>PaO₂ (mmHg)</i>	<i>PaCO₂ (mmHg)</i>	<i>pH</i>	<i>PAM (mmHg)</i>
CONT.	4	93,1 (±4,0)	43,2 (±1,7)	7,36 (±0,01)	111,5 (±9,0)
AMI.	4	93,2 (±3,4)	44,8 (±2,6)	7,36 (±0,01)	99,5 (±8,5)*

Tabela 2 - Efeito da amitriptilina (AMI), 34 mg/kg, i.p., sobre os gases do sangue arterial (PaO₂ e PaCO₂), pH e pressão arterial média (PAM). Apresentam-se as médias aritméticas e erros padrão.

*Significativamente diferente do controlo (CONT), p<0,05 (t emparelhado).

IV - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE AMINAS SIMPATICOMIMÉTICAS SOBRE A PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Estudou-se o efeito da administração intracerebroventricular de noradrenalina, fenilefrina e isoprenalina sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica.

As doses usadas foram as seguintes: noradrenalina 37,5, 75, 150 e 300µg, fenilefrina 400, 800 e 1600 µg e isoprenalina 10 µg. A noradrenalina e a fenilefrina aumentaram, de forma dependente da dose, a permeabilidade da

barreira hematoencefálica à fluoresceína, enquanto que a isoprenalina não teve qualquer efeito (figuras 6, 7 e 8).

Na situação de controlo o valor da taxa de extracção cerebral da fluoresceína sódica foi de $0,76 \pm 0,06\%$.

Os valores da taxa de extracção obtidos com a administração intracerebroventricular de 37,5, 75 e 150 μg de noradrenalina foram respectivamente de $0,81 \pm 0,11\%$, $1,44 \pm 0,13\%$ e $1,92 \pm 0,35\%$. Destes, só os dois últimos são significativamente diferentes do controlo (figura 6).

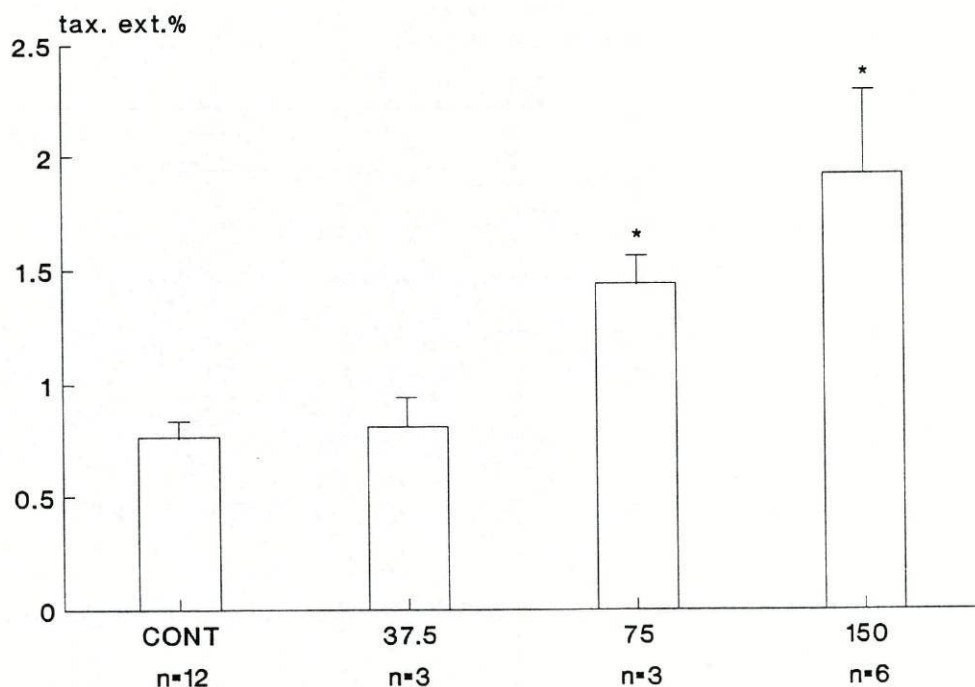


Fig. 6 - Efeito da noradrenalina intracerebroventricular, 37,5, 75 e 150 μg ou igual volume do seu dissolvente (10 μl) (CONT) na taxa de extracção cerebral de fluoresceína sódica. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 3 a 12 experiências.

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

Relativamente à fenilefrina apenas a dose de 800 μg aumentou significativamente, em relação ao controlo, a permeabilidade da barreira hematoencefálica, sendo naquela situação experimental o valor da taxa de extracção cerebral da fluoresceína de $1,42 \pm 0,23\%$ (figura 7).

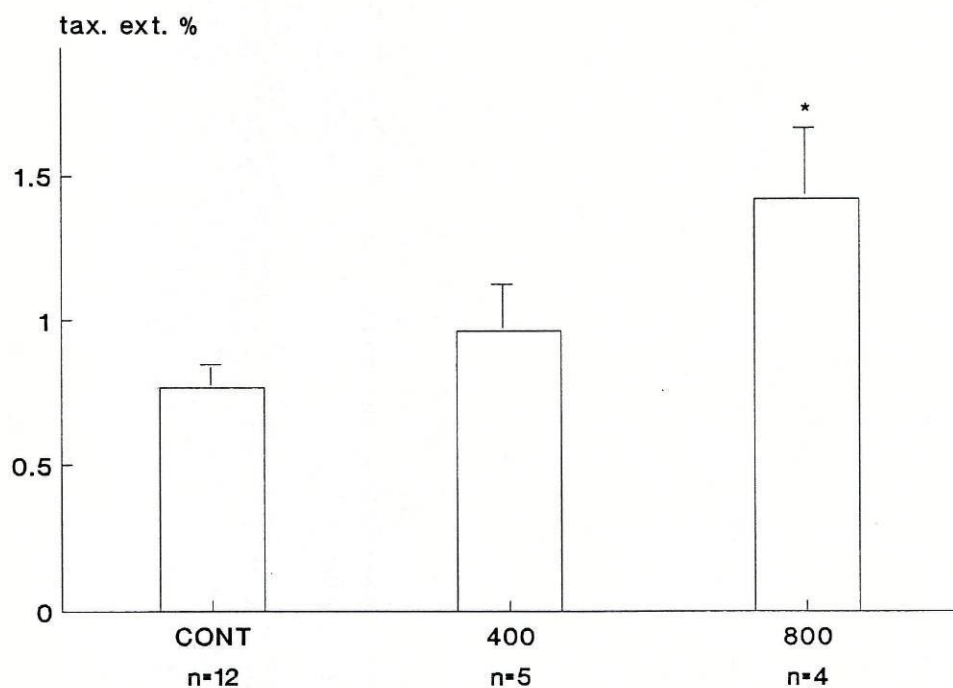


Fig. 7 - Efeito da fenilefrina intracerebroventricular, 400 e 800 μg , ou igual volume do seu dissolvente (10 μl) (CONT), na taxa de extracção cerebral de fluoresceína sódica. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 4 a 12 experiências.

* Significativamente diferente do controlo, $p < 0,05$ (t independente).

A taxa de extracção cerebral obtida com a administração intracerebroventricular de isoprenalina, 10 μg , foi de $0,70 \pm 0,10\%$, não tendo esta amina alterado significativamente em relação ao controlo a permeabilidade da barreira hematoencefálica (figura 8).

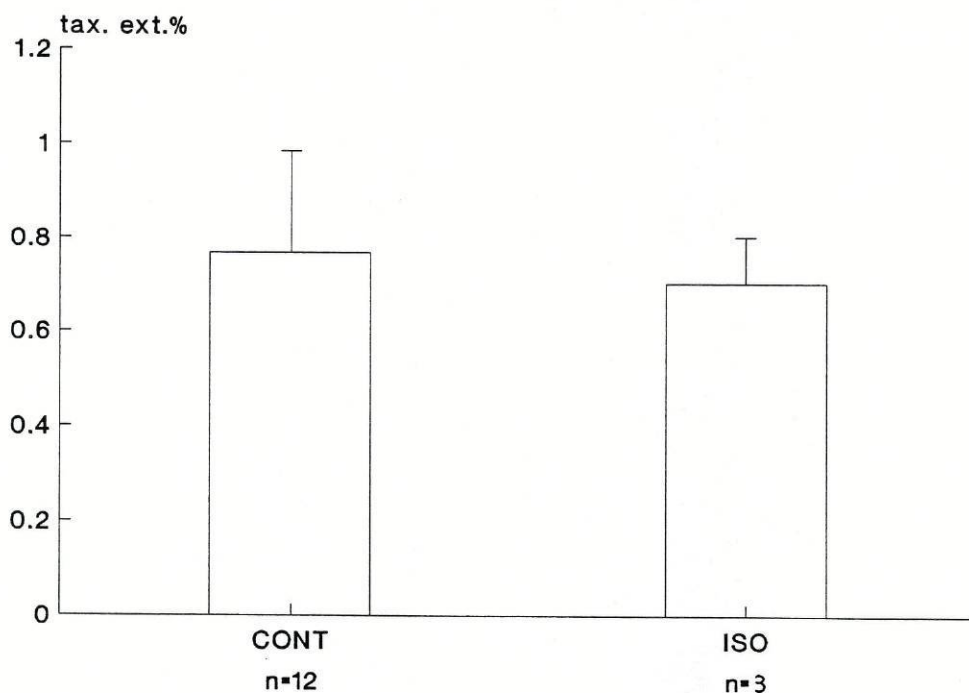


Fig. 8 - Efeito da isoprenalina intracerebroventricular, 10 μg , ou igual volume do seu dissolvente (10 μl) (CONT), na taxa de extracção cerebral de fluoresceína sódica. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 3 a 12 experiências.

Com doses de 300 μg de noradrenalina ou de 1600 μg de fenilefrina os animais morreram quase todos, pelo que não considerámos esses resultados.

V - EFEITOS DA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE 150 μ g DE NORADRENALINA NA PRESSÃO ARTERIAL, PaO₂, PaCO₂ E pH

Após a injeção estereotáxica intracerebroventricular de 10 μ l de soro fisiológico ou de igual volume de solução de noradrenalina (150 μ g) mediu-se a pressão arterial a seis animais, ao longo de 10 minutos. A noradrenalina não aumentou significativamente a pressão arterial média (tabela 2).

A injeção intracerebroventricular de noradrenalina também não alterou significativamente os valores da PaO₂, PaCO₂ e pH no sangue arterial (tabela 2).

	<i>n</i>	<i>PaO₂ (mmHg)</i>	<i>PaCO₂ (mmHg)</i>	<i>pH</i>	<i>PAM (mmHg)</i>
CONT.	3	110,6 (\pm 4,0)	43,6 (\pm 6,7)	7,37 (\pm 0,04)	121,6 (\pm 10,2)
NA.	3	115,8 (\pm 0,4)	40,6 (\pm 2,8)	7,38 (\pm 0,01)	143,3 (\pm 13,3)

Tabela 3 - Efeito da injeção intracerebroventricular de 10 μ l de soro fisiológico (CONT) ou do mesmo volume de noradrenalina (NA), 150 μ g, sobre os gases do sangue arterial (PaO₂ e PaCO₂), pH e pressão arterial média (PAM). Os gases de sangue foram avaliados 10 minutos após a injeção intracerebroventricular, ao passo que a PAM foi avaliada ao longo dos 10 minutos na situação controlo e experimental. Apresentam-se as médias aritméticas e erros padrão.

VI - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE PROSTAGLANDINA F2 α NA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Para esclarecermos se o efeito obtido com a noradrenalina e com a fenilefrina estava relacionado com eventual vasoconstrição estudámos os efeitos de um vasoconstritor não adrenérgico.

Como pode ver-se na figura 9, a prostaglandina F2 α não induziu qualquer alteração significativa na permeabilidade da barreira hematoencefálica, sendo a taxa de extracção cerebral da fluoresceína sódica de $0,76 \pm 0,06\%$ na situação de controlo e de $0,84 \pm 0,12\%$ e $0,57 \pm 0,03\%$ após a administração intracerebroventricular de 50 e 100 μg , respectivamente, desta prostaglandina.

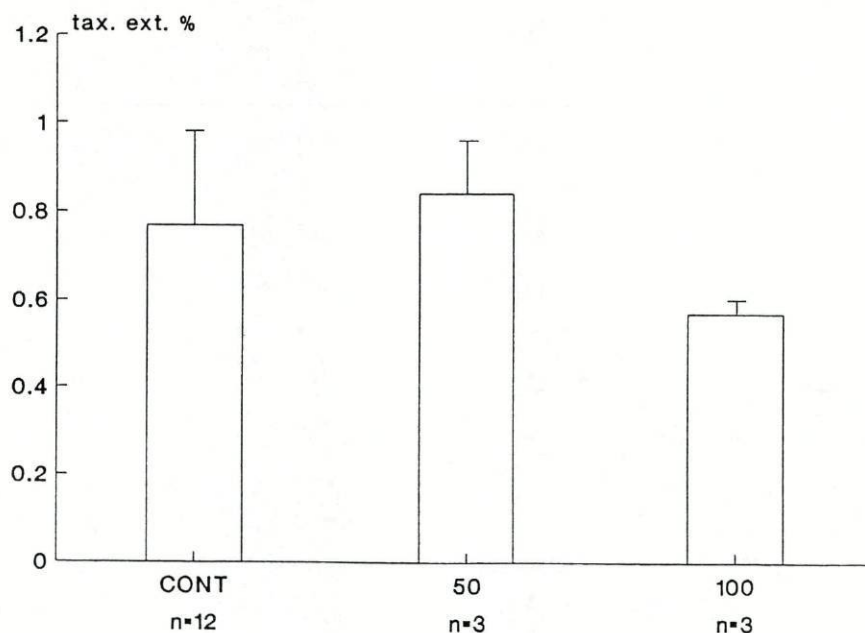


Fig. 9 - Efeito da prostaglandina F2 α intracerebroventricular, 50 e 100 μg , ou igual volume do seu veículo (10 μl) (CONT), na taxa de extracção cerebral de fluoresceína sódica. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 3 a 12 experiências.

VII - EFEITO DA FENOXIBENZAMINA NAS ALTERAÇÕES DE PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA INDUZIDAS PELA NORADRENALINA

Administrou-se a fenoxibenzamina, 25 mg/kg, i.p., 24 h antes da injeção intracerebroventricular de 150 µg de noradrenalina.

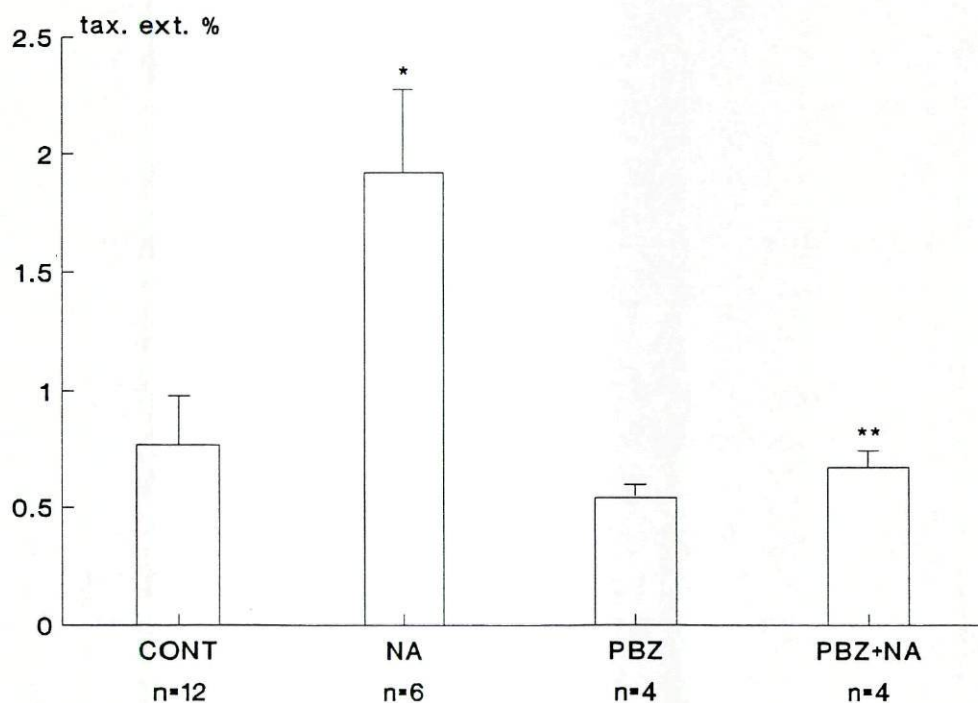


Fig. 10 - Efeito da fenoxibenzamina (PBZ) 25 mg/kg, i.p., nas alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzidas pela noradrenalina (NA), 150 µg, intracerebroventricular ou igual volume do seu dissolvente (10 µl) (CONT). A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 4 a 12 experiências.

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

** Significativamente diferente da NA 150 µg, $p < 0,001$ (t independente).

A taxa de extracção cerebral da fluoresceína foi de $1,92 \pm 0,35\%$ quando se fez a injeccção intracerebroventricular de noradrenalina ($150 \mu\text{g}$), passando a ser de $0,67 \pm 0,08\%$ quando se administrou previamente a fenoxibenzamina, valor que é semelhante ao obtido em situação de controlo ($0,76 \pm 0,06\%$). Ou seja, o bloqueador alfa preveniu completamente o aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica provocado pela dose de noradrenalina para a qual se obtém o efeito máximo (figura 10).

