

Co-transmissão noradrenalina - ATP

Razões da variabilidade da
participação noradrenérgica



Jorge Gonçalves

Porto, 1991

JORGE MANUEL MOREIRA GONÇALVES

Co-transmissão noradrenalina - ATP

**Razões da variabilidade da participação
noradrenérgica**

Dissertação de candidatura ao grau de doutor,
apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Porto, 1991

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

Aos Professores Serafim Correia Pinto Guimarães
Alfredo de Amaral e Albuquerque

À Doutora Maria Quitéria da Silva Paiva

"É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal."

Decreto Lei nº 388/70, Artº 8º, parágrafo 2.

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

- I — Guimarães S, Gonçalves J, Paiva MQ (1988) α_2 -adrenoceptor-mediated effects of selective α_1 -adrenoceptor agonists, after phenoxybenzamine *in vivo*. Br J Pharmacol 97: 856P
- II — Gonçalves J, Nunes JP, Paiva MQ, Guimarães S (1988) Loss of selectivity of so-called selective α_1 -adrenoceptor agonists after phenoxybenzamine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 338: 234-238
- III — Gonçalves J, Carvalho F, Guimarães S (1988) Uptake inhibitors do not change the effect of imidazoline α_2 -adrenoceptor agonists on noradrenaline release evoked by single pulse stimulation. Br J Pharmacol 97: 750P
- IV — Gonçalves J, Carvalho F, Guimarães S (1988) Uptake inhibitors do not change the effect of imidazoline α_2 -adrenoceptor agonists on transmitter release evoked by single pulse stimulation in mouse vas deferens. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 339: 288-292 (1989)
- V — Gonçalves J, Guimarães S (1990) Relationship between postjunctional α -adrenoceptors and sympathetic nerve terminals in the epididymal and prostatic portions of the rat vas deferens. J Aut Pharmacol 10: 22
- VI — Gonçalves J, Carvalho F, Guimarães S (1991) Does the distance between nerve varicosities and adrenoceptors play any role in the relative contribution of ATP/noradrenaline for postjunctional response? (em publicação em Advances in the biosciences, pela Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin)
- VII — Gonçalves J, Guimarães S. (1992) Influence of neuronal uptake on pre- and postjunctional effects of α -adrenoceptor agonists in tissues with noradrenaline - ATP cotransmission. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (aceite para publicação).

A contribuição pessoal consistiu na:

- colaboração no planeamento e estabelecimento do protocolo experimental;
- realização da maioria das experiências;
- colaboração na discussão dos resultados e na elaboração dos trabalhos mencionados.

Índice

Introdução	9
A noradrenalina como neurotransmissor	10
Desenvolvimento da noção de co-transmissão a nível das junções simpáticas pós-ganglionares	10
O ATP como neurotransmissor	14
O ATP como co-transmissor nas junções simpáticas pós-ganglionares	15
Variação na importância relativa do ATP na resposta pós-juncional	21
Material e métodos	25
Descrição geral	25
Preparação dos órgãos isolados	25
Curvas de concentração resposta	26
Registo das respostas contrácteis a agonistas exógenos	26
Registo da resposta contráctil à estimulação eléctrica	28
Estudo da libertação da noradrenalina endógena	30
Doseamento do teor em catecolaminas	32
nos tecidos	32
nos líquidos	32
Carga e libertação de noradrenalina- ³ H	33
Preparação das amostras e doseamento cintilométrico	35
Análise ultra-estrutural	35
Descrição e análise estatística dos resultados	36
Fármacos usados	36
Resultados e comentários	37
Análise do conteúdo tecidual em noradrenalina	37
Resultados	37
Comentários	38
Acumulação e libertação de noradrenalina- ³ H	39
Resultados	39
Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato	39
Artérias jejunal e da orelha de Coelho	41
Comentários	42
Influência da inibição da captação neuronal nas respostas pós-juncionais mediadas pelos receptores noradrenérgicos- α	43
Resultados	43
Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato	43

Artérias da orelha e jejunal de Coelho	48
Comentários	52
Influência da captação neuronal sobre as respostas mediadas pelos receptores- α_2 pré-juncionais da porção prostática e epididimal do canal deferente de Rato	54
Resultados	54
Comentários	58
Influência do bloqueio da captação neuronal da noradrenalina ou dos receptores- α_2 pré-juncionais, sobre o efluxo de noradrenalina- ^3H induzido por estimulação eléctrica	61
Resultados	61
Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato	61
Artérias jejunal e da orelha de Coelho	65
Comentários	68
Influências da adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina induzida por estimulação eléctrica	69
Resultados	69
Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato	69
Influência da inibição dos receptores purinérgicos P_1	69
Influência da inibição da captação de adenosina	71
Artérias da orelha e jejunal de Coelho	72
Influência da inibição dos receptores purinérgicos P_1	72
Influência da inibição da captação de adenosina	73
Comentários	74
Análise ultra-estrutural das porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato	77
Resultados	77
Comentários	81
Discussão	83
Relação entre conteúdo em noradrenalina /densidade de inervação noradrenérgica e participação do ATP na resposta contráctil	84
Relação entre a localização dos receptores adrenérgicos- α pós- juncionais e a importância relativa do componente noradrenérgico na resposta à estimulação nervosa	87
A difusão de noradrenalina da neurofase como factor condicionante da importância da participação noradrenérgica	93
A modulação purinérgica da libertação de noradrenalina como factor condicionante da participação noradrenérgica	97
Confronto da presente hipótese perante outras já existentes	99
Resumo	105
Summary	107
Bibliografia	111
Agradecimentos	140

Introdução

Ao estudar a neurotransmissão nas fibras nervosas aferentes primárias (que possuem terminações à periferia e na espinal medula), Dale (1935) propôs que um neurónio deveria sintetizar e libertar o mesmo mediador em todas as suas terminações. Esta ideia que foi generalizada aos outros neurónios, foi sendo interpretada como equivalente à de que um neurónio utiliza um único transmissor, noção conhecida por "Princípio de Dale".

A libertação simultânea de várias substâncias, a partir do mesmo neurónio (co-libertação), era um facto desde há muito conhecido. Porém, não perturbava o "Princípio de Dale", já que se admitia que apenas uma dessas substâncias assegurava a neurotransmissão. Estudos realizados em culturas de neurónios simpáticos demonstraram que o mesmo neurónio podia conter e libertar, em simultâneo, mais do que um neurotransmissor. A este exemplo sucederam-se muitos outros que demonstraram a ocorrência de co-existência, co-libertação e co-transmissão (ver Campbell 1987, para citações originais). Tal obrigou a que o designado "Princípio de Dale" fosse re-interpretado. À luz das provas existentes dever-se-ia antes afirmar que cada neurónio utiliza sempre o mesmo conjunto de neurotransmissores, em todas as suas terminações (para discussão sobre este assunto ver Burnstock 1976; Stjärne 1986; Campbell 1987).

A existência de co-transmissão, a nível dos neurónios noradrenérgicos, veio complicar um esquema simples, já muito radicado no pensamento e na linguagem dos farmacologistas, obrigando a um esforço de investigação e de re-interpretação de dados já existentes, que não tem sido fácil. Este trabalho surge como uma modesta contribuição para esse esforço.

A noradrenalina como neurotransmissor

A teoria da neurotransmissão química, apesar de ter sido avançada por Elliott (1905), apenas através dos trabalhos de Otto Loewi (1921), recolheu a primeira prova demonstrativa do envolvimento de uma mediação química, na transmissão dos impulsos nervosos. Quase em simultâneo, Cannon e colaboradores demonstraram que a estimulação dos nervos simpáticos promovia a libertação de uma substância semelhante à adrenalina. A demonstração de que essa substância era a noradrenalina foi realizada por von Euler, mas só na década de quarenta (ver von Euler 1954).

A evolução dos métodos analíticos permitiu a von Euler analisar quantitativamente a substância simpaticomimética presente nos extractos de tecidos e nos fluidos corporais e verificar a sobreposição entre as suas acções farmacológicas e as da noradrenalina. Permitiu-lhe, ainda, identificar a presença de noradrenalina nos nervos simpáticos (e o seu desaparecimento pela desnervação) e isolá-la a partir do líquido de perfusão após estimulação eléctrica dos nervos simpáticos que a esse órgão se dirigem (ver von Euler 1954). Este conjunto de resultados levou à aceitação de que a transmissão química, nos nervos pós-ganglionares simpáticos, era assegurada pela noradrenalina.

Desenvolvimento da noção de co-transmissão, a nível das junções simpáticas pós-ganglionares.

A ideia de que a noradrenalina assegurava, isoladamente, a transmissão pós-ganglionar simpática foi perturbada pela observação de que os antagonistas- α , *in vitro*, inibiam mais facilmente as respostas à noradrenalina exógena do que as respostas resultantes da estimulação dos nervos simpáticos. Esta discrepância é particularmente evidente no canal deferente de várias espécies (Bentley e Smith 1967; Hotta 1969; Ambache e Zar 1971; Swedin 1971; Ambache *et al.* 1972; Wakade e Krusz 1972; von Euler e Hedqvist 1975). Neste tecido, a estimulação nervosa provoca uma resposta contráctil bifásica, constituída por uma fase inicial rápida a que se segue uma mais lenta e sustentada (Gillespie e McGrath 1975). Os antagonistas- α inibem mais eficazmente a segunda fase, afectando pouco a primeira (McGrath 1978; Sneddon *et al.* 1982).

Para explicar a menor eficiência dos antagonistas- α em inibir as respostas

provocadas pela estimulação eléctrica, propuseram-se três hipóteses. De acordo com uma, durante a estimulação eléctrica atingir-se-iam elevadas concentrações de noradrenalina nas fendas sinápticas estreitas, o que dificultaria a acção do antagonista, diminuindo a sua eficácia (Bevan e Su 1971; Swedin 1971). Como segunda hipótese, admitia-se a existência de dois tipos de receptores noradrenérgicos pós-juncionais: os extra-juncionais, receptores com as características farmacológicas dos receptores- α "clássicos", activados preferencialmente pela noradrenalina exógena, e uns receptores "juncionais", preferencialmente activados pela noradrenalina libertada das terminações nervosas e sobre os quais os antagonistas α seriam pouco eficazes (Hotta 1969; Hirst e Neild 1980). Uma terceira hipótese, proposta por Ambache e colaboradores, sugere que o neurotransmissor responsável pela primeira fase da resposta contráctil à estimulação eléctrica não é a noradrenalina (Ambache e Zar 1971; Ambache *et al.* 1972). A função da inervação noradrenérgica presente nestes tecidos seria a de modular a resposta motora não-noradrenérgica (Ambache *et al.* 1972). O componente noradrenérgico dever-se-ia ao efluxo de noradrenalina desses nervos noradrenérgicos inibitórios até aos receptores noradrenérgicos excitatórios.

A descoberta de receptores noradrenérgicos- α , localizados a nível pré-juncional, cuja estimulação conduz a uma diminuição da libertação de noradrenalina e cujo bloqueio leva a uma aumento dessa libertação (ver Langer 1977; Starke 1977, 1987), veio introduzir um novo dado e reforçar a primeira hipótese. Os antagonistas- α , por inibirem os receptores- α pré-juncionais, iriam provocar uma desinibição da libertação, aumentando a quantidade de noradrenalina na fenda sináptica e assim, diminuir a eficácia dos antagonistas- α sobre a resposta contráctil à estimulação eléctrica (Furness 1974; Westfall *et al.* 1979).

A explicação anterior não se apresentou totalmente satisfatória. Hirst e Neild (1984) defendem que, embora seja admissível que com a desinibição da libertação, a actividade dos antagonistas- α fosse prejudicada, deveria ser sempre possível observar alguma inibição da resposta pós-juncional. Sendo o tecido exposto a um pré-tratamento com um antagonista, durante 30 a 60 minutos, seria pouco provável que a noradrenalina libertada por estimulação nervosa, fosse suficiente para deslocar, instantânea e totalmente um antagonista, como por exemplo, a prazosina que se dissocia lentamente dos receptores- α . Além disso, a eficácia dos antagonistas- α aumenta com a frequência de estimulação (Cheung

1982). Se, com níveis mais elevados de noradrenalina na fenda sináptica, o efeito dos antagonistas aumenta, não parece provável que, nestas condições já não ocorra o deslocamento do antagonista.

A utilização de métodos electrofisiológicos veio fornecer informações fundamentais para o esclarecimento deste problema. A aplicação de noradrenalina, na artéria da orelha (Droogmans *et al.* 1977), na artéria pulmonar (Casteels *et al.* 1977) e na artéria safena (Holman e Surprenant 1979) de Coelho provoca contracções. Estas, não são acompanhadas por alterações significativas no potencial de membrana das células musculares. Porém, as contracções induzidas pela estimulação nervosa das artérias safena e da orelha de Coelho (Holman e Surprenant 1979, 1980) e das arteríolas da submucosa de Cobaia (Hirst 1977; Hirst e Neild 1980, 1981), são acompanhadas por significativas despolarizações de membrana e mesmo por potenciais de acção. Nestes tecidos, a aplicação de uma estimulação nervosa de baixa frequência provoca pequenas, mas rápidas, alterações do potencial de membrana, com amplitudes entre 1,8 e 12 mV. Estas alterações do potencial de membrana designam-se, correntemente, por potenciais juncionais excitatórios (PJE). São potenciais locais que, quando somados, podem levar o potencial de membrana até ao limiar de disparo, originando um potencial de acção.

Os antagonistas- α (por exemplo a fentolamina, a tolazolina, a prazosina), assim como o labetalol (um antagonista- β com afinidade também para os receptores- α), na concentração de $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, não modificam a amplitude dos PJE. Isto observa-se mesmo quando os PJE são desencadeados por estimulações nervosas com baixa frequência. Pelo contrário, as respostas à noradrenalina exógena, aplicada por iontoforese, não são acompanhadas por alterações do potencial de membrana, mas são inibidas pela fentolamina (Hirst e Neild 1980). Quando a aplicação da noradrenalina se faz em determinadas áreas, surgem os PJE, podendo surgir, também, potenciais de acção, tal como com a estimulação eléctrica (Hirst e Neild 1980; 1981).

Admitiram estes autores que estas respostas à noradrenalina, eram mediadas por receptores noradrenérgicos distintos dos receptores- α e, com base nisso, relançaram a ideia de existirem dois tipos de receptores noradrenérgicos excitatórios, a nível pós-juncional.

Os receptores de um desses tipos (localizados na membrana pós-juncional da junção neuromuscular) estariam ligados à despolarização da membrana da

célula muscular (os designados por receptores juncionais, mais tarde por receptores γ ; Hirst e Neild 1981). Os outros receptores excitatórios, que se localizariam fora da junção (extra-juncionais), estariam associados à despolarização lenta (e menos marcada) da membrana da célula muscular e teriam as propriedades farmacológicas dos receptores α "tradicionais". Os receptores juncionais seriam preferencialmente activados pela noradrenalina libertada das terminações nervosas. Os extra-juncionais seriam activados preferencialmente pela noradrenalina exógena. Com estimulação nervosa de baixa frequência ou pouco prolongada, apenas os juncionais seriam envolvidos. Tal, explicaria a menor capacidade dos antagonistas- α em inibir a resposta a estimulações com estas características. Durante estimulações nervosas prolongadas, a noradrenalina libertada poderia atingir os receptores α (extra-juncionais), especialmente em tecidos com densa inervação noradrenérgica (Cheung 1982).

Esta hipótese fundamentava-se, substancialmente, na semelhança entre as alterações do potencial de membrana, resultantes da estimulação nervosa e as alterações observadas, pela aplicação local de noradrenalina exógena (ver Neild e Hirst 1984). De acordo com os estes autores, a noradrenalina exógena induz alterações do potencial semelhantes aos PJs. No canal deferente de Cobaia, a análise das características das respostas contrácteis e das alterações do potencial de membrana a elas associadas, vieram pôr em questão a responsabilidade da noradrenalina, na componente da resposta à estimulação eléctrica insensível aos antagonistas- α (ver Sneddon e Burnstock 1984a).

A primeira fase da resposta contráctil à estimulação eléctrica que, segundo a hipótese anterior, seria mediada pela noradrenalina, através da activação dos receptores noradrenérgicos γ , não possuía as características de uma resposta noradrenérgica. Por um lado, esta resposta não era mimetizada pela noradrenalina exógena (o que poderia explicar-se por envolver um tipo diferente de receptores) e, principalmente, não era reduzida, significativamente, pela depleção da noradrenalina com reserpina, nem era aumentada pelo bloqueio da captação neuronal (Ambache e Zar 1971; Swedin 1971). Por outro lado, a contracção era inibida pelo ANAPP₃ (arilazido-aminopropionil ATP; Fedan *et al.* 1981) ou pelo α,β -metileno ATP (Meldrum e Burnstock 1983; Sneddon e Burnstock 1984b), fármacos que bloqueiam as contracções mediadas pelo ATP.

Entretanto, Sneddon e Westfall (1984), demonstraram que a aplicação local de noradrenalina, no canal deferente de Cobaia, provocava alterações do potencial de membrana, distintas dos PJs. Essas alterações eram lentas e com

uma amplitude menor do que os PJs. Era possível obter variações do potencial semelhantes aos PJs, quando se aplicava ATP (Sneddon e Westfall 1984). A análise das variações de potencial em função do tempo ("discret events") permitiu, ainda, mostrar que a libertação do mediador, responsável por estas alterações de potencial, era quântica (Cunnane e Stjärne 1984; Stjärne e Åstrand 1984) e sensível à temperatura (Stjärne e Alberts 1985).

Estes estudos permitiram reforçar a hipótese que propunha que a resposta de alguns tecidos (e em particular do canal deferente), à estimulação simpática era mediada por mais do que um neurotransmissor. Sugeriu-se que, além da noradrenalina, o ATP estaria, também, envolvido. Seria o responsável pela primeira fase da contracção, a fase rápida e insensível aos antagonistas- α . A noradrenalina seria o responsável pela segunda fase, mais lenta e sustentada (Sneddon e Westfall 1984).

O ATP como neurotransmissor

A possibilidade do ATP ser um neurotransmissor tinha sido adiantada muito antes de se ter sugerido a sua participação na transmissão simpática (Holton e Holton 1954; Holton 1959; Burnstock *et al.* 1970, 1972).

A nível periférico, o ATP era responsabilizado pela mediação das respostas "não-colinérgicas-nem-adrenérgicas" de alguns tecidos, nomeadamente, do intestino e da bexiga de Cobaia e da bexiga de Rato. Nestes órgãos, quer o ATP, quer a estimulação nervosa produzem uma contracção rápida e fugaz que é inibida pela quinidina ou pela dessensibilização ao ATP (ver Burnstock 1972).

Quando se incubam tiras de *taenia coli*, de Cobaia, com adenosina tritiada verifica-se a síntese de AMP, ADP e ATP, produtos que são libertados por estimulação nervosa (Su *et al.* 1971). O ATP libertado é alvo de um eficiente sistema de inactivação que envolve ecto-ATPases e a ecto-5'-nucleotidase (Keller e Zimmermann 1983; Nagy *et al.* 1983; Kreutzberg *et al.* 1986), verificando-se a formação, entre outros produtos, de adenosina que é um modulador potente da libertação de diversos neurotransmissores (ver Ribeiro 1978; 1979; Su 1983; Fredholm e Dunwiddie 1988).

O ATP e as outras purinas exercem os seus efeitos actuando num conjunto de receptores de membrana, específicos, designados por receptores purinérgicos. Estes receptores estão divididos em dois grandes grupos: o dos receptores P_1 e o dos receptores P_2 . Os receptores P_1 são mais sensíveis à adenosina e subdividem-

se em receptores A_1 e A_2 , ambos acoplados à adenilciclase (ver Williams 1987). Foi também proposta a existência de um receptor A_3 , sensível à xantinas (Ribeiro e Sebastião 1985, 1986; Sebastião e Ribeiro 1988, 1989) e acoplado ao sistema de transdução que envolve a proteína-cinase-C e os derivados do fosfatidilinositol (Sebastião e Ribeiro 1990). Os receptores P_2 , mais sensíveis ao ATP (Burnstock 1978), estão classificados em P_{2X} e P_{2Y} . Esta sub-classificação baseia-se na natureza da resposta (contração e relaxamento, respectivamente) e, também, na actividade relativa de agonistas selectivos. Assim, o α,β -metileno ATP e o β,γ -metileno ATP apresentam alguma selectividade para os receptores P_{2X} enquanto que, o 2-metiltio ATP e o β -flúor ADP têm alguma selectividade para os receptores P_{2Y} (Kennedy e Burnstock 1985; Hourani *et al.* 1985, 1986, 1988). Recentemente, foram propostos dois novos sub-tipos de receptores P_2 , apresentando uma distribuição mais limitada: os P_{2Z} , descritos em células do sistema imunitário e os P_{2T} , descritos em plaquetas (TIPs, Receptor Classification Supplement 1991). Também a existência de um outro tipo de receptores purinérgicos, os P_3 , onde a adenosina e o ATP seriam equipotentes, tem também sido proposta (Shinozuka *et al.* 1988; 1990). No entanto, a sua existência ainda não foi aceite pela Comissão para Classificação e Nomenclatura de Receptores para Fármacos da IUPHAR.

Este conjunto de características, associado à ubiquidade dos sistemas de síntese de ATP, cumprem as exigências para considerar o ATP um neurotransmissor (para citações originais ver Burnstock 1972; Ribeiro 1978). Porém, ainda se mantêm algumas reservas quanto à hipótese, defendida por Burnstock (1972), de existirem nervos purinérgicos, em cuja transmissão estaria envolvido, apenas, o ATP.

O ATP como co-transmissor nas junções simpáticas pós-ganglionares

A hipótese de o ATP ser um co-transmissor nos nervos pós-ganglionares simpáticos fundamenta-se num conjunto de observações, nomeadamente, no facto da adenosina poder ser captada pelos nervos noradrenérgicos, convertida em ATP (Su 1975) e no facto do ATP co-existir com a noradrenalina, quer nas vesículas das células cromafins da medula da supra-renal (Hillarp *et al.* 1955; Blaschko *et al.* 1956; von Euler *et al.* 1963; Douglas e Poisner 1966), quer nas vesículas das varicosidades dos nervos noradrenérgicos (Schümann 1958; Stjärne

e Lishajko 1966; Geffen e Livett 1971; Lagercrantz e Stjärne 1974; Richards e Da Prada 1977).

Nos terminais dos nervos noradrenérgicos, a noradrenalina parece ser armazenada em pelo menos duas populações de vesículas: as pequenas com núcleo denso e as grandes com núcleo denso (ver Geffen e Livett 1971). Em ambos os tipos de vesículas foi identificado um sistema de captação de ATP e de outros nucleótidos (Kostron *et al.* 1977; Winkler 1977; Aberer *et al.* 1979). Este sistema que é dependente do gradiente de prótons entre o interior das vesículas e o axoplasma (Aberer *et al.* 1978), o mesmo gradiente que condiciona o transporte de catecolaminas (Njus e Radda 1978).

Não existe unanimidade relativamente à relação molar em que a noradrenalina e o ATP se combinam, nas vesículas. Sugeriu-se que tal relação pudesse variar entre 7 e 12 (ver Burnstock 1990b). No entanto, alguns autores apontam para relações mais desfavoráveis ao ATP (entre 20 e 60; Fredholm *et al.* 1982).

A possível libertação conjunta (ou co-libertação) de ATP e de noradrenalina dos nervos noradrenérgicos foi inicialmente observada na *taenia coli* de Cobaia. Após a incorporação de adenosina-³H, a estimulação nervosa induzia a libertação de compostos tritiados, libertação que era anulada por tratamento do tecido com guanetidina (Su *et al.* 1971). Posteriormente, Nakaniski e Takeda (1973) sugeriram que uma "co-libertação", de ATP e de noradrenalina, pudesse ocorrer também, nas terminações do nervo hipogástrico, na vesícula seminal de Cobaia.

A estimulação nervosa de diversos vasos de Coelho, previamente incubados com adenosina-³H induz também, a libertação de ATP-³H de um modo paralelo ao da libertação de noradrenalina. A libertação de ambas as substâncias é diminuída ou anulada por tratamento com guanetidina ou com tetrodotoxina (Su 1975). Estes resultados foram confirmados pelos obtidos por outros autores. Descreveu-se que no tecido adiposo de Cão (Fredholm 1976), no rim de Coelho (Fredholm e Hedqvist 1978), no canal deferente de Cobaia (Westfall *et al.* 1978), na membrana nictitante de Gato (Luchelli-Fortis *et al.* 1979), na veia porta de Coelho (Burnstock *et al.* 1979; Levitt e Westfall 1982) e no canal deferente de Rato (Fredholm *et al.* 1982; Vizi e Burnstock 1988) a estimulação simpática é acompanhada de uma libertação de purinas.

O facto da libertação de purinas ser coincidente com a de noradrenalina não constitui, *per se*, uma prova de que o ATP, ou outro nucleótido relacionado, tenha origem exclusivamente neuronal.