A fenoxibenzamina, quando administrada isoladamente, não alterou significativamente, em relação à situação de controlo, o valor da taxa de extracção de fluoresceína ($0,54 \pm 0,05\%$) (figura 10).

VIII – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE NORADRENALINA SEM E COM A ADMINISTRAÇÃO PRÉVIA DE FENOXIBENZAMINA NA MORFOLOGIA ULTRASTRUTURAL DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Estudou-se o efeito morfológico ultrastrutural da noradrenalina, $150 \mu\text{g}$, administrada no ventrículo cerebral lateral direito. Foram fotografados todos os capilares observados nos cortes ultrafinos e fez-se a quantificação das vesículas de pinocitose no respectivo endotélio.

A única diferença morfológica aparente entre o endotélio dos capilares dos animais controlo e o dos tratados foi no número de vesículas de pinocitose, que foi, respectivamente, de $1,40 \pm 0,29/\mu\text{m}^2$ e $4,30 \pm 0,38/\mu\text{m}^2$ (figuras 11 e 12). Não se observou qualquer outra alteração morfológica, nomeadamente dos espaços interendoteliais (figura 12).

A injeccção de fenoxibenzamina (24 horas antes da noradrenalina) reduziu significativamente o efeito da noradrenalina na pinocitose. Contudo, o valor

obtido nestas condições, $2,94 \pm 0,42$ vesículas/ μm^2 , é ainda significativamente superior ao do controlo (figura 11).

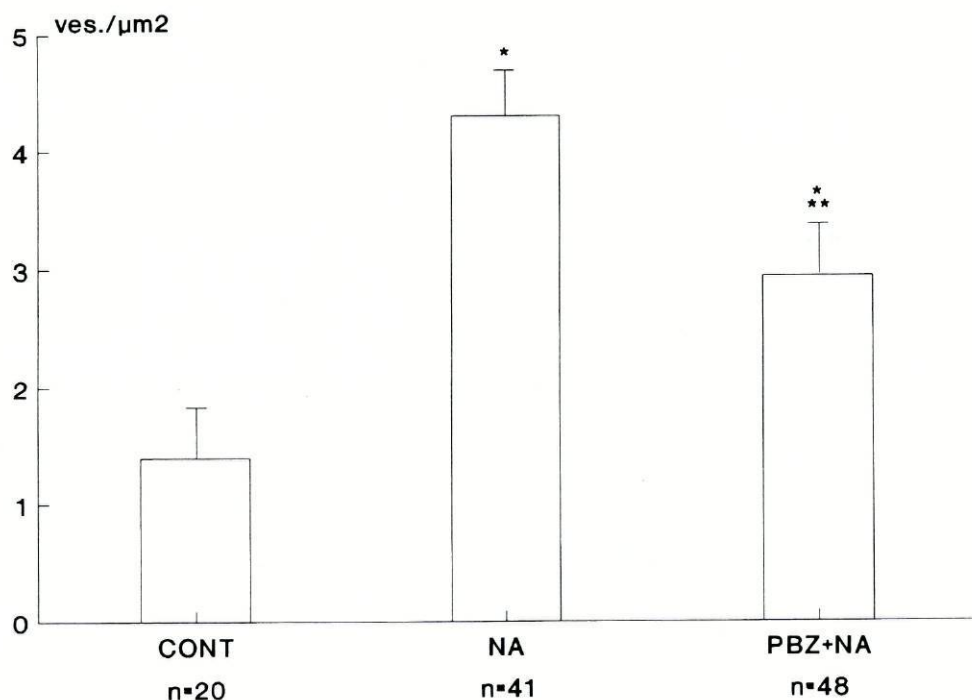


Fig. 11 - Efeito da noradrenalina (NA) intracerebroventricular, $150\mu\text{g}$, ou de igual volume do seu dissolvente ($10\mu\text{l}$) (CONT), sobre o número de vesículas de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais sem e com a administração prévia de fenoxibenzamina (PBZ), 25 mg/kg , i.p.. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão do número de vesículas de pinocitose quantificadas em 109 capilares de 6 ratos.

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

** Significativamente diferente da noradrenalina, $150\mu\text{g}$, $p < 0,001$ (t independente).

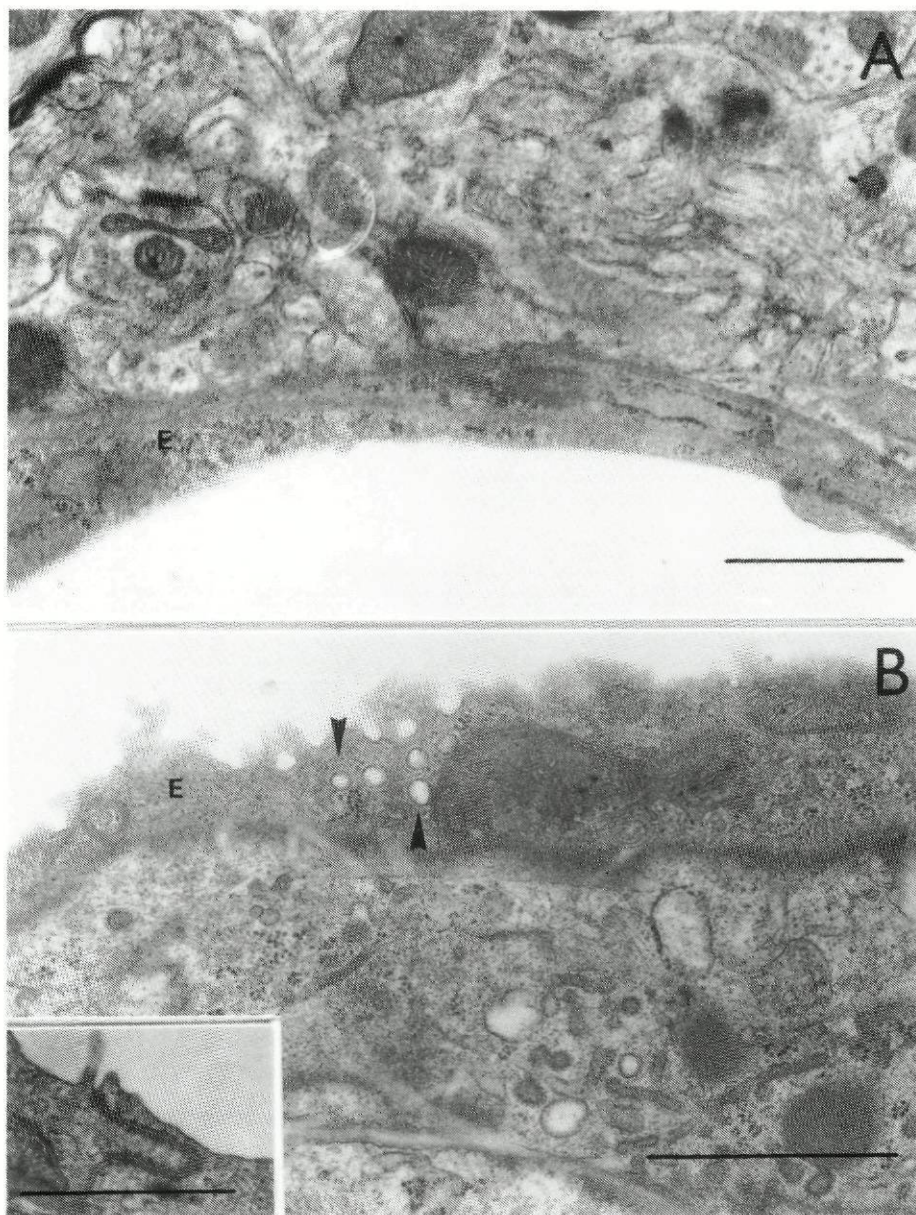


Fig. 12 A e B - Fotografias ultraestruturais de capilares cerebrais de um animal controle, A, e de um injectado intracerebroventricularmente com noradrenalina, 150 μ g, B. As vesículas de pinocitose são escassas em A e abundantes em B (setas). Na fotografia B inseriu-se junção apertada. E-célula endotelial. As barras correspondem a 1 μ m.

IX – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE ISOPRENALINA NA MORFOLOGIA ULTRASTRUTURAL DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Estudou-se o efeito da isoprenalina (10 µg administrados no ventrículo cerebral lateral direito) sobre a morfologia ultrastrutural dos capilares cerebrais.

Verificou-se que houve, nos animais tratados, um aumento significativo de pinocitose ($7,16 \pm 0,76$ ves/µm²) em relação aos controlos ($1,40 \pm 0,29$ ves/µm²), sendo esta a única diferença morfológica aparente entre o endotélio dos capilares dos animais controlo e o dos tratados (figuras 13 e 14).

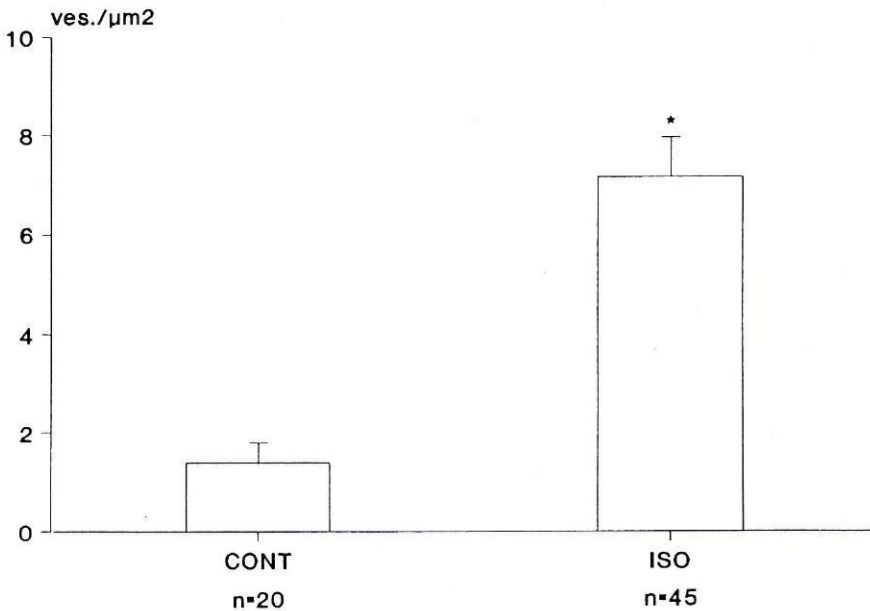


Fig. 13 - Efeito da isoprenalina (ISO) intracerebroventricular, 10 µg, ou igual volume do seu dissolvente (10 µl) (CONT), no número de vesículas de pinocitose do endotélio dos capilares cerebrais. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão do número de vesículas de pinocitose quantificadas em 65 capilares de 6 ratos.

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



Fig. 14 A e B - Fotografias ultraestruturais de capilares cerebrais de um animal controlo, A, e de um animal injectado intracerebroventricularmente com isoprenalina, 10 μ g, B. As vesículas de pinocitose são escassas em A e abundantes em B (setas). Na fotografia B inseriu-se uma junção apertada. E- célula endotelial. As barras correspondem a 1 μ m.

X – EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA DO *LOCUS COERULEUS* SOBRE A PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA À FLUORESCEÍNA SÓDICA

Este estudo mostrou que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumentou, de forma dependente da frequência, a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica (figura 15).

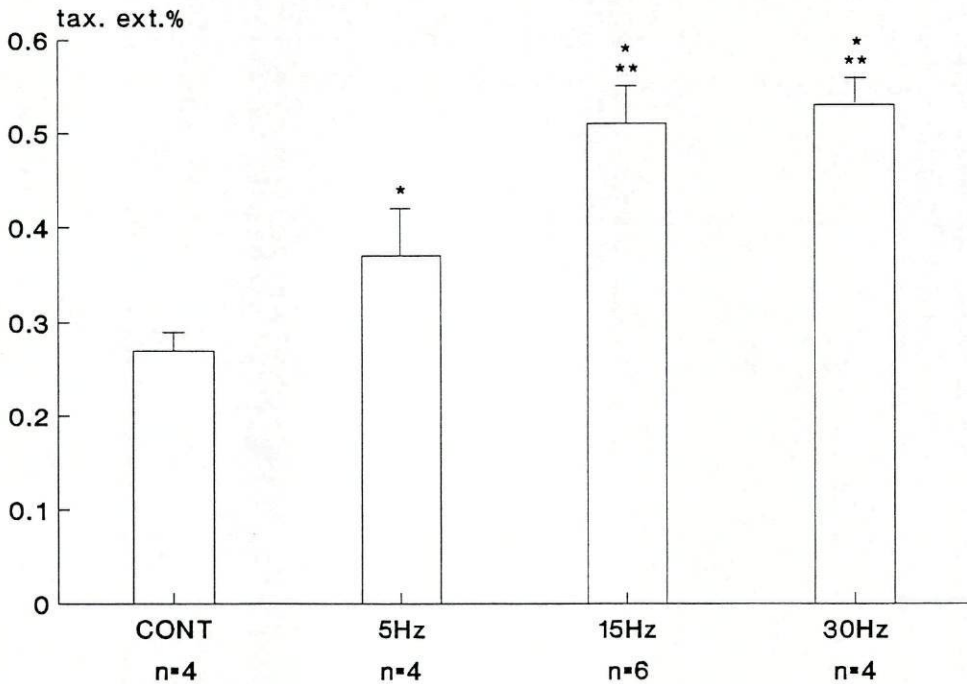


Fig. 15 - Efeito da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* com correntes de 5, 15 e 30 Hz de frequência, sobre a taxa de extracção cerebral de fluoresceína sódica. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 4 a 6 experiências.

* Significativamente diferente do controlo, $p < 0,02$ (t independente).

** Significativamente diferente de 5 Hz, $p < 0,005$ (t independente).

No grupo controlo a taxa de extracção cerebral de fluoresceína foi de $0,27 \pm 0,01\%$. A estimulação eléctrica com frequência de 5Hz aumentou significativamente a passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central, passando a taxa de extracção a ser de $0,37 \pm 0,02\%$. Com a frequência de 15Hz atingiu-se, provavelmente, um efeito próximo do máximo, $0,51 \pm 0,01\%$, pois este valor não aumentou significativamente com a utilização de uma frequência de 30Hz- $0,53 \pm 0,01\%$.

A administração prévia de fenoxibenzamina, 10 mg/kg, i.p., antagonizou o efeito da estimulação eléctrica (15 Hz) sobre a passagem de fluoresceína sódica para o parênquima cerebral, sendo o valor da taxa de extracção, nesta circunstância, de $0,29 \pm 0,04\%$ (figura 16).

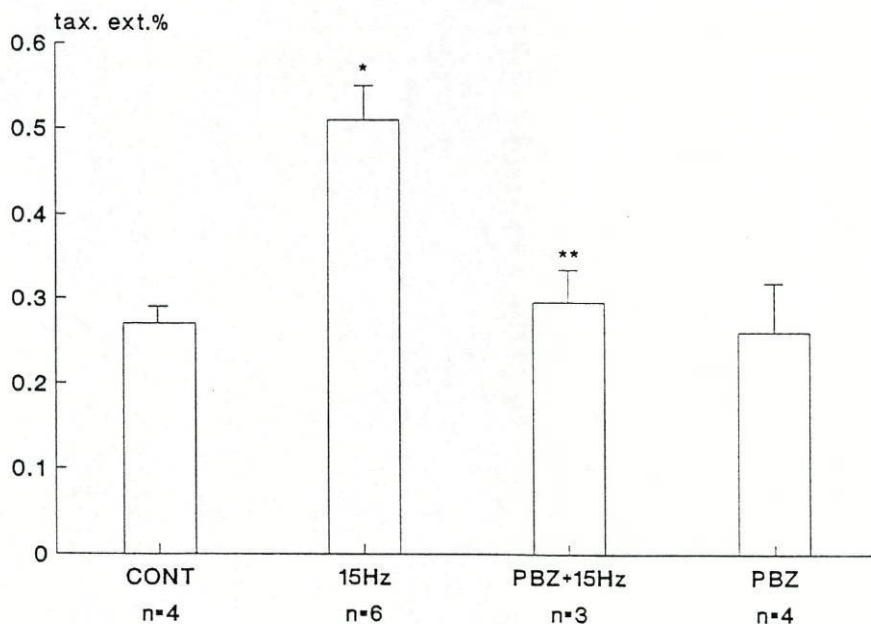


Fig. 16 - Efeito da fenoxibenzamina (PBZ), sobre a alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pela estimulação eléctrica (15 Hz) do locus coeruleus. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 3 a 6 experiências.

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

** Significativamente diferente de 15 Hz, $p < 0,001$ (t independente).

XI - EFEITO DO PINDOLOL SOBRE A ALTERAÇÃO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA DO *LOCUS COERULEUS*

Estudou-se o efeito do pindolol na alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus*.