No tecido adiposo de Cão, a estimulação simpática promove a libertação de purinas. Porém, esta é significativamente reduzida pela inibição dos receptores- α pós-juncionais (Fredholm 1976; Fredholm e Sollevi 1981), facto que sugere que a libertação de purinas possa estar associada à estimulação dos receptores- α pós-juncionais.

Na membrana nictitante de Gato (Luchelli-Fortis *et al.* 1979) e no rim de Coelho (Fredholm e Hedqvist 1978), o efluxo de purinas pode ser aumentado não só através da estimulação nervosa, como também por contacto do tecido com noradrenalina, acetilcolina ou tiramina. A quantidade de purinas formada é, em qualquer dos casos, proporcional à intensidade do estímulo.

Este conjunto de resultados levou Fredholm a sugerir que as purinas surgem em consequência da estimulação dos tecidos, pela noradrenalina, libertada das varicosidades ou pelos agonistas exógenos. Esta hipótese retirava toda a importância à libertação de purinas, por exocitose, questionando a existência de uma co-transmissão envolvendo estes compostos e a noradrenalina.

No entanto, trabalhos de diversos autores forneceram dados que demonstram uma origem neuronal das purinas.

A libertação de purinas, induzida pela estimulação nervosa do canal deferente de Cobraia, é sensível à tetrodotoxina, mesmo em condições em que a resposta contráctil é impedida (Westfall *et al.* 1978). Esta libertação não é anulada pela depleção da noradrenalina tecidual (Kirkpatrick e Burnstock 1987), nem pela inibição das respostas à estimulação nervosa, através do bloqueio simultâneo dos receptores- α_1 pós-juncionais e da dessensibilização dos receptores P_2 (com α, β -metileno ATP; Kasakov *et al.* 1988).

No canal deferente de Rato, o bloqueio dos canais de K^+ aumenta o efluxo de noradrenalina- ^3H e de ATP- ^{14}C induzido pela estimulação eléctrica. Este aumento, paralelo, do efluxo de noradrenalina e de ATP continua a observar-se mesmo se os receptores- α pós-juncionais estiverem inibidos (Vizi e Burnstock 1988).

Na veia porta de Coelho, a inibição dos receptores- α_1 , apesar de reduzir, drasticamente, a amplitude da resposta contráctil à estimulação nervosa e de não modificar a libertação de noradrenalina- ^3H , reduz apenas em 20% o efluxo de purinas (Levitt e Westfall 1982).

Na artéria basilar de Cão, o efluxo de noradrenalina- ^3H e de purinas- ^3H , induzido pela estimulação eléctrica, é aumentado pela fentolamina (um antagonista- α não selectivo), enquanto que a noradrenalina produz o efeito

inverso (Muramatsu *et al.* 1981).

Em varicosidades isoladas do plexo mioentérico de Cobaia (preparação que não tem células musculares), a aplicação de agentes despolarizantes provoca uma libertação de purinas que é dependente do cálcio (White e Leslie 1982) e que pode ser mimetizada por agonistas nicotínicos (White 1982).

Em artérias de Coelho, o aumento no efluxo de adenosina- ^3H , causado pelo ionóforo de cálcio A-23187, observa-se quer na presença de fentolamina, quer em animais reserpinizados (Katsuragi e Su 1980).

Outra prova indicadora de que o ATP tem origem, também, nas terminações noradrenérgicas, foi dada pelas consequências da desnervação química. A 6-hidroxidopamina produz uma perda quase total da noradrenalina endógena que é, também, acompanhada por uma redução no efluxo de purinas induzido pela estimulação eléctrica (Levitt e Westfall 1982) e ainda, por uma anulação não só dos PJs (Allcorn *et al.* 1986) como, também, do componente purinérgico da resposta contráctil à estimulação nervosa (Fedan *et al.* 1981; French e Scott 1983; Warland e Burnstock 1987; Saville e Burnstock 1988).

Este amplo conjunto de resultados fornece uma indicação segura de que, embora as estruturas pós-juncionais contribuam para as purinas que surgem durante a estimulação nervosa (Westfall *et al.* 1978, 1987; Levitt e Westfall 1982), uma parte dessas purinas tem origem neuronal. Isto verifica-se, não só na transmissão noradrenérgica (ver Sedaa *et al.* 1990), como também na colinérgica (Ribeiro e Sebastião 1987).

A libertação neuronal de purinas parece ser um facto de ocorrência geral. Porém, o ATP não desempenha, em todos os tecidos, um papel relevante como agente da resposta motora. Por exemplo, na artéria pulmonar de Coelho, a estimulação simpática não provoca as alterações do potencial de membrana características do ATP (Su *et al.* 1964; Suzuki 1983) e, no entanto, quer a estimulação eléctrica (Katsuragi e Su 1982), quer o potássio ou o ionóforo de cálcio A-23187 (Katsuragi e Su 1980) induzem uma libertação de purinas. A afirmação do papel do ATP, como mediador motor apoia-se, por isso, na observação das respostas pós-juncionais, eléctricas ou mecânicas, resultantes da estimulação de nervos noradrenérgicos. Essas respostas não têm as características de uma resposta noradrenérgica e são sensíveis a fármacos que interferem com os receptores P_2 .

Na membrana nictitante de Gato, a reserpina induz uma redução no

conteúdo de noradrenalina para cerca de 2% do valor inicial. No entanto, nestas condições, a resposta à estimulação nervosa pós-ganglionar, não sensível aos antagonistas- α , atinge ainda cerca de 50% da resposta máxima (Langer e Pinto 1976).

No canal deferente de Cabaia, a resposta contráctil à estimulação eléctrica compreende duas fases, a inicial rápida e fásica e uma seguinte lenta e sustentada. A primeira fase, tal como a resposta da membrana nictitante de gatos reserpinizados, não é antagonizada pelos antagonistas- α , apresentando as características de uma resposta purinérgica (Westfall *et al.* 1978).

A disponibilidade de fármacos antagonistas dos receptores P_2 permitiu comprovar a participação purinérgica nas respostas contrácteis, de alguns tecidos, à estimulação simpática. De entre os fármacos usados encontram-se o α,β -metileno ATP e o ANAPP₃.

O α,β -metileno ATP é um fármaco agonista dos receptores P_2 . Provoca uma despolarização da membrana da célula muscular e uma contracção rápida, semelhante à obtida pelo ATP, mas com uma maior amplitude. Se se prolongar o contacto com o tecido produz-se uma dessensibilização ao ATP (Hedlund *et al.* 1983; Kasakov e Burnstock 1983; Meldrum e Burnstock 1983).

O ANAPP₃ é um análogo ao ATP que, quando adicionado a um tecido, comporta-se como agonista desencadeando uma resposta. Se se mantiver em contacto com o tecido comporta-se como antagonista reversível, em relação ao ATP ou a outros agonistas P_2 . Este efeito desaparece se o composto for retirado do meio. Porém, se durante o contacto do fármaco com o tecido, o sistema for irradiado com luz (460-480 nm, 15 min), dá-se uma fotólise que transforma o composto num nitreno intermediário, bastante reactivo, que forma ligações covalentes com o receptor P_2 . Nestas condições, o ANAPP₃ pode comportar-se, também, como um antagonista irreversível, permanecendo o seu efeito mesmo após o fármaco ter deixado de estar em contacto com o tecido (Fedan *et al.* 1985).

Por exemplo, o ANAPP₃ inibe a primeira fase da resposta contráctil à estimulação nervosa do canal deferente de Cabaia, não influenciando a segunda fase da resposta que é sensível aos antagonistas- α (Hogaboom *et al.* 1980). A inibição condicionada pelo ANAPP₃ é relativamente maior em animais reserpinizados, enquanto que a desnervação simpática, induzida pela 6-hidroxidopamina, reduz a influência do ANAPP₃ sobre a resposta à estimulação eléctrica (Fedan *et al.* 1981).

No mesmo tecido, Sneddon e Burnstock (1984b), utilizando o α,β -metileno ATP, chegaram às mesmas conclusões, quanto à participação do ATP na resposta eléctrica e mecânica à estimulação nervosa.

No canal deferente de diversas espécies, além da Cobaia, demonstrou-se, também, que as alterações rápidas do potencial de membrana são antagonizadas pelo α,β -metileno ATP (Stjärne e Åstrand 1985) e deprimidas pela desnervação simpática com 6-hidroxidopamina (Allcorn *et al.* 1986).

Na membrana nictitante de Gato, a utilização de α,β -metileno ATP permitiu demonstrar a participação do ATP na resposta à estimulação nervosa pós-ganglionar (Duval *et al.* 1985).

Na artéria da cauda de Rato, os estudos electrofisiológicos mostraram que a resposta à estimulação eléctrica compreende uma despolarização inicial rápida, não influenciada pelos antagonistas- α , mas sensível ao α,β -metileno ATP (Sneddon e Burnstock 1984c).

Na artéria mesentérica de Coelho, a estimulação nervosa induz o aparecimento de PJs (Kuriyama e Makita 1984; Mishima *et al.* 1984)e, nos ramos ileocecais, a vasoconstrição induzida pela estimulação nervosa é sensível ao α,β -metileno ATP (von Kügelgen e Starke 1985). A participação do ATP foi também demonstrada nos ramos jejunaes de menor calibre (Ramme *et al.* 1987).

Nas artérias mesentéricas de outras espécies, nomeadamente do Cão (Muramatsu 1986), da Cobaia (Kuriyama e Makita 1983) e do Rato (Yamamoto *et al.* 1988; Sjoblom-Widfelt *et al.* 1990) foi também descrita a existência de um componente purinérgico na resposta contráctil à estimulação simpática.

Na artéria safena de Coelho, o α,β -metileno ATP anula o componente não noradrenérgico da resposta contráctil à estimulação nervosa (Burnstock e Warland 1987). Por seu lado, a reserpina reduz o componente noradrenérgico, sem influenciar, significativamente, o purinérgico (sensível ao α,β -metileno ATP), enquanto que, a 6-hidroxidopamina reduz, drasticamente, ambos os componentes (Warland e Burnstock 1987).

Na artéria da orelha de Coelho, a estimulação nervosa induz o aparecimento de PJs, não sensíveis aos antagonistas- α (Holman e Surprenant 1980; Suzuki e Kou 1983; Suzuki *et al.* 1984) e de respostas contrácteis, sensíveis ao α,β -metileno ATP (Kennedy *et al.* 1986), as quais permanecem após tratamento com reserpina (Saville e Burnstock 1988).

Na artéria hepática de Coelho, a estimulação transmural induz o aparecimento de uma resposta contráctil, inibida parcialmente pelos antagonistas-

α ou pelo α,β -metileno ATP. Em animais reserpinizados, essa resposta é totalmente inibida pelo α,β -metileno ATP, enquanto que a 6-hidroxidopamina reduz, drasticamente, ambos os componentes (Brizzolara e Burnstock 1990).

A existência de co-transmissão envolvendo a noradrenalina e o ATP tem sido evidenciada, também, no animal inteiro. A estimulação hipotalâmica de coelhos anestesiados provoca uma vasodilatação a nível dos leitos vasculares dos músculos esqueléticos que se pensa ser mediada pelo ATP (Shimada e Stitt 1984). A resposta pressora à estimulação simpática de ratos desmedulados apresenta uma componente resistente aos antagonistas- α , tendo sido atribuída a uma participação purinérgica (Grant *et al.* 1985; Bulloch e McGrath 1988a; Schlicker *et al.* 1989).

Variação na importância relativa do ATP na resposta pós-juncional

Embora a estimulação das fibras simpáticas pós-ganglionares promova a libertação de noradrenalina e de purinas, a importância relativa, de cada um destes neurotransmissores na resposta contráctil não é a mesma em todos os tecidos.

Na artéria pulmonar de Coelho, embora a estimulação nervosa promova a libertação de purinas, o seu papel limita-se a exercer uma retro-inibição sobre a libertação dos neurotransmissores (Katsuragi e Su 1982). Na artéria pulmonar de Cobaia, todas as alterações de potencial, observadas a nível da célula muscular e resultantes da estimulação nervosa, são inibidas pelos antagonistas- α (Suzuki 1983).

Na artéria da orelha de Coelho, embora se observem PJs (Holman e Surprenant 1980) e exista um certo componente da resposta contráctil resistente aos antagonistas- α , esta é, maioritariamente noradrenérgica (Kennedy *et al.* 1986). Situação semelhante ocorre na artéria da cauda de Rato (Itoh *et al.* 1983; Sneddon e Burnstock 1984c).

Noutros tecidos, como na artéria safena de Coelho (Burnstock e Warland 1987) e em diversos níveis da artéria mesentérica de Coelho (von Kügelgen e Starke 1985; Ramme *et al.* 1987), quer as respostas eléctricas, quer as respostas contrácteis desencadeadas pela estimulação nervosa são pouco influenciadas pela inibição dos receptores noradrenérgicos pós-juncionais.

A importância relativa do componente purinérgico na resposta contráctil à

estimulação nervosa varia não só de tecido para tecido, como também, dentro do mesmo tecido, de zona para zona. Um exemplo disso é o canal deferente de Rato. A resposta contráctil à estimulação nervosa da porção prostática é mais resistente aos antagonistas- α do que a resposta da porção epididimal (McGrath 1978), o que indica que a participação purinérgica é maior na porção prostática do que na porção epididimal.

O componente purinérgico é, pois, facilmente evidenciado nas respostas de alguns tecidos como, por exemplo, a porção prostática do canal deferente de Rato, a artéria mesentérica e a artéria safena de Coelho, enquanto que noutros, como por exemplo a porção epididimal do canal deferente de Rato, a artéria da orelha de Coelho e, de certa forma, também, a membrana nictitante de Gato, o componente purinérgico é facilmente encoberto pelo componente noradrenérgico.

Um outro facto curioso é o de que, num mesmo tecido, a contribuição relativa do componente noradrenérgico e do componente purinérgico, para a resposta contráctil à estimulação nervosa, variar com as características da estimulação nervosa. A contribuição purinérgica perde importância, relativamente à noradrenérgica, à medida que a frequência ou a duração da estimulação aumenta. Isto observa-se independentemente da importância relativa que o componente noradrenérgico possa ter na resposta à estimulação nervosa. Por exemplo, na artéria safena de Coelho, tecido em que o componente purinérgico predomina, a prazosina apenas reduz significativamente a amplitude da resposta contráctil à estimulação nervosa quando a frequência da estimulação é elevada (Burnstock e Warland 1987). Situação semelhante ocorre na artéria mesentérica de Coelho (Bullock e Starke 1990). Por outro lado, nos tecidos em que o componente noradrenérgico predomina, só é possível observar o componente purinérgico, quando a frequência de estimulação é baixa ou/e os períodos de estimulação são muito curtos (Kennedy *et al.* 1986) ou então após deplectar o tecido em noradrenalina (Langer e Pinto 1976; Duval *et al.* 1985).

O aumento da importância relativa do componente noradrenérgico em relação ao purinérgico observa-se, não só variando as características da estimulação, como também através de outros procedimentos que promovam um aumento da libertação. O bloqueio dos receptores- α_2 pré-juncionais, por antagonizar a auto-inibição exercida pela noradrenalina, aumenta a libertação dos neurotransmissores (Starke 1977, 1987). Porém, o aumento da libertação não se traduz num aumento paralelo do componente purinérgico e noradrenérgico da

resposta contráctil, sendo o noradrenérgico mais favorecido (Bulloch e Starke 1990).

Estas variações da importância relativa da contribuição noradrenérgica, assim como as variações de tecido para tecido, não foram, ainda, cabalmente explicadas. Burnstock tem vindo a atribuir estas diferenças a uma heterogeneidade de nervos, ou de varicosidades dentro do mesmo nervo (Burnstock 1990b). Alguns nervos (ou algumas varicosidades) teriam uma proporção de ATP/noradrenalina maior, do que resultaria uma maior importância da contribuição purinérgica.

A junção neuro-muscular noradrenérgica apresenta uma grande diversidade estrutural (ver Bevan e Su 1973) e este facto é susceptível, só por si, de condicionar modos diferentes de controlo da libertação e de acesso dos neurotransmissores aos respectivos receptores pós-juncionais. As variações inter-tecduais da importância da contribuição noradrenérgica para a resposta contráctil à estimulação nervosa podem depender de diferenças na interacção dos mecanismos reguladores da libertação e/ou da disposição e eficácia da noradrenalina libertada. Estas podem condicionar uma maior ou menor disponibilidade dos neurotransmissores, podendo por isso privilegiar ou prejudicar um determinado componente.

O facto do aumento da libertação favorecer mais o componente noradrenérgico levou-nos a propôr a hipótese de que tal se deva a diferentes localizações dos receptores noradrenérgicos pós-juncionais, em relação às varicosidades, e/ou a outros factores que modulam a libertação ou controlam o acesso da noradrenalina libertada aos respectivos receptores pós-juncionais. Perante esta hipótese, os objectivos deste trabalho foram:

- Verificar se o conteúdo tecidual e a fracção de libertação da noradrenalina estão de acordo com a importância relativa do componente noradrenérgico na resposta à estimulação nervosa;

- Determinar a influência que a inibição da captação neuronal (principal mecanismo responsável pela inactivação da noradrenalina) exerce sobre as respostas pré- e pós-juncionais à noradrenalina;

- Estudar se a libertação é modulada de igual modo nos tecidos em que a importância da participação noradrenérgica é diferente.

O estudo realizou-se em quatro tecidos. Em dois deles - porção epididimal do canal deferente de Rato e artéria da orelha de Coelho, há franco predomínio do componente noradrenérgico na resposta à estimulação eléctrica; nos dois restantes - porção prostática do canal deferente de Rato e artéria jejunal de Coelho, o componente purinérgico é francamente predominante.

Material e métodos

Descrição geral

Utilizaram-se as porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato, o segmento proximal da artéria central da orelha de Coelho e os ramos jejunais da artéria mesentérica de Coelho. Os tecidos foram obtidos a partir de ratos Wistar de sexo masculino, com peso compreendido entre 250 e 300 g e de coelhos de raça indeterminada, indistintamente de sexo feminino ou masculino e com peso compreendido entre 2,5 e 3 Kg.

A composição da solução de Krebs-Henseleit foi a seguinte (expressa em gramas, por litro de água destilada): NaCl 6,94; KCl 0,35; CaCl₂ 0,28; KH₂PO₄ 0,16; MgSO₄·7H₂O 0,29; NaHCO₃ 2,1; glucose 1,81. A esta solução adicionava-se, ainda, ácido ascórbico 0,01g e etilenodiaminotetracetato de sódio 0,01 g, para evitar a oxidação não enzimática das catecolaminas. Após a sua preparação, a solução era continuamente oxigenada através do borbulhar de uma corrente gasosa de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono.

Preparação dos órgãos isolados

O canal deferente era seccionado na extremidade epididimal e removido até ao topo prostático. Depois de isolados os canais eram colocados numa placa de Petri, com líquido nutritivo e à temperatura ambiente (entre 20 e 25°C). Cada um dos canais era seccionado de modo a que a porção epididimal correspondesse a cerca de dois terços do comprimento total do canal.

Após terem sido postas a descoberto, as artérias de Coelho eram retiradas, mergulhadas em líquido nutritivo e dissecadas sob uma lupa biocular, sendo-lhes retirados segmentos de 20 a 25 milímetros de comprimento e com 1 a 1,3 milímetros de diâmetro externo.

Curvas de concentração-resposta

Em todos os casos em que se registaram curvas de concentração-resposta, o processo de representação foi sempre o mesmo: em ordenadas, em escala aritmética, representaram-se os efeitos obtidos em percentagem da resposta máxima e em abcissas, as concentrações em escala logarítmica.

Em cada ensaio, e apenas com as concentrações de agonista que originavam respostas entre 16 e 84% de resposta (correspondendo aos probits 4 e 6, respectivamente), obtinha-se uma recta de regressão, sendo contabilizados todos os ensaios em que o coeficiente de regressão era superior a 0,95. Através da equação desta recta calculava-se a concentração de agonista capaz de provocar 20% da resposta máxima. Este parâmetro foi designado por concentração eficaz 20 (CE₂₀), quando representava a concentração de agonista capaz de provocar 20% da resposta contráctil máxima e por concentração inibitória 20 (CI₂₀), quando representava a concentração de agonista capaz de reduzir 20% a resposta à estimulação eléctrica.

Registo das respostas contrácteis a agonistas exógenos

Os ensaios realizaram-se em banhos de órgãos isolados, com 20 ml de capacidade que continham Krebs-Henseleit, mantido a 37°C e onde se fazia borbulhar uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. O líquido nutritivo continha, além da composição salina já referida, 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de propranolol, 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de hidro cortisona e 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de U-0521 (3,4-dihidroxy-2-metilpropiofenona). Estes fármacos destinavam-se a inibir os receptores- β , a captação extraneuronal e a catecol-O-metiltransferase, respectivamente.

O líquido nutritivo contido no banho de órgãos era renovado de 15 em 15 minutos, com excepção para os 20 minutos a seguir ao fim de cada curva de

concentração-resposta, durante os quais a renovação se fazia de 5 em 5 minutos.

Em cada experiência utilizavam-se, em simultâneo, quatro preparações, sendo duas de cada tecido. Assim, nas experiências com canal deferente utilizavam-se de cada vez, as duas porções prostáticas e as duas epididimais retiradas do mesmo animal. No caso das artérias de Coelho, utilizavam-se ao mesmo tempo, dois anéis da artéria da orelha e dois da artéria jejunal do mesmo animal. Isso permitia obter resultados emparelhados e realizar sempre ensaios de controlo.

Com o auxílio de um fio de algodão, a porção prostática ou a epididimal do canal deferente de Rato prendia-se, por uma das extremidades, a uma haste de suporte que era introduzida no banho de órgãos isolados e, pela outra, à alavanca de um transdutor isométrico (mod 7004; Ugo Basile, Varese, Itália). Estes tecidos eram colocados sob uma tensão basal de 9,8 mN. Esta tensão era controlada através do registo no polígrafo e depois de se ter feito uma calibração prévia. A estabilização do sistema demorava entre 90 e 120 minutos, durante os quais a tensão era periodicamente ajustada. Considerava-se terminada a estabilização quando a tensão basal não se modificava significativamente durante um período de 30 minutos (deslocamento inferior a 5% da tensão basal).

Para as experiências com a artéria da orelha ou jejunal de Coelho utilizaram-se anéis, com cerca de 4 mm de largura. Pelo seu lúmen passavam-se dois fios de aço inoxidável com 0,05 mm de diâmetro, cada um dobrado de modo a formar um gancho de forma triangular. A base do triângulo ficava dentro do lúmen da artéria e a ligação ao suporte ou à alavanca era feita pelo vértice que se opunha a esta base. O movimento da preparação era comunicado ao transdutor isométrico (mod 7004; Ugo Basile). Os tecidos mantinham-se sob uma tensão basal de 3 a 4 mN. A estabilização demorava entre 120 e 150 minutos durante os quais a tensão era periodicamente ajustada. Esta considerava-se terminada, quando a tensão basal não se modificava significativamente durante um período de 30 minutos (deslocamento inferior a 5% da tensão basal).

Determinaram-se curvas de concentração-resposta à noradrenalina, à adrenalina e à α -metilnoradrenalina nas porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato. Nas artérias da orelha e jejunal de Coelho apenas se determinaram curvas à noradrenalina e à adrenalina.

As curvas de concentração-resposta foram obtidas pelo método cumulativo. O agonista era adicionado ao banho, de modo a se obter concentrações três vezes superior à concentração anterior e até se atingir a resposta máxima. Considerou-se resposta máxima a resposta causada por $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de noradrenalina, excepto quando a preparação era a porção prostática do canal deferente. Neste caso a concentração de noradrenalina usada para obter a resposta máxima foi $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Obtiveram-se, em cada preparação, duas curvas de concentração-resposta, com um intervalo de 60 minutos entre o fim da primeira e o início da segunda.

Para estudar a influência da captação neuronal na sensibilidade das preparações aos vários agonistas noradrenérgicos, usou-se 40 nmol.l^{-1} de desipramina. Esta concentração está descrita como capaz de inibir, significativamente, a captação neuronal sem interferir em outros sistemas de captação de noradrenalina resistentes à cocaína (Ungell e Graefe 1987). A desipramina adicionava-se ao banho 30 minutos antes do início da segunda curva e mantinha-se até ao final da experiência. Simultaneamente, realizavam-se ensaios controlo para cada tecido. Nestes ensaios cumpria-se o mesmo protocolo apenas não se adicionava a desipramina.

A influência da inibição da captação neuronal na sensibilidade às aminas simpaticomiméticas exprimiou-se pelo quociente entre a CE_{20} obtidas na ausência do inibidor da captação neuronal e a CE_{20} obtida na segunda curva (após a adição do inibidor), depois de corrigidas as alterações espontâneas verificadas na experiência-controlo.

Registo da resposta contráctil à estimulação eléctrica

Os ensaios realizaram-se em banhos de órgãos isolados com 20 ml de capacidade, contendo Krebs-Henseleit, a 37°C e onde se fazia borbulhar uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. O líquido nutritivo continha, além dos constituintes já referidos, $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de propranolol, $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de prazosina, $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de hidrocortisona e $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de U-0521, fármacos que se destinavam a bloquear os receptores- β , os receptores- α_1 , a captação extraneuronal e a catecol-O-metiltransferase, respectivamente. O líquido nutritivo contido no banho de órgãos era renovado de 15 em 15 minutos, com excepção para o período de realização da curva concentração-resposta, em que a substituição do líquido se fazia de 2 em 2 minutos.