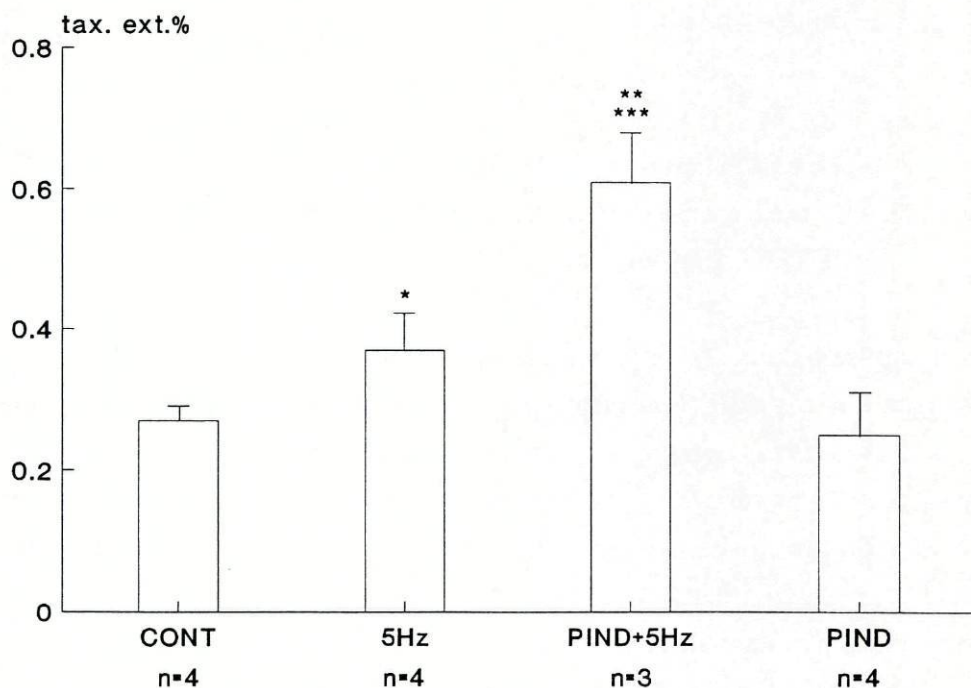


Fig. 17 - Efeito do pindolol (PIND), 10 mg/kg, i.p., sobre a alteração da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzida pela estimulação eléctrica (5 Hz) do *locus coeruleus*. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão de 3 a 4 experiências.

*Significativamente diferente do controlo, $p < 0,02$ (t independente).

** Significativamente diferente do controlo e do pindolol (PIND), $p < 0,001$ (t independente).

***Significativamente diferente de 5 Hz, $p < 0,005$ (t independente).

Administrou-se o pindolol (10 mg/kg, i.p.) 1h antes da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* com uma corrente de 5Hz. Verificámos que houve uma potenciação significativa do efeito da estimulação eléctrica sobre a passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central, passando a taxa de extracção, de $0,27 \pm 0,02\%$ para $0,61 \pm 0,04\%$ (figura 17).

A taxa de extracção cerebral da fluoresceína foi de $0,25 \pm 0,02\%$, quando o pindolol foi administrado a animais nos quais não se estimulou eléctricamente o *locus coeruleus*, não sendo este valor significativamente diferente do de controlo.

XII – EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA DO *LOCUS COERULEUS* (15Hz) SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL, FREQUÊNCIA CARDÍACA, pH E GASES DO SANGUE

Fez-se o controlo da pressão arterial, frequência cardíaca, pH e gases do sangue em três animais controlo e em três animais submetidos a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* com uma corrente eléctrica de 15 Hz, frequência para a qual se obteve o efeito máximo sobre a passagem da fluoresceína através da barreira hematoencefálica. Foram feitas várias medições da pressão arterial e da frequência cardíaca ao longo dos 20 minutos de estimulação eléctrica ou apenas de manutenção do eléctrodo sem estimulação.

Nos animais controlo os valores da pressão arterial média e da frequência cardíaca foram, respectivamente, de $132,9 \pm 12,8$ mmHg e de 438 ± 20 batimentos/min e nos estimulados de $130,65 \pm 10,3$ mmHg e de 499 ± 11 batimentos/min.

Os valores destes parâmetros, obtidos em medições efectuadas apenas durante todos os períodos de 15 segundos de estimulação, foram, respectivamente, de $134,2 \pm 13,2$ mmHg e de 523 ± 14 batimentos/min (tabela 4). Verificou-se, assim, que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* apenas

altera de forma significativa a frequência cardíaca, provocando um aumento de cerca de 12% quando se considera globalmente todo o período de estimulação e de 17% se se considerarem apenas os valores obtidos durante os períodos de 15 segundos de estimulação.

Foram também medidos os valores da PaO_2 , $PaCO_2$ e pH ao fim de 20 minutos em animais em que apenas foi colocado o eléctrodo e naqueles em que foi feita a estimulação eléctrica. Estes parâmetros não foram significativamente alterados pela estimulação eléctrica (tabela 4).

	<i>n</i>	<i>PAM</i> (mmHg)	<i>FC</i> (bat./min)	<i>PaO₂</i> (mmHg)	<i>PaCO₂</i> (mmHg)	<i>pH</i>
CONT.	3	132,9±12,8	438±20	106,0±2,0	56,9±7,0	7,37±0,01
15 Hz	3	130,6±10,3	499±11	122,6±21,4	52,2±9,0	7,38±0,02
15 Hz (ON)	3	134,2±13,2	523±14*			

Tabela 4 - Efeito da estimulação eléctrica do locus coeruleus (15 Hz) sobre os gases do sangue arterial (PaO_2 e $PaCO_2$), pH, frequência cardíaca (bat./min.) e pressão arterial média (PAM). Nos animais controlo (CONT) foi colocado o eléctrodo durante 20 minutos, não se tendo procedido à estimulação eléctrica. 15 Hz(ON)-medições efectuadas apenas durante os períodos de 15 segundos "on" ao longo dos 20 minutos de estimulação. Apresentam-se as médias aritméticas e os erros padrão.

* Significativamente diferente do controlo (CONT), $p < 0,05$ (t independente).

XIII – EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉCTRICA (15Hz) DO *LOCUS COERULEUS* SOBRE A MORFOLOGIA ULTRASTRUTURAL DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A observação ultrastrutural do córtex parietal mostrou que a estimulação eléctrica, com correntes de 15 Hz, induziu um aumento significativo na densidade de vesículas de pinocitose (figuras 18 e 19), passando o seu número de $3,56 \pm 0,55/\mu\text{m}^2$ no controlo para $9,31 \pm 1,91/\mu\text{m}^2$ nos animais estimulados. Este aumento de pinocitose acompanhou-se, nalguns casos, de edema cerebral perivascular (figura 20). Não foi observada qualquer alteração morfológica das junções apertadas.

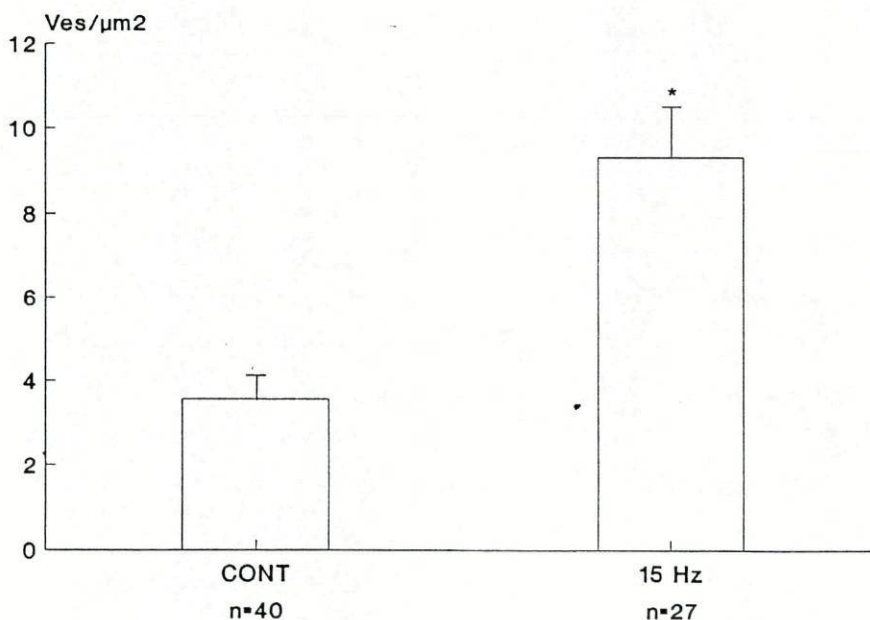


Fig. 18 - Efeito da estimulação eléctrica do locus coeruleus (15 Hz) sobre o número de vesículas de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais. A altura das colunas representa as médias aritméticas e erros padrão do número de vesículas de pinocitose quantificadas em 67 capilares de 6 ratos.

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

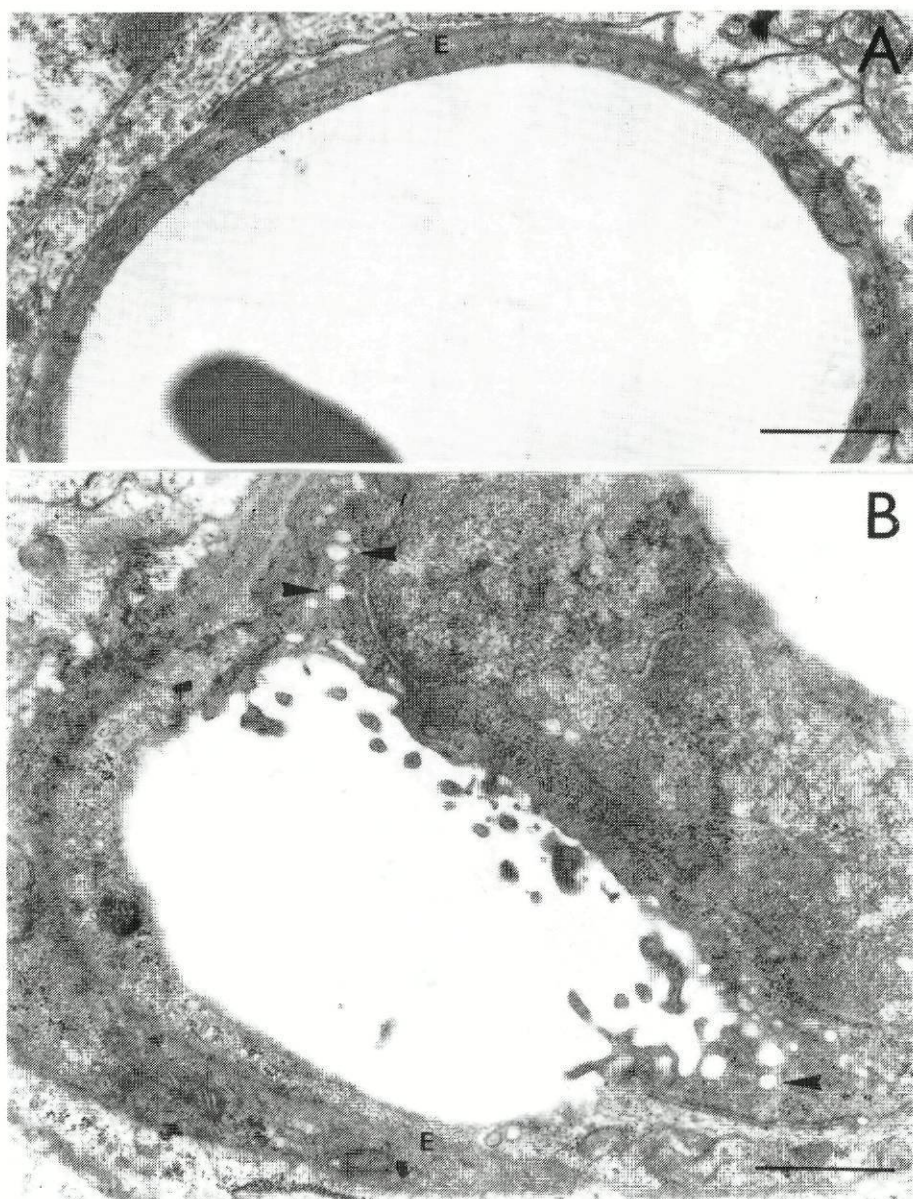


Fig. 19 A e B - Fotografias ultraestruturais de capilares cerebrais de um animal controlo, A, e de um animal em que se fez a estimulação eléctrica do locus coeruleus (15 Hz), B. As vesículas de pinocitose são escassas em A e abundantes em B (setas). E-célula endotelial. As barras correspondem a 1 μ m.

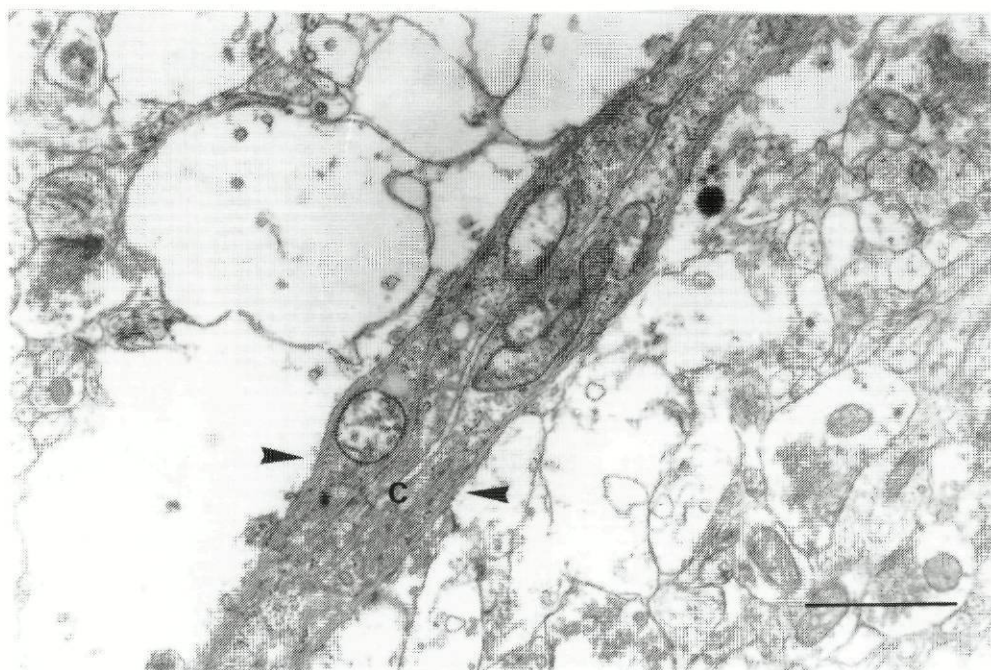


Fig. 20 - Fotografia ultraestrutural do córtex cerebral parietal direito de um animal em que se fez a estimulação eléctrica do locus coeruleus. As setas mostram a zona de edema perivascular que, neste caso, levou ao colapso do capilar (C). A barra corresponde a 1 μ m.

XIV – CONTROLO MORFOLÓGICO DAS INJEÇÕES NO VENTRÍCULO CEREBRAL LATERAL DIREITO E DA COLOCAÇÃO DO ELÉCTRODO NO *LOCUS COERULEUS*

1 - *Controlo das injeções no ventrículo cerebral lateral direito.*

Nos dez animais em que se fez a injeção por estereotaxia de azul de toluidina, este localizou-se no ventrículo lateral direito.

2 - *Controlo morfológico da localização do eléctrodo no locus coeruleus.*

Em apenas 3 dos 37 animais o eléctrodo não se localizou no *locus coeruleus*. Os resultados desses 3 animais foram rejeitados.

DISCUSSÃO

I - Introdução

Antes de iniciar a discussão dos resultados parece importante fazer algumas considerações àcerca de aspectos metodológicos relacionados com o estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

No entanto, embora já fora da secção destinada a discutir especificamente estes aspectos, abordarei ainda, ao comentar os resultados, alguns aspectos metodológicos pontuais e específicos do estudo em causa.

Comentarei separadamente os resultados da amitriptilina, da administração intracerebroventricular de aminas simpaticomiméticas e da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* na permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Farei de seguida uma análise do efeito das referidas manipulações da barreira hematoencefálica na morfologia ultrastrutural dos capilares cerebrais.

Será ainda feita uma breve revisão em que abordarei a possibilidade de envolvimento de mecanismos adrenérgicos centrais nas alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica subjacentes a vários tipos de patologia do sistema nervoso central.

A interpretação global dos resultados obtidos será apresentada na secção destinada aos comentários e conclusões.

II - Aspectos metodológicos gerais

1 - *Fluoresceína sódica*

A fluoresceína sódica foi por nós utilizada em todos os estudos de permeabilidade da barreira hematoencefálica. Para além desta, o único

marcador utilizado, embora apenas num número restrito de experiências, foi a albumina-I¹³¹.

A fluoresceína é um ácido dibásico com uma baixa lipossolubilidade, com um peso molecular de 378 e que se liga em 80% às proteínas plasmáticas. Em situações fisiológicas não atravessa a barreira hematoencefálica e é eliminada sob forma inalterada pelo rim (Tervo et al. 1979; Ernest 1979). Tem sido muito utilizada em estudos da integridade da barreira sangue-nervo óptico, que é em questões de permeabilidade sobreponível à barreira hematoencefálica (Kupersmith e Shakib 1989).

O primeiro estudo em que a fluoresceína sódica foi empregue como marcador de permeabilidade da barreira hematoencefálica foi feito por Hoffman e Olszewski em 1961. Desde então tem sido referida por outros autores como sendo um marcador muito útil em estudos de permeabilidade desta barreira (Tervo et al. 1979; Gulati et al. 1982; Baba et al. 1988).

O facto de, como já foi aqui referido, não atravessar em circunstâncias normais a barreira hematoencefálica, a sua toxicidade desprezível quando utilizada nas doses habituais, a ausência de metabolização, a existência de métodos simples e muito sensíveis para o seu doseamento (espectrofotofluorimetria) e ainda o seu baixo preço, foram as razões que nos levaram a escolher a fluoresceína sódica como marcador da permeabilidade da barreira hematoencefálica na maior parte dos nossos estudos.