A estimulação eléctrica transmural era aplicada por intermédio de dois fios

de platina, com cerca de 20 mm de comprimento, dispostos paralelamente e afastados entre si cerca de 4 mm. Estes fios encontravam-se fixos no interior de uma matriz cilíndrica, construída num bloco de acrílico.

Em cada experiência utilizavam-se duas preparações do mesmo tecido, servindo uma de controlo da outra.

Com auxílio de um fio de algodão, a porção prostática, ou a epididimal do canal deferente de Rato era presa, por uma das extremidades, a uma haste de suporte que era introduzida no banho de órgãos. Passava-se, em seguida, o tecido pelo interior do cilindro onde estavam colocados os eléctrodos, prendendo-se a outra extremidade da preparação à alavanca do transdutor isométrico (mod 7004; Ugo Basile). Os tecidos eram submetidos a uma tensão basal de 9,8 mN. Esta tensão era controlada através do registo no polígrafo, depois de se ter procedido a uma calibração prévia do sistema de registo. O período de estabilização que seguia, demorava entre 90 e 120 minutos, durante o qual a tensão era periodicamente ajustada. Considerava-se terminada a estabilização quando a tensão basal não se modificava significativamente durante um período de 30 minutos (deslocamento inferior a 5% da tensão basal).

A aplicação de um estímulo eléctrico de 100 V durante 2 ms provocava, quer na porção prostática quer na epididimal, uma contracção rápida e monofásica. Os efeitos dos agonistas noradrenérgicos (adrenalina e α -metilnoradrenalina) sobre os receptores- α_2 pré-juncionais foram avaliados pela redução provocada sobre a amplitude da resposta contráctil à estimulação eléctrica. Com base neste efeito inibitório da libertação, traduzido na diminuição da amplitude da resposta contráctil, obtiveram-se curvas de concentração-resposta nas porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato. Nas artérias da orelha e jejunal de Coelho não foi possível executar este protocolo já que, em qualquer destas artérias, não foi possível obter respostas contrácteis mensuráveis a estímulos eléctricos com estas características.

Os estímulos eléctricos aplicavam-se de 2 em 2 minutos, sendo o líquido nutritivo substituído imediatamente após a resposta à estimulação eléctrica ter terminado. Quando a amplitude da resposta contráctil se tornava regular, iniciava-se a obtenção da curva de concentração-resposta. O método seguido aqui foi o das doses únicas. O agonista adicionava-se ao banho 45 segundos antes de se desencadear o estímulo. Este tempo revelou-se suficiente para o agonista exercer o seu efeito máximo, qualquer que fosse a sua concentração. A primeira

concentração do agonista usada foi de 1 nmol.l⁻¹. Esta concentração era depois, multiplicada, sucessivamente, por um factor de três.

O efeito do agonista foi contabilizado pela diferença entre a amplitude da resposta contráctil à mesma estimulação eléctrica, obtida antes do início da curva e depois da adição de cada concentração do agonista. Considerou-se um efeito de 100% a anulação da resposta contráctil à estimulação eléctrica. Tal efeito era conseguido com 0,5 µmol.l⁻¹ do agonista- α_2 selectivo, UK-14,304 (cloridrato de 5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)-quinoxalina; Cambridge 1981).

Em cada preparação determinaram-se duas curvas de concentração-resposta, sendo de 60 minutos o intervalo entre o fim da primeira e o início da segunda.

Para estudar a influência da captação neuronal na sensibilidade das porções prostática e epididimal à adrenalina e à α -metilnoradrenalina, usaram-se 40 nmol.l⁻¹ de desipramina para inibir essa captação. Este fármaco era adicionado ao banho 30 minutos antes do início da segunda curva e mantido no líquido nutritivo até ao final da experiência. Paralelamente, realizava-se um ensaio controlo, segundo o mesmo protocolo, apenas não se adicionando desipramina ao líquido nutritivo.

A influência da inibição da captação neuronal na sensibilidade à adrenalina e à α -metilnoradrenalina foi expressa pelo quociente entre a CI₂₀ obtida antes de se adicionar o inibidor da captação e a CI₂₀ obtida após inibição da captação neuronal. A evolução espontânea da sensibilidade foi sempre testada em experiências paralelas, nas quais, entre a primeira e a segunda curva de concentração-resposta, não se adicionou qualquer inibidor da captação neuronal. Sempre que se detectaram alterações da sensibilidade estas foram descontadas no efeito do fármaco ensaiado na experiência a decorrer em paralelo. Compararam-se ainda as inclinações das rectas obtidas a partir dos valores das primeiras e segundas curvas, no sentido de detectarem deslocamentos não paralelos das curvas concentração-resposta.

Estudo da libertação da noradrenalina endógena

Em cada experiência utilizaram-se, em simultâneo, quatro preparações, sendo duas de cada tecido e todas do mesmo animal. Assim, utilizavam-se as duas porções prostáticas e as duas porções epididimais dos dois canais deferentes do mesmo Rato, ou duas tiras da artéria da orelha e duas da artéria jejunal do

mesmo Coelho. Assim os resultados eram sempre emparelhados.

Após terem sido dissecados, os tecidos introduziam-se em frascos que continham líquido nutritivo, com pargilina (1 mmol.l^{-1}). A solução era oxigenada com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono, mantida a 37°C e continuamente agitada num banho para incubações (mod. 1083; GFL, Grosburgwedel, RFA). Após este passo, destinado a inibir a monoaminoxidase e assim favorecer o efluxo de noradrenalina não metabolizada, colocavam-se os tecidos em tinas com 1 ml de capacidade onde eram perifundidos com líquido nutritivo, continuamente oxigenado e mantido a 37°C .

A velocidade de perfusão dos tecidos era de 1 ml.min^{-1} , assegurada por uma bomba peristáltica (mod. Miniplus 2; Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, França).

A solução de perfusão continha, ainda, desipramina (40 nmol.l^{-1}) e ioimbina ($3 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), com o objectivo de inibir, a captação neuronal da noradrenalina e a auto-inibição mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais, respectivamente. Após quarenta e cinco minutos do início da perfusão, os tecidos que tinham sido presos pelas extremidades a dois eléctrodos de platina, eram submetidos a uma salva de 2700 estímulos eléctricos (100 V , 1 ms , 5 Hz ; Stimulator II X, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, RFA). Esta estimulação que era designada por E_1 , era repetida aos 105 minutos (E_2). Quarenta e cinco minutos antes do início de E_2 , adicionava-se ao líquido de perfusão dipiridamol ($3 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), para inibir a captação de adenosina ou o DPSPX (1,3-dialquil-8-(p-sulfofenil) xantina; 5 nmol.l^{-1}), para inibir os receptores P_1 .

O líquido de perfusão era colhido durante os 12 minutos que precediam a estimulação e durante os 12 minutos que lhe seguiam. A colheita era feita para frascos de polietileno, com fundo cónico, que continham $1,2 \text{ ml}$ de ácido perclórico (1 mol.l^{-1}) para inibir a oxidação da noradrenalina.

No fim de E_2 , os tecidos eram removidos, enxugados por contacto leve com papel de filtro e pesados.

A noradrenalina libertada por estimulação eléctrica foi calculada através da diferença entre a quantidade de noradrenalina colhida durante e antes de cada período de estimulação. Esta foi expressa em nanogramas de noradrenalina por estímulo e por miligrama de tecido.

A influência do dipiridamol ou do DPSPX foi determinada pela razão entre a quantidade de noradrenalina libertada por E_2 e a libertada por E_1 , corrigida, em cada experiência, pela variação obtida nas preparações controlo.

Doseamento do teor em catecolaminas

O doseamento da noradrenalina foi feito em várias modalidades experimentais:

a) nos tecidos:

Imediatamente, após o sacrifício dos animais, os tecidos eram isolados e removidos. A seguir, pesavam-se e introduziam-se em tubos de polietileno contendo 0,5 ml ou 1 ml de ácido perclórico ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) consoante se destinassem às artérias ou às porções do canal deferente, respectivamente.

Seguidamente, os tecidos eram mantidos, durante 24 horas, a 4°C e, mais tarde, colocados a -20°C , até se proceder à quantificação das catecolaminas. Antes do doseamento, as amostras eram descongeladas e filtradas, através de um filtro de $0,2 \mu\text{m}$ e com auxílio de centrifugação (1500 rpm, 5 min). Do filtrado utilizavam-se 50 μl para injeção no cromatógrafo.

b) nos líquidos:

A extracção das catecolaminas dos líquidos de perfusão baseou-se no princípio da adsorção das catecolaminas em meio alcalino e da sua libertação em meio ácido.

Aos líquidos de perfusão, colhidos em meio ácido, adicionavam-se 100 μl de uma solução de di-hidroxibenzilamina (25 ng.ml^{-1}), que funcionava como padrão interno, e cerca de 50 mg de alumina. O pH era ajustado entre 8,4 e 8,6 pela adição de uma solução de tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) (200 g.l^{-1}). A seguir as amostras eram agitadas durante 20 minutos e submetidas a uma centrifugação (2000 rpm, 10 min). Após esta operação rejeitavam-se os sobrenadantes transferindo-se a alumina para um sistema de filtração, constituído por dois tubos (S+S 009; Schleicher e Schuell) separados por uma membrana porosa de $0,2 \mu\text{m}$. Para separar as catecolaminas da alumina, adicionavam-se 200 μl de ácido perclórico ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$), agitavam-se as amostras durante 1 minuto, deixando-se, em seguida em repouso durante 5 minutos após o que se procedia a uma centrifugação (2000 rpm, 5 min). Da solução centrifugada injectavam-se 50 μl no cromatógrafo.

O doseamento de catecolaminas foi realizado através de um sistema de cromatografia líquida de alta resolução com detecção electroquímica (HPLC-ED). O sistema era constituído por uma bomba (modelo 302; Gilson) ligada a um

módulo de pressão (modelo 802C; Gilson) e a uma coluna de 5 μm ODS com 25 cm de comprimento (Biophase; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, EUA). A quantificação realizava-se num detector electroquímico (mod 141; Gilson) em uma célula de detecção. Esta era formada por um eléctrodo indicador, constituído por um disco com 7 mm^2 de carbono vítreo, por um eléctrodo de referência de AgCl/Ag e por um eléctrodo auxiliar de carbono. A célula operava a um potencial de +70 mV e a corrente produzida era registada num integrador (modelo 4290; Varian; Walnut Creek, California, EUA).

A fase móvel era constituída por 0,1 mmol.l^{-1} de ácido cítrico, 0,5 mmol.l^{-1} de octilsulfato de sódio, 0,1 mol.l^{-1} de acetato de sódio, 0,15 mmol.l^{-1} de etilenodiaminotetracetato de sódio, 1 mmol.l^{-1} de dibutilamina e 10% (v/v) de metanol em água tridestilada. A solução era filtrada através de uma membrana porosa de 0,2 μm (RC58; Schleicher e Schuell, Dassel, RFA), desgaseificada, sendo de seguida o pH ajustado a 3,5. A fase móvel circulava sob pressão, com um fluxo de 1 ml.min^{-1} e à temperatura ambiente (20 e 25°C).

A área dos picos registados relacionou-se com as áreas obtidas por injeção de concentrações conhecidas de noradrenalina e de di-hidroxibenzilamina. Os valores de noradrenalina obtidos em cada amostra eram corrigidos com um factor de rendimento, correspondente à razão entre a área do pico obtido pela injeção directa da mesma quantidade de di-hidroxibenzilamina e a área do pico de di-hidroxibenzilamina no cromatograma da amostra sujeita ao processo extractivo.

Carga e libertação de noradrenalina- ^3H

Nas experiências em que se avaliou a libertação de noradrenalina- ^3H , utilizavam-se quatro preparações, duas de cada tecido e todas do mesmo animal.

A solução de Krebs-Henseleit utilizada continha, além da composição já referida, 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de propranolol, 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de hidrocortisona e 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ de U-0521, fármacos que se destinavam a inibir os receptores- β , a captação extraneuronal e a catecol-O-metiltransferase, respectivamente.

Imediatamente, após o sacrifício dos animais, as porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato ou as artérias da orelha e jejunal de Coelho introduziam-se em pequenos matrizes que continham cerca de 3 ml de líquido nutritivo. Este encontrava-se a 37°C, era continuamente oxigenado com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono e continha pargilina na concentração de 1 mmol.l^{-1} , fármaco destinado a inibir a mono-aminoxidase.

Após 30 minutos de contacto com a pargilina, os tecidos introduziam-se em novos matrizes, com cerca de 3 ml de líquido nutritivo que continha (-)-noradrenalina- ^3H , na concentração de $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. A incubação durava 60 minutos, durante os quais se procedia a uma agitação e oxigenação constantes, mantendo-se o meio a 37°C .

Após o período de carga com a (-)-noradrenalina- ^3H , e enquanto aguardavam a montagem nas câmaras de perfusão, os tecidos mantinham-se em matrizes com líquido nutritivo.

Para a montagem, os tecidos prendiam-se, pelas suas extremidades, a dois fios de platina os quais, por sua vez, se encontravam ligados a um estimulador de onda quadrada. O conjunto formado pelo tecido e pelos dois fios era introduzido na câmara de perfusão, de modo que o tecido permanecia na zona média da câmara, ficando um dos fios preso no orifício da entrada e o outro no da saída do líquido nutritivo. Os tecidos eram perfundidos a um fluxo de 1 ml.min^{-1} .

A drenagem do líquido era realizada através de um capilar de vidro em forma de ansa, para um matraz de vidro ou para tubos de polietileno, quando se pretendia dosear o efluxo. Ao fim de sessenta minutos de perfusão, adicionava-se desipramina (40 nmol.l^{-1}) ao líquido de apenas dois dos quatro sistemas de perfusão, de modo que, de cada preparação em estudo, uma era tratada com desipramina e outra não. Ao fim de 120 minutos de lavagem, iniciava-se a colheita do líquido de perfusão, em amostras correspondentes a períodos de 5 minutos.

A cada tecido aplicavam-se cinco períodos de estimulação eléctrica: aos 10, 45, 80, 115 e 150 minutos contados a partir do início da colheita do líquido. Estes períodos de estimulação, designados por E_1 , E_2 , E_3 , E_4 e E_5 , respectivamente, consistiam na aplicação de uma estimulação de 100 V, 2 ms, 1 Hz durante 5 minutos, através de um estimulador eléctrico de onda quadrada (Stimulator II X, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, RFA).

A ioimbina, na concentração de 50, 500 e 5000 nmol.l^{-1} , era adicionada ao líquido de perfusão, 20 minutos antes de E_3 , E_4 e E_5 , respectivamente. A sua influência foi contabilizada pela razão entre a fracção de libertação obtida com ioimbina e a obtida antes da adição deste fármaco (a induzida por E_2). Foi considerado efeito máximo quando, entre duas concentrações consecutivas de ioimbina, não se registava um aumento da fracção de libertação superior a 10%.

A variação da fracção de libertação ao longo do ensaio foi avaliada em experiências de controlo, onde se repetia o mesmo procedimento descrito

anteriormente, mas se omitia a adição de ioimbina.

No fim de cada experiência, os tecidos eram retirados das câmaras de perfusão, enxugados em papel de filtro e pesados, sendo depois mergulhados em 2 ml de ácido perclórico ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$), durante pelo menos 24 horas. O teor em trítio recolhido nos 2 ml da solução extractiva dava o conteúdo em noradrenalina- ^3H presente no tecido no fim da experiência.

Preparação das amostras e doseamento cintilométrico

A alíquotas de 2 ml das amostras recolhidas ao longo da experiência e a alíquotas de 0,5 ml dos extractos dos tecidos, adicionava-se 10 ml de uma mistura de cintilação, composta por 330 ml de Triton X-100, 5,5 g de Permablend III e 1000 ml de tolueno ou por 330 ml de Triton X-100, 5 g de 2,5-difeniloxazol (PPO), 0,5 g de p-bis(o-metilestril) benzeno (bis MSB) e tolueno até perfazer 1000 ml. A radioactividade total era determinada por cintilometria líquida em contador de cintilações (Tri-Carb Scintillation Spectrometer, mod. 3320; Packard, Warrenville, ILL, EUA ou Liquid Scintillation Counter BF 500, Berthold, Wildbad, RFA).

A fracção de libertação (FL) foi determinada de acordo com o descrito por Luchelli-Fortis e Langer (1975), isto é, calculando-se o quociente entre a quantidade de amina- ^3H libertada por impulso eléctrico e a quantidade de trítio presente na preparação no momento em que se iniciava a respectiva estimulação. Este valor foi calculado a partir da quantidade total de noradrenalina- ^3H presente no tecido, no final da experiência adicionada da noradrenalina- ^3H libertada desde o início da respectiva colheita até ao final da experiência.

Análise ultra-estrutural

Imediatamente após a morte dos animais, colhiam-se pequenas porções dos segmentos prostático e epididimal do canal deferente de Rato. Estes tecidos eram fixados em glutaraldeído-ósmio, desidratados em etanol/óxido de propileno e incluídos em Epon, de modo a se poder executar cortes transversais. Preparavam-se, depois, cortes ultrafinos dos blocos que continham cada um dos tecidos que, depois de corados com uranilo e chumbo, eram observados em

microscopia electrónica. Fotografaram-se todas as varicosidades observadas em cada corte, com uma ampliação de 10.000 vezes. As fotografias, depois de ampliadas 3 vezes, foram utilizadas para as várias avaliações qualitativas e morfométricas.

Descrição e análise estatística dos resultados

Os resultados das experiências são expressos pelas médias aritméticas e erros padrão ou pelas médias geométricas e respectivos limites de confiança de 95%. Para avaliação estatística das diferenças entre os vários grupos de resultados utilizou-se o teste *t* de Student para valores emparelhados ou independentes. A análise foi sempre bilateral e consideraram-se estatisticamente significativas as diferenças entre as médias sempre que o valor de *P* fosse inferior a 0,05.

Fármacos utilizados

Bitartarato de (-)-adrenalina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), cloridrato de desipramina (Ciba-Geigy, Basileia, Suíça), cloridrato de ioimbina (Sigma), α -metilnoradrenalina ((-)-3,4-di-hidroxinorefedrina; Sigma), cloridrato de (-)-noradrenalina (Sigma), cloridrato de (-)-noradrenalina-[7-³H(N)] (18,8 - 23,1 Ci/mmol; New England Nuclear, Dreieich, RFA), cloridrato de pargilina (Sigma), cloridrato de prazosina (Pfizer, Seixal, Portugal), cloridrato de ($\pm$)-propranolol (Sigma), dipiridamol (Sigma), DPSPX (1,3-dialquil-8-(p-sulfofenil) xantina; RBI, Natick, MSS, EUA), 21-hemissuccinato sódico de hidrocortisona (Sigma), UK-14304 (cloridrato de 5-bromo-6-(2-imidazolin-2-ilamino)-quinoxalina; Pfizer), U-0521 (3,4-di-hidroxy-2-metilpropiofenona; Upjohn Comp., Kalamazoo, EUA).

Todos os produtos usados que não constam da lista anterior foram de qualidade *pro analysi*, ou, nas respectivas situações, de qualidade cromatográfica ou para cintilometria.

As soluções das substâncias usadas eram dissolvidas em líquido nutritivo ou em água destilada e foram sempre preparadas antes de cada experiência a partir do produto de origem ou a partir de soluções em ácido clorídrico (0,01 mol.l⁻¹). Estas soluções mãe nunca tinham uma idade superior a 72 horas e mantinham-se ao abrigo da luz e a temperaturas inferiores a 5°C.

Resultados e comentários

1. *Análise do conteúdo tecidual em noradrenalina.*

1.1 *Resultados*

Os resultados apresentados na tabela 1 e expressos em micrograma por grama de tecido, mostram o conteúdo em noradrenalina das porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato e das artérias da orelha e jejunal de Coelho.

Tabela 1. Conteúdo tecidual em noradrenalina das porções epididimal e prostática do canal deferente de Rato e das artérias da orelha e jejunal de Coelho. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão; n= 12 amostras de cada tecido.

	Conteúdo em noradrenalina (μg / g de tecido)
Porção epididimal	$17,4 \pm 1,11^a$
Porção prostática	$23,2 \pm 1,17^b$
Artéria da orelha	$3,1 \pm 0,23^c$
Artéria jejunal	$4,8 \pm 0,82^d$

As diferenças entre a e b e entre c e d são estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

No canal deferente de Rato, o conteúdo em noradrenalina da porção prostática é superior ao conteúdo da porção epididimal [$23,2 \pm 1,17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $17,4 \pm 1,11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente ($n=12$; $P<0,05$)]. Situação semelhante ocorre entre as duas artérias usadas: o conteúdo em noradrenalina da artéria jejunal é, também, superior ao da artéria da orelha [$4,8 \pm 0,23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $3,1 \pm 0,82 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente ($n=12$; $P<0,05$)].

1.2 Comentários

A análise do conteúdo em noradrenalina revelou que, entre as duas porções do canal deferente de Rato e entre as duas artérias de Coelho, existe uma diferença significativa dos respectivos conteúdos em noradrenalina.

A importância do componente noradrenérgico da resposta contráctil à estimulação nervosa é, também, diferente entre a porção epididimal e a porção prostática por um lado (McGrath 1978) e entre a artéria da orelha e a artéria jejunal, por outro (von Kügelgen e Starke 1985; Kennedy *et al.* 1986). No entanto, estas diferenças não são concordantes com as existentes entre os conteúdos em noradrenalina. A porção epididimal e a artéria da orelha apesar de apresentarem um componente noradrenérgico mais amplo, possuem um conteúdo em noradrenalina inferior ao da porção prostática e ao da artéria jejunal, respectivamente.

Tem-se sugerido que o predomínio da participação purinérgica se deva a um maior valor da razão entre o conteúdo tecidual em ATP e em noradrenalina (Burnstock 1990b). Porém, se a resposta pós-juncional dependesse, apenas, das quantidades relativas de cada um dos co-transmissores, o tecido com maior contribuição noradrenérgica deveria ser o mais rico em noradrenalina e não o contrário, como se verifica. O mesmo raciocínio se deverá aplicar para os tecidos onde predomina o componente purinérgico. Tal não acontece. Embora a resposta contráctil da porção prostática apresente um componente purinérgico maior do que a resposta da porção epididimal, o que deveria traduzir uma menor riqueza tecidual em noradrenalina, o conteúdo desta porção em noradrenalina é superior ao da porção epididimal. Situação semelhante ocorre com as duas artérias estudadas: apesar do conteúdo em noradrenalina da artéria jejunal ser superior ao da artéria da orelha, a importância relativa do componente noradrenérgico é menor.

A expressão do conteúdo em noradrenalina em função do peso de tecido

como índice da densidade de inervação, está sujeita a algumas críticas. Se a distribuição das terminações neuronais, no tecido, não for uniforme e se os diferentes tecidos apresentarem diferenças nas suas espessuras, o conteúdo em noradrenalina por peso de tecido poderá não ser um indicador fiel da densidade de inervação noradrenérgica (Bevan *et al.* 1980a; Osswald e Guimarães 1983). Quanto mais espesso for o tecido mais, por defeito, este parâmetro representará a densidade de inervação noradrenérgica. Para ultrapassar este problema alguns autores preferem usar, como índice da densidade de inervação, o conteúdo em neurotransmissor por unidade de superfície (ver por exemplo Soares-da-Silva 1988).

No presente estudo, a expressão do conteúdo em função do peso ou em função da superfície, não parece susceptível de modificar o sentido dos resultados e, por isso, de perturbar as conclusões retiradas. Não se detectaram diferenças significativas entre a espessura das artérias. Entre as porções do canal deferente de Rato, embora a porção prostática tenha uma espessura superior à da porção epididimal, a apresentação dos resultados em função da área iria acentuar, ainda mais, a diferença entre o conteúdo da porção prostática e o da porção epididimal. Por outro lado, as informações colhidas pela análise estrutural e pela marcação com noradrenalina tritiada (Moura *et al.* 1990; Schöming *et al.* 1990) indicam que a inervação do canal deferente é uma inervação difusa, não havendo inervação preferencial de uma só camada, como acontece em alguns vasos (ver Bevan e Su 1974; Osswald e Guimarães 1983).

Como não é possível dosear o ATP que está em condições de poder ser mobilizado como neurotransmissor, as nossas conclusões fundamentam-se apenas no conteúdo em noradrenalina. Apesar desta limitação, parece-nos ser lógica a conclusão de que a menor importância da participação noradrenérgica, na resposta contráctil à estimulação nervosa, não pode ser atribuída a uma deficiência em noradrenalina do tecido.

2. *Acumulação e libertação de noradrenalina-³H.*

2.1 *Resultados*

2.1.1 *Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato.*

A incubação durante uma hora, das porções prostática e epididimal do

canal deferente de Rato, num meio contendo $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de (-)-noradrenalina tritiada (4395 CPM.nmol $^{-1}$; marcada predominantemente no carbono 7), seguida de perfusão de 120 min, originou um teor tecidual de amina radioactiva de $1,90 \pm 0,16 \mu\text{g.mg}^{-1}$, na porção epididimal e de $1,28 \pm 0,12 \mu\text{g.mg}^{-1}$, na porção prostática.

Nessas condições e ao fim desse tempo havia, em ambos os tecidos, um efluxo espontâneo de trítio. Na porção prostática esse efluxo era de $13,10 \pm 2,30$ CPM.mg $^{-1}$.min $^{-1}$ (n=6), enquanto que, na porção epididimal era de $27,78 \pm 1,90$ CPM.mg $^{-1}$.min $^{-1}$ (n=6).

A estimulação eléctrica (100 V, 2 ms, 1 Hz, 5 min) aumentou o efluxo de trítio cerca de 2,5 vezes, tanto na porção epididimal como na prostática. A fracção de libertação induzida pela estimulação eléctrica também não foi significativamente diferente nas duas porções do canal deferente ($\times 10^{-5}$): 1,88 (1,76 - 2,01) (n=6) e 2,01 (1,57 - 2,55) (n=6), na porção prostática e na porção epididimal, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2. Canal deferente de Rato: acumulação e libertação de noradrenalina- ^3H (fracção de libertação) da porção prostática e da porção epididimal. A acumulação está representada pelas médias aritméticas $\pm$ erro padrão e os valores da fracção de libertação pelas médias geométricas e limites de confiança a nível dos 95%. Qualquer um dos valores foi calculado a partir dos resultados obtidos em 6 experiências emparelhadas.

	Acumulação de noradrenalina- ^3H ($\mu\text{g.mg}^{-1}$)	Fracção de libertação ($\times 10^{-5}$)
Porção prostática	$1,28 \pm 0,12$	1,88 (1,76 - 2,01)
Porção epididimal	$1,90 \pm 0,16$	2,01 (1,57 - 2,55)

A acumulação na porção epididimal é significativamente superior à acumulação na porção prostática ($P < 0,05$).

2.1.2 Artérias jejunal e da orelha de Coelho.

A incubação de uma hora, das artérias jejunal e da orelha de Coelho, num meio contendo $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de (-)-noradrenalina tritiada ($4395 \text{ CPM.nmol}^{-1}$; marcada, predominantemente no carbono 7), seguida de 120 minutos de perfusão, originou um teor tecidual de amina radioactiva de $5,76 \pm 0,35 \mu\text{g.mg}^{-1}$ ($n=6$) na artéria jejunal e de $4,82 \pm 0,82 \mu\text{g.mg}^{-1}$ ($n=6$) na artéria da orelha.

Nessas condições e ao fim desse tempo havia, em ambos os tecidos, um efluxo espontâneo de trítio. Na artéria jejunal esse efluxo foi de $60 \pm 4 \text{ CPM.mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=6$), enquanto que, na artéria da orelha, foi de $31 \pm 5 \text{ CPM.mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=6$).

A estimulação eléctrica (100 V, 2 ms, 1 Hz, 5 min) aumentou o efluxo de trítio cerca de $2,6 \pm 0,24$ vezes ($n=6$) na artéria jejunal e $2,7 \pm 0,32$ vezes ($n=6$) na artéria da orelha. A fracção de libertação induzida pela estimulação eléctrica, também não foi significativamente diferente nas duas artérias ($\times 10^{-5}$): $1,53$ ($1,13 - 2,07$) ($n=6$) e $1,22$ ($0,85 - 1,74$) ($n=6$) na artéria da orelha e na artéria jejunal, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3. Artérias de Coelho: acumulação e libertação de noradrenalina- ^3H (fracção de libertação da artéria jejunal e da artéria da orelha. A acumulação está representada pelas médias aritméticas $\pm$ erro padrão e os valores da fracção de libertação pelas médias geométricas e limites de confiança a nível dos 95%. Qualquer um dos valores foi calculado a partir dos resultados de 6 experiências, emparelhadas.

	Acumulação de noradrenalina- ^3H ($\mu\text{g.mg}^{-1}$)	Fracção de libertação ($\times 10^{-5}$)
Artéria jejunal	$5,76 \pm 0,35$	$1,22$ ($0,85 - 1,74$)
Artéria da orelha	$4,82 \pm 0,82$	$1,53$ ($1,13 - 2,07$)

A acumulação de noradrenalina- ^3H na artéria jejunal é significativamente superior à acumulação na artéria da orelha ($P < 0,05$).

2.2 Comentários

Nas porções do canal deferente de Rato e nas duas artérias de Coelho observou-se uma acumulação de noradrenalina- ^3H o que demonstra a existência em qualquer destes tecidos, de sistemas de transporte e armazenamento para a noradrenalina (ver Moura 1988).

Considerando as duas artérias, verifica-se que a acumulação de noradrenalina- ^3H foi superior na artéria jejunal, o que mostra um paralelismo entre a acumulação de noradrenalina exógena e o conteúdo em noradrenalina endógena. Relativamente às duas porções do canal deferente, a acumulação de noradrenalina- ^3H já não se fez de acordo com os respectivos conteúdos em noradrenalina. Embora a porção prostática possua um conteúdo em noradrenalina endógena superior ao da porção epididimal, a acumulação de noradrenalina- ^3H foi menor do que a acumulação na porção epididimal. Este facto pode ser explicado por dificuldades na marcação dos depósitos teciduais de noradrenalina.

A espessura da parede do canal deferente é consideravelmente maior do que a espessura da parede de qualquer das artérias estudadas e, considerando as duas porções do canal deferente, a espessura da parede da porção prostática é superior à da porção epididimal. Esta diferença na espessura pode condicionar uma maior dificuldade na difusão da noradrenalina- ^3H e, desta forma, condicionar a marcação dos depósitos teciduais de noradrenalina.

Moura e colaboradores (1990) observaram, por estudo auto-radiográfico que, no canal deferente de Cobaia, a incubação com noradrenalina- ^3H dava origem a uma marcação mais intensa na periferia e progressivamente menor, à medida que se penetrava na espessura da parede, permanecendo as áreas mais profundas sem qualquer marcação (ver também Schöming *et al.* 1990).

A não homogeneidade na marcação permite explicar, porque é que, apesar do canal deferente ter um maior conteúdo em noradrenalina do que qualquer das artérias, a quantidade que qualquer das porções acumula é consideravelmente menor. Sendo a parede da porção prostática mais espessa que a da epididimal, é admissível que, nessa porção, a marcação seja menos homogênea, havendo uma parte maior do tecido que não é atingida pelo trítio.

Além da espessura da parede, a densidade da inervação pode também condicionar a marcação. Uma maior densidade de inervação pode tornar mais provável a captação neuronal e, assim, dificultar a progressão da noradrenalina- ^3H e a marcação dos depósitos mais profundos. Como a porção prostática parece

apresentar uma maior densidade de inervação, a avaliar pelo seu maior conteúdo em noradrenalina, mais força adquire a hipótese que defende que a falta de concordância entre a acumulação e conteúdo possa dever-se a dificuldades na marcação dos depósitos de noradrenalina.

3. Influência da inibição da captação neuronal nas respostas pós-juncionais mediadas pelos receptores noradrenérgicos- α

3.1 Resultados

3.1.1 Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato

Em concentrações compreendidas entre 1 nmol.l⁻¹ e 400 μ mol.l⁻¹, os agonistas- α provocaram uma resposta contráctil, quer da porção prostática, quer da epididimal, com uma amplitude que era dependente da concentração de agonista utilizada.

Na porção epididimal, as concentrações mínimas capazes de provocar respostas contrácteis foram as seguintes: 20 nmol.l⁻¹ de noradrenalina, 4 nmol.l⁻¹ de adrenalina e 40 nmol.l⁻¹ de α -metilnoradrenalina. Na porção prostática foram necessárias concentrações mais elevadas para produzirem efeitos equivalentes: 200 nmol.l⁻¹ de noradrenalina, 20 nmol.l⁻¹ de adrenalina e 250 nmol.l⁻¹ de α -metilnoradrenalina.

Quer na porção prostática, quer na porção epididimal, as respostas máximas à adrenalina e à α -metilnoradrenalina tiveram uma amplitude semelhantes à da resposta máxima obtida com noradrenalina. Em ambas as porções, a inibição da captação neuronal, com desipramina (40nmol.l⁻¹), potenciou a resposta à noradrenalina e à adrenalina, sem modificar a amplitude das respostas máximas. Relativamente à α -metilnoradrenalina, só na porção epididimal, houve potenciação dos seus efeitos pela desipramina. Também aqui, sem modificação da resposta máxima.

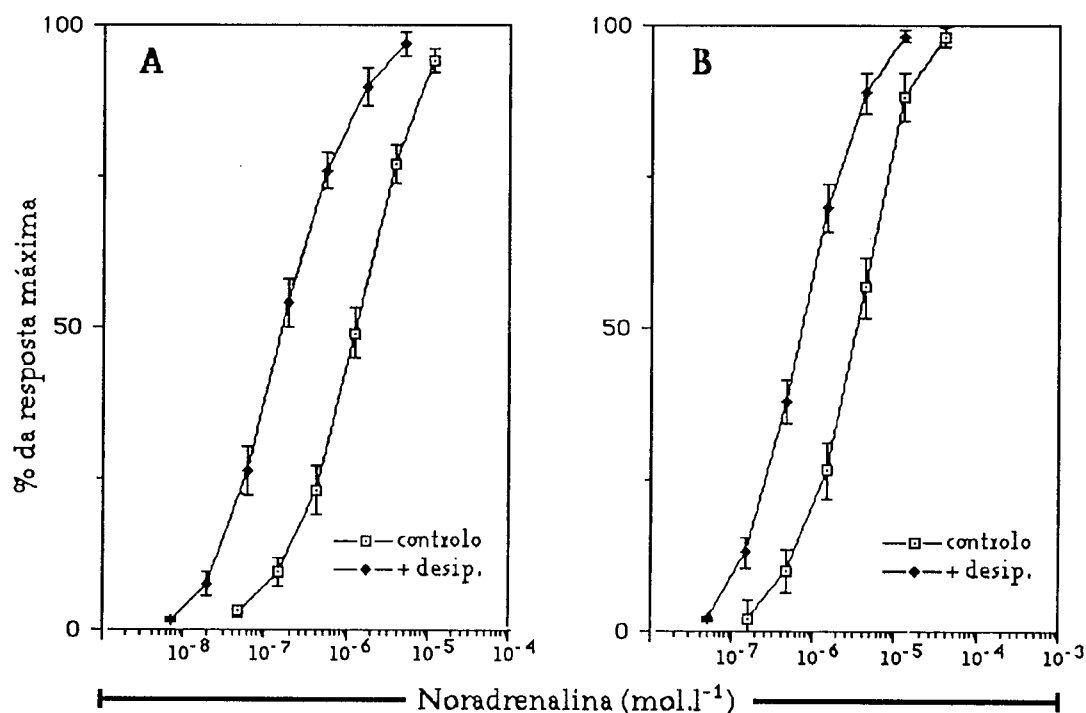


Figura 1. Curvas de concentração-resposta para a noradrenalina na porção epididimal (A) e na porção prostática (B) do canal deferente de Rato. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) ou na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l⁻¹). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros padrão.

Este aumento de sensibilidade, verificado em ambas as porções do canal deferente, para a noradrenalina e adrenalina e, só na porção epididimal, para a α -metilnoradrenalina, expressou-se pelo deslocamento paralelo e para a esquerda, das curvas de concentração-resposta (figuras 1, 2 e 3) e quantificou-se pela razão entre as concentrações de agonista necessárias para induzir uma resposta equivalente a 20% da resposta máxima (concentração eficaz 20; CE₂₀) antes e após desipramina.

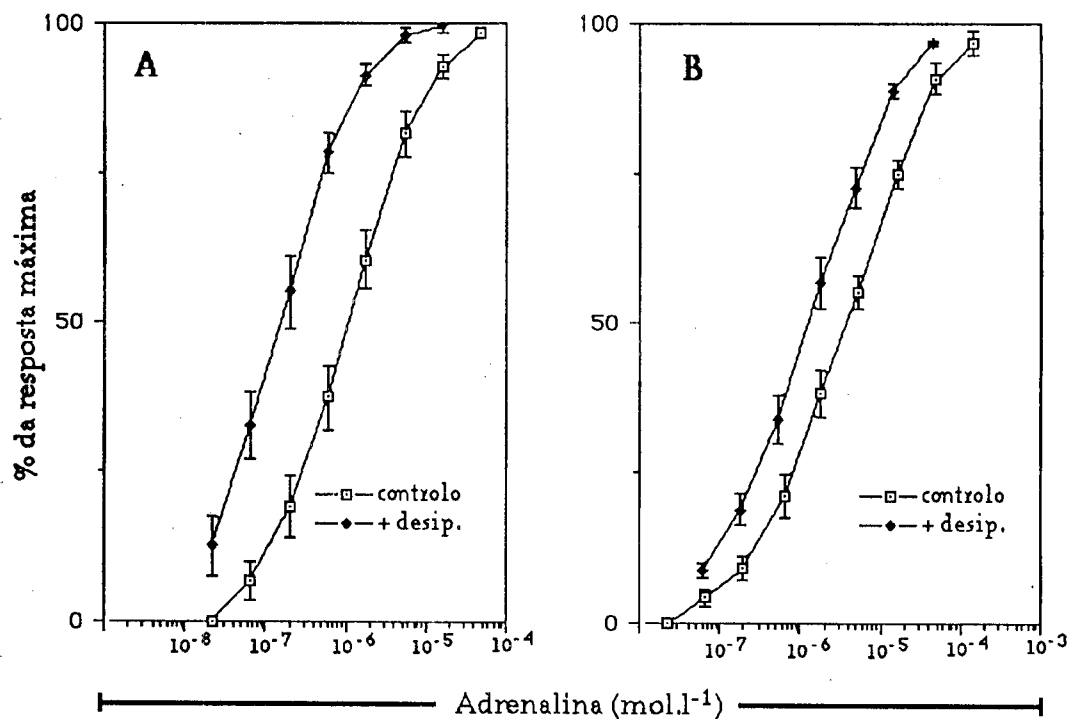


Figura 2. Curvas de concentração-resposta para a adrenalina na porção epididimal (A) e na porção prostática (B) do canal deferente de Rato. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) e na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l⁻¹). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

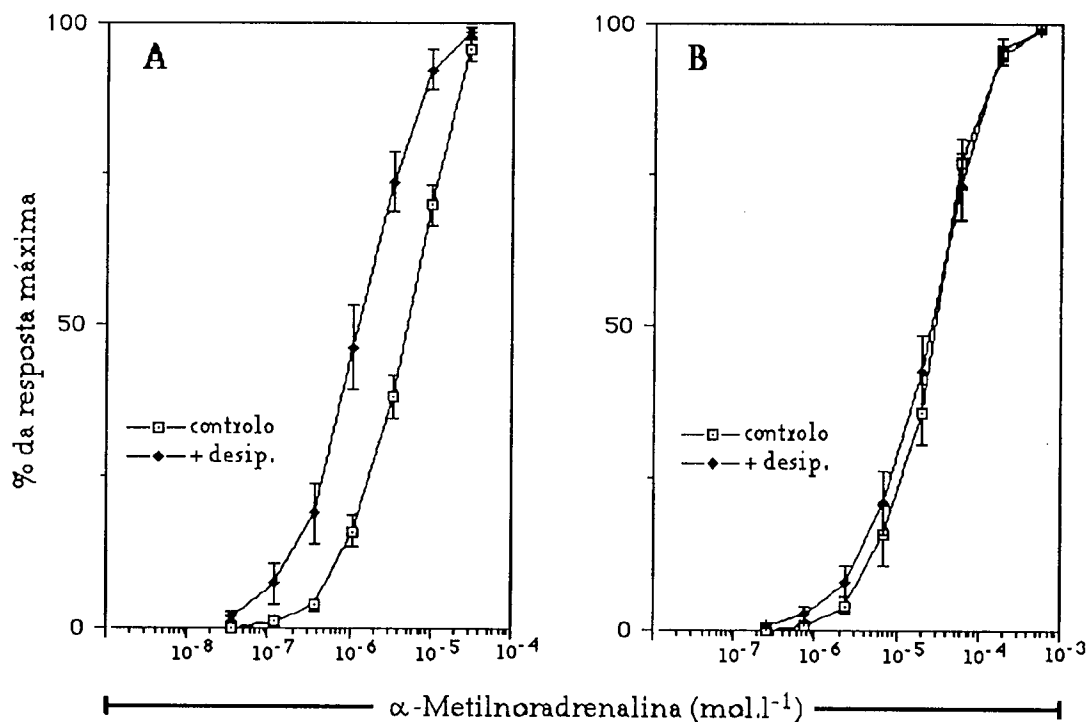


Figura 3. Curvas de concentração-resposta para a α -metilnoradrenalina na porção epididimal (A) e na porção prostática (B) do canal deferente de Rato. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) ou na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l⁻¹). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

Na tabela 4 estão expressos os valores de CE₂₀ para os três agonistas usados no canal deferente de Rato. As razões entre as CE₂₀ obtidas antes e após inibição da captação neuronal estão representadas na tabela 5.

Tabela 4. Canal deferente de Rato: Influência da captação neuronal sobre as respostas mediadas pelos adrenocetores- α pós-juncionais da porção prostática e epididimal desencadeada pela noradrenalina, adrenalina e α -metilnoradrenalina. Os valores apresentados representam as concentrações de cada agonista ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) capazes de provocar 20% da resposta máxima (CE_{20}) na ausência ou na presença de desipramina (40nmol.l^{-1}). Estão representadas as médias geométricas e limites de confiança a nível de 95%; n= 6; ensaios emparelhados.

	CE_{20} controle	CE_{20} com desipramina
<u>Porção epididimal</u>		
Noradrenalina	0,35 (0,20 - 0,60)	0,038 * (0,021 - 0,067)
Adrenalina	0,21 (0,06 - 0,75)	0,030 * (0,026 - 0,036)
α -Metilnoradrenalina	1,39 (0,87 - 2,23)	0,33 * (0,18 - 0,62)
<u>Porção prostática</u>		
Noradrenalina	0,92 (0,48 - 1,75)	0,33 * (0,26 - 0,43)
Adrenalina	0,65 (0,36 - 1,19)	0,26 * (0,17 - 0,38)
α -Metilnoradrenalina	10,26 (4,16 - 23,51)	6,37 (2,94 - 13,77)

* Valor estatisticamente inferior ao do respectivo controle ($P < 0,05$).

Em ambas as preparações, a adrenalina foi a amina mais potente, seguida da noradrenalina e da α -metilnoradrenalina. A potência da adrenalina era cerca

de três vezes maior na porção epididimal do que na prostática, antes do bloqueio da captação neuronal. Após o bloqueio dessa captação, a adrenalina passou a ser cerca de dez vezes mais potente a nível epididimal. O mesmo se verificou com a noradrenalina que era, também, cerca de três vezes mais potente na porção epididimal antes e passou a ser cerca de dez vezes mais potente após a adição de desipramina. Com a α -metilnoradrenalina verificou-se, também, um fenómeno semelhante. Antes era cerca de sete vezes mais potente na porção epididimal e, após desipramina, passou a ser cerca de vinte vezes (tabela 5).

Tabela 5. Canal deferente de Rato: comparação da potenciação dos efeitos de algumas aminas simpaticomiméticas, causada pela desipramina na porção epididimal e na porção prostática. Os valores representam as médias geométricas e limites de confiança a nível de 95% (n= 6; ensaios emparelhados) dos factores da potenciação causada pela inibição da captação neuronal (pela desipramina).

	Porção epididimal	Porção prostática
Noradrenalina	9,28 (5,10 - 16,91)	2,80 * (1,49 - 5,25)
Adrenalina	6,47 (2,18 - 13,70)	2,23 * (1,39 - 3,58)
α -Metilnoradrenalina	4,13 (3,68 - 4,65)	1,50 * (0,68 - 3,57)

* Valores estatisticamente inferiores aos obtidos na porção epididimal ($P < 0,05$)

3.1.2 Artérias jejunal e da orelha de Coelho

A noradrenalina e a adrenalina, em concentrações compreendidas entre 0,5 nmol.l⁻¹ e 20 μ mol.l⁻¹, provocaram em ambas as artérias, uma resposta contráctil cuja amplitude era dependente da concentração de agonista usada. A resposta contráctil à noradrenalina começou a evidenciar-se com concentrações próximas

de 10 nmol.l^{-1} , enquanto que, a resposta à adrenalina começou a evidenciar-se com concentrações próximas de 3 nmol.l^{-1} .

A resposta máxima à adrenalina não foi significativamente diferente da obtida com a noradrenalina. Esta foi atingida com concentrações da ordem dos $20 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$. A desipramina (40 nmol.l^{-1}) não modificou significativamente a amplitude da resposta máxima em qualquer das preparações.

A influência da inibição da captação neuronal (com 40 nmol.l^{-1} de desipramina) sobre a sensibilidade da artéria da orelha e da artéria jejunal de Coelho está representada nas figuras 4 e 5, para a noradrenalina e para a adrenalina, respectivamente.

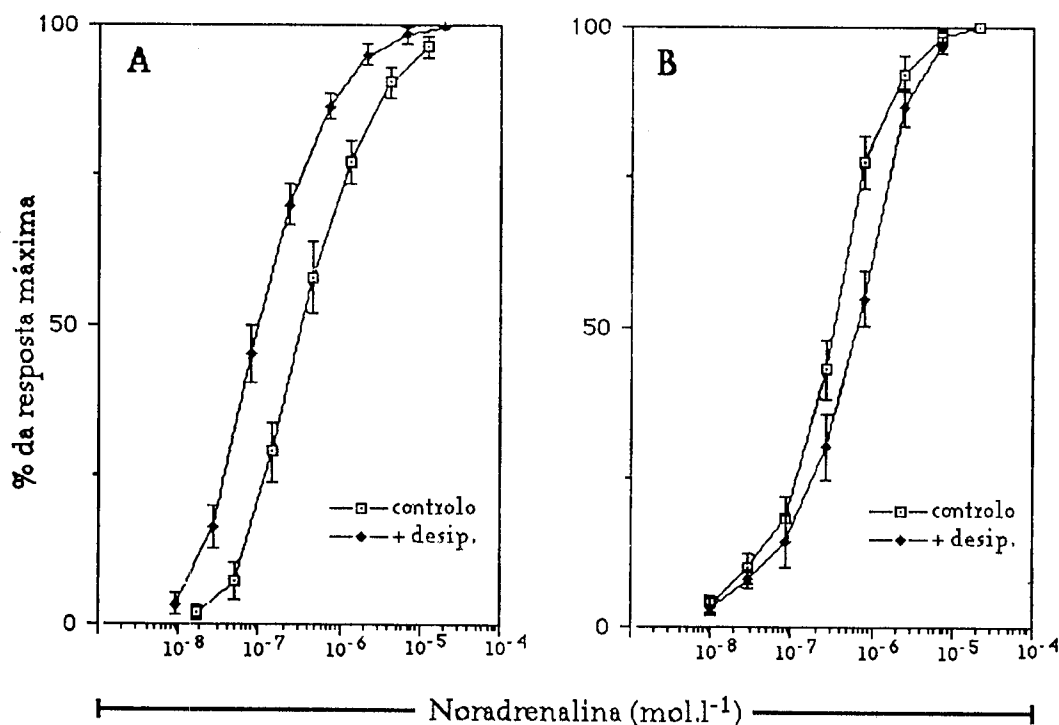


Figura 4. Curvas de concentração-resposta para a noradrenalina na artéria da orelha (A) e na artéria jejunal (B) de Coelho. As respostas foram obtidas na ausência ($\square$) ou na presença ($\blacklozenge$) de desipramina (40 nmol.l^{-1}). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

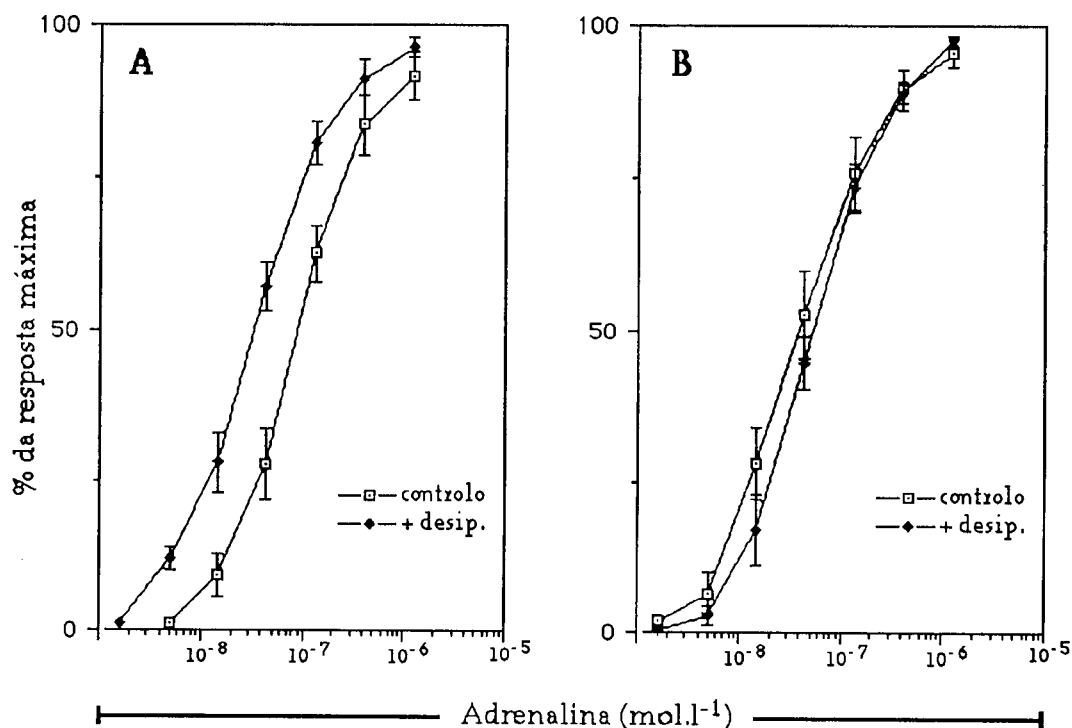


Figura 5. Curvas de concentração-resposta para a adrenalina na artéria da orelha (A) e na artéria jejunal (B) de Coelho. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) ou na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l⁻¹). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

Na tabela 6 estão expressos os valores da CE₂₀ obtidos, para a noradrenalina e para a adrenalina, nas artérias da orelha e jejunal de Coelho. As preparações mostraram uma sensibilidade semelhante aos agonistas usados, sendo ambas mais sensíveis à adrenalina do que à noradrenalina. Para o mesmo agonista, o valor da CE₂₀ obtido na artéria da orelha não foi significativamente diferente do obtido na artéria jejunal.