2 - Método de estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica

As duas abordagens metodológicas fundamentais para o estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica são:

- captação contínua
- captação após primeira passagem

Relativamente à primeira, captação contínua, há duas grandes subdivisões:

- administração endo-venosa, da qual constam três modalidades,
 - análise compartimental
 - *graphic analysis/multiple time-point*
 - *single time-point analysis*
- perfusão cerebral

A segunda, captação após primeira passagem, tem três sub-divisões fundamentais,

- difusão do indicador
- *brain uptake index* (BUI)
- injeção única/registo externo

Os métodos baseados na captação após primeira passagem são pouco sensíveis, pois a permeabilidade é determinada após tempos de captação cerebral muito curtos (5 a 15 segundos), destinando-se a estudos em que se usam marcadores que passam muito facilmente para o sistema nervoso central (Smith 1989). Estes métodos são inadequados para substâncias do tipo da fluoresceína, que têm coeficientes de permeabilidade muito baixos. Excluimos, conseqüentemente, para o nosso estudo este tipo de métodos de avaliação de permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Os métodos baseados na captação contínua são cerca de 100 vezes mais sensíveis do que os anteriores (Smith et al. 1984).

A perfusão cerebral (Takasato et al. 1984), técnica de captação contínua, não se nos afigurou vantajosa. Embora não seja excessivamente complexa, tem o inconveniente de, mesmo com o uso de líquidos de perfusão altamente nutritivos, não garantir a viabilidade funcional do cérebro por períodos superiores a poucos minutos e portanto mais curtos do que os que usámos nas nossas experiências. A principal vantagem desta técnica é a manutenção da constância da composição do meio perfusor (Smith e Takasato 1986).

A análise compartimental, um método de captação contínua e que está englobado no sub-grupo das técnicas de administração endovenosa, foi inicialmente descrita por Davson (1955). É especialmente adequada para o

estudo da permeabilidade da barreira hematoencefálica no Homem, usando a tomografia de emissão de positrões (Bradbury 1979). Este método tem sérias limitações quando aplicado a pequenos animais, dado o facto de ser necessário o cálculo do coeficiente de influxo, coeficiente de efluxo, fluxo sanguíneo cerebral e volume de sangue intracerebral. O número de animais necessários é enorme, tornando-se um processo muito dispendioso e moroso (Smith 1989). Estas limitações podem ser ultrapassadas no caso de se usarem grandes animais em que é possível a execução da tomografia de emissão de positrões ou a tomografia simples de emissão de fotões.

O *graphic analysis/multiple time-point* tem vantagens em relação ao método anteriormente referido. Não requer cálculos relativos à distribuição intracerebral do marcador ou do volume vascular cerebral e o número de animais necessário é muito menor do que no método de análise compartimental. Quando a concentração plasmática do marcador é mantida constante, o cálculo do coeficiente de influxo unidireccional para o cérebro ou taxa de extracção cerebral, (K_{in}), é dado pelo valor da inclinação da porção linear da curva de captação cerebral do marcador. No eixo das ordenadas colocam-se os quocientes da quantidade de marcador existente no cérebro pela sua concentração plasmática ao fim de vários tempos e no eixo das abcissas colocam-se os respectivos tempos. A ordenada na origem da porção linear da referida curva de captação dá o valor de V_p .

$$q(\text{tot})T/C_p = k_{in}T + V_p$$

$q(\text{tot})T$ -quantidade total no cérebro ao fim do tempo T

C_p -concentração do marcador no plasma

V_p -volume do plasma no compartimento vascular cerebral

Uma vez conhecido o k_{in} pode calcular-se o produto permeabilidade•superfície (PS) de acordo com a fórmula que os relaciona.

Os inconvenientes deste método são:

- possibilidade de erros devidos à metabolização do marcador
- tendência à sub-valorização do kin por dificuldade de determinação da porção linear do gráfico
- necessidade de manutenção de concentrações plasmáticas constantes do marcador

A *single time-point analysis* é a mais simples de todas as variantes do método de administração e.v. para medição da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Este método foi desenvolvido por Rapoport et al. em 1979. É especialmente útil em pequenos animais pois a captação cerebral pode ser medida em apenas um ponto no tempo em cada animal. Portanto esta é a única versão dos métodos de administração e.v. que permite, em animais pequenos, obter um quociente de permeabilidade em apenas um animal. Esta propriedade, juntamente com a simplicidade e flexibilidade da técnica, fizeram dela o principal método de estudo do transporte cerebrovascular em pequenos animais (Smith 1989). Tem ainda a vantagem de que a concentração plasmática do marcador não tem que ser mantida constante.

A fórmula para obtenção do kin por este processo foi já apresentada na secção referente ao material e métodos.

As principais causas de erro do método de *single time-point analysis* são:

- erros no cálculo da quantidade de marcador que permaneceu no compartimento intravascular cerebral.
- o assumir-se um refluxo cérebro-sangue desprezível em situações em que este seja significativo.

Quanto à primeira causa de erro, nas nossas condições experimentais não existe, pois pelas razões já apontadas em "Material e Métodos" foi possível fazer-se a lavagem do compartimento intravascular.

A possibilidade de refluxo cérebro-sangue não é, no nosso modelo, significativa pois nos vários tempos em que captação cerebral foi estudada não se verificou diminuição da relação $q(\text{tot})/cp$ sendo esta igual aos 10 e aos 35

minutos. Nunca foram utilizados, nos nossos estudos, tempos de captação superiores a 30 minutos. Segundo Smith (1989), este dado permite excluir a possibilidade de um refluxo importante. Aliás, a possibilidade de refluxo cérebro/sangue põe-se com especial relevância quando são usados marcadores francamente lipossolúveis (Fenstermacher, 1989).

Em estudo recente, Hatashita e Hoff (1990) referem que o k_{in} é um índice perfeitamente adequado ao estudo de alterações relativas de permeabilidade em várias condições experimentais.

3 - *Produto permeabilidade.superfície (PS) e fluxo sanguíneo cerebral.*

Uma vez conhecido o k_{in} , pode obter-se o PS usando a seguinte fórmula:

$$PS = -vF \ln(1 - k_{in}/vF)$$

v - volume de distribuição fraccional do marcador no sangue

F - fluxo sanguíneo cerebral

S - superfície dos capilares perfundidos

O PS (produto permeabilidade.superfície) tem em conta não só a permeabilidade dos capilares como também a superfície de capilares perfundidos. O valor de S depende, fundamentalmente, do fluxo sanguíneo cerebral. Quando os valores do fluxo são altos poderá ser maior o número de capilares perfundidos.

No nosso estudo usámos como índice de permeabilidade o k_{in} e não entrámos em linha de conta com o PS.

Foram vários os motivos que nos permitiram abdicar do seu cálculo:

1º O fluxo sanguíneo cerebral afecta a passagem para o sistema nervoso central, principalmente de substâncias que penetram muito facilmente através da barreira hematoencefálica.

Para uma substância que penetra muito mal através da barreira

hematoencefálica, cujo coeficiente de influxo unidireccional para o cérebro (kin) é, por conseguinte, muito baixo, a razão $kin/\text{fluxo sanguíneo cerebral} \rightarrow 0$. Nesta situação o $kin \rightarrow PS$, ou seja o valor do coeficiente de influxo unidireccional para o cérebro (kin) ou taxa de extracção cerebral é semelhante ao produto permeabilidade/superfície. (Fenstermacher 1989; Smith 1989).

Dada a baixa penetração da fluoresceína pareceu-nos legítimo aplicar-lhe estas considerações.

2º O fluxo sanguíneo cerebral e o número de capilares perfundidos podem variar com a pressão arterial.

Sabe-se que, no Rato, para valores da pressão arterial média compreendidos entre os 60 e os 180 a 200 mm de Hg, os mecanismos de autorregulação mantêm o fluxo sanguíneo cerebral inalterado (Rapoport e Thompson 1975; Edvinsson et al. 1976). Acima destes valores é excedido o limite superior de autorregulação, isto é, a vasoconstrição torna-se insuficiente para impedir o aumento de fluxo provocado por pressões de perfusão muito elevadas (Edvinsson e Mackenzie 1977).

Nunca nas nossas diversas situações experimentais os valores tensionais excederam estes limites.

3º O aumento da superfície de capilares perfundidos de uma situação controlo para uma situação experimental far-se-ia através do recrutamento de capilares que estariam numa situação de reserva. Segundo estudos recentes (Bradbury 1989; Gobel et al. 1991), o Rato não tem reserva cerebral de capilares.

4º Caso haja aumento de fluxo sem que haja um aumento do número de capilares perfundidos aquele não iria influenciar a quantidade de uma substância captada por um processo como a pinocitose. Esta é fundamentalmente influenciada pela sua concentração no sangue.

5º Em nenhuma das situações experimentais se verificou qualquer aumento significativo da $PaCO_2$. Esta influencia decisivamente o fluxo sanguíneo cerebral pois o seu aumento compromete os mecanismos de

autorregulação. Valores da PaCO_2 superiores a 60 mmHg fazem com que variações tensionais ligeiras alterem significativamente o fluxo sanguíneo cerebral (Skinho e Paulson 1969; Harper e McCulloch 1985).

III - Discussão dos resultados

1 - *Efeitos da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica.*

Para além do efeito inibidor da recaptção neuronal da noradrenalina (Ross e Reny 1967), a amitriptilina tem vários outros efeitos a nível do sistema nervoso central, nomeadamente reforço de mecanismos serotoninícos (Carlsson 1970) e efeito anticolinérgico (Snyder e Yamamura 1977) e anti-histamínico (Richelson 1978). Preskorn et al. (1980) demonstraram que a amitriptilina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à água tritiada. Em estudo ulterior, Preskorn et al. (1982a) verificaram também que os efeitos da amitriptilina se mantêm mesmo aquando do tratamento prévio com agentes anti-serotoninícos e que fármacos anticolinérgicos e anti-histamínicos não têm qualquer influência na permeabilidade da barreira hematoencefálica à água.

Assumindo, com base nos resultados acabados de referir, embora com as devidas reservas, que o efeito da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica é realmente um efeito adrenérgico, tentámos esclarecer qual a alteração da barreira hematoencefálica responsável por este aumento de permeabilidade.

Em estudo prévio realizado no nosso Laboratório, Azevedo et al. (1984), demonstraram que a noradrenalina aumentava a pinocitose no endotélio de artérias mesentéricas de Cão. Este facto sugeriu-nos a hipótese de que a amitriptilina, pelos seus efeitos adrenérgicos centrais, actuasse na barreira

hematoencefálica por aumento da pinocitose.

Com um protocolo semelhante ao de Preskorn et al. (1980, 1982a), usámos como marcador de permeabilidade da barreira hematoencefálica, em vez da água tritiada, a albumina- I^{131} . Moléculas com as características e dimensões da albumina só poderão penetrar através da barreira hematoencefálica, em que as junções apertadas estejam íntegras, por transporte transcelular (Pappas 1970; Cervós-Navarro et al. 1988).

São numerosas as situações de permeabilidade anormalmente elevada em que o transporte por pinocitose de albumina ou de peroxidase do rábano para o sistema nervoso central foi demonstrado. Isto verificou-se em vários modelos experimentais de aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica tais como meningite (Quagliarello et al. 1986; Tunkel e Scheld 1989; Tunkel et al. 1990), hipertensão arterial (Westergaard et al. 1977; Johansson et al. 1982; Nag 1984, 1986), isquemia cerebral (Zaren et al. 1970; Liu 1988; Bolwig 1989), convulsões (Lorenzo et al. 1972, 1975; Nitsch et al. 1986; Bolwig 1989) e edema cerebral pós-traumático (Osterholm et al. 1969; Beggs e Waggener 1976)

Para além de termos verificado que a amitriptilina aumentou a permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina, os estudos de morfologia ultrastrutural, mostraram que este fármaco aumentou também marcadamente a pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais. Os restantes aspectos morfológicos da barreira eram semelhantes aos dos controlos.

Concluímos que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzido pela amitriptilina foi provavelmente mediado por um aumento de pinocitose.

A albumina- I^{131} é um marcador de permeabilidade da barreira hematoencefálica amplamente estudado e bastante adequado a estudos de permeabilidade do endotélio dos capilares cerebrais a macromoléculas. No entanto tem alguns inconvenientes, entre os quais o seu elevado custo. Tem ainda, na nossa circunstância particular, a limitação de, para o doseamento da

radiactividade, termos que recorrer a um contador gama, do qual não dispomos actualmente no nosso Laboratório.

Foram estas algumas das motivações que nos levaram a, usando um modelo experimental idêntico, substituir a albumina- I^{131} pela fluoresceína sódica, embora esta, pelo tamanho da sua molécula, não possa ser considerada como um marcador específico de pinocitose.

O facto de, nas principais situações em que se induziu aumentos da permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína, se ter verificado concomitantemente um aumento de pinocitose nos capilares cerebrais sugere, embora não prove, o seu envolvimento no transporte da fluoresceína para o sistema nervoso central.

Comparando os efeitos da amitriptilina sobre a passagem destes dois marcadores para o sistema nervoso central, verifica-se que enquanto a taxa de extracção cerebral da albumina aumenta de 1,16% para 1,40%, a da fluoresceína passa de 0,33% para 0,61%. O aumento da taxa de extracção em relação aos respectivos controlos foi de cerca de 20% para albumina- I^{131} enquanto que para a fluoresceína sódica foi de 85%.

Não é provável que a amitriptilina provoque um aumento maior da passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central do que de albumina porque, na observação morfológica da barreira hematoencefálica, não se visualizaram alterações das junções apertadas ou de quaisquer outras estruturas, para além dum aumento de pinocitose, que pudessem constituir uma via alternativa para a passagem da fluoresceína. A explicação para esta diferença pode residir no facto da quantidade de albumina ter sido sobrevalorizada na situação de controlo e sub-valorizada nos animais tratados.

A taxa de extracção de aproximadamente 1% nos controlos é semelhante à obtida por outros autores quando usam protocolos em que, tal como no nosso caso, não foi feita a lavagem do compartimento intravascular para remoção da radiactividade residual (Amtoorp 1976). Este valor é, em grande parte, reflexo da albumina que permaneceu no compartimento intravascular.

Quando é feita a lavagem, obtém-se taxas de extracção de cerca de 0,2% (Chiueh et al. 1978; Hansson e Johansson 1979), valor semelhante ao que obtivemos com a fluoresceína.

O facto de não termos feito a lavagem, por perfusão, do compartimento intravascular cerebral deveu-se a termos seguido o protocolo de Amtorp (1976), que se adequava ao estudo que pretendíamos efectuar e que não previa a lavagem.

O valor de 1,4% da taxa de extracção cerebral da albumina- I^{131} poderá ter sido calculado por defeito. Parte da albumina, que por efeito da amitriptilina, passou para o sistema nervoso central pode ter sido removida rapidamente. Em ratos em que se induziram convulsões pelo pentetrazol, Lorenzo et al. (1972) verificaram que a quantidade de albumina- I^{131} que entrou para o cérebro diminuiu muito rapidamente após a cessação das convulsões. Esta diminuição foi atribuída não só à sua possível metabolização no cérebro como também, e fundamentalmente, à sua remoção para o sangue contra gradiente de concentração.

2 - Efeitos da administração intracerebroventricular de aminas simpaticomiméticas na permeabilidade da barreira hematoencefálica

O uso de amitriptilina como forma de estudar a influência de mecanismos adrenérgicos centrais na permeabilidade da barreira hematoencefálica tem limitações importantes. Embora o seu uso nos tenha dado informações úteis, para prosseguirmos foi-nos necessário o recurso a métodos de estudo mais directos e cujos resultados pudessem ser mais facilmente interpretados.

Optámos pela administração estereotáxica intracerebroventricular de catecolaminas, pois a barreira hematoencefálica é particularmente eficaz relativamente à prevenção da penetração de catecolaminas no sistema nervoso central (Weil-Malherbe et al. 1959; Bertler et al. 1966; Olendorf 1971; Mrsulja e Djuricic 1980; Hardebo 1980 et al). O endotélio dos capilares

cerebrais constitui uma verdadeira barreira enzimática à passagem de neurotransmissores da periferia para o sistema nervoso central. Estas células são muito ricas em várias enzimas nomeadamente em MAO, COMT e dopa-descarboxilase (Mrsulja e Djuricic 1980; Hardebo et al. 1980).

O que pretendemos ao estabelecer este protocolo, foi estudar o efeito de agonistas adrenérgicos no endotélio dos capilares cerebrais, permitindo que contactassem com os capilares pelo seu lado abluminal, na tentativa de simularmos o que se passa com o neurotransmissor libertado pelos nervos centrais.

Qualquer substância administrada no líquor pode difundir para o interstício cerebral (Dunker et al. 1976; Fenstermacher e Patlak 1977; Smith e Rapoport 1984; Spector e Eells 1984), pois quer a pia mater que reveste a superfície cerebral quer a membrana endimária que reveste os ventrículos não constituem qualquer tipo de barreira (Levin et al. 1970; Patlak e Fenstermacher 1975; Fenstermacher e Patlak 1977).

Entre as células cerebrais existem "canais" com cerca de 200 Å que facilitam a difusão de substâncias através do interstício (Brightman 1965). Esta é fundamentalmente limitada por processos de metabolização e de captação celular.

Estudos de microinjecção de várias substâncias no parênquima cerebral mostram que a sua difusão não é uniforme; esta vai dar-se preferencialmente para os espaços perivasculares (Cserr et al. 1981; Rennels et al. 1985). Sempre que se estudam efeitos no parênquima cerebral de fármacos injectados no líquor, as amostras de tecido cerebral devem ser colhidas o mais próximo possível do local em que o fármaco foi injectado (Spector e Eells 1984). Este foi um dos motivos pelo qual o fragmento de córtex obtido nas nossas experiências se situava na posição imediatamente dorsal ao ventrículo lateral direito, local em que foi injectado o fármaco em estudo, tendo-se tido, no entanto, o cuidado de rejeitar a zona em que foi feito o orifício da injecção estereotáxica.

Dada a eficácia, rapidez e magnitude com que é inativada (Loizou 1970, Korf et al. 1973b), atendendo-se ao facto de não terem sido usados inibidores da captação neuronal ou da metabolização, optámos pelo uso de doses altas de noradrenalina e tempos de actuação curtos (10 minutos).

Não nos parece estranho que para a obtenção do efeito máximo tenham sido necessárias doses de noradrenalina de 150 µg. Uma revisão da literatura mostra-nos que sempre que se recorre à administração intracerebroventricular de noradrenalina as doses são bastante elevadas. Por exemplo, para o estudo de vários tipos de efeitos farmacológicos Haley e McCormick (1956) administraram 10 µg de adrenalina no ventrículo lateral do Ratinho (peso 20 a 25g). Sparkes e Spencer (1971) administraram 80 µg de noradrenalina no ventrículo cerebral lateral do Rato consciente, para estudo da possível interacção com o efeito antinociceptivo da morfina, sendo a única alteração descrita uma hiperestesia da qual o animal recuperou rapidamente. Philippu et al. (1971), para avaliarem possíveis efeitos cardiovasculares centrais da noradrenalina, no Gato, fizeram uma perfusão com doses de noradrenalina que iam de 2 a 4×10^{-3} M, durante 20 min, a um ritmo de 0,15 ml/min (a dose total foi de 1 a 2 mg), tendo inibido previamente a COMT e a MAO. Com a dose de 2×10^{-3} M obtiveram apenas uma elevação tensional ligeira não superior a 15 mmHg. Share e Melville (1963), com a administração de 80 µg de noradrenalina i.c.v. ao Gato, não obtêm para além de uma bradicardia outras alterações cardiovasculares significativas. Rosendorf (1972) e Mitchell et al. (1975) para estudarem o efeito da noradrenalina sobre o fluxo sanguíneo nas arteríolas intracerebrais injectaram no tálamo do coelho doses de 1 a 200 µg desta amina.

Tempos superiores a 10 minutos aumentam a probabilidade de inactivação total da noradrenalina (Korf et al., 1973b). Por outro lado, o tempo necessário para o transporte das lipoproteínas de alta densidade (HDL) através do endotélio dos capilares cerebrais é de 5 minutos (Vasile et al. 1983). Portanto optámos por 10 minutos para avaliar a passagem de fluoresceína para

o cérebro após a administração intracerebroventricular da amina. É provável que após a administração intracerebroventricular o fármaco atinja, por difusão através do interstício cerebral, o lado abluminal do endotélio dos capilares cerebrais.

Os receptores adrenérgicos alfa e beta, que foram descritos em preparações de capilares isolados, situam-se provavelmente no lado abluminal da membrana (Peroutka et al. 1980; Harik et al. 1980; Kobayashi et al. 1981, 1982, 1985). Na realidade a presença de uma inervação adrenérgica central nos microvasos cerebrais (Hartman 1973; Edvinsson et al. 1973; Rennels e Nelson 1975; Swansson et al. 1977) e a existência de adenilciclase no lado abluminal da membrana das células endoteliais dos capilares cerebrais (Herbst et al. 1979; Nathanson e Glaser 1979), são evidências a favor da localização dos receptores adrenérgicos no lado abluminal dos microvasos cerebrais.

A célula endotelial dos capilares cerebrais é, sob o ponto de vista enzimático, marcadamente assimétrica. Por exemplo, a ATPase activada pelo $\text{Na}^+\text{-K}^+$ existe apenas no lado abluminal destas células (Betz et al. 1980; Mrsulja et al. 1984).

O facto de verificarmos que agonistas alfa, noradrenalina e fenilefrina, quando administrados por via intracerebroventricular, provocam um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, dependente da dose, sendo este efeito bloqueado pela fenoxibenzamina, é altamente sugestivo da mediação daquele efeito por receptores.

O aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica foi acompanhado por um aumento significativo da pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais. Este efeito foi parcialmente bloqueado pela fenoxibenzamina. Estes resultados, juntamente com os obtidos por Jóo (1971) e Jóo et al. (1975, 1983), que verificaram que o AMPc e o dibutilil GMPc aumentam a pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais e, por Azevedo et al. (1984), que demonstraram que a noradrenalina aumenta a pinocitose em vasos periféricos de Cão, reforçam a hipótese de que haja um contributo adrenérgico na modulação da pinocitose.

Outro aspecto que merece reflexão é o facto de a administração intracerebroventricular dos fármacos utilizados poder alterar o fluxo sanguíneo cerebral. Desta alteração poderiam resultar modificações da taxa de extracção cerebral da fluoresceína, independentes de alterações da permeabilidade dos capilares cerebrais. No entanto, como já foi discutido anteriormente, a passagem de marcadores com as características da fluoresceína sódica, através da barreira hematoencefálica, é pouco afectada pelo fluxo sanguíneo cerebral (Smith 1989; Fenstermacher 1989). Por outro lado, Preskorn et al. (1982b) referem que a amitriptilina na dose de 7 mg/kg, e.v., não afecta o fluxo sanguíneo cerebral, embora tenham verificado que a administração subsequente de uma dose idêntica o diminui. Este pode, no entanto, ser aumentado pela administração central de noradrenalina (Edvinsson e Mackenzie 1977) e de isoprenalina (Wahl et al. 1974) e diminuído pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus* (Raichle et al. 1975, 1976; Katayama et al. 1981).

Os nossos trabalhos mostram que, quer a amitriptilina, quer a noradrenalina quer a estimulação eléctrica, aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica apesar dos seus efeitos sobre o fluxo sanguíneo cerebral poderem ser opostos. A administração central de noradrenalina ou de isoprenalina aumenta o fluxo sanguíneo cerebral; no entanto, apenas a noradrenalina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica. Estes factos sugerem que as alterações do fluxo sanguíneo cerebral, a ocorrerem nas nossas situações experimentais, não são a principal condicionante das alterações da taxa de extracção cerebral da fluoresceína.

Ainda no sentido de afastarmos a possibilidade dos nossos resultados estarem fundamentalmente dependentes de alterações do fluxo sanguíneo cerebral, administrámos por via intracerebroventricular um vasoconstritor não adrenérgico. Para tal utilizámos a prostaglandina F₂α em duas doses diferentes, 50 e 100 µg. Em nenhuma das doses esta substância alterou

significativamente a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Isto permitiu-nos afastar a hipótese de que um eventual efeito vasoconstritor pudesse ser o responsável pelas alterações da permeabilidade verificadas com o uso de agonistas adrenérgicos alfa.

3 - Efeitos da estimulação eléctrica do locus coeruleus sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica

Para esclarecermos qual o significado funcional dos resultados obtidos com a administração intracerebroventricular de aminas simpaticomiméticas procedemos a estudos de estimulação eléctrica do *locus coeruleus*.

O *locus coeruleus* é o principal núcleo adrenérgico em várias espécies animais, inclusivamente no Rato. Dele partem neurónios eferentes exclusivamente noradrenérgicos, para várias zonas do sistema nervoso central, nomeadamente para o córtex cerebral (Dahlstrom e Fuxe 1964; Loizou 1969; Ungerstedt 1971). Há evidências morfológicas e funcionais de que estes neurónios inervam os capilares cerebrais (Hartman 1973; Edvinsson et al. 1973; Rennels e Nelson 1975; Swansson e Connelly 1977).

Verificámos que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumentou significativamente, e de forma dependente da frequência da corrente de estimulação, a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica. Tal como aconteceu com o efeito da noradrenalina intracerebroventricular, também neste caso a fenoxibenzamina bloqueou completamente o efeito máximo da estimulação eléctrica.

O facto da administração central de isoprenalina não ter tido qualquer efeito sobre o transporte de fluoresceína para o sistema nervoso central e, paradoxalmente, ter aumentado marcadamente o número de vesículas de pinocitose no endotélio dos capilares, sugeriu-nos a hipótese de que a estimulação beta pudesse ter efeitos contrários aos da estimulação dos receptores alfa em relação à pinocitose/transporte no endotélio dos capilares cerebrais.

Para testarmos esta hipótese, decidimos estudar qual o efeito da administração de um bloqueador beta previamente à estimulação eléctrica.

Usámos o pindolol por atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e por ser um bloqueador beta não selectivo (Ablad et al. 1976). Esta inespecificidade interessava-nos numa primeira abordagem uma vez que estão descritos os dois sub-tipos de receptor beta no endotélio dos capilares cerebrais (Kobayashi et al. 1981).

Verificámos que este bloqueador potenciou significativamente o efeito da estimulação com correntes de 5 Hz, a frequência mais baixa para a qual se obtinha aumento significativo da taxa de extracção cerebral da fluoresceína em relação ao controlo. Neste caso, a permeabilidade passou a ser semelhante à obtida com correntes de 15 e 30 Hz.

A injeção intracerebral de doses baixas de noradrenalina tem um efeito agonista predominantemente nos receptores beta vasculares, passando o seu efeito a ser fundamentalmente mediado por adrenoceptores alfa quando se aumenta a quantidade de noradrenalina injectada (Rosendorff 1972; Mitchell et al. 1975).

Estudos de Graham e Aghajanian (1971) referem que a frequência espontânea de descarga do *locus coeruleus* é de 2 Hz. Ao usarmos frequências de 5 Hz, embora a resultante do estímulo seja de tipo alfa (pois há um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica), a componente beta da resposta pode assumir uma importância ainda relativamente grande. Daí que a influência resultante do bloqueio beta nestas circunstâncias seja claramente mensurável, assumindo provavelmente maior importância relativa do que se se usassem frequências mais altas.

Korf et al. (1973a, 1973b) demonstraram que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumenta, de forma dependente da frequência, a libertação da noradrenalina no córtex ipsilateral do Rato. O efeito máximo verificou-se para frequências de 20 Hz e o nível do sulfato de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) atingiu um estado de equilíbrio, com um valor 80% superior ao do

hemisfério contralateral, ao fim de 15 minutos de estimulação. Quando inibiam previamente a síntese de noradrenalina, os autores verificaram que estimulando o *locus coeruleus* com uma corrente de 30 Hz o seu nível diminuía em duas fases, sendo a taxa de diminuição nos primeiros dois minutos (primeira fase) 10 vezes superior à da segunda fase (até aos trinta minutos). Os autores concluíram que o nível de noradrenalina no córtex cerebral depende do fluxo do impulso nervoso através das fibras adrenérgicas (Korf et al. 1973a, 1973b).

Concluimos pois que a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica, sendo este efeito mediado por receptores adrenérgicos alfa. A estimulação beta terá, provavelmente, um efeito oposto.

Os efeitos cardiovasculares da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* permanecem mal esclarecidos. A proximidade anatómica entre o *locus coeruleus* e estruturas implicadas na regulação cardiovascular central (Mraovitch et al. 1982, 1985; Bandler et al. 1991) torna difícil este tipo de estudos, mas o *locus coeruleus* não parece estar primariamente implicado no controlo cardiovascular (Ward e Gunn 1976).

A estimulação eléctrica do *locus coeruleus* provoca, no Gato, subidas tensionais significativas (cerca de 40 mm de Hg) apenas quando se usam correntes de intensidade compreendida entre os 200 e os 800 μ A e frequências de 50 Hz (Ward e Gunn 1976).

Raichle et al. (1975), ao estimularem electricamente o *locus coeruleus*, verificaram uma diminuição do fluxo sanguíneo cerebral. Se aquela estimulação provocasse uma subida tensional considerável que excedesse o limite superior de autorregulação, o fluxo não diminuiria, mas pelo contrário, aumentaria.

As características da corrente por nós utilizada, 50 μ A e uma frequência máxima de 30 Hz, diminuem a probabilidade de estimulação de outras estruturas para além do *locus coeruleus*.

No entanto o facto mais importante no sentido de excluir o aumento da pressão arterial como sendo responsável pelo aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica decorrente da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* foi o de que a medição da pressão arterial que efectuámos durante todo o período de estimulação ter mostrado que esta não foi significativamente diferente da dos animais controlo durante o mesmo período de tempo, nunca excedendo os limites superiores de autorregulação. Estes são excedidos quando a pressão arterial média ultrapassa os 180 a 200 mmHg (Rapoport e Thompson 1975; Edvinsson et al. 1976).

Como já foi oportunamente referido, o controlo das experiências de estimulação eléctrica consistiu na colocação do eléctrodo no *locus coeruleus* durante o mesmo tempo que foi utilizado nas situações em que a estimulação foi efectuada. A este propósito merece ser comentado o facto de que o valor da taxa de extracção cerebral da fluoresceína obtido na situação controlo foi de 0,27%. Este valor contrasta com o valor da taxa de extracção cerebral de fluoresceína encontrado nas experiências de injeção estereotáxica intracerebroventricular, na situação de controlo, (0,76%). A explicação para tal discrepância advém, muito provavelmente, do facto de que nas experiências de estimulação eléctrica do *locus coeruleus* a craneotomia para introdução do eléctrodo ter sido feita a uma distância consideravelmente maior da zona de onde se colheu a amostra de tecido para doseamento do marcador do que nas situações de injeção intracerebroventricular. Nestas, embora se tenha tido o cuidado de obter a amostra de tecido de forma a que fosse evitado o local da injeção, a distância entre os dois locais foi pequena, pois a administração do fármaco ou do seu dissolvente fez-se no ventrículo lateral direito e o local de doseamento do marcador foi o córtex parietal do mesmo lado. Está de acordo com esta hipótese explicativa a semelhança dos valores obtidos no controlo das situações experimentais destinadas ao estudo dos efeitos da amitriptilina na permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica, em que não se fez craneotomia, e no controlo da

estimulação eléctrica. O traumatismo local, mecânico e térmico, resultante da craneotomia pode, de alguma forma, ter afectado a permeabilidade da barreira hematoencefálica na zona circundante.

4 - *Estudo morfológico ultrastrutural*

A escassez de pinocitose, em circunstâncias normais, é uma característica fundamental da barreira hematoencefálica (Cervós-Navarro 1963). No entanto, sob determinadas influências experimentais ou patológicas verifica-se um aumento acentuado de pinocitose no endotélio dos capilares, acompanhado de um aumento de transporte de macromoléculas. Portanto, o sistema de transporte de macromoléculas não deverá ser considerado inexistente mas sim inactivo ou suprimido em circunstâncias normais.

Dos resultados das nossas experiências concluímos que os agonistas adrenérgicos alfa, quando administrados por via intracerebroventricular, aumentam a actividade de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais.

No caso da administração i.p. de amitriptilina, intracerebroventricular de noradrenalina e da estimulação eléctrica do *locus coeruleus*, o aumento da pinocitose foi acompanhado por um aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica. O facto de não termos observado quaisquer outras alterações morfológicas no endotélio dos capilares cerebrais que pudessem explicar a passagem dos marcadores por nós utilizados para o sistema nervoso central, sugere que a pinocitose esteve implicada no transporte transcelular.

Há modelos patológicos experimentais e mesmo situações patológicas em que a permeabilidade da barreira hematoencefálica está aumentada, sendo a única alteração morfológica observada um aumento acentuado de vesículas de pinocitose. Constituem exemplos disto, os vários tipos de edema cerebral desde o pós-traumático (Beggs e Waggener 1976; Osterholm et al. 1969) ao pós-isquémico (Zaren et al. 1970; Liu 1988; Hatashita e Hoff 1990) ou ao induzido pelo frio (Bodsch et al. 1982). Estes fenómenos também se verificam

em modelos experimentais de hipertensão arterial (Westergaard et al. 1977; Johansson et al. 1982; Nag 1984, 1986), meningite (Quagliarello et al. 1986; Tunkel e Scheld 1989; Tunkel et al. 1990), convulsões (Lorenzo et al. 1972, 1975; Nitsch et al. 1986; Bolwig 1989), diabetes (Schivers, 1979; Stauber et al. 1981) e patologia vascular cerebral (Zaren et al. 1970; Liu 1988; Hatashita e Hoff 1990).

As patologias humanas correspondentes aos modelos referidos cursam frequentemente com aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica acompanhado de edema cerebral, sendo este responsável por parte da morbidade e mortalidade consequentes a estas situações patológicas (McMenamin e Volpe 1984).

Quando estudámos os efeitos morfológicos ultraestruturais da estimulação eléctrica do *locus coeruleus* verificámos que, para além do aumento da pinocitose, estavam, em alguns casos, presentes sinais morfológicos indiscutíveis de edema cerebral.