Tabela 6. Artérias de Coelho: efeito da inibição da captação neuronal na potencia da noradrenalina e da adrenalina como agonistas dos receptores- α pós-juncionais das artérias da orelha e jejunal de Coelho. Os valores apresentados dizem respeito às concentrações de agonista ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) capazes de provocar 20% da resposta máxima (CE_{20}) na ausência ou na presença de desipramina (40nmol.l^{-1}). Os valores correspondem às médias geométricas e limites de confiança a nível de 95%; n= 6; ensaios emparelhados.

	CE_{20} controle	CE_{20} após desipramina
<u>Artéria da orelha</u>		
Noradrenalina	0,08 (0,048 - 0,118)	0,027 * (0,021 - 0,036)
Adrenalina	0,032 (0,021 - 0,049)	0,014 * (0,009 - 0,023)
<u>Artéria jejunal</u>		
Noradrenalina	0,08 (0,061 - 0,105)	0,23 * (0,12 - 0,39)
Adrenalina	0,014 (0,005 - 0,034)	0,023 * (0,010 - 0,049)

* Valor estatisticamente inferior ao do respectivo controle ($P < 0,05$)

A inibição da captação neuronal potenciou a acção dos agonistas noradrenérgicos, apenas na artéria da orelha (aumentou cerca de 3 vezes a potência à noradrenalina e cerca de 2,3 à adrenalina). Na artéria jejunal, a desipramina em concentrações até 400 nmol.l^{-1} , não aumentou, significativamente, o efeito mediado pelos receptores- α pós-juncionais e causado pelos mesmos agonistas.

Na tabela 7 estão expressas as razões entre as CE₂₀ obtidas sem e com inibição da captação neuronal.

Tabela 7. Artérias de Coelho: comparação da potenciação dos efeitos de algumas aminas simpaticomiméticas, causada pela desipramina na artéria da orelha e na artéria jejunal. Os valores representam as médias geométricas e limites de confiança a nível de 95% (n= 6; ensaios emparelhados) dos factores da potenciação causada pela inibição da captação neuronal (pela desipramina).

	Artéria da orelha	Artéria jejunal
Noradrenalina	3,01 (2,35 - 3,86)	0,71 * (0,32 - 1,56)
Adrenalina	2,25 (1,52 - 3,32)	0,84 * (0,52 - 1,35)

* Valores estatisticamente diferentes dos obtidos na artéria da orelha (P<0,05).

3.2 Comentários

A potenciação dos efeitos dos agonistas simpaticomiméticos mediados pelos receptores- α , foi sempre maior nos tecidos em que o componente noradrenérgico da resposta à estimulação eléctrica é predominante, isto é, foi mais intensa na porção epididimal do que na prostática no canal deferente de Rato e mais intensa na artéria da orelha do que na artéria jejunal de Coelho.

No que diz respeito às duas porções do canal deferente, estes resultados confirmam os descritos por Markus e Avellar (1990) que obtiveram, também, por inibição da captação neuronal, um aumento de sensibilidade maior na porção epididimal do que na porção prostática do canal deferente de Rato.

Em efeitos mediados pelos receptores- α pós-juncionais, a porção prostática é menos sensível do que a porção epididimal aos agonistas simpaticomiméticos. Este facto, descrito na literatura (ver por exemplo MacDonald e McGrath 1980, Sallés e Badia 1991) poderia ser invocado para explicar a menor potenciação verificada na porção prostática.

Paiva e Guimarães (1984) propuseram que, da razão entre o Km do local de perda e o CE₅₀ do agonista depende o grau de potenciação causado pelo bloqueio de um local de perda (ver também Guimarães e Trendelenburg 1985). Assim,

quanto maior for a CE₅₀ menor potenciação será de esperar, em consequência da inibição de um local de perda.

Como as CE da porção prostática são superiores às da porção epididimal, essas concentrações estariam mais próximas da saturação do sistema. Da inibição deste resultaria, por isso, uma menor potenciação.

No entanto, por definição, o aumento de sensibilidade induzido por inibição de um local de perda não depende da concentração do agonista no líquido de incubação, mas sim, da concentração de agonista junto dos receptores (biofase) e junto do local de perda. A difusão dos agonistas através de uma estrutura tão compacta como é o canal deferente e, em particular, através da porção prostática, é difícil (Kenakin 1980). É, por isso, compreensível que, para assegurar a mesma concentração de agonista na biofase, seja necessária, na porção prostática, uma maior concentração de agonista no líquido de incubação, do que num tecido em que a difusão seja mais fácil. Em favor desta explicação está o facto de que se ordenarmos os agonistas, de acordo com o grau de potenciação que experimentam em consequência do bloqueio do local de perda, verifica-se que ficam ordenados da mesma forma, na porção prostática e na epididimal.

A actividade de um mecanismo de inactivação condiciona a concentração de um agonista num determinado local, tanto mais quanto mais próximo esse local esteja do sistema de inactivação. Deste raciocínio resulta que a inibição de um mecanismo de inactivação vai influenciar mais a concentração dos agonistas nas áreas mais próximas do que nas mais remotas, e assim condicionar uma potenciação de efeitos tanto maior, quanto mais próximos os receptores estiverem do local de perda (Guimarães 1982). Esta abordagem metodológica já permitiu caracterizar diferentes biofases em relação a diversos locais de perda (Guimarães e Paiva 1981a,b; Proença *et al.* 1988; ver também Guimarães 1982).

Uma vez que as diferenças na densidade de inervação não justificam a menor potenciação na porção prostática e na artéria jejunal em relação à potenciação na porção epididimal e na artéria da orelha, respectivamente, é muito provável que essa diferença se deva a uma distância diferente entre os receptores e as varicosidades naqueles dois tipos de tecidos. Se os receptores- α pós-juncionais estiverem mais afastados das varicosidades na porção prostática, do que na porção epididimal do canal deferente de Rato e na artéria jejunal, do que na artéria da orelha de Coelho, justificar-se-à, porque a potenciação da acção dos agonistas, causada pela inibição da captação neuronal, é maior na porção epididimal do que na porção prostática e maior na artéria da orelha do que na artéria jejunal.

4. Influência da captação neuronal sobre as respostas mediadas pelos receptores- α_2 pré-juncionais da porção prostática e epididimal do canal deferente de Rato

4.1 Resultados

Na presença de prazosina, quer a porção prostática, quer a porção epididimal, do canal deferente de Rato, respondem à estimulação eléctrica (100 V, 2 ms, estímulo único), com uma contracção rápida e monofásica. Nas condições do ensaio, a amplitude das contracções não variou, significativamente, ao longo do tempo.

A resposta contráctil, induzida pela estimulação eléctrica, era devida à estimulação nervosa, uma vez que era inibida pela activação dos receptores- α_2 pré-juncionais. O UK-14304, um agonista- α_2 , selectivo, reduziu, de modo dependente da concentração a amplitude dessa resposta. O efeito máximo do UK-14304 (equivalente à anulação da resposta contráctil) foi conseguido com concentrações próximas de $0,5\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Tabela 8. Respostas máximas à adrenalina e à α -metilnoradrenalina obtidas na porção epididimal e na porção prostática do canal deferente de Rato. Os resultados estão expressos em percentagem do efeito máximo obtido com UK-14,304 (um agonista- α_2 , selectivo). Os valores correspondem às médias aritméticas $\pm$ erros- padrão (n=12).

	% do efeito máximo	
	Sem inibição da captação neuronal	Com inibição da captação neuronal
Adrenalina	$34 \pm 5,3$	$71 \pm 4,8^*$
α -Metilnoradrenalina	$42 \pm 6,1$	$76 \pm 5,3^*$
Adrenalina	$43 \pm 4,2$	$92 \pm 4,1^*$
α -Metilnoradrenalina	$60 \pm 3,8$	$94 \pm 4,0^*$

* Respostas significativamente superiores às obtidas com a captação neuronal operante ($P < 0,05$).

Entre a porção prostática e a porção epididimal, não se registaram diferenças significativas na potência dos agonistas. Em ambas as porções, a adrenalina foi mais potente do que a α -metilnoradrenalina.

O bloqueio da captação neuronal, pela desipramina, causou um intenso desvio, para a esquerda, das curvas de concentração-resposta da adrenalina e da α -metilnoradrenalina. Este deslocamento foi acompanhado por um aumento muito significativo, da resposta máxima de ambas as aminas.

Nas figuras 5, 6, 7 e 8 estão representados os desvios verificados nas curvas de concentração-resposta e os aumentos observados nas respostas máximas.

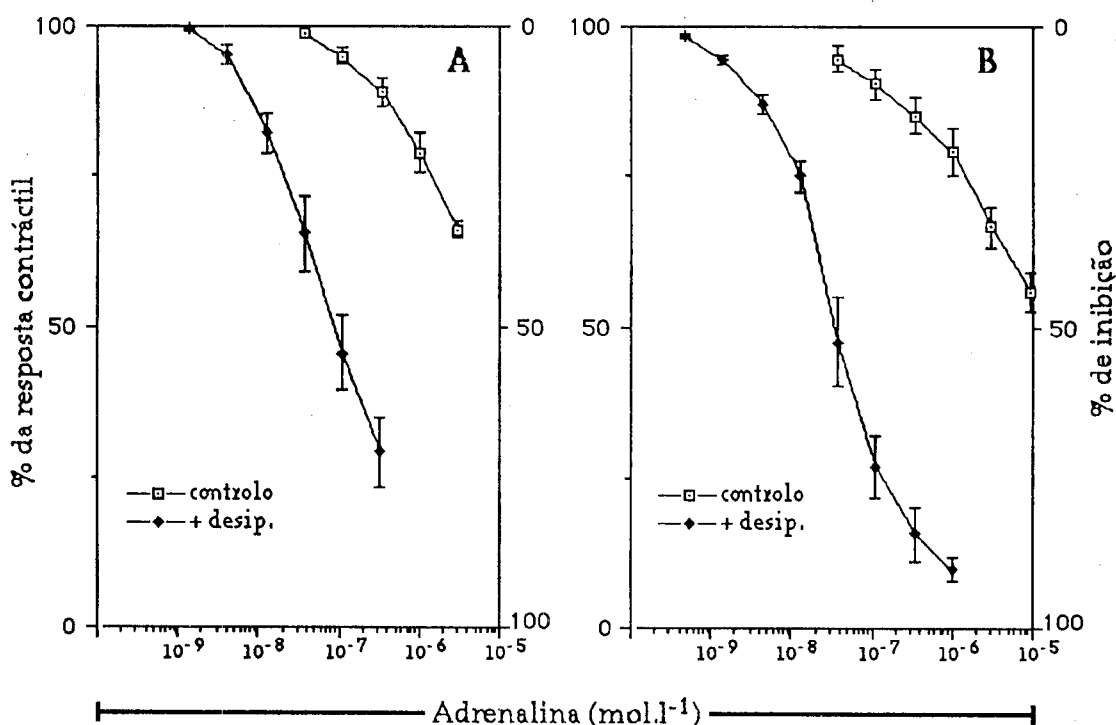


Figura 6. Curvas de concentração resposta para o efeito inibitório da adrenalina sobre a resposta contráctil à estimulação eléctrica da porção epididimal (A) e da porção prostática (B) do canal deferente de Rato. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) ou na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l⁻¹). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

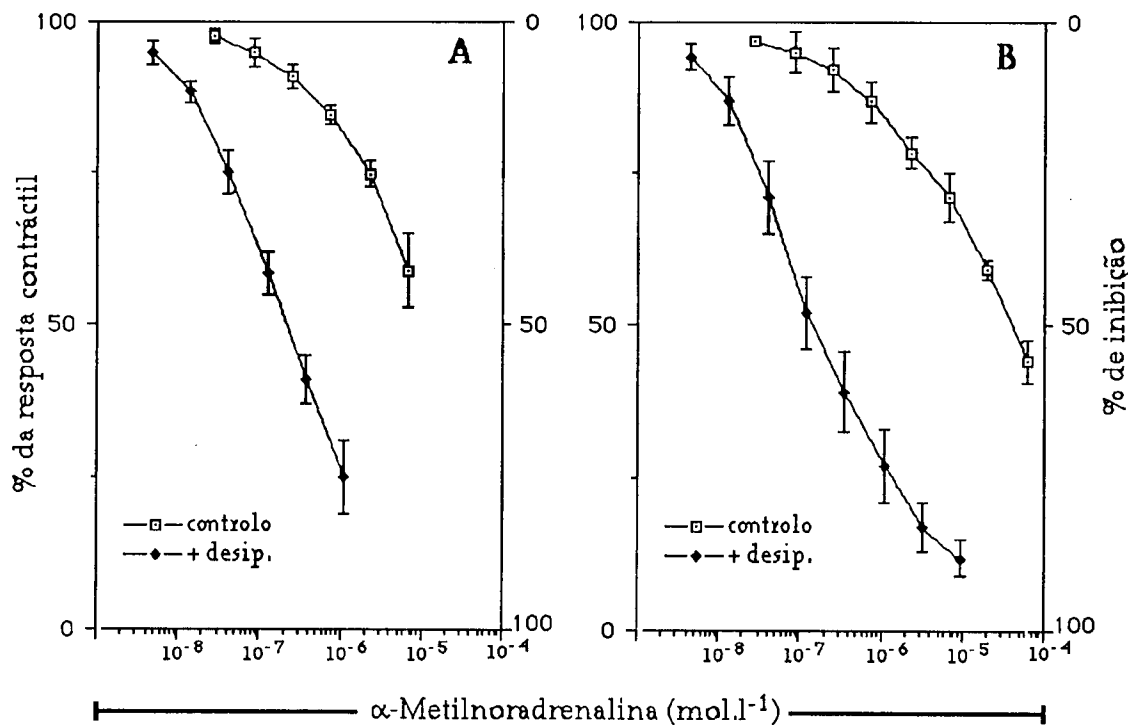


Figura 7. Curvas de concentração resposta para o efeito inibitório da α -metilnoradrenalina sobre a resposta contráctil à estimulação eléctrica da porção epididimal (A) e da porção prostática (B) do canal deferente de Rato. As respostas foram obtidas na ausência (—□—) ou na presença (—♦—) de desipramina (40 nmol.l^{-1}). Estão representados os valores médios de 6 experiências. As barras verticais representam os respectivos erros-padrão.

Na tabela 9 estão expressas as concentrações dos agonista capazes de reduzirem 20%, a amplitude da resposta contráctil (equivalente a 20% da inibição máxima obtida com UK-14304; Cl_{20}) antes e após o bloqueio da captação neuronal.

Tabela 9. Canal deferente de Rato: influência exercida pela inibição da captação neuronal sobre a pré-juncional (inibição da contracção causada pela estimulação eléctrica) à adrenalina à α -metilnoradrenalina na porção epididimal e prostática. Os valores apresentados dizem respeito às concentrações de agonista ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) capazes de provocar 20% de inibição da resposta contráctil (CI_{20}) na ausência ou na presença de desipramina (40nmol.l^{-1}). Os valores correspondem às médias geométricas e limites de confiança a nível de 95% ($n=6$).

	CI_{20} controlo	CI_{20} após desipramina
<u>Porção epididimal</u>		
Adrenalina	1,04 (0,43 - 2,51)	0,014* (0,007 - 0,023)
α -Metilnoradrenalina	1,07 (0,76 - 1,52)	0,014* (0,012 - 0,070)
<u>Porção prostática</u>		
Adrenalina	0,45 (0,13 - 1,62)	0,007* (0,005 - 0,011)
α -Metilnoradrenalina	1,56 (1,02 - 2,39)	0,024* (0,006 - 0,097)

* Valor de CI_{20} estatisticamente diferente do respectivo controlo ($P<0.05$).

A inibição da captação neuronal produziu uma enorme potenciação das respostas à adrenalina e à α -metilnoradrenalina. Ao contrário do que se tinha verificado para as respostas pós-juncionais, a potenciação obtida na porção epididimal não foi, para qualquer das aminas, diferente da obtida na porção prostática (tabela 10).

Tabela 10. Canal deferente de Rato: comparação da potenciação causada pelo bloqueio da captação neuronal sobre a acção pré-juncional da adrenalina e da α -metilnoradrenalina na porção epididimal e prostática. Os valores correspondem às médias geométricas e limites de confiança a nível de 95%; n= 6.

	Porção epididimal	Porção prostática
Adrenalina	72,5 (20,9 - 252,1)	93,5 NS (41,3 - 211,8)
α -Metilnoradrenalina	34,7 (11,5 - 104,8)	41,4 NS (17,5 - 98,7)

NS-Não significativa a diferença entre os valores obtidos, nas duas porções, para a mesma amina.

4.2 Comentários

Pretendeu-se com o estudo das consequências da inibição da captação neuronal sobre acções de agonistas noradrenérgicos, esclarecer dois aspectos: por um lado, conhecer qual o aumento de potencia que a inibição deste local de perda induz, em respostas mediadas por receptores localizados muito perto deste local de perda e, por outro lado, investigar se, na concentração usada, a desipramina induz o mesmo aumento de potência nos dois tecidos usados.

A utilização das modificações de uma resposta contráctil como índice de uma acção pré-juncional, não é insusceptível de crítica, uma vez que as respostas pós-juncionais nem sempre reflectem, de forma absolutamente linear, as quantidades de mediador libertado. Por outro lado, não é possível realizar este tipo de estudo em todos os tecidos. Nesta situação estão os dois tecidos vasculares utilizados no presente trabalho. Nestes tecidos não é possível obter respostas mecânicas a estímulos eléctricos com as características dos utilizados nas duas porções do canal deferente de Rato. Apesar destas limitações, este foi o método escolhido por permitir minorar a interferência do mediador endógeno sobre as acções de outros agonistas.

Se recorressemos ao doseamento do efluxo de noradrenalina para estudar o

efeito dos agonistas, seria ainda mais discutível a interpretação dos resultados. Para se conseguir um efluxo de noradrenalina mensurável seria necessário aplicar estímulos eléctricos repetidos e próximos. Nestas condições, o mediador endógeno, presente na fenda sináptica em consequência dos estímulos anteriores, compete para os mesmos receptores com o agonista exógeno, perturbando a acção deste.

No caso de estudo de efeitos mediados pelos receptores- α_2 pré-juncionais, a inibição exercida pelo mediador endógeno aumentaria com o bloqueio da captação neuronal, alterando as condições de ensaio e perturbando, ainda mais, o efeito dos agonistas (Starke 1972; Starke e Montel 1973a, b; Raiteri *et al.* 1984; Zier *et al.* 1988; Gonçalves *et al.* 1989). Além disto, a quantidade de noradrenalina endógena que permanece na fenda em condições de exercer uma auto-inibição, pode variar de tecido para tecido. Esta possibilidade torna arriscada a comparação dos efeitos de agonistas em diferentes tecidos com base na avaliação da libertação através da aplicação de estímulos múltiplos.

No nosso estudo, obtiveram-se com a adrenalina e a α -metilnoradrenalina, efeitos qualitativamente semelhantes aos obtidos com o UK-14304. No entanto, com a captação neuronal operante, nem na porção prostática, nem na porção epididimal foi possível atingir 100% de efeito (anulação da resposta contráctil à estimulação eléctrica). Por serem pouco selectivos para os receptores- α_2 , estes agonistas induziam respostas contrácteis, resultantes da sua acção directa sobre os receptores- α pós-juncionais, antes de se conseguir o efeito pré-juncional máximo. Apesar desta limitação, teve que se manter a adrenalina e a α -metilnoradrenalina como agonistas- α_2 pré-juncionais, porque ao contrário do UK-14304, estes agonistas são substratos da captação neuronal.

A inibição da captação neuronal, com 40 nmol.l⁻¹ de desipramina produziu, nas presentes experiências, um significativo aumento da potência dos agonistas, quer na porção prostática, quer na porção epididimal do canal deferente de Rato. Este facto demonstra que as diferenças no aumento de potência aos agonistas, detectadas nos efeitos mediados pelos receptores- α pós-juncionais não pode ser atribuído à existência, nestas duas porções, de sistemas com sensibilidade diferente à desipramina.

A potenciação da acção dos agonistas causada pela inibição da captação neuronal, embora não estatisticamente diferente, apresenta uma tendência para ser maior na porção prostática. Tal resultado é o inverso do obtido relativamente

às respostas mediadas pelos receptores pós-juncionais. No entanto, está de acordo com a provável maior densidade de inervação da porção prostática, em relação à porção epididimal e com a sugestão de que, quanto maior é a densidade de inervação noradrenérgica, maior é o aumento de sensibilidade que a inibição da captação neuronal induz (Hermann e Graefe 1977).

Os resultados obtidos revelam ainda que a inibição da captação neuronal se repercute mais intensamente, na concentração do agonista ao nível da biofase dos receptores pré-juncionais, do que ao nível da dos receptores pós-juncionais, uma vez que a potenciação das respostas, em consequência dessa inibição, é muitíssimo maior a nível pré do que a nível pós-juncional (tabela 11).

A extraordinária diferença no grau de potenciação está de acordo com a ideia proposta por Guimarães (1982). Segundo este autor, quanto mais próximo está um receptor de um local de perda mais pronunciado é o aumento na sensibilidade a um agonista, quando esse local de perda é inibido.

De facto, aceita-se que os receptores- α_2 pré-juncionais se localizam na varicosidade ou muito próximos desta (ver Starke 1987) e, por isso, muito próximos do sistema de captação neuronal. Uma diferença tão grande nos aumentos de sensibilidade sugere, também, que os receptores pós-juncionais estão localizados numa biofase distante do sistema de captação neuronal e, por isso, dos receptores- α_2 pré-juncionais.

Um outro aspecto importante a realçar é o facto da inibição da captação neuronal aumentar a resposta inibitória máxima à adrenalina e à α -metilnoradrenalina. Isso pode explicar-se de acordo com a mesma teoria: se os receptores pré-juncionais são mais influenciados do que os pós-juncionais, pelo aumento da concentração de agonista, causado pelo bloqueio da captação neuronal, é lógico que o efeito pré-juncional aumente mais do que o pós-juncional. Desse modo, o efeito pós-juncional que contraria a expressão do efeito pré-juncional, só mais tardiamente aparece a contraria-lo, permitindo que o efeito pré-juncional se realce mais amplamente. Sendo assim, haveria mais um indicador de que os receptores- α_2 estão localizados numa biofase mais próxima do sistema de captação e mais afastada da biofase onde se localizam os receptores- α pós-juncionais.

Tabela 11. Canal deferente de Rato: comparação das potenciações causadas pelo bloqueio da captação neuronal (desipramina 40 nmol.l⁻¹) sobre os efeitos pré- e pós-juncionais da adrenalina e da α -metilnoradrenalina. Os valores correspondem às médias geométricas e limites confiança a nível de 95%; n=6.

	Razão entre as CI ₂₀ antes e após desipramina	Razão entre as CE ₂₀ antes e após desipramina
<u>Porção epididimal</u>		
Adrenalina	72,5 (36,3 - 144,5)	5,47 * (2,18 - 13,7)
α -Metilnoradrenalina	34,7 (17,8 - 67,6)	4,13 * (3,68 - 4,65)
<u>Porção prostática</u>		
Adrenalina	93,5 (52,5 - 166,0)	2,23 * (1,39 - 3,58)
α -Metilnoradrenalina	41,4 (22,9 - 75,9)	1,50 * (0,68 - 3,57)

* Aumentos de sensibilidade estatisticamente menores do que os obtidos nas respostas pré-juncionais ($P < 0.001$).