No caso da administração central de isoprenalina, o aumento de pinocitose por ela induzido não se acompanhou de um aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica. Esta pinocitose não teve efeitos no transporte da periferia para o sistema nervoso central. Estes resultados apresentam semelhanças com os que Dux et al. (1988) referem para a histamina. Estes autores demonstraram que a administração intracerebroventricular de histamina, no Rato, provocou um aumento marcado de pinocitose não acompanhado de aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica. Em consequência dos seus resultados, os autores sugeriram a existência duma pinocitose "inversa" destinada ao transporte do cérebro para o sangue. A existência de uma pinocitose deste tipo foi também sugerida por van Deurs (1976) e por Lorenzo et al. (1972). Estes últimos estudaram a permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina-I¹²⁵ em ratos com convulsões provocadas pelo pentetrazol e verificaram que a albumina que entrou para o sistema nervoso central saiu rapidamente após cessação do

estímulo que provocou a sua entrada. Os autores concluíram que a saída da albumina não se deveu à difusão para o líquido cefalorraquidiano, pelo menos de forma significativa, à sua metabolização intracerebral, mas sim a um transporte retrógrado para o sangue por pinocitose.

Este mecanismo é também sugerido pelo facto de que quando se injecta albumina marcada no parênquima cerebral esta se vai localizar na zona perivascular, sendo depois eliminada para o sangue (Rennels et al. 1985).

Especulou-se também acerca da possibilidade de um mecanismo deste tipo estar implicado na reabsorção das proteínas extravasadas para a zona perivascular da glia, na fase de regressão do edema induzido pela isquemia, no Rato (Vorbrot et al. 1985; Hatashita e Hoff 1990).

Foi baseado nesta hipótese da pinocitose inversa que interpretei os resultados obtidos com a isoprenalina. Eles sugerem que nesta circunstância este tipo de pinocitose possa estar dependente da estimulação de receptores beta. Os resultados da estimulação adrenérgica alfa ou beta sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica, correlacionados com os respectivos resultados morfológicos, são compatíveis com a seguinte hipótese: a estimulação adrenérgica alfa e a estimulação adrenérgica beta têm efeitos opostos na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os fundamentos desta hipótese são os seguintes:

- pinocitose induzida pela noradrenalina ou pela isoprenalina acompanhada, somente no caso da primeira, de aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica
- a administração prévia de fenoxibenzamina bloqueou apenas parcialmente o aumento de pinocitose induzido pela administração central de noradrenalina mas bloqueou totalmente o aumento da permeabilidade
- o efeito da estimulação eléctrica na permeabilidade da barreira hematoencefálica foi bloqueado pela administração prévia de um bloqueador alfa e potenciado pela administração prévia de um bloqueador beta.

Atribuímos o aumento da passagem de marcadores para o sistema nervoso central verificado nas várias situações experimentais, cujos resultados acabámos de discutir, fundamentalmente a um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e não da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano pelas seguintes razões:

- a superfície da barreira hematoencefálica é cerca de 5000 vezes maior do que a da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (Pardridge 1983; Bolwig 1989), sendo portanto quantitativamente muito mais importante em situações em que se verifica a passagem para o sistema nervoso central de uma substância que, como a fluoresceína sódica, não passa, em circunstâncias normais, para o cérebro.
- a passagem de uma substância da periferia para o parênquima cerebral através do líquido implica bastante tempo, pois a substância tem de atravessar os plexos coroideus e depois difundir do líquido para o parênquima cerebral (Carpenter e Sutin 1983). Os tempos que utilizámos em todas as nossas experiências foram relativamente curtos (10 a 30 minutos).
- os estudos que efectuámos de morfologia ultrastrutural mostram que nas situações de aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica houve aumento do número de vesículas de pinocitose, no endotélio dos capilares cerebrais, o que pode explicar aqueles aumentos de permeabilidade.

Também não nos parece provável que os nossos resultados tenham sido significativamente influenciados pela passagem dos marcadores da permeabilidade da barreira hematoencefálica através dos capilares dos órgãos circumventriculares. Sob esta designação, órgãos circumventriculares, engloba-se a glândula pineal, a neuro-hipófise, a área postrema, o órgão sub-fornical e a eminência média do hipotálamo. Nestas estruturas não existe barreira hematoencefálica porque os capilares cerebrais são fenestrados (ver Carpenter e Sutin 1983). Para além da superfície do leito capilar dos órgãos

circunventriculares ser desprezível comparativamente com a dos capilares da barreira hematoencefálica, o epêndima que reveste estas estruturas tem, entre as células, junções apertadas que impedem o extravasamento de substâncias destas zonas para outros locais do sistema nervoso central através do líquido (Brightman et al. 1975) Estes factos, acrescidos ainda da circunstância de que os órgãos circunventriculares se localizam a uma distância considerável do local em que foi colhida a amostra de cérebro para doseamento do marcador, o córtex parietal direito, tornam improvável a hipótese de que estas estruturas tenham sido relevantes na passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central.

5 - Possibilidade da implicação de mecanismos adrenérgicos centrais nas alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica que acompanham determinadas patologias

Estão descritas alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica, acompanhadas de aumento da pinocitose nos microvasos cerebrais, em vários tipos de situações patológicas. Aquelas são em muitos casos responsáveis, pelo menos em parte, pela morbidade e mortalidade da patologia em causa. São exemplo, a meningite (Quagliarello et al. 1986; Tunkel e Scheld 1989; Tunkel et al. 1990), a isquemia (Zaren et al. 1970; Liu 1988; Hatashita e Hoff 1990) e o traumatismo cerebral (Beggs e Waggener 1976; Osterholm et al. 1969), a hipertensão arterial aguda ou crónica (Westergaard et al., 1977; Johansson et al. 1982; Nag 1984, 1986), a diabetes (Schivers 1979; Stauber et al. 1981), as convulsões (Lorenzo et al. 1972, 1975; Nitsch et al. 1986; Bolwig 1989) e o envelhecimento (Ordy et al. 1975; Ohata et al. 1981).

Agressões ao sistema nervoso central, de etiologias completamente diversas, traduzem-se por um mecanismo comum de alterações metabólicas, as quais são responsáveis pelas lesões das células do sistema nervoso central

(Simon 1989).

Situações infecciosas, traumáticas ou isquémicas do sistema nervoso central levam à síntese de neurotransmissores excitatórios, aminoácidos tais como o glutamato ou o N-metil-D-aspartato (NMDA) (Brierley e Graham, 1984; Benveniste et al. 1984; Drejer et al. 1985; Silverstein et al. 1986). Estes, actuando nos canais de cálcio mediados por receptores, provocam um aumento do cálcio intracelular (Olney et al. 1986), do qual resulta, entre outras, a libertação de grandes quantidades de noradrenalina pelos terminais nervosos (Magnoni et al. 1987).

Em várias situações patológicas, em que há alterações da permeabilidade da barreira hematoencefálica, há um aumento do turnover da noradrenalina no sistema nervoso central (Meyer et al. 1974; Preskorn et al. 1981), tendo, em 1976, Fenske et al. admitido a hipótese de as aminas biogénicas poderem ser indutoras de edema cerebral.

Também nalguns modelos experimentais de stress, no Rato, provocado pelo frio, pela imobilização ou pela administração de choques eléctricos, há aumento de actividade adrenérgica a nível central (Barchas e Freedman 1963; Maynert e Levi 1963; Porsolt et al. 1979; Harri e Kvusela 1986; Sharma et al. 1991). Sharma et al. (1991), quando provocam a natação forçada ao Rato, verificam que há um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina.

Em linhas gerais o que está descrito a este propósito nas várias situações experimentais é o seguinte:

Meningite bacteriana

Vários modelos experimentais de meningite mostram que poucas horas após a administração intracisternal de estirpes patogénicas causadoras habituais desta infecção, de extractos das suas cápsulas ou paredes, da sua endotoxina ou de interleucina-1, há um aumento de permeabilidade da barreira

hematoencefálica (Quagliarello et al. 1986, 1987; Wispelwey et al. 1988; Tunkel e Scheld 1989;). Esta está também aumentada na doença humana (Swartz e Dodge 1965). Aqueles modelos experimentais permitiram caracterizar morfológicamente o tipo de alterações em causa. Verificou-se, pois, que para além do aumento da permeabilidade à albumina ou à peroxidase do rábano, houve um aumento marcado de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais.

A rapidez com que decorrem estas alterações após a injeção intracisternal dos microrganismos infectantes e a distância a que se dão do local da inoculação faz pensar que a infecção possa desencadear estas alterações por provocar a entrada em funcionamento de mecanismos com repercussão generalizada no sistema nervoso central. Pode pois especular-se se o aumento da libertação da noradrenalina, descrito em situações de agressão do sistema nervoso central, poderá ter sido responsável pelo aumento da pinocitose e da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Desde o advento dos antibióticos, em 1950, altura em que a mortalidade da meningite baixou drasticamente, verifica-se que apesar de se dispor de fármacos bactericidas cada vez mais potentes, a mortalidade global desta doença pouco mudou (Schlech et al. 1985; Quagliarello e Scheld 1986). A meningite pneumocócica, por exemplo, tinha uma mortalidade de 30% quando tratada com a penicilina, nos anos que se sucederam à introdução deste antibiótico; trinta anos depois a mortalidade é quase a mesma (Quagliarello e Scheld 1986). Aponta-se como explicação possível para estes factos, a hipótese de que isto se deva às lesões neurológicas consequentes à hipertensão intracraniana, na génese da qual está um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica induzido por mecanismos desencadeados pelo agente infectante e que se mantêm para além da erradicação do microrganismo (Shenkin e Bouzarth 1970; Scheld 1981; McMenamin e Volpe 1984).

O conhecimento mais profundo da fisiopatologia da meningite e dos mecanismos que controlam a permeabilidade da barreira hematoencefálica

poderia conduzir a formas de terapêutica eficazes para reverter situações de aumento excessivo da permeabilidade da barreira hematoencefálica. Isto reduziria muito provavelmente a mortalidade e morbidade decorrentes desta doença.

Convulsões

Uma crise convulsiva generalizada é acompanhada quase sempre de aumento da pressão intracraniana e por vezes de edema cerebral significativo, resultante de um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Lorenzo et al. 1972, 1975; Nitsch et al. 1986; Bolwig 1989).

Em modelos de convulsões, no Rato, provocadas pela administração do pentetrazol, verificou-se que havia aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, acompanhado de um aumento de pinocitose a nível dos capilares cerebrais. Não parece provável que este seja apenas devido a um aumento da pressão arterial pois, para valores tensionais idênticos, o pentetrazol só aumentou a permeabilidade da barreira hematoencefálica nos animais em que provocou convulsões (Abbott e Revest 1991). Por outro lado, em animais curarizados, com controlo da tensão arterial, a descarga neuronal de tipo convulsivante só por si aumentou a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Lorenzo et al. 1967).

As crises convulsivas são também exemplos de situações em que há hiperactividade adrenérgica central, podendo-se especular sobre a possibilidade desta hiperactividade adrenérgica intervir na génese das alterações descritas.

Isquemia e traumatismo cerebral

Também estas situações se acompanham de edema cerebral, pelo qual a pinocitose tem sido responsabilizada.

Na isquemia, consoante a fase do processo, a pinocitose poderia estar implicada no transporte de proteínas para o sistema nervoso central (Hirano

et al. 1969; Baker et al. 1971) ou, na fase de resolução do edema, faria o transporte das mesmas no sentido cérebro-sangue (Vorbrodt et al. 1985). Esta é designada por alguns autores como pinocitose inversa (Lorenzo et al. 1972; Dux et al. 1988).

O cálcio intracelular está também aumentado após isquemia ou traumatismo, o que poderá contribuir para a libertação maciça de noradrenalina que ocorre, nestas situações, no sistema nervoso central (Meyer et al. 1974; Welch et al. 1977; Magnoni et al. 1987).

Zervas e Hori (1973) verificaram que num modelo experimental de isquemia a incidência de sequelas neurológicas era menor quando se inibia previamente a síntese da noradrenalina.

Em vários modelos animais, verificou-se um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica após a oclusão da carótida interna (Zaren et al. 1970; Liu 1988; Hatashita e Hoff 1990). Magnoni (1984a) demonstrou que este aumento de permeabilidade se acompanhava de uma diminuição do número de receptores adrenérgicos beta nos microvasos cerebrais em ambos os hemisférios cerebrais. A diminuição dos receptores beta foi anulada, no hemisfério contralateral, pela secção do corpo caloso (Magnoni et al. 1984b) e nos dois hemisférios, pela destruição prévia do locus coeruleus pela 6-hidroxi-dopamina (Magnoni et al. 1986).

A diminuição dos receptores beta seria mais um factor que poderia contribuir para o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Hipertensão arterial

Quer a hipertensão arterial aguda quer a crónica (Westergaard et al. 1977; Johansson et al. 1982; Nag 1984, 1986), acompanham-se de aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Em modelos animais de hipertensão aguda provocada pela administração de adrenalina, angiotensina ou metaraminol, o aumento de permeabilidade acompanha-se de aumento de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais,

sendo a passagem de proteínas para o sistema nervoso central impedida pelo tratamento prévio dos animais com fármacos inibidores da pinocitose (Hardebo e Johansson 1980).

O aumento agudo da pressão arterial acompanha-se de aumento do cálcio intracelular no sistema nervoso central (Magnoni et al. 1987), o que, como se referia atrás, leva à libertação de noradrenalina pelos terminais nervosos (Magnoni et al. 1987).

Foi demonstrado que nos ratos espontaneamente hipertensos, situação em que a permeabilidade da barreira hematoencefálica e a pinocitose estão aumentadas, há um aumento de receptores alfa-1 e uma diminuição dos receptores beta nos microvasos cerebrais (Magnoni et al. 1983; Kobayashi et al. 1985).

Parece, pois, que também na associação entre hipertensão arterial e aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica há lugar para a intervenção de mecanismos adrenérgicos.

Não penso que seja provável que o aumento de pinocitose no endotélio dos capilares verificado nas situações ou modelos patológicos que acabámos de referir resulte de agressão inespecífica à célula endotelial. Existindo uma seriação de lesões que fundamenta a noção de "vulnerabilidade selectiva", as células endoteliais caracterizam-se, entre as células do sistema nervoso central, por serem das menos vulneráveis, quando aquele é submetido a uma agressão generalizada (Brierley e Graham 1984).

Nas situações que acabámos de descrever, a relação entre o aumento da pinocitose e a libertação da noradrenalina é uma possibilidade a ter em conta.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Iniciámos em 1987 o estudo da possibilidade de que mecanismos adrenérgicos centrais pudessem influenciar a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

A abordagem deste tema foi feita através da administração periférica de fármacos com actividade adrenérgica central, com a administração central, por estereotaxia, de agonistas adrenérgicos e ainda pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus*. Foram, em cada uma destas circunstâncias, estudadas quer a permeabilidade da barreira hematoencefálica a um marcador, quer a morfologia ultrastrutural da barreira hematoencefálica. As conclusões obtidas deste estudo foram as seguintes:

- 1 - A amitriptilina aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina- I^{131} e à fluoresceína sódica.
- 2 - A amitriptilina aumenta a actividade de pinocitose, sem provocar qualquer outra alteração morfológica no endotélio dos capilares cerebrais.
- 3 - A noradrenalina e a fenilefrina administradas por via intracerebroventricular aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica, sendo o efeito da noradrenalina completamente bloqueável pela fenoxibenzamina.
- 4 - A noradrenalina administrada por via intracerebroventricular aumenta a actividade de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais, sendo este efeito parcialmente bloqueável pela fenoxibenzamina.
- 5 - A administração intracerebroventricular de isoprenalina não tem qualquer efeito na permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica.

- 6 - A isoprenalina administrada por via intracerebroventricular aumenta a pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais.
- 7 - A estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica à fluoresceína sódica, sendo este efeito completamente bloqueado pela fenoxibenzamina e potenciado pelo pindolol.
- 8 - A estimulação eléctrica do *locus coeruleus* aumenta a pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais, sendo este acompanhado de sinais morfológicos evidentes de edema cerebral.

Em nenhuma das situações em que se verificou aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, houve alterações significativas de outros parâmetros que o pudessem explicar. Os parâmetros estudados foram a pressão arterial, PaO₂, PaCO₂ e pH sanguíneo.

Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, integrados com outros conhecimentos existentes neste campo e já abordados na discussão, formulei a seguinte proposta de interpretação global:

A barreira hematoencefálica é uma estrutura dinâmica que sob determinadas influências, nomeadamente do *locus coeruleus*, poderá modificar as suas características de permeabilidade. Em determinadas circunstâncias em que haja necessidade de aumento do aporte de determinados substratos da periferia para o sistema nervoso central, há um aumento de permeabilidade neste sentido, podendo este ser invertido em situações em que haja necessidade de remoção de determinadas substâncias do sistema nervoso central.

O transporte transcelular por pinocitose poderá ser uma forma importante de transporte através da barreira hematoencefálica em situações de aumento de actividade adrenérgica central.

A estimulação de receptores adrenérgicos alfa e beta existentes no endotélio dos capilares cerebrais tem efeitos opostos sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica. A estimulação alfa, por aumento da pinocitose no sentido da periferia para o sistema nervoso central, poderá aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, e a estimulação beta, por indução de um transporte transcelular em sentido inverso, será responsável pela remoção de substâncias existentes no interstício cerebral.

A predominância do efeito beta ou alfa estará dependente da quantidade do neurotransmissor libertado. Para pequenas quantidades o efeito predominante poderá ser o beta e por conseguinte haverá um predomínio do transporte do sistema nervoso central para a periferia, e pelo contrário, para grandes quantidades de neurotransmissor libertado o transporte far-se-á da periferia para o sistema nervoso central.