5. Influência do bloqueio da captação neuronal da noradrenalina ou dos receptores- α_2 pré-juncionais, sobre o efluxo de noradrenalina-³H induzido por estimulação eléctrica.

5.1 Resultados

5.1.1 Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato.

As fracções de libertação obtidas com as cinco estimulações eléctricas (ver Métodos) apresentaram alguma irregularidade, particularmente no que diz respeito à primeira estimulação. Entre a fracção de libertação induzida pela

segunda estimulação e seguintes, não se detectaram diferenças significativas, razão pela qual, a fracção de libertação induzida pela primeira estimulação nunca foi contabilizada.

A figura 8 ilustra o efluxo de noradrenalina- ^3H ao longo de uma experiência com a porção epididimal do canal deferente de Rato e as modificações induzidas pelas diversas estimulações eléctricas. O efluxo de noradrenalina- ^3H observado na porção prostática não foi significativamente diferente do descrito para a porção epididimal.

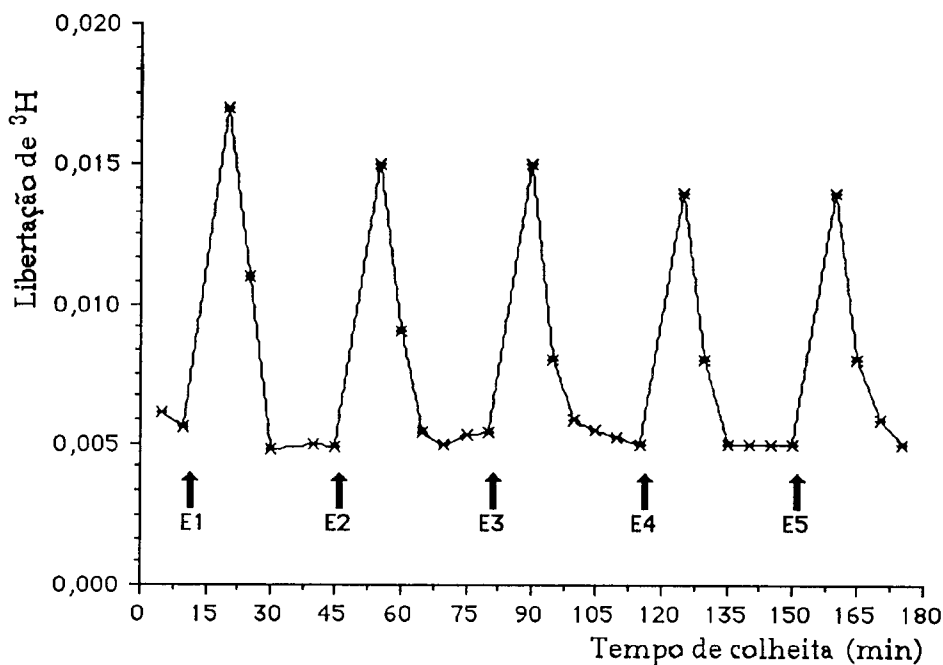


Figura 8. Canal deferente de Rato (porção epididimal): efluxo de noradrenalina- ^3H ao longo de uma experiência. E1, E2, E3, E4 e E5 indicam o início do 1º, 2º, 3º, 4º e 5º períodos de estimulação eléctrica. A libertação de noradrenalina- ^3H é expressa pela razão entre a quantidade de trítio recolhido (por miligrama de tecido) e a quantidade presente no tecido no início do respectivo período de colheita.

Na porção epididimal, a fracção de libertação das preparações tratadas com desipramina (40 nmol.l^{-1}) foi significativamente superior à obtida em preparações não tratadas ($\times 10^{-5}$): 2,01 (1,57-2,55) e 4,27(3,22-5,67), respectivamente; $n=6$; $P<0,05$. O mesmo não se observou na porção prostática. Neste tecido, a fracção de libertação de preparações tratadas com desipramina não foi diferente da obtida em preparações não tratadas ($\times 10^{-5}$): 1,88 (1,76-2,01) e 2,15 (1,51-3,08), respectivamente; $n=6$; $P<0,05$ (tabela 12).

Tabela 12. Canal deferente de Rato: fracção de libertação de noradrenalina- ^3H induzida pela estimulação eléctrica da porção epididimal e da prostática em preparações controlo e em preparações com a captação neuronal inibida, com 40 nmol.l^{-1} de desipramina. Os valores representam as médias geométricas (e limites de confiança a nível de 95%) das fracções de libertação ($\times 10^{-5}$); $n=6$.

	Fracção de libertação de noradrenalina- ^3H	
	Controlo	Com desipramina
Porção epididimal	2,01 (1,57 - 2,55)	4,27 * (3,22 - 5,67)
Porção prostática	1,88 (1,76 - 2,01)	2,15 (1,51 - 3,08)

* Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($P<0,05$).

A ioimbina causou, em ambas as porções do canal deferente, um aumento da fracção de libertação que foi dependente da concentração. Com as concentrações utilizadas (50 nmol.l^{-1} a $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) foi possível anular a auto-inibição e atingir a fracção de libertação máxima.

Na porção epididimal, a anulação da auto-inibição, nos tecidos em que a captação neuronal estava bloqueada, causou um aumento da fracção de libertação que não foi diferente do obtido nas preparações que tinham a captação neuronal operante: respectivamente, 2,18 (1,60-2,96) e 1,62 (1,31-2,01); $n=6$ (tabela 13).

Na porção prostática, a anulação da auto-inibição, nos tecidos em que a captação neuronal estava bloqueada, causou um aumento da fracção de libertação que foi superior ao obtido nas preparações que tinham a captação neuronal operante: 2,44 (1,91-3,11) e 1,40 (1,15-3,11), respectivamente; $n=6$; $P<0,05$ (tabela 13).

Tabela 13. Canal deferente de Rato: influência exercida pelo bloqueio dos receptores α_2 pré-juncionais, sobre a fracção de libertação a partir de tecidos em que a captação neuronal se encontrava operante e de tecidos em que a captação neuronal foi inibida com 40 nmol.l⁻¹ de desipramina. Os valores representam as médias geométricas (e limites de confiança a nível de 95%) das fracções de libertação e das razões, obtidas em cada experiência, entre as fracções de libertação obtidas com e sem inibição dos receptores- α_2 ; $n=6$.

	Fracção de libertação de noradrenalina- ^3H		Aumentos da fracção de libertação
	Controlo	Após ioimbina	
<u>Porção epididimal</u>			
Sem inibição da captação neuronal	2,01 (1,51 - 3,08)	3,26 * (2,71 - 3,91)	1,62 (1,31 - 2,01)
Com inibição da captação neuronal	4,27 (3,22 - 5,67)	9,32 * (6,65 - 13,17)	2,18 (1,60 - 2,96)
<u>Porção prostática</u>			
Sem inibição da captação neuronal	1,88 (1,76 - 2,01)	2,64 (1,91 - 3,65)	1,40 ^a (1,15 - 1,70)
Com inibição da captação neuronal	2,15 (1,51 - 3,08)	5,25 * (4,62 - 5,97)	2,44 ^b (1,91 - 3,11)

* Valor estatisticamente diferente do respectivo controlo ($P<0,05$). A diferença entre a e b é significativa.

4.2 Artérias jejunal e da orelha de Coelho.

As fracções de libertação obtidas com as cinco estimulações eléctricas (ver Métodos) apresentaram, também, alguma irregularidade, particularmente no que diz respeito à primeira estimulação. Entre a fracção de libertação induzida pela segunda estimulação e as seguintes, não se detectaram diferenças significativas, razão pela qual, a fracção de libertação induzida pela primeira estimulação nunca foi contabilizada.

A figura 9 ilustra o efluxo de noradrenalina- ^3H ao longo de uma experiência com um fragmento da artéria da orelha de Coelho. O efluxo de noradrenalina- ^3H observado na artéria jejunal não foi qualitativamente diferente do descrito para a artéria da orelha.

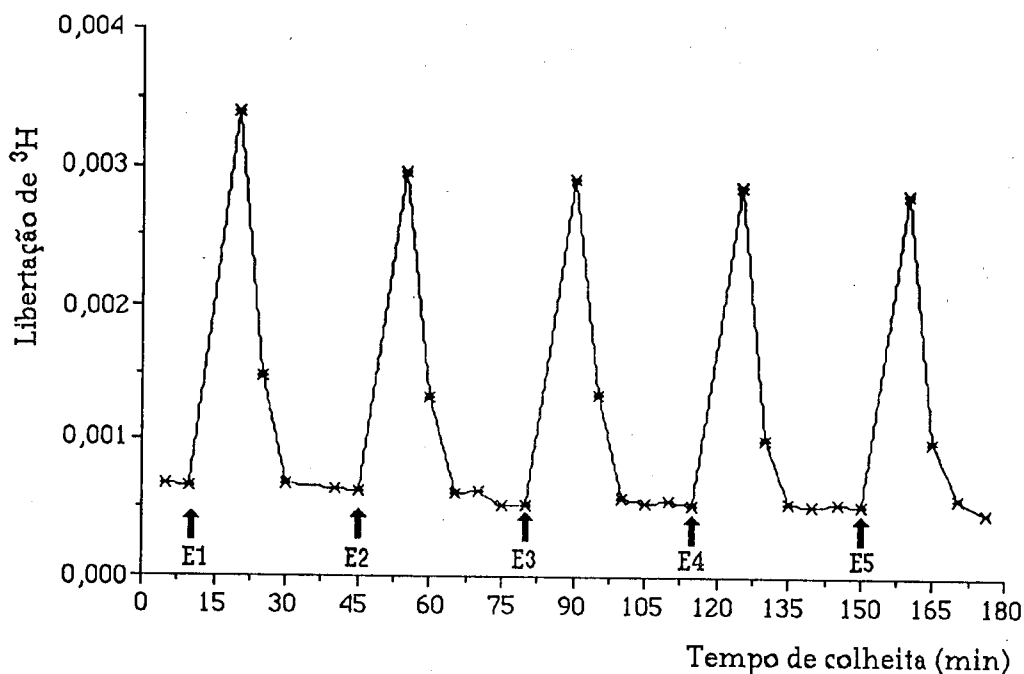


Figura 9. Artérias de Coelho (artéria da orelha): efluxo de noradrenalina- ^3H ao longo de uma experiência. E1, E2, E3, E4 e E5 indicam o início do 1º, 2º, 3º, 4º e 5º períodos de estimulação eléctrica. A libertação de noradrenalina- ^3H é expressa pela razão entre a quantidade de trítio recolhido (por miligrama de tecido) e a quantidade presente no tecido no início do respectivo período de colheita.

A fracção de libertação de noradrenalina- ^3H de artérias da orelha tratadas com desipramina (40 nmol.l^{-1}) foi superior à fracção de libertação de artérias não tratadas ($\times 10^{-5}$): 2,45 (2,13-2,82) e 1,53 (1,13-2,07), respectivamente; $n=6$; $P<0,05$. O mesmo não se observou na artéria jejunal. Nesta, a fracção de libertação, de preparações tratadas com desipramina, não foi diferente da verificada nas preparações não tratadas ($\times 10^{-5}$): 1,54 (0,95-2,49) e 1,22 (0,85-1,74), respectivamente; $n=6$ (tabela 14).

Tabela 14. Artérias de Coelho: fracção de libertação de noradrenalina- ^3H , induzida pela estimulação eléctrica da artéria da orelha e da artéria jejunal, a partir de preparações controlo e de preparações com a captação neuronal inibida com 40 nmol.l^{-1} de desipramina. Os valores representam as médias geométricas (e limites de confiança a nível de 95%) das fracções de libertação ($\times 10^{-5}$); $n=6$.

	Fracção de libertação de noradrenalina- ^3H	
	Controlo	Com desipramina
Artéria da orelha	1,53 (1,13 - 2,07)	2,45 * (2,13 - 2,82)
Artéria jejunal	1,22 (0,85 - 1,74)	1,54 (0,95 - 2,49)

* Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($P<0,05$).

A ioimbina causou um aumento da fracção de libertação que foi dependente da concentração. Com as concentrações utilizadas (50 nmol.l^{-1} a $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$), foi possível anular a auto-inibição e atingir a fracção de libertação máxima.

Na artéria da orelha, a anulação da auto-inibição, nos tecidos que tinham a captação neuronal bloqueada, causou um aumento da fracção de libertação que não foi estatisticamente diferente do obtido nas preparações que tinham a captação neuronal operante: 1,58 (1,34-1,87) e 1,64 (1,38-1,95), respectivamente; $n=6$ (tabela 15).

Na artéria jejunal, a anulação da auto-inibição, nos tecidos que tinham a captação neuronal bloqueada, causou um aumento da fracção de libertação que foi superior ao obtido nas preparações que tinham a captação neuronal operante: 2,75 (2,14-3,55) e 1,41 (1,36-2,02), respectivamente (tabela 15).

Tabela 15. Artérias de Coelho: influência exercida pelo bloqueio dos receptores- α_2 pré-juncionais sobre a fracção de libertação a partir de tecidos em que a captação neuronal se encontrava operante e de tecidos em que a captação neuronal foi inibida com 40 nmol.l⁻¹ de desipramina. Os valores representam as médias geométricas (e limites de confiança a nível de 95%) das fracções de libertação e das razões, obtidas em cada experiência, entre as fracções de libertação obtidas com e sem inibição dos receptores- α_2 ; n=6.

	Fracção de libertação de noradrenalina- ³ H		Aumentos da fracção de libertação
	Controlo	Após ioimbina	
<u>Artéria da orelha</u>			
Sem inibição da captação neuronal	1,53 (1,13 - 2,07)	2,51 * (2,40 - 2,61)	1,64 (1,38 - 1,95)
Com inibição da captação neuronal	2,45 (2,13 - 2,82)	3,86 * (3,18 - 4,70)	1,58 (1,34 - 1,87)
<u>Artéria jejunal</u>			
Sem inibição da captação neuronal	1,22 (0,85 - 1,74)	1,72 (1,17 - 2,55)	1,41 ^a (1,36 - 2,02)
Com inibição da captação neuronal	1,54 (0,95 - 2,49)	4,25 * (3,56 - 5,07)	2,75 ^b (2,14 - 3,55)

* Valor estatisticamente diferente do respectivo controlo (P<0,05). A diferença entre a e b é significativa.

5.2 Comentários

Como os resultados mostram, a inibição da captação neuronal ou da auto-inibição (mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais), condicionam de *per se*, um aumento da fracção de libertação da noradrenalina- ^3H maior nos tecidos onde a participação noradrenérgica predomina. Este facto poderia indicar que a estimulação nervosa mobiliza mais noradrenalina nos tecidos em que o componente noradrenérgico predomina do que naqueles em que predomina o componente purinérgico. Nesse caso, e como o grau de auto-inibição depende da concentração de noradrenalina na fenda sináptica (Enero e Langer 1973; Cubeddu *et al.* 1974), o bloqueio da captação neuronal deveria induzir uma maior auto-inibição nos tecidos em que a participação noradrenérgica predomina, o que não acontece. Enquanto que na porção epididimal e na artéria da orelha a inibição da captação neuronal não amplia o efeito já obtido pelo bloqueio da auto-inibição, na porção prostática e na artéria jejunal, a inibição da captação neuronal amplia o efeito produzido pelo bloqueio da auto-inibição. Esta ampliação é de tal modo que o bloqueio dos dois mecanismos acaba por aumentar mais o efluxo de noradrenalina na porção prostática do que na epididimal e na artéria jejunal mais do que na da orelha.

Parece-nos, pois que, nos tecidos em que a participação purinérgica é mais importante, os menores aumentos da fracção de libertação que a inibição da captação neuronal, ou da auto-inibição, isoladamente, induzem, poderão não ser devidos a uma menor capacidade da estimulação nervosa mobilizar noradrenalina, mas à forma como aqueles dois sistemas juncionais condicionam a libertação e a inactivação da noradrenalina libertada.

Nos tecidos em que o componente purinérgico predomina, a noradrenalina é libertada para uma biofase que parece estar sob uma influência apertada, quer pela captação neuronal, quer pela auto-inibição mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais. A existência de uma vicariância, entre estes dois sistemas, explicaria porque é que do bloqueio da captação neuronal, ou da auto-inibição, resulta um menor aumento no efluxo de noradrenalina: a inibição da captação neuronal provocará numa primeira fase, um aumento na concentração de noradrenalina na fenda; porém, de seguida, haverá uma maior auto-inibição, reduzindo a libertação, prevenindo, assim, grandes acumulações de noradrenalina na fenda e maiores dificuldades em a noradrenalina escapar da neurofase (fluido extracelular adjacente à varicosidade; Graefe e Bonisch 1988).

Nos tecidos em que a participação noradrenérgica predomina, o bloqueio da

captação neuronal, ou da auto-inibição, isoladamente, já aumenta a quantidade de noradrenalina que eflui para o líquido de perfusão. Isto sugere que, nestes tecidos, os dois sistemas interactuam de modo menos eficiente. Quando um dos sistemas é inibido, o outro parece ter menores condições de o substituir, ficando a noradrenalina com melhores condições para escapar da neurofase. Esta hipótese justificaria, porque é que o efluxo de noradrenalina aumenta, quando apenas um dos sistemas (captação neuronal ou auto-inibição) é inibido. Justificaria ainda, porque é que, quando um dos sistemas está já inibido, o aumento adicional no efluxo de noradrenalina, causado pela inibição do outro sistema, é menor do que nos tecidos em que o componente purinérgico predomina.

6. Influências da adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina induzida por estimulação eléctrica.

6.1 Resultados

6.1.1 Porções prostática e epididimal do canal deferente de Rato

6.1.1.1 Influência da inibição dos receptores purinérgicos P_1 .

A estimulação eléctrica (5 Hz, 1 ms, 100 V, 2700 impulsos) da porção prostática ou da porção epididimal do canal deferente, na presença de ioimbina ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$) e de desipramina (40 nmol.l^{-1}), causa um significativo aumento do efluxo de noradrenalina. Na tabela 16 estão representadas as quantidades de noradrenalina libertadas por impulso eléctrico (em nanogramas por miligrama de tecido) da porção epididimal e da porção prostática do canal deferente de Rato.

Tabela 16. Canal deferente de Rato: efluxo de noradrenalina induzido por estimulação eléctrica da porção prostática e epididimal. Os valores representam as médias aritméticas ($\pm$ erro padrão) da quantidade de noradrenalina colhida no líquido de perfusão (expressos em picogramas por grama de tecido e por estímulo eléctrico); $n=6$.

	Efluxo de noradrenalina (pg. g ⁻¹ . estímulo ⁻¹)
Porção prostática	38,0 $\pm$ 4,9 ^a
Porção epididimal	73,5 $\pm$ 8,8 ^b

As diferenças entre a e b são estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Quer na porção prostática, quer na porção epididimal, o DPSPX (um antagonista dos receptores P_1 ; Daly *et al.* 1985), na concentração de 5 nmol.l⁻¹, causou uma variação significativa do efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica. No entanto, enquanto que na porção prostática o efluxo de noradrenalina aumentou $2,17 \pm 0,12$ vezes ($n=6$), na porção epididimal esse efluxo diminuiu $1,26 \pm 0,05$ vezes ($n=6$) (figura 10).

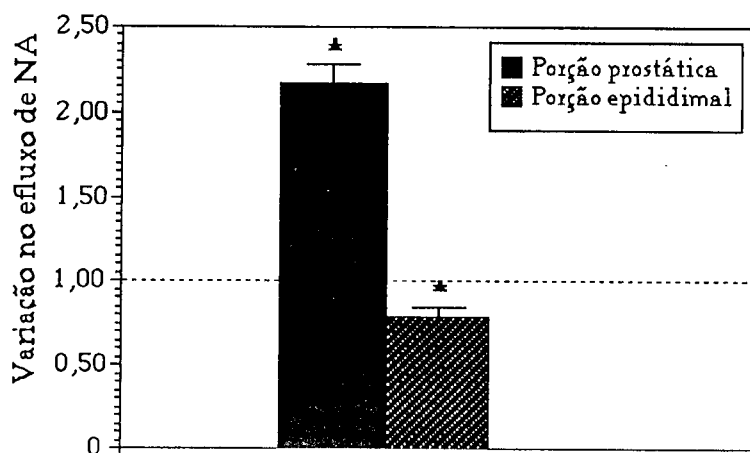


Figura 10. Canal deferente de Rato: influência da inibição dos receptores P_1 pelo DPSPX (5nmol.l⁻¹) sobre o efluxo de noradrenalina induzido por estimulação eléctrica da porção prostática (■) e da porção epididimal (▨). As colunas representam a razão entre o efluxo obtido na presença e na ausência de DPSPX. * Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($n=6$; $P < 0.05$).

6.1.1.2 Influência da inibição da captação de adenosina.

Quer na porção prostática, quer na porção epididimal do canal deferente de Rato, o dipiridamol (um inibidor da captação de adenosina; Wu e Phillis 1984) na concentração de $3 \mu\text{mol.l}^{-1}$, causou uma variação significativa no efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica. No entanto, enquanto que na porção prostática a inibição da captação de adenosina reduziu o efluxo de noradrenalina ($1,47 \pm 0,07$ vezes; $n=6$), na porção epididimal a inibição da captação de adenosina aumentou a libertação de noradrenalina ($1,34 \pm 0,08$ vezes; $n=6$) (figura 11).

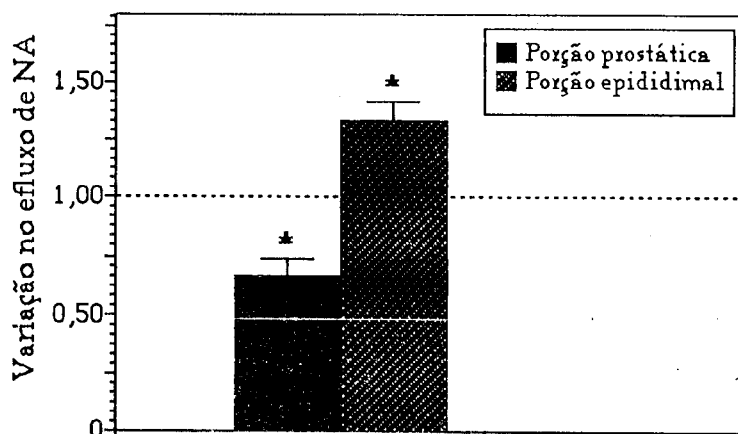


Figura 11. Canal deferente de Rato: influência da inibição da captação de adenosina pelo dipiridamol ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$) sobre o efluxo de noradrenalina induzido por estimulação eléctrica da porção prostática (■) e da porção epididimal (▨). As colunas representam a razão entre o efluxo obtido na presença e na ausência de dipiridamol.

* Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($n=6$; $P<0.05$).

6.1.2 Artérias da orelha e jejunal de Coelho

6.1.2.1 Influência da inibição dos receptores purinérgicos P_1 .

A estimulação eléctrica (5 Hz, 1 ms, 100 V, 2700 impulsos) da artéria da orelha e da jejunal, na presença de ioimbina ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$) e de desipramina (40 nmol.l^{-1}) causa um significativo aumento do efluxo de noradrenalina. Na tabela 17 estão representadas as quantidades de noradrenalina libertadas por impulso eléctrico (em nanogramas por miligrama de tecido) da artéria jejunal e da orelha de Coelho.

Tabela 17. Artérias de Coelho: efluxo de noradrenalina induzido por estimulação eléctrica das artérias jejunal e da orelha. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão, da quantidade de noradrenalina colhida no líquido de perfusão (em picogramas por grama de tecido e por impulso eléctrico); $n=6$.

	Efluxo de noradrenalina (pg. g ⁻¹ . estímulo ⁻¹)
Artéria jejunal	192,5 $\pm$ 14,5 ^a
Artéria da orelha	99,5 $\pm$ 13,0 ^b

As diferenças entre a e b são estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Quer na artéria jejunal, quer na artéria da orelha de Coelho, a inibição dos receptores P_1 (com 5 nmol.l^{-1} de DPSPX) modificou o efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica. No entanto, enquanto que na artéria jejunal o DPSPX aumentou o efluxo de noradrenalina $1,25 \pm 0,06$ vezes ($n=6$), na artéria da orelha o efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica, diminuiu $1,47 \pm 0,06$ vezes ($n=6$) (figura 12).

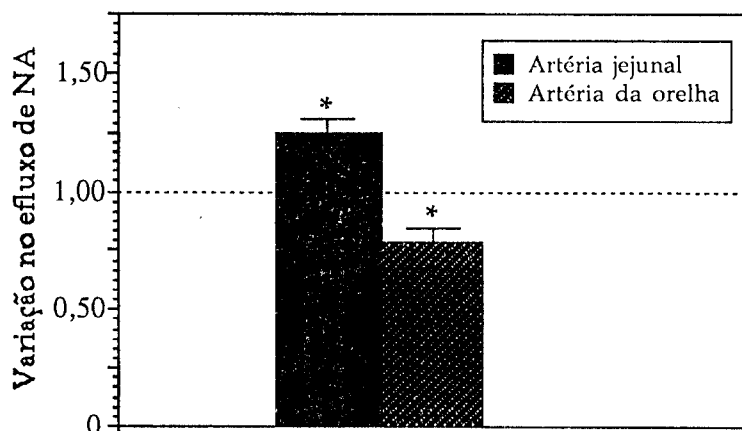


Figura 12. Artérias de Coelho: influência da inibição dos receptores P_1 pelo DPSPX (5 nmol.l^{-1}) sobre o efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica da artéria jejunal (■) e da artéria da orelha (▨). As colunas representam a razão entre o efluxo obtido na presença e na ausência de DPSPX. *Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($n=6$; $P<0.05$).

6.1.2.2 Influência da inibição da captação de adenosina.

Quer da artéria da orelha, quer na artéria jejunal de Coelho, a inibição da captação de adenosina (com $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ de dipiridamol) modificou o efluxo de noradrenalina, induzido pela estimulação eléctrica. No entanto, enquanto que na artéria jejunal, a inibição da captação de adenosina reduziu o efluxo de noradrenalina $1,18 \pm 0,04$ vezes ($n=6$), na artéria da orelha, o efluxo de noradrenalina, induzido por estimulação eléctrica, aumentou $1,59 \pm 0,13$ vezes ($n=6$) (figura 13).

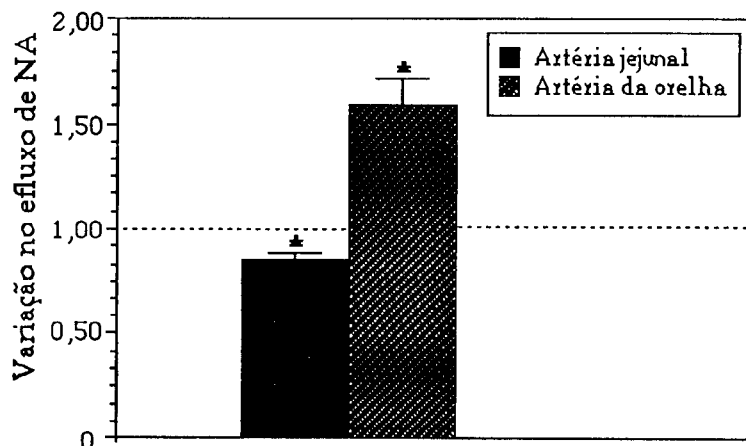


Figura 13. Artérias de Coelho: influência da inibição da captação de adenosina pelo dipiridamol ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$) sobre o efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica da artéria jejunal (■) e da artéria da orelha (▨). As colunas representam a razão entre o efluxo obtido na presença e na ausência de dipiridamol. * Estatisticamente diferente do respectivo controlo ($n=6$; $P<0.05$).

6.2 Comentários

Os resultados obtidos nestas experiências demonstram que, em todos os tecidos estudados, a adenosina endógena exerce uma modulação sobre a libertação de noradrenalina (e provavelmente também sobre a libertação de outros co-transmissores). Porém, esta influência não foi igual em todos os tecidos. Curiosamente, nos tecidos em que o componente noradrenérgico é menos importante (porção prostática do canal deferente de Rato e artéria jejunal de Coelho), a influência da adenosina sobre a libertação de noradrenalina foi de tipo inibitório. Nos tecidos em que o componente noradrenérgico predomina (porção epididimal do canal deferente de Rato e artéria da orelha de Coelho), a influência da adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina foi de tipo facilitatório.

As diferenças inter-tecduais, no tipo de influência exercida pela adenosina endógena, foram demonstradas pelos efeitos do antagonista dos receptores da adenosina (o DPSPX) e, também, confirmadas pelos efeitos antagonísticos, causados pela inibição da captação de adenosina.

Na porção prostática e na artéria jejunal, a inibição da libertação de

noradrenalina, causada pela adenosina endógena, foi demonstrada pelo aumento da libertação causado pelo bloqueio dos receptores da adenosina e pela redução da libertação que o bloqueio da sua captação de adenosina causou (figura 14).

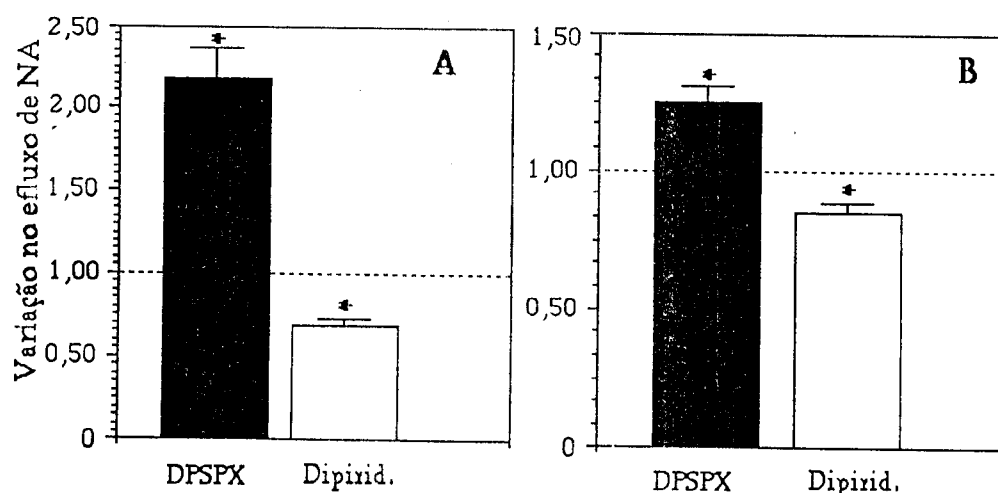


Figura 14. Influência da adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina induzida pela estimulação eléctrica de tecidos onde o componente noradrenérgico da resposta contráctil à estimulação eléctrica é menos importante (A-porção prostática do canal deferente de Rato; B- artéria jejunal de Coelho). Variação na libertação de noradrenalina causada pela inibição dos receptores da adenosina (■) e pela inibição da sua captação (□).

De modo inverso, na porção epididimal e na artéria da orelha, a influência facilitatória, exercida pela adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina, foi demonstrada pela redução na quantidade de noradrenalina libertada que o bloqueio dos receptores da adenosina causou, como também, pelo aumento da libertação de noradrenalina causado pela inibição da captação de adenosina (figura 15).

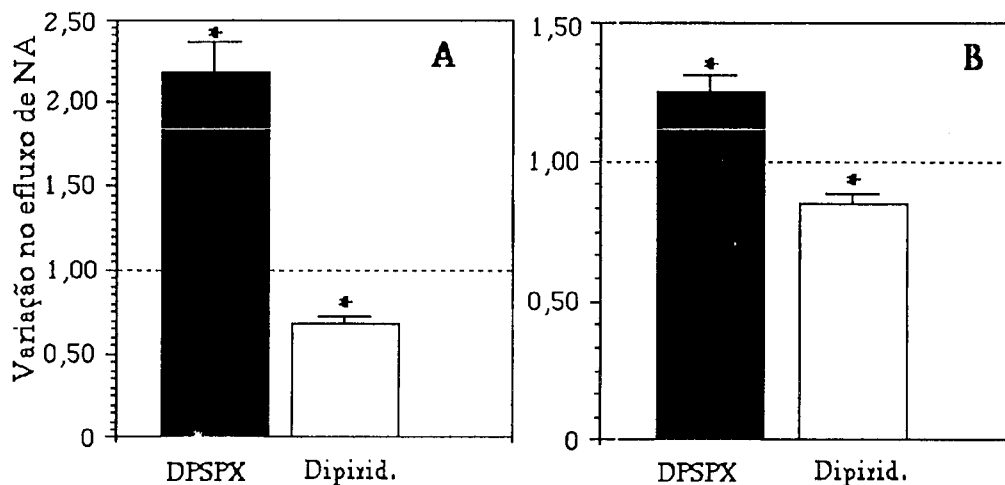


Figura 15. Influência da adenosina endógena sobre a libertação de noradrenalina induzida pela estimulação eléctrica de tecidos onde predomina o componente noradrenérgico na resposta contráctil à estimulação eléctrica (A- porção epididimal do canal deferente de Rato; B- artéria da orelha de Coelho). Variação na libertação de noradrenalina causada pela inibição dos receptores da adenosina (■) e pela inibição da sua captação (□).

A importância da influência inibitória exercida pela adenosina endógena, parece variar de tecido para tecido. Assim, na porção prostática, a adenosina endógena parece exercer um controlo mais pronunciado sobre a libertação de noradrenalina do que na artéria jejunal, dado que o efeito inibitório exercido pela estimulação adenosínica, foi mais pronunciado na porção prostática do canal deferente.

Entre a porção epididimal e a artéria da orelha, tecidos em que se evidenciou uma influência facilitatória da adenosina, sobre a libertação de noradrenalina, não se observaram diferenças significativas entre a amplitude das variações da libertação causadas pelo bloqueio dos receptores da adenosina.

Em qualquer dos tecidos, as influências facilitatórias sobre o efluxo não foram muito expressivas, o que pode levantar o problema do seu significado. No entanto, se compararmos estes efeitos com os obtidos na porção prostática e na artéria jejunal (onde a influência é inibitória) e se tivermos presente que foi nos tecidos em que a resposta à estimulação eléctrica é predominantemente noradrenérgica que esse tipo de efeito se manifestou, parece-nos que esse facto

pode ter já bastante importância.

A modulação adenosínica faz com que, nos tecidos em que a participação noradrenérgica é menos importante, a libertação esteja mais sob esta influência inibitória. Isto contribuirá, também, para prevenir grandes acumulações de noradrenalina na fenda sináptica, reduzindo as probabilidades da noradrenalina atingir os receptores- α pós-juncionais, podendo limitar, deste modo, a participação da noradrenalina na resposta contráctil à estimulação nervosa.

7. Análise ultra-estrutural da porção prostática e epididimal do canal deferente de Rato

7.1 Resultados

A análise ultra-estrutural das duas porções do canal deferente de Rato mostrou varicosidades, algumas delas com uma maior proporção de "vesículas grandes com núcleo denso" (Fotografia 1 e 2). Algumas varicosidades apresentavam-se quase totalmente envolvidas por células musculares, sendo a distância entre a membrana da varicosidade e a da célula muscular mais próxima de cerca de 20 nm (Fotografia 3). Foram também observados fibroblastos, estando alguns associados a complexos varicosidade/fibras musculares (Fotografia 1 e 4).

Embora não se tenham observado formações específicas de qualquer das porções, foi possível detectar que alguns arranjos estruturais eram mais frequentes numa das porções do que na outra (tabela 18). A porção prostática apresenta uma maior abundância de varicosidades do que a porção epididimal. Possui, também, uma maior proporção de varicosidades encastradas, *i.e.*, varicosidades intimamente envolvidas por fibras musculares. As varicosidades observadas na porção prostática possuíam, ainda, uma maior proporção de vesículas grandes com núcleo denso. As associações entre os fibroblastos e os complexos nervo/célula muscular, embora também ocorram na porção prostática, são mais frequentes na porção epididimal.

Tabela 18 Canal deferente de Rato: distribuição, na porção prostática e na epididimal de alguns dos elementos considerados na análise ultra-estrutural .

	Porção prostática	Porção epididimal
Número de varicosidades por fotografia	1,92	1,16
% de varicosidades encastradas	32	8
% de varicosidades com uma grande proporção de vesículas grandes com núcleo denso	31,2	19,6
% de complexos neuromusculares com fibroblastos	30	41
Número de varicosidades avaliadas: 164		

A análise da distribuição das distâncias, entre as varicosidades e as células musculares, está representada nas figuras 16 e 17 para a porção prostática e para a porção epididimal, respectivamente. Entre as duas porções, o padrão de distâncias entre as varicosidades e as células musculares é sobreponível. No entanto, existe na porção prostática uma maior abundância de distâncias inferiores a 55 nm, enquanto que, na porção epididimal, são as distâncias entre 55 e 115 nm as mais frequentes.

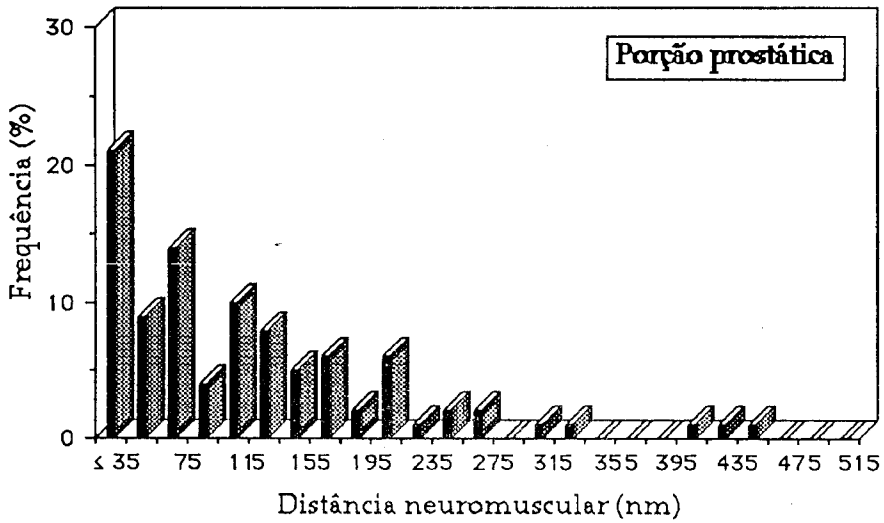
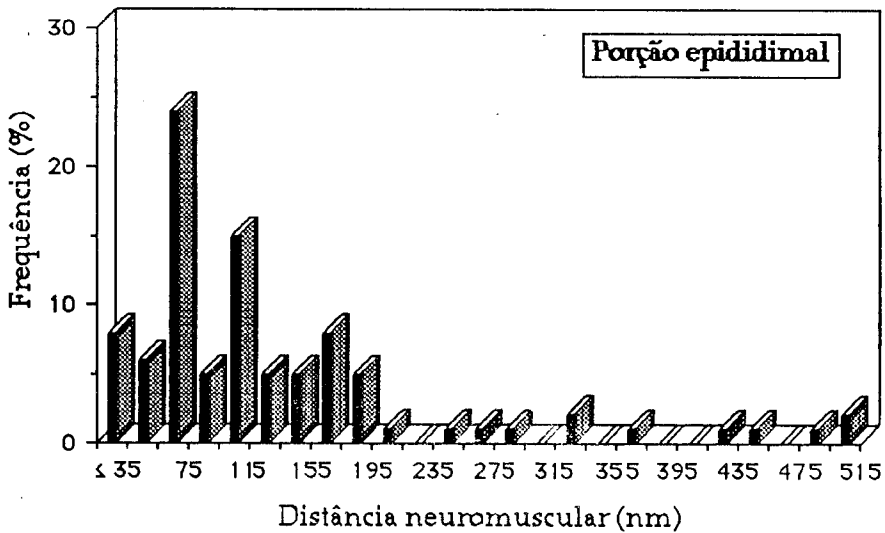


Figura 16. Canal deferente de Rato: histograma das distâncias neuromusculares recolhidas na análise morfométrica da porção prostática.



Embora na porção epididimal sejam mais frequentes as associações entre fibroblastos e varicosidades, a análise da distribuição das distâncias varicosidade-fibroblasto não revelou, entre as duas porções do canal deferente, diferenças significativas (figuras 18 e 19).

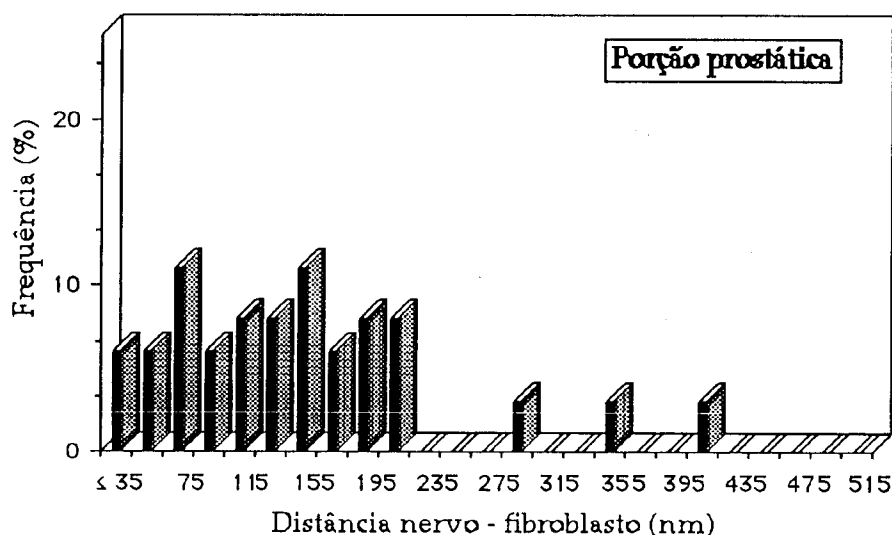


Figura 18. Canal deferente de Rato: histograma das distâncias nervo-fibroblasto recolhidas na análise morfológica da porção prostática.

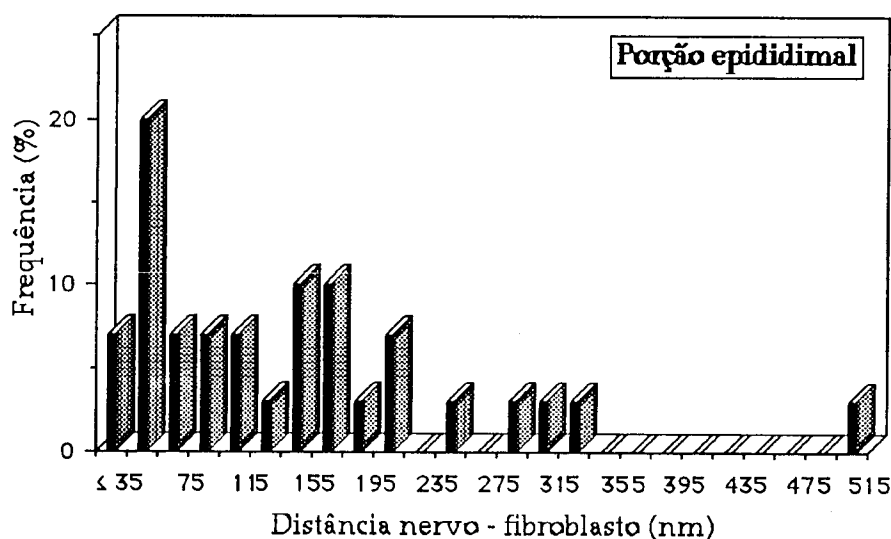


Figura 19. Canal deferente de Rato: histograma das distâncias nervo-fibroblasto recolhidas na análise morfológica da porção epididimal.



Fotografia 1. Varicosidade grande (V) localizada muito perto de músculo liso (Sm) e sem fibroblastos associados ao complexo neuromuscular. Barra = 1 μ m.



Fotografia 2. Varicosidades pequenas (V) com grande proporção de vesículas grandes com núcleo denso (setas), encontrando-se um fibroblasto (F) entre as varicosidades e as células de músculo liso (Sm). Barra = 1 μ m.



Fotografia 3. Varicosidade "encastrada" (E) com vesículas pequenas de núcleo denso. Pode-se observar também uma varicosidade pequena com uma grande proporção de vesículas grandes com núcleo denso (seta) e envolvida por músculo liso (seta). Barra = 1 μ m.



Fotografia 4. Varicosidade pequena (V), com vesículas grandes de núcleo denso (seta), junto de um fibroblasto (F). SM — células de músculo liso. Barra = 1 μ m.

7.2 Comentários

O objectivo do estudo morfológico foi o de tentar saber, se existe alguma base ultra-estrutural que justifique as diferenças na importância da contribuição noradrenérgica para a resposta pós-juncional. Embora o objectivo inicial fosse estudar os quatro tecidos (porção epididimal, porção prostática, artéria da orelha e artéria jejunal), só nos foi possível recolher dados suficientes para a análise da porção prostática e da porção epididimal do canal deferente de Rato.

A maior densidade de varicosidades que a porção prostática possui, em relação à porção epididimal, está de acordo com o seu maior conteúdo em noradrenalina. Este facto, vem sugerir, também, que a porção prostática tem uma densidade de inervação superior à da porção epididimal.

O facto de serem mais abundantes, na porção prostática, as varicosidades com uma maior proporção de vesículas grandes com núcleo denso pode sugerir que estas vesículas funcionem como os reservatórios preferenciais de ATP.

No entanto, sabe-se que as vesículas pequenas de núcleo denso também têm sistemas de transporte para o ATP (Aberer *et al.* 1979) sendo também capazes de o acumular (Geffen e Livett 1971; Lagercrantz e Stjärne 1974; Richards e Da Prada 1977). Por outro lado, as "vesículas grandes com núcleo denso" são mobilizadas, preferencialmente, pelos estímulos mais intensos (Stjärne *et al.* 1986), o que não se ajusta ao facto conhecido, e bem demonstrado, do componente purinérgico se revelar tanto melhor quanto menos intenso for o estímulo (Kennedy *et al.* 1986; Schwartz e Malik 1988; Bulloch e Starke 1990).

Um aspecto que nos parece de realçar é o de que as distâncias neuromusculares mais estreitas são mais abundantes na região prostática. A diversidade de largura, das junções neuromusculares simpáticas, poderá ter um papel determinante na importância que cada um dos neurotransmissores tem na resposta pós-juncional. Para a mesma quantidade de mediador libertado, a concentração, atingida na fenda sináptica, será maior nas fendas mais estreitas e maior a resposta. Como as fendas mais estreitas são mais frequentes na porção prostática, o ATP terá neste tecido, melhores condições para activar os receptores purinérgicos (P_2) pós-juncionais e, assim, desencadear uma resposta contráctil mais ampla do que nos tecidos em que este tipo de fendas seja menos abundante. Segundo a literatura (ver Bevan e Su 1974; Osswald e Guimarães 1983), a largura da fenda na artéria mesentérica é menor do que na artéria da orelha. Sendo assim, é possível que, também nestes tecidos, a largura da fenda sináptica seja um factor favorecedor da manifestação das respostas purinérgicas.

Discussão

A resposta contráctil de diversos tecidos à estimulação simpática é mediada, não só pela noradrenalina, como também, por outros neurotransmissores com ela co-libertados. De entre esses neurotransmissores, o ATP é aquele que mais tem sido responsabilizado pelo componente não-noradrenérgico da resposta contráctil, de vários tecidos, à estimulação simpática.

Apesar do interesse pelo componente purinérgico ser recente, tal não significa que este corresponda sempre a um componente menor, na resposta à estimulação eléctrica. De facto, em diversos tecidos, por exemplo na porção prostática do canal deferente de Rato (McGrath 1978), na artéria mesentérica de Coelho (von Kügelgen *et al.* 1985) e na artéria safena de Coelho (Burnstock e Warland 1988), a importância relativa do componente purinérgico pode ser mesmo superior à do componente noradrenérgico.

As explicações para a variação da importância relativa destes dois componentes não são satisfatórias. Burnstock (1990b) sugeriu que ela fosse devida à diferente proporção em que estes neurotransmissores se encontram nos nervos ou nas vesículas mobilizadas pela estimulação eléctrica. Esta ideia, apesar de partilhada por outros autores (ver Schwartz e Malik 1989), tem um fundamento experimental limitado e discutível. Por outro lado, são inúmeros os estudos que apontam para a existência de uma heterogeneidade na transmissão noradrenérgica, nomeadamente, no que diz respeito aos receptores envolvidos, à localização desses receptores em relação às varicosidades e à importância dos sistemas de inactivação na remoção da noradrenalina. No nosso entender, é possível que a importância relativa do componente noradrenérgico, na resposta contráctil num dado tecido, possa ser condicionada por este conjunto de factores e não seja, pelo menos exclusivamente, um reflexo das proporções em que os neurotransmissores se encontram na varicosidade.

Neste sentido, o objectivo central deste estudo foi o de testar esta hipótese, analisando se a importância relativa da participação noradrenérgica, na resposta contráctil à estimulação nervosa, está relacionada com as quantidades de noradrenalina presentes no tecido, com a quantidade de noradrenalina libertada pela estimulação nervosa, com uma diferente localização dos receptores noradrenérgicos pós-juncionais e/ou com factores juncionais susceptíveis de influenciar as quantidades de mediadores libertados, nomeadamente o sistema de captação neuronal de noradrenalina e os mecanismos que modulam a libertação dos neurotransmissores.

Os resultados obtidos demonstram que, quando comparados com os tecidos em que o componente noradrenérgico predomina, os tecidos com participação noradrenérgica menos marcada:

- apresentam conteúdos em noradrenalina superiores (e, provavelmente, maior densidade de inervação noradrenérgica);
- não apresentam fracções de libertação de noradrenalina inferiores;
- apresentam os receptores- α pós-juncionais mais afastados das varicosidades ou, pelo menos, numa biofase menos influenciada pela noradrenalina presente junto das varicosidades;
- apresentam uma maior vicariância entre a captação neuronal de noradrenalina e a auto-inibição, mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais;
- apresentam a libertação modulada, inibitoriamente, pelas purinas endógenas.