A escassa actividade de pinocitose descrita nos capilares cerebrais em situações de controlo poderá funcionar no sentido sistema nervoso central/periferia e resultará do efeito da actividade basal do *locus coeruleus*. Este poderá pois, em circunstâncias basais, contribuir para o reforço da barreira hematoencefálica.

RESUMO

Os capilares cerebrais de várias espécies animais, entre as quais a do Rato, são inervados por nervos adrenérgicos com origem no próprio sistema nervoso central e cujos corpos celulares se localizam no *locus coeruleus*.

O significado fisiológico desta inervação é ainda mal conhecido, embora tenha sido admitida a hipótese de que possa ter algum papel na regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Os resultados dos estudos neste campo têm sido contraditórios, o que explica provavelmente a ausência quase total de referências ao papel deste tipo de inervação nas principais revisões actuais sobre permeabilidade da barreira hematoencefálica.

No presente trabalho estudámos as possíveis interacções de mecanismos adrenérgicos centrais com a barreira hematoencefálica, quer sob o ponto de vista de transferência de marcadores, quer ainda sob o aspecto morfológico ultrastrutural.

Neste estudo usámos fundamentalmente três abordagens distintas:

- a administração periférica de fármacos com actividade adrenérgica central;
- a administração estereotáxica central de fármacos com actividade adrenérgica;
- a estimulação eléctrica do *locus coeruleus*.

A administração de amitriptilina (34 mg/kg, i.p.) aumentou a permeabilidade da barreira hematoencefálica à albumina- I^{131} e à fluoresceína sódica. Este aumento de permeabilidade acompanhou-se de um aumento de pino-citose no endotélio dos capilares cerebrais.

A administração estereotáxica intracerebroventricular de noradrenalina (75 e 150 μ g) e de fenilefrina (800 μ g), bem como a estimulação eléctrica do *locus coeruleus* (5, 15 e 30 Hz) aumentaram a permeabilidade da barreira

hematoencefálica à fluoresceína sódica. A fenoxibenzamina (25 e 10 mg/kg, i.p.) administrada previamente à noradrenalina intracerebroventricular (150µg) ou à estimulação eléctrica com 15 Hz bloqueou completamente o aumento de permeabilidade à fluoresceína sódica. Pelo contrário, quando antes da estimulação eléctrica com 5 Hz se administrou o pindolol (10 mg/kg, i.p.) houve uma potenciação do efeito da estimulação eléctrica em relação à passagem de fluoresceína para o sistema nervoso central.

Paralelamente ao aumento da permeabilidade induzido pela noradrenalina intracerebroventricular ou pela estimulação eléctrica, houve um aumento de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais. A administração prévia de fenoxibenzamina bloqueou parcialmente o aumento de pinocitose induzido pela noradrenalina intracerebroventricular.

Aquele paralelismo não se verificou, contudo, no caso da administração intracerebroventricular de isoprenalina (10 µg), que aumentou a pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais sem ter alterado a permeabilidade da barreira hematoencefálica.

Do conjunto de resultados obtidos concluo que:

- 1 - A estimulação de adrenoceptores alfa aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica.
- 2 - A estimulação de adrenoceptores beta poderá estar implicada no transporte em sentido oposto, isto é, do sistema nervoso central para o sangue.
- 3 - As variações de permeabilidade dependentes de mecanismos adrenérgicos centrais estão provavelmente relacionadas com variações de actividade de pinocitose no endotélio dos capilares cerebrais.
- 4 - A permeabilidade da barreira hematoencefálica varia, provavelmente, com as condições fisiológicas, nervosas e /ou humorais, estando o seu controlo dependente da actividade do *locus coeruleus*.

SUMMARY

In several animal species, the rat included, brain capillaries are innervated by central adrenergic neurons with origin in the *locus coeruleus*.

The physiological role of this innervation is not well established. However, the hypothesis that these nerves are involved in the control of blood-brain barrier permeability has been raised. The studies in this field have produced contradictory results. This fact may explain, at least in part, the scarcity of references to the adrenergic control of blood-brain barrier permeability in recent reviews on the blood-brain barrier.

Here we present the results of several studies on the influences of central adrenergic mechanisms in both the permeability and the ultrastructural morphology of the rat blood-brain barrier.

Three main methodological approaches have been used:

- peripheral administration of drugs with central adrenergic effects
- central stereotaxic administration of adrenergic drugs
- electrical stimulation of *locus coeruleus*

Amitriptyline (34 mg/kg, i.p.) induced an increase in blood-brain barrier permeability to I¹³¹-albumin and to sodium fluorescein. This was accompanied by an increased pinocytotic activity in brain capillary endothelial cells.

Stereotaxically administered noradrenaline (75 and 150 µg) or phenylephrine (800 µg) as well as electrical stimulation of *locus coeruleus* (5, 15 and 30 Hz), increased blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein.

Phenoxybenzamine (25 and 10 mg/kg, i.p.) completely prevented the increase in blood-brain barrier permeability induced by 150 µg of centrally administered noradrenaline or by 15 Hz electrical stimulation of *locus coeruleus*. On the other hand, previous administration of pindolol (10 mg/kg, i.p.) potentiated the effects of 5 Hz electrical stimulation of the *locus coeruleus*.

An increase in pinocytotic activity of capillary endothelial cells has been observed, accompanying the increase in blood-brain barrier permeability induced by intracerebroventricular noradrenaline or by electrical stimulation of *locus coeruleus*. Previously administered phenoxybenzamine has only partially prevented the noradrenaline induced increase in the pinocytotic activity of capillary cells.

Intracerebroventricular administration of isoprenaline (10 µg) had no effect on blood-brain barrier permeability to peripherally injected sodium fluorescein. Nevertheless it has induced an increase in capillary endothelial cell pinocytosis.

From the present results, it may be concluded that:

- 1 - Alpha adrenoceptor stimulation increases the permeability of blood-brain barrier.
- 2 - The stimulation of beta adrenoceptors probably induces an increase in the transport from the brain to the blood.
- 3 - The permeability changes of blood-brain barrier dependent on central adrenergic mechanisms are probably related with pinocytotic activity variations in brain capillary endothelial cells.
- 4 - The permeability properties of blood-brain barrier could be adapted to several stress situations, its control being dependent on the activity of the *locus coeruleus*.

BIBLIOGRAFIA

Abbott NJ, Revest PA (1991) Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 3:39-72

Ablad B, Carlsson E, Dahlof C (1976) Some aspects of pharmacology of β -adrenoceptor blockers. *Drugs*, 11(suppl 1):100-111

Amtrop O (1976) Transfer of I^{125} -albumine from blood into brain and cerebrospinal fluid in newborn and juvenile rats. *Acta Physiol Scand*, 96:399-406

Azevedo I, Castro-Tavares J, Garrett J (1981) Ultrastructural changes of blood vessels of perinephritic hypertensive dogs. *Blood Vessels*, 18:110-119

Azevedo I, Castro-Tavares J, Sarmento A (1984) Effects of catecholamines on the pinocytotic activity of endothelium, smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood-Vessels*, 21:132-133

Baba H, Oishi R, Saeki K (1988) Enhancement of blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein by stimulation of μ opioid receptors in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 337:423-428

Bachelard HS, Daniel PM, Love ER (1973) The transport of glucose into the brain of the rat *in vivo*. *Proc R Soc Lond*, 183:71-82

Baker RN, Cancilla PA, Pollock PS (1971) The movement of exogenous protein in experimental cerebral edema. *J Neuropathol Exp Neurol*, 30:668-679

Bandler R, Carrive P, Zhang SP (1991) Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progr Brain Res*, 87:269:305

Barchas JD, Freedman D (1963) Brain amines: Response to physiological stress. *Biochem Pharmacol*, 12:1232-1235

Becker H, Quadbeck G (1952) Tierexperimentelle Untersuchungen über die Funktionsweise der Blut-Hirnschranke. *Z Naturforsch*, 7B:493 (ver Davson 1989)

Beggs JL, Waggener JD (1976) Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury of the spinal cord. *Lab Invest*, 34:428-439

Benvenist H, Drejer J, Schovsboe A, Diemer NH (1984) Elevation of extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracellular microdialysis. *J Neurochem*, 43:1369-1374

Bertler A, Falk B, Owman CH, Rosengren E (1966) The localization of monoaminergic blood-brain barrier mechanisms. *Pharmac Rev*, 18:369-385

Betz AL, Firth JA, Goldstein GW (1980) Polarity of the blood-brain barrier. Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res*, 192:17-28

Bodsch W, Hurter T, Hossmann (1982) Immunochemical method for quantitative evaluation of vasogenic brain edema following cold injury of rat brain. *Brain Res*, 249:11-121

Bolwig TG (1989) Epileptic seizures and the blood-brain barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol II*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp567-574

Bradbury MW (1979) *Concept of Blood-Brain Barrier*, Wiley, Chirchester

Bradbury MW (1989) Transport across the blood-brain barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol I*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp119-136

Brierley JB, Graham D (1984) Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In: Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW (eds) Greenfield's Neuropathology 4th ed, Wiley, New York, pp125-207

Brightman MW (1965a) The distribution within the brain of ferritin injected into the cerebrospinal fluid compartments. *J Cell Biol*, 26:99-123

Brightman MW (1965b) The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II Parenchymal distribution. *Am J Anat*, 117:193-220

Brightman MW, Reese TS (1969) Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40:647-677

Brightman MW, Prescott L, Reese TS (1975) Intercellular junctions of special ependyma. In: Knige KM, Scott DE, Kobayashi H, Ishii S (eds) Brain endocrine interaction. II The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. Krager, Basel

Carlsson A (1970) Structural specificity for inhibition of ^{14}C -hydroxytryptamine uptake by cerebral slices. *J Pharm Pharmacol*, 22:729-732

Carpenter MB, Sutin J (1983) Meninges and cerebrospinal fluid. In: Carpenter MB, Sutin J (eds) Human Neuroanatomy, Williams and Wilkins, London, pp1-25

Cervós-Navarro J (1963) Elektromikroskopische Befunde an den Capillaren der Hirnrinde. *Arch Psychia Nervenkr*, 204:484-504

Cervós-Navarro J, Kannuki S, Nakagawwa S (1988) Blood-brain barrier (BBB). Review from morphological aspect. *Histol Histopath*, 3:203-213

Chiueh CC, Sun CL, Kopin IJ, Fredericks WR, Rapoport SI (1978) Entry of ^3H -Norepinephrine, ^{125}I -Albumine and Evans Blue from blood into brain following unilateral osmotic opening of the blood-brain barrier. *Brain Res*, 145:291-301

Cserr HF, Cooper DN, Suri PK (1981) Efflux of radiolabelled polyethylene glycols and albumin from rat brain. *Am J Physiol*, 240:F319-F328

Dahlstrom A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, (suppl 232):1-55

Davson H (1955) A comparative study of aqueous humor and cerebrospinal fluid in the rabbit. *J Physiol (Lond)*, 129:111-133

Davson H (1989) History of the blood-brain barrier concept. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol I*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp27-52

Donovik PJ (1974) A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Technol*, 49:49-51

Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schovsboe A (1985) Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem*, 45:145-151

Dunker RO, Harris AB, Jenkins DP (1976) Kinetics of horseradish peroxidase migration through the cerebral cortex. *Brain Res*, 118:199-217

Dux E, Dóczy T, Joó F, Szerdahelyi P, Siklós L (1988) Reverse pinocytosis induced in cerebral endothelial cells by injection of histamine in the cerebral ventricle. *Acta Neuropathol (Berl)*, 76:484-488

Edvinsson L, MacKenzie ET (1977) Amine mechanisms in the cerebral circulation. *Pharmac Rev*, 28(4):276-278

Edvinsson L, Lindvall O, Nielsen K, Owman C (1973) Are brain vessels innervated by central (non-sympathetic) adrenergic neurons? *Brain Res*, 63:496-499

Edvinsson L, Owman CH, Siesjö B (1976) Physiological role of cerebrovascular sympathetic nerves in the autorregulation of cerebral blood-flow. *Brain Res*, 117:519-523

Ehrlich P (1895) *Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbanalytische Studie.* Hirschwald, Berlin (ver Goldstein e Betz 1986)

Ernest T (1979) Recent correlates of ocular physiology and fluorescein angiography, angiography and fluorophotometry. *J Contin Educ Ophthalmol*, 41:13-27

Fenske A, Sinterhauf K, Reulen H (1976) The role of monoamines in the development of cold-induced edema. In: Papius HM, Feindel W (eds) *Dynamics of Brain Edema*, Springer-Verlag, New York pp150-154

Fenstermacher JD (1984) Volume regulation of central nervous system. In: Straub NC, Taylor AE (eds) *Brain Edema*, Raven Press Publishers, New York, pp383-404

Fenstermacher JD (1989) Pharmacology of blood-brain barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol I*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp137-155

Fenstermacher JD, Patlak CS (1977) CNS, CSF and extradural fluid uptake of various hydrophilic material in the dogfish. *Am J Physiol*, 232:R45-53

Gobel V, Theilen H, Schrock H, Kuschinsky W (1991) Dynamics of capillary perfusion in the brain. *Blood Vessels*, 28:190-196

Goldmann E (1913) *Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physiopathologie des Plexus Coroideus und der Hirnhäute.* *Abh Preuss Akad Wiss Phys-Math*, 1:1-60 (ver Goldstein e Betz, 1986)

Goldstein GW, Betz AL (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am*, 255:70-79

Graham AW, Aghajanian GK (1971) Effects of amphetamine on single cell activity in a catecholamine nucleus, the *locus coeruleus*. *Nature*, 234:100

Gulati A, Nath C, Shanker K, Dhawan KN, Bhargava KP (1982) Fluorescein spectrophotofluorimetry: A sensitive quantitative method for evaluating blood-brain barrier. *Pharmacol Res Commun*, 14:649-661

Haley TJ, McCormick WG (1956) Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in conscious mouse. *Br J Pharmacol*, 12:12-15

Hansson HA, Johansson BB (1979) Prevention of protein extravation in the brain by an anion transport inhibitor in acute experimental hypertension in rats. *Acta Physiol Scand*, 105:513-517

Hardebo JE, Johansson BB (1980) Effect of an anion transport inhibitor on blood-brain lesions during acute hypertension. Possible prevention of transendothelial transport. *Acta Neuropathol(Berl)*, 51:33-38

Hardebo JE, Emson PC, Falck B, Owman CH, Rosengren E (1980) Enzymes related to monoamine transmitter metabolism in brain microvessels. *J Neurochem*, 35:1388-1393

Harik SI, Sharma VK, Weatherbae JR, Warren RH, Banerjee SP (1980) Adrenergic receptors of cerebral microvessels. *Eur J Pharmacol*, 61:207-208

Harper AM, McCulloch J (1985) Cerebral blood flow and cerebrovascular disease. In: Swash M, Kennard C (eds) *Scientific Basis of Clinical Neurology*. Churchill Livingstone, Edimburg, pp518-532

Harri M, Kvusela P (1986) Is swimming exercise a cold exposure for rat? *Acta Physiol Scand*, 126:189-197

Hartman BK (1973) The innervation of cerebral blood vessels by central noradrenergic neurons. In: Usdin E, Snyder SH (eds) *Frontiers in Catecholamine Research*. Pergamon Press, New York, pp91-96

Hatashita S, Hoff JT (1990) Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 21:582-588

Herbst TJ, Raichle ME, Ferrendelli JA (1979) β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate concentration in brain microvessels. *Science*, 204:330-332

Hirano A, Becker NH, Zimmerman HM (1969) Pathological alterations in the cerebral endothelial cell barrier to peroxidase. *Arch Neurol*, 20:300-308

Hoffman HG, Olazewski J (1961) Spread of sodium fluorescein in normal brain tissue. *Neurology*, 11:1081-1085

Johansson BB, Aver LM, Linder LE (1982) Phenothiazine-mediated protection of the blood-brain barrier during acute hypertension. Evidence of a modification of the endothelial cell membrane. *Stroke*, 13:220-225

Joó F (1971) Effect of N⁶,-O⁶-dibutiryl cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. *Experientia*, 28:1470-1471

Joó F, Rakonezay Z, Wollemann M (1975) cAMP-mediated regulation of the permeability in the brain capillaries. *Experientia*, 31:582-583

Joó F, Temesvari P, Dux E (1983) Regulation of macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res*, 278:165-174

Kalaria RN, Stockmeier CA, Harik SI (1989) Brain microvessels are innervated by *locus coeruleus* noradrenergic neurons. *Neurosci Lett* 97:203-208

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixation for high osmolality of use in electron microscopy. *J Cell Biol*, 27:137

Katayama Y, Veno Y, Tsukiyama T, Tsubokawa T (1981) Long lasting suppression of firing cortical neurons and decrease in cortical blood-flow following train pulse stimulation of the *locus coeruleus* in the cat. *Brain Res*, 216:173-179

Kobayashi H, Maoret T, Ferrante M, Spano PF, Trabucchi M (1981) Subtypes of beta adrenergic receptors in rat cerebral microvessels. *Brain Res*, 220:194-197

Kobayashi H., Cazzaniga A, Spano PF, Trabuchi M (1982) Ontogenesis of alfa and beta receptors located on cerebral microvessels. *Brain Res*, 242:358-360

Kobayashi H, Wada A, Izumi F, Magnoni MS, Trabucchi M (1985) Alpha adrenergic receptor function in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 56:402-409