No nosso entender, a conjugação destes factores poderá influenciar a importância com que cada um dos co-transmissores (noradrenalina e ATP) participa na resposta contráctil à estimulação nervosa. As formas como tal poderá ocorrer são, a seguir, discutidas.

Relação entre conteúdo em noradrenalina/densidade de inervação noradrenérgica e participação do ATP na resposta contráctil.

A quantificação do conteúdo em noradrenalina revelou que, nos tecidos em que a importância do componente noradrenérgico é menor, o conteúdo em noradrenalina é superior ao dos tecidos usados como comparação e onde a

contribuição noradrenérgica é mais significativa. Este facto está em desacordo com a ideia de que, a importância da participação, de cada um dos neurotransmissores, na resposta pós-juncional, depende da quantidade em que esses mediadores se encontram nas varicosidades.

Embora, por razões de ordem técnica, não se possa fazer uma análise semelhante para o ATP, parece improvável que, nos tecidos em que o efeito do ATP é mais pronunciado, a quantidade deste neurotransmissor seja tão elevada que supere a influência da maior quantidade de noradrenalina.

Nestas condições, a conclusão possível é a de que a quantidade de noradrenalina não parece ser o factor limitante na definição da importância relativa do componente noradrenérgico. Poderá ser a quantidade de ATP o factor limitante?

Apesar desta ideia poder ser contraditória, a existência de um maior conteúdo em noradrenalina poderá, quanto a nós, indiciar uma maior probabilidade para que a resposta purinérgica se evidencie.

Sabe-se que o ATP está armazenado, juntamente com a noradrenalina (Smith 1972; Stjärne 1972; Philippu e Matthaei 1988), nas vesículas grandes e nas pequenas com núcleo denso (Richards e Da Prada 1977), sendo, também, libertado por exocitose (ver Winkler 1988) e de forma quântica (Blakeley e Cunnane 1979; Cunnane e Stjärne 1984; Åstrand e Stjärne 1989). Os valores, referidos na literatura, da proporção em que o ATP e noradrenalina se encontram nas varicosidades, são muito variáveis. No entanto, existe unanimidade quanto à noradrenalina ser o predominante.

Encontrando-se o ATP numa proporção desfavorável e sendo, após a sua libertação, alvo de um sistema eficiente de inactivação (Keller e Zimmermann 1983; Nagy *et al.* 1983; Heymann e Reddington 1986; Ribeiro e Sebastião 1987), o ATP tem piores condições, do que a noradrenalina, para atingir, junto da célula efectora, concentrações capazes de desencadear uma resposta pós-juncional significativa. A participação purinérgica será, pois, favorecida por uma maior densidade de inervação. Tecidos com uma maior densidade de inervação noradrenérgica terão também condições para libertar mais ATP, mais probabilidades de gerar PJs (provavelmente, devido à activação de canais catiónicos selectivos; Nakazawa e Matsuki 1987; Friel 1988), com uma amplitude capaz de activar os canais de Ca^{2+} , aos quais estão acoplados (Blakeley *et al.* 1981; Stone 1981; MacKenzie *et al.* 1988) e, consequentemente, desencadear a contracção.

Na porção prostática do canal deferente de Rato (onde o componente purinérgico e a densidade de inervação é maior), observou-se, ainda, uma maior abundância de fendas sinápticas mais estreitas. Como, no caso das fendas estreitas, o volume do compartimento, para onde os neurotransmissores são libertados, é menor, maior será a concentração de ATP que aí se atinge e mais intensos serão os seus efeitos.

Mesmo que existam condições para o ATP desencadear os potenciais juncionais que levam à contracção, apenas em alguns pontos do tecido, esta forma de acoplamento, ao contrário da noradrenérgica, é susceptível de se propagar ao longo do músculo (Bevan e Ljung 1974). É pois admissível que tais fenómenos, mesmo gerados em pontos limitados do tecido, se possam propagar às células musculares vizinhas, contribuindo assim, para o desenvolvimento de uma resposta contráctil que, em algumas condições, pode gerar uma tensão superior à da resposta noradrenérgica.

Parece-nos, por isso, que a influência do conteúdo tecidual em neurotransmissores, na importância do componente noradrenérgico ou purinérgico, pode depender, não da proporção entre um e outro neurotransmissor, mas sim, da riqueza da inervação que permita que o neurotransmissor que está em menor proporção (ATP) seja libertado em quantidades suficientes para exercer o seu efeito. Ou, então, que a geometria da fenda sináptica permita uma concentração tal que compense a pouca quantidade libertada e a rápida inactivação.

Nos tecidos em que a densidade de inervação é menor, ou que apresentam maiores distâncias neuromusculares, menores serão as probabilidades da resposta ao ATP se desencadear e menos "perturbado" será o componente noradrenérgico.

De acordo com esta ideia está o facto da membrana nictitante de Gato, um tecido que possui um conteúdo em noradrenalina considerável ($4,3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; Smith *et al.* 1966) e fendas sinápticas estreitas (20 nm; Esterhuizen *et al.* 1968), apresentar, na resposta contráctil à estimulação nervosa, um componente não noradrenérgico, que pode contribuir com cerca de 50% para a amplitude total da resposta (Trendelenburg *et al.* 1962; Lee 1967), sendo este componente de natureza purinérgica (Langer e Pinto 1976; Duval *et al.* 1985).

Na artéria safena de Coelho, um tecido com uma inervação noradrenérgica densa disposta não só na junção adventício-medial, como, também, na média (Bevan e Purdy 1973), a estimulação nervosa induz, quer PJs, quer contracções, resistentes aos antagonistas- α (Holman e Surprenant 1980) e que são atribuídas ao ATP (Burnstock e Warland 1987; Warland e Burnstock 1987).

A veia porta é outro tecido que apresenta fendas sinápticas estreitas (Holman *et al.* 1968), uma densa inervação noradrenérgica (Johansson *et al.* 1970; Burnstock *et al.* 1979) e onde se tem demonstrado a existência de um componente não-noradrenérgico-nem-colinérgico significativo (Hughes e Vane 1967, 1970), provavelmente mediado pelo ATP (Burnstock *et al.* 1979, 1984; Hung e Su 1982).

Por outro lado, na artéria pulmonar, que apresenta grandes distâncias neuromusculares (entre 1000 e 4000 nm; Verity e Bevan 1968), apesar da estimulação nervosa induzir uma libertação de purinas (Katsuragi e Su 1982), não se detectam respostas pós-juncionais, atribuíveis ao ATP (Suzuki 1983).

Relação entre a localização dos receptores noradrenérgicos- α pós-juncionais e a importância relativa do componente noradrenérgico na resposta à estimulação nervosa.

John Bevan e Che Su, na sua revisão sobre os mecanismos simpáticos a nível vascular afirmam: *"It is the concentration of neurogenic noradrenaline at the α -adrenergic receptors of vascular muscle that determines the influence of the sympathetic innervation on vascular muscle tone"* (Bevan e Su 1973). Enquadrando esta ideia num processo de co-transmissão, em que a transmissão simpática não é assegurada, apenas, pela noradrenalina, poder-se-á, então, dizer que é a concentração de noradrenalina a nível dos receptores- α presentes na musculatura vascular que vai definir a importância relativa da contribuição noradrenérgica para a resposta pós-juncional.

A transmissão noradrenérgica depende da estrutura do terminal neuro-elector e as características desta junção podem condicionar, de modo distinto, a eficiência da modulação da libertação e da inactivação dos neurotransmissores.

Foi com os trabalhos realizados durante as décadas de 60 e 70, e em que Bevan e colaboradores desempenharam um papel de realce, que a junção neuromuscular noradrenérgica começou a ser melhor conhecida. Em termos estruturais, a junção neuro-electora apresenta uma grande diversidade, nomeadamente, quanto à distância entre a varicosidade e a membrana da célula muscular mais próxima. É possível encontrar distâncias entre 4,5 e 4000 nm (ver Bevan e Su 1973; Osswald e Guimarães 1983). É de supôr que estas diferenças

estruturais impliquem consideráveis diferenças em termos funcionais. Poder-se-á dizer que, quanto mais estreita for a junção, mais esta se aproxima, funcionalmente, de uma sinapse, no sentido comum do termo. Nos terminais em que a fenda sináptica é larga, por não haver uma relação anatómica entre uma varicosidade e uma determinada fibra muscular, a noradrenalina difunde-se pelo espaço extracelular, radialmente, em todas as direcções (Bevan e Su 1973).

A difusão da noradrenalina não é livre, porque depende da resistência relativa que as barreiras teciduais oferecem (Bevan e Török 1970; Guimarães *et al.* 1975; Kenakin 1980). Por esta razão, a libertação dos neurotransmissores cria um gradiente de concentrações a partir da neurofase, que será tanto mais marcado, quanto menor o coeficiente aparente de difusão tecidual (Bevan e Török 1970).

O facto da difusão não ser livre tem ainda como consequência, que um sistema de inactivação (local de perda) pode funcionar como um mecanismo gerador de gradientes de concentração, para qualquer agonista substrato desse local de perda. Da actividade de um destes sistemas, resulta uma rarefacção das moléculas do agonista que será, tanto maior, quanto mais perto se está do local de perda (Guimarães 1982, 1984). Quando se bloqueia a acção de tal sistema, a concentração de moléculas de agonista, disponíveis para a activação de receptores, sobe e a intensidade e a duração da resposta, aumentam (Trendelenburg 1972, 1988; Guimarães 1982). Num determinado ponto, o aumento na concentração de agonista, causado pela inibição de um local de perda, será tanto maior, quanto menor for a distância, entre esse ponto e o local de perda (Guimarães *et al.* 1975; Guimarães e Paiva 1981a, b).

De acordo com os princípios referidos anteriormente, a potenciação resultante da inibição da captação neuronal, poderá ser usada como um indicador da maior ou menor distância a que os receptores- α pós-juncionais se encontram das varicosidades e, assim, avaliar da sua maior, ou menor, susceptibilidade em serem atingidos pela noradrenalina libertada por exocitose.

No presente estudo, a inibição da captação neuronal potenciou mais a resposta às aminas simpaticomiméticas, em tecidos em que o componente noradrenérgico, da resposta à estimulação nervosa, predomina. Sem se poder excluir outras hipóteses interpretativas, este facto pode ser explicado por uma localização mais próxima dos receptores- α pós-juncionais relativamente às varicosidades, de onde o mediador provém.

Compreende-se que a captação neuronal seja tanto mais eficiente, quanto

maior for a densidade de inervação noradrenérgica de um tecido. Por essa razão, a potenciação do efeito do agonista, resultante da inibição da captação neuronal, é maior em tecidos com uma maior densidade de inervação noradrenérgica (Trendelenburg 1972). No nosso caso, o maior aumento de sensibilidade, obtido nos tecidos em que a participação noradrenérgica na resposta pós-juncional é maior (porção epididimal do canal deferente de Rato e artéria da orelha de Coelho), não pode ser explicado por diferenças na densidade de inervação. Os dados obtidos na análise do conteúdo tecidual em noradrenalina e na análise ultra-estrutural (apenas nas duas porções do canal deferente de Rato), sugerem uma maior densidade de inervação noradrenérgica, precisamente, nos tecidos onde o aumento de sensibilidade foi menor (porção prostática do canal deferente de Rato e artéria jejunal de Coelho).

Excluída a influência da densidade de inervação, os resultados obtidos constituem um forte indicador de que, os receptores- α pós-juncionais estão mais próximos do sistema de captação neuronal e das varicosidades, na porção epididimal, do que na porção prostática do canal deferente de Rato e na artéria da orelha mais, do que na artéria jejunal de Coelho. Ou, pelo menos, de que os receptores- α pós-juncionais são influenciados, mais facilmente, pelas variações na concentração de noradrenalina na neurofase.

Os efeitos resultantes da inibição da captação neuronal podem considerar-se, em certa medida, semelhantes aos resultantes da libertação dos neurotransmissores: ambos os procedimentos promovem um aumento da concentração do agonista, junto das varicosidades. Na porção prostática do canal deferente de Rato, os receptores- α pós-juncionais são menos atingidos, do que os da porção epididimal, pelo aumento na concentração de agonista na neurofase, induzido pela inibição da captação neuronal. Será lógico admitir que o sejam, também, pelo aumento da concentração de noradrenalina na neurofase, induzido pela exocitose. Situação semelhante ocorre entre a artéria jejunal e a artéria da orelha de Coelho. Os receptores- α pós-juncionais da artéria jejunal, também devem estar menos expostos ao aumento de noradrenalina na neurofase. Neste tecido, no que diz respeito aos efeitos mediados pelos receptores- α pós-juncionais, a inibição da captação neuronal induz um menor aumento da sensibilidade, do que na artéria da orelha de Coelho.

Uma maior distância, entre as varicosidades e os receptores- α pós-juncionais, na porção prostática do que na porção epididimal do canal deferente de Rato e maior na artéria jejunal do que na artéria da orelha de Coelho, não se

concilia com os dados recolhidos na análise ultra-estrutural e com os descritos na literatura (para citações originais ver Bevan e Su 1974). Estes tecidos, em particular o canal deferente, apresentam distâncias neuromusculares dentro das menores que vêm referidas na literatura. Este facto, torna improvável a existência de diferentes biofases, no interior de uma fenda tão estreita. Além disso, nos tecidos em que a inibição da captação neuronal induz um menor aumento de sensibilidade, portanto onde os receptores- α pós-juncionais parecem estar mais afastados das varicosidades, as fendas sinápticas não são mais largas do que as dos tecidos onde o aumento de sensibilidade foi superior. Esta não concordância sugere que os receptores- α pós-juncionais, não se localizam no interior da junção, pelo menos naquelas que apresentam uma fenda estreita.

Os resultados obtidos em diversos estudos indicam que, de entre os receptores noradrenérgicos pós-juncionais, os receptores β estão situados, mais longe das varicosidades do que os receptores- α (Guimarães e Paiva 1981a, b). No entanto, os dados da literatura não demonstram uma localização intra-juncional dos receptores- α , semelhante, por exemplo, à descrita para os receptores nicotínicos, da junção neuromuscular esquelética. Pelo contrário, alguns estudos sugerem mesmo que, os receptores- α pós-juncionais, poderão não estar, preferencialmente, expostos à noradrenalina libertada das varicosidades.

Em arteríolas de Cobaia, a aplicação de noradrenalina, por iontoforese, provoca uma contracção, junto do local onde é aplicada. Porém, quando a noradrenalina é aplicada em alguns locais, geram-se alterações do potencial de membrana, das células musculares, que são semelhantes às induzidas pela estimulação nervosa (Hirst e Neild 1980, 1981).

Os resultados anteriores serviram de base à proposta de que, as respostas induzidas pela noradrenalina exógena, não envolvem, necessariamente, os mesmos receptores e os mesmos sistemas de transdução, que as respostas induzidas pela estimulação dos nervos noradrenérgicos (ver Angus 1982). Estas envolviam a activação de receptores juncionais (designados, por receptores γ ; Hirst e Neild 1981), que provocavam despolarizações da membrana. Estes receptores seriam os únicos envolvidos, na resposta à estimulação nervosa feita com frequências baixas (0,4 Hz) e localizar-se-iam, apenas, nas áreas com inervação noradrenérgica (Edwards *et al.* 1989). Para frequências mais elevadas, começam a evidenciar-se os efeitos eléctricos e mecânicos, semelhantes aos obtidos com a noradrenalina exógena (Cheung 1982; Karashima e Kuriyama 1981; Suzuki 1981). Este facto, leva a supôr que os receptores noradrenérgicos

pós-juncionais, que medeiam os efeitos causados pelas frequências de estimulação mais elevadas, se localizam fora da junção, sendo, por isso, facilmente atingidos pela noradrenalina exógena. Estes receptores, ao contrário dos que medeiam os PJs, apresentam características farmacológicas semelhantes às dos receptores- α .

A existência de receptores intra-juncionais noradrenérgicos, não está, no entanto, cabalmente demonstrada (ver Laher *et al.* 1986; Hirst e Jobling 1989), uma vez que o ATP, através de receptores P_2X , provoca, também, alterações no potencial da membrana pós-juncional, o que pode explicar, em larga medida, os efeitos pós-juncionais resultantes da estimulação nervosa (ver Sneddon e Burnstock 1984a).

A hipótese da localização extra-juncional dos receptores- α é mais provável, fundamentando-se, quer nos dados referidos na literatura, quer numa análise teórica da dinâmica intra-juncional. A noradrenalina e o ATP encontram-se armazenados nas mesmas varicosidades e numa proporção que é desfavorável ao ATP. Com baixas frequências de estimulação nervosa é possível observar os efeitos do ATP (PJs), mas não qualquer resposta devida à noradrenalina (Hirst e Neild 1980), que é o neurotransmissor mais abundante. Isso sugere que os receptores noradrenérgicos se situam em locais menos acessíveis à noradrenalina libertada, sendo, por isso, pouco provável que estejam no interior da própria fenda. Além disso, a inibição da captação neuronal reduz a amplitude da contracção induzida pela estimulação eléctrica da artéria mesentérica de Cobaia (Kuriyama e Suyama 1983), do canal deferente de Rato e de Ratinho (Marshall *et al.* 1977). O aumento da concentração de noradrenalina na fenda sináptica, causado pela inibição da captação neuronal, é maior na biofase dos receptores pré-juncionais do que na dos pós-juncionais. Daqui ressalta, que a potenciação do efeito pré-juncional (inibição), se sobrepõe à potenciação do efeito pós-juncional (resposta contráctil), razão pela qual, pode haver redução da resposta contráctil à estimulação eléctrica, em consequência do bloqueio da captação neuronal de noradrenalina.

No presente estudo, a inibição da captação neuronal causou uma potenciação dos efeitos, mediados pelos receptores- α_2 pré-juncionais, muito superior à provocada nos efeitos mediados pelos receptores- α pós-juncionais. Se, qualitativamente, este resultado era previsível, uma vez que os receptores pré-juncionais se localizam nas varicosidades (Starke e Langer 1979), quantitativamente, trata-se de um resultado imprevisto. Uma diferença tão

marcada no aumento de sensibilidade (ver comentários aos resultados) sugere, também, que os receptores- α pós-juncionais se localizam numa biofase muito afastada daquela onde os receptores pré-juncionais se localizam. Se os receptores noradrenérgicos pós-juncionais estivessem localizados no interior da junção, não é provável que, da inibição da captação neuronal se gerasse um gradiente de concentração de cerca de quarenta vezes, entre a zona onde estão os receptores pré-juncionais e a zona onde estão os receptores pós-juncionais, como no caso da adrenalina na porção prostática, .

A localização extra-juncional, dos receptores noradrenérgicos pós-juncionais, permite compreender que a potenciação, causada pelo bloqueio da captação neuronal, seja maior na porção epididimal e na artéria da orelha, do que na porção prostática e na artéria jejunal, respectivamente.

O facto da inibição da captação neuronal causar uma potenciação maior nos tecidos em que a participação noradrenérgica é maior, sugere que a difusão da noradrenalina, desde a neurofase até à biofase dos receptores- α pós-juncionais, é mais fácil nestes tecidos, do que naqueles em que a participação noradrenérgica é menor.

A maior facilidade de difusão poderá ser o reflexo de uma menor distância, entre esses receptores e as varicosidades. No entanto, como o coeficiente de difusão é influenciado pelas "dificuldades do percurso" entre os receptores e o local de perda (Bevan e Su 1973), também se deve ter em consideração este parâmetro. Poderá acontecer que, nos tecidos em que a potenciação é menor, as fendas sinápticas sejam mais estreitas e isso constituir um obstáculo à difusão. Nesse caso, os receptores- α pós-juncionais poderão estar, em todos os tecidos, à mesma distância das varicosidades, apenas a difusão da noradrenalina, desde estas até a biofase onde se localizam os receptores, poderá ser mais difícil nos tecidos onde se observou uma menor potenciação.

Os dados disponíveis permitem propôr que as diferenças de distância entre as varicosidades e os receptores- α pós-juncionais (e/ou das facilidades de difusão da noradrenalina) podem influenciar a concentração de noradrenalina na biofase dos receptores- α pós-juncionais e, assim, influenciar a importância da participação noradrenérgica na resposta contráctil à estimulação nervosa. Nos tecidos em que os receptores- α pós-juncionais estão mais afastados das varicosidades (e/ou a difusão da noradrenalina é mais difícil), será menor o aumento na concentração de noradrenalina na biofase, causado pela estimulação nervosa e, menor, o contributo da noradrenalina para a resposta pós-juncional.

Nos tecidos em que os receptores- α pós-juncionais se localizam mais perto das varicosidades (e/ou a difusão da noradrenalina é mais fácil), a estimulação nervosa causará, mais facilmente, aumentos na concentração de noradrenalina na biofase, maior sendo a contribuição noradrenérgica.

Como o ATP existe nas varicosidades em quantidades menores do que as de noradrenalina e, porque, após a sua libertação, o ATP é rapidamente inactivado, é de prever que, os receptores- P_2 pós-juncionais se localizem num local extremamente acessível ao ATP libertado. Por isso, os receptores para o ATP devem estar localizados intra-juncionalmente. Se assim for, o acesso do ATP aos respectivos receptores será mais fácil e com maiores probabilidades de ultrapassar os mecanismos de inactivação.

Além de ser variável na sua importância, o componente noradrenérgico aparece mais tarde. Este facto pode ser explicado, também, pela localização extra-juncional dos receptores noradrenérgicos. Nos tecidos em que o acesso da noradrenalina aos receptores- α pós-juncionais é mais difícil, serão necessárias maiores concentrações de noradrenalina na neurofase para criar um gradiente suficiente que vença as dificuldades de difusão. Isso fará com que o componente noradrenérgico só se evidencie, quando a estimulação eléctrica for mais intensa ou prolongada. Pelo contrário, nos tecidos em que a difusão da noradrenalina é mais fácil, não é necessário criar uma concentração tão elevada, sendo possível que, com estimulações menos intensas, já se observem respostas noradrenérgicas pós-juncionais.

De acordo com esta ideia está o facto da importância relativa da contribuição noradrenérgica aumentar com a frequência de estimulação nervosa (Kennedy *et al.* 1986; Burnstock e Warland 1987; Schwartz e Malik 1989) e com o bloqueio da auto-inibição mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais (Bulloch e Starke 1990).

A difusão de noradrenalina da neurofase como factor condicionante da importância da participação noradrenérgica

A noradrenalina libertada das varicosidades é exposta a um conjunto de receptores e sistemas de transporte que asseguram, por um lado, condições para que a noradrenalina exerça os seus efeitos e, por outro lado, condições para que a

sua presença e os seus efeitos sejam transitórios.

A noradrenalina pode actuar em receptores pré-juncionais (auto-receptores), que modificam a libertação subsequente de neurotransmissores e, em receptores pós-juncionais, que modificam a reactividade das células aferentes. Estão descritos receptores noradrenérgicos pré-juncionais de tipo- α_2 , cuja activação reduz a libertação (Farnebo e Hamberger 1971; Kirpekar e Puig 1971; Langer *et al.* 1971; Starke 1971, 1972) e de tipo- β , cuja activação facilita a libertação (Langer *et al.* 1974; Hedqvist e Moawad 1975). O efeito inibitório mediado pelos auto-receptores- α_2 é o predominante, sendo facilmente observado em diversas condições consideradas semelhantes às fisiológicas e praticamente, em todos os tecidos com inervação noradrenérgica (ver Starke 1987). Os receptores- β pré-juncionais são menos comuns e aparecem, apenas, em alguns tecidos (ver Starke 1977) e, em alguns casos, só se revelam em condições especiais (Guimarães *et al.* 1978).

A noradrenalina, ao contrário do ATP, é removida fundamentalmente, por sistemas de captação (ver Trendelenburg 1972, 1988; Graeffe e Bönisch 1988). A captação neuronal é o sistema mais importante para assegurar a inactivação da noradrenalina e, por essa razão, para controlar a concentração de noradrenalina junto dos receptores noradrenérgicos (Trendelenburg 1972).

Deste modo, existe na neurofase dois sistemas, de cuja actividade resulta uma menor disponibilidade em noradrenalina: a captação neuronal, que remove, da fenda para a varicosidade, a noradrenalina libertada e os auto-receptores- α_2 que promovem uma redução da libertação.

Nestas condições, a inibição da captação neuronal só potenciará as respostas pós-juncionais à estimulação nervosa, se existirem condições para que a noradrenalina, libertada pelos estímulos anteriores, se difunda rapidamente da neurofase. Caso contrário, resultará uma sobre-activação dos receptores- α_2 pré-juncionais. Pela compensação que a auto-inibição exerce, o bloqueio da captação neuronal pode induzir um aumento de duas a três vezes, no efluxo de noradrenalina (Folkow *et al.* 1967; Kahan *et al.* 1984), que poderá não ter tradução num aumento da resposta pós-juncional.

A ocorrência desta compensação foi demonstrada, por exemplo, em arteríolas mesentéricas de Rato, onde a inibição