Korf J, Aghajanian GK, Roth RH (1973a) Stimulation and destruction of the *locus coeruleus*: opposite effects on 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulphate levels in the rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol*, 21:305-310

Korf J, Roth RH, Aghajanian GK (1973b) Alterations in turnover and endogenous levels of norepinephrine in cerebral cortex following electrical stimulation and acute axotomy of cerebral noradrenergic pathways. *Eur J Pharmacol*, 23:276-282

Kupersmith MJ, Shakib M (1989) The blood-ocular barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol I*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp369-390

Lee JC (1971) Evolution in the concept of blood-brain barrier phenomenon. In: Zimmermann HM (ed) *Progress in Neuropathology Vol I*, Grune and Stratton, New York, pp84-145

Levin VA, Fenstermacher JD, Patk CS (1970) Sucrose and inulin space measurements of cerebral cortex in four mammalian species. *Am J Physiol*, 291:1528-1553

Liu HM (1988) Neovasculature and blood-brain barrier in ischemic brain infarct. *Acta Neuropath (Berl)*, 75:422-426

Loizou LA (1969) Projections of the *locus coeruleus* in the albino rat. *Brain Res*, 15:563-566

Loizou LA (1970) Uptake of monoamines into central neurons and the blood-brain barrier in the infant rat. *Br J Pharmacol*, 40:800-813

Lorenzo AV, Barlow CF, Roth LJ, (1967) Effect of metrazol convulsions of ^{35}S entry into cat central nervous system. *Am J Physiol*, 212:1277-1287

Lorenzo AV, Shiarahige JA, Liang M, Barlow CF (1972) Temporary alterations of cerebrovascular permeability during drug-induced seizures. *Am J Physiol*, 223:268-277

Lorenzo AV, Hedley-Whyte ET, Eisenberg HM (1975) Increased penetration of horseradish peroxidase across blood-brain barrier induced by metrazol seizures. *Brain Res*, 88:136-140

Magnoni MS, Kobayashi H, Cazzaniga A, Izumi F, Spano PF, Trabucchi M (1983) Hypertension reduces the number of β -adrenergic receptors in rat brain microvessels. *Circ Res*, 67:610-613

Magnoni MS, Govoni S, Trabucchi M (1984a) Effect of cerebral ischemia on microvessel adrenergic receptor function. In: Bes A, Braquet P, Paoletti R, Siejo BK (eds) *Cerebral Ischemia*, Elsevier, Amsterdam, pp75-80

Magnoni MS, Govoni S, Pasinetti G, Kobayashi H, Trabucchi M (1984b) Asymmetry in microvessel neurochemical changes induced by ischemia is partially reversed by corpus callosum section. In: Racagni G, Paoletti R, Kilholz P (eds) *Clinical Neuropharmacology Vol VII*, Raven Press, New York, pp510-511

Magnoni MS, Kobayashi H, Govoni S, Battaini F, Pasinetti G (1986) Partial reversal of asymmetry in microvessel neurochemical changes after ischemia by corpus callosum section. *Circ Res*, 73:784-788

Magnoni MS, Govoni S, Trabucchi M (1987) Microcirculation and neurotransmitter metabolism in the pathophysiology of brain ischemia. A role for calcium. *Drugs*, 33 (suppl 2):12-18

Maynert EW, Levi R (1964) Stress-induced release of brain norepinephrine and its inhibition by drugs. *J Exp Pharm Ther*, 143:90-95

McMenamin J, Volpe J (1984) Bacterial meningitis in infancy: effects of intracranial pressure and cerebral blood flow velocity. *Neurology*, 34:500-504

Meyer JS, Welch KMA, Okamoto S, Shimazu K (1974) Disordered neurotransmitter function. Demonstration by measurement of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in CSF of patients with cerebral recent infarction. *Brain*, 97:655-664

Milhorat TH, Davis DA, Lloyd BJ (1973) Two morphologically distinct blood-brain barriers preventing entry of cytochrome into cerebrospinal fluid. *Science*, 180:76-77

Mitchell G, Scriven DRL, Rosendorf C (1975) Adrenoceptor in intracerebral resistance vessels. *Br J Pharmacol*, 54:11-15

Mraovitch S, Kumada M, Reis DJ (1982) Role of the *nucleus parabrachialis* in cardiovascular regulation in cat. *Brain Res*, 232:57-75

Mraovitch S, Iadecola C, Ruggiero, DA, Reis DJ (1985) Widespread reductions in cerebral blood-flow and metabolism elicited by electrical stimulation of *parabrachial nucleus* in rat. *Brain Res*, 341:283-296

Mrsulja BB, Djuricic BM (1980) Biochemical characteristics of cerebral capillaries. In: Eisenberg HM, Sudith RL (eds) *The Cerebral Microvasculature*. Academic Press, New York pp29-42

Mrsulja BB, Djuricic BM, Cvejic V, Micic DV (1984) Pharmacologic approach to post-ischemic brain edema in gerbils. In: Go KG, Baethmann A (eds) *Recent Progress in the Study and Therapy of Brain Edema*, Plenum Press, New York, pp683-689

Nag S (1984) Cerebral endothelial surface change in hypertension. *Acta Neuropath (Berl)*, 63:276-281

Nag S (1986) Cerebral endothelial plasma membrane alterations in acute hypertension. *Acta Neuropath (Berl)*, 70:38-43

Nathanson JA, Glaser GH (1979) Identification of beta-adrenergic sensitive adenylate cyclase in intracranial blood vessels. *Nature*, 278:567-569

Nitsch C, Goping G, Laursen H, Klatzo I (1986) The blood-brain barrier to horseradish peroxidase at the onset of bicuculline-induced seizures in hypothalamus, pallidum, hippocampus and other selected regions of the rabbit. *Acta Neuropath (Berl)*, 69:1-16

Ohata M, Sundaram V, Frederic WR, London ED, Rapoport SI (1981) Regional cerebral blood flow during development and aging. *Brain Res*, 104:319-332

Olendorf WH (1971) Brain uptake of radiolabelled amino-acids, amine and hexose, after arterial injection. *Am J Physiol*, 221:1629-1639

Olendorf WH, Cornford MH, Brain WJ (1977) The large apparent work capability of the blood-brain barrier. A study of mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*, 1:409-417

Olney JW, Collins RC, Sloviter RS (1986) Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. *Adv Neurol*, 44:857-877

Ordy JM, Kaack B, Brizee KR (1975) Life span neurochemical changes in the human and non human primate brain. In Brody H, Hartman D, Ordy JM (eds) *Aging Vol I*, Raven Press, New York pp139-191

Osterholm JL, Bell J, Meyer R, Pyenson J (1969) Experimental effects of free serotonin on the brain and its relation to brain injury, Part II: Trauma-induced alterations in spinal fluid and brain. *J Neurosurg*, 31:413-416

Owman CH, Rosengren E (1967) Dopamine formation in brain capillaries-an enzymatic blood-brain barrier mechanism. *J Neurochem*, 14:547-550

Pappas GD (1970) Some morphological considerations of the blood-brain barrier. *J. Neurol Sci*, 10:241-246

Pardridge WM (1983) Neuropeptides and blood-brain barrier. *Ann Rev Physiol*, 45:73-83

Patlak CS, Fenstermacher JD (1975) Measurements of dog blood-brain barrier transfer constants by ventriculocisternal perfusion. *Am J Physiol*, 229:877-884

Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn Academic Press, Sidney

Peroutka SJ, Moskowitz MA, Penhard JF, Snyder SH (1980) Neurotransmitter receptor binding in bovine cerebral microvessels. *Science*, 208:610-612

Philippu A, Przuntek H, Heyd G, Burger A (1971) Central effects of sympathomimetic amines on the blood pressure. *Eur J Pharmacol*, 15:200-208

Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Daniel M, Jalfre M (1979) Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur J Pharmacol*, 57:201-210

Preskorn SH, Hartman BK, Raichle ME, Clark HB (1980) The effect of dibenzazepines (tricyclic antidepressants) on cerebral capillary permeability in the rat *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*, 213:313-320

Preskorn SH, Irwin GH, Simpson S (1981) Therapies for mood disorders alter the blood-brain barrier. *Science*, 213:469-471

Preskorn SH, Hartman BK, Irwin GH, Hughes CW (1982a) Role of central adrenergic system in mediating amitriptyline induced alteration in mammalian blood-brain barrier *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*, 223:388-395

Preskorn SH, Raichle ME, Hartman BK (1982b) Antidepressants alter cerebrovascular permeability and metabolic rate in primates. *Science*, 217:250-252

Quagliarello VJ, Scheld WM (1986) Review: Recent advances in the pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Am J Med Sci*, 292:306-309

Quagliarello V, Long WJ, Scheld WM (1986) Morphologic alterations of blood-brain barrier with experimental meningitis in rat. Temporal sequence and role of encapsulation. *J Clin Invest*, 77:1084-1095

Quagliarello VJ, Long WJ, Scheld WM (1987) Human interleukin modulates blood-brain barrier injury *in vivo*. *Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 614(abstr)

Raichle ME, Hartman BK, Eichling JO, Sharp LG (1975) Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:3726-3730

Raichle ME, Eichling JO, Grubb RL, Hartman BK (1976) Central noradrenergic regulation of brain microcirculation. In: Pappius HM, Feindel WM (eds) *Dynamic of Brain Edema*, Springer Verlag, Berlin, pp11-17

Rapoport SI (1985) A model for brain edema. In: Inaba Y, Klatzo Y, Spaatz M (eds) *Brain Edema*, Springer-Verlag, Tokyo, pp59-71

Rapoport S, Thompson H (1975) Opening of the blood-brain barrier by a pulse of hydrostatic pressure. *Biophys J*, 15:326a

Rapoport SI, Ohno K, Pettigrew KD (1979) Drug entry into the brain. *Brain Res*, 172:354-359

Reese TS, Karnovsky MJ (1967) The structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34:207-217

Rennels ML, Nelson E (1975) Capillary innervation in mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration. *Am J Anat*, 144:233-241

Rennels M, Gregory TF, Blaumanis OR, Katsukuni F, Grady PA (1985) Evidence for a "paravascular" fluid circulation in mammalian central nervous system provided by the rapid distribution of tracer protein through the brain from the subarachnoid space. *Brain Res*, 326:47-63

Richelson E (1978) Tricyclic antidepressants block H_1 receptors of mouse neuroblastoma cells. *Nature (Lond)* 274:176-177

Rodriguez LA (1965) Experiments on the histologic *locus* of the hematoencephalic barrier. *J Comp Neurol*, 102:27-45

Rosendorff C (1972) The measurement of local cerebral blood-flow and the effect of amines. In: Meyer JS, Schadé JP (eds), Elsevier, Amsterdam, pp115-156

Ross R, Reny A (1967) Inhibition of the uptake of tritiated catecholamines by antidepressants and related agents. *Eur J Pharmacol*, 2:181-186

Scheld WM (1981) Pathophysiological correlates in bacterial meningitis. *J Infect*, 3(suppl):5-19

Schivers RR (1979) Effect of hyperglycemia on brain capillary permeability in the lizard *anelis carolinensis*. *Brain Res*, 170:509-522

Schlech WF, Ward JJ, Band JD, Hightower A, Fraser DW, Broome CV (1985) Bacterial meningitis in United States, 1978 through 1981. The national bacterial meningitis surveillance study. *J Am Med Assoc*, 253:1749-1754

Share NW, Melville KI (1963) Centrally mediated sympathetic cardiovascular responses induced by intraventricular norepinephrine. *J Pharmacol Exp Therap*, 141:15-21

Sharma HS, Cervós-Navarro J, Dey PK (1991) Increased blood-brain barrier permeability following acute short-term swimming exercise in conscious normotensive young rats. *Neurosci Res*, 10:211-221

Shenkin HA, Bouzarth WF (1970) Clinical methods of reducing intracranial pressure. Role of cerebral circulation. *N Engl J Med*, 282:1465-1471

Silverstein FS, Buchanan K, Johnston MV (1986) Perinatal hypoxia-ischemia disrupts striatal high-affinity ^3H -glutamate uptake into synaptosomes. *J Neurochem*, 47:1614-1619

Simon RP (1989) Role of endogenous excitatory amino acid neurotransmitters in the pathogenesis and evolution of acute brain injury. *Ped Inf Dis J*, 8:913-915

Skinho JE, Paulson OB (1969) Carbon dioxide and cerebral circulatory control. *Arch Neurol*, 20:249-252

Smith QR (1989) Quantitation of blood-brain barrier permeability. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation vol I*, Plenum Medical Book Company, New York, London, pp85-118

Smith QR, Rapoport SI (1984) Carrier-mediated transport of chloride across blood-brain barrier. *J Neurochem*, 42:754-763

Smith QR, Rapoport SI (1986) Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium and chloride. *J Neurochem*, 46:1732-1742

Smith QR, Takasato Y (1986) Kinetics of aminoacid transport at the blood-brain barrier using an *in situ* brain perfusion technique. *Ann Ny Acad Sci*, 481:186-201

- Smith QR, Takasato Y, Rapoport SI (1984) Kinetic analysis of L-leucine transport across the blood-brain barrier. *Brain Res*, 311:167-170
- Snyder S, Yamamura HI (1977) Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor. *Arch Gen Psychiat*, 34:263-269
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman, New York
- Sparkes CG, Spencer PJ (1971) Antinociceptive activity of morphine after injection of amines in cerebral ventricle of conscious rat. *Br J Pharmacol*, 42:230-241
- Spatz H (1934) Die Bedeutung der vitalen Färbungen für die Lehre von Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. *Arch Psychiat Nervenheilk*, 101:267-358 (ver Davson 1989)
- Spector R, Eells J (1984) Deoxynucleoside and vitamine transport into central nervous system. *Fed Proc*, 43:193-200
- Stauber WT, Ong SH, McKuskey RS (1981) Selective extravascular escape of albumin into the cerebral cortex of diabetic rat. *Diabetes*, 30:500-503
- Stern L, Gautier R (1922a) Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et la circulation sanguine. *Arch Intern Physiol*, 17:138-192 (ver Davson 1989)
- Stern L, Gautier R (1922b) Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Intern Physiol*, 17:391-448 (ver Davson 1989)
- Swansson LW, Connelly MA, Hartman BK (1977) Ultrastructural evidence for central monoaminergic innervation of blood vessels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, 136:166-173
- Swartz M, Dodge P (1965) Bacterial meningitis: A review of selected aspects. *N Engl J Med*, 272:731-735

Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR (1984) An *in situ* brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol*, 247:H484-H493

Tervo T, Joó F, Palkama A, Salminen L (1979) Penetration barrier to sodium fluorescein and fluorescein labelled dextrans of various molecular sizes in brain capillaries. *Experientia*, 35:252-254

Tunkel AR, Scheld WM (1989) Alterations of blood-brain barrier in bacterial meningitis: *in vivo* and *in vitro* models. *Ped Inf Dis J*, 8:911-913

Tunkel AR, Wispelwey B, Scheld WM (1990) Pathogenesis and pathophysiology of meningitis. *Inf Dis Clin North Am*, 4:555-581

Ungerstedt U (1971) Mapping of the central dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine pathways. *Acta Physiol Scand*, suppl367:1-48

van Deurs B (1976) Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of cerebral microvasculature. *Brain Res*, 124:1-8

Vasile E, Siminescu M, Siminescu N (1983) Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium *in situ*. *J Cell Biol*, 96:1677-1689

Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM (1985) Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)*, 66:265-273

Wahl M, Kuschinsky W, Bosse O, Neiss A (1974) Micropuncture evaluation of β -receptors in pial arteries of cats. *Pflugers. Arch*, 348:293-303

Ward DG, Gunn CG (1976) *Locus coeruleus* complex: elicitation of a pressor response and a brain stem region necessary for its occurrence. *Brain Res*, 107:401-406

Weibel ER (1973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: Hayat MA (ed) Principles and Techniques of Electron Microscopy vol III. Von Nostrand Reinhold Company, New York, p237

Weil-Malherb H, Axelrod J, Tomchick R (1959) Blood-brain barrier for adrenaline. *Science (Wash. DC)*, 129:1226-1227

Weil-Malherb H, Whitby LG, Axelrod J, (1961) The blood-brain barrier for catecholamines in different regions of the brain. In: Ketty SS, Eldes J (eds) *Regional Neurochemistry*, Pergamon, Oxford, pp 284-292

Welch KMA, Chabi E, Buckingham J, Bergin B, Achar VS, Meyer JS (1977) Catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels in ischemic brain. *Stroke*, 8:341-346

Westergaard EV, Deurs B, Bronsted HE (1977) Increased vesicular transfer of horseradish peroxidase across cerebral endothelium evoked by acute hypertension. *Acta Neuropath (Berl)*, 37:141-152

Wispelwey B, Lesse AJ, Hansen EJ, Scheld WM (1988) Haemophilus influenzae lipopolysaccharide induced blood-brain barrier permeability during experimental meningitis in rat. *J Clin Invest*, 82:1339-1346

Wolff K (1963) Beiträge zur Ultrastruktur der Kapillaren im Zentralnervensystem. *Z Zellforsch*, 60:409-431

Zaren HA, Weinstein JD, Langfitt TW (1970) Experimental ischemic brain swelling. *J Neurosurg*, 32:227-235

Zervas NT, Hori H (1973) Effect of alpha methyl tyrosine on cerebral infarction. *Stroke*, 4:331(abstr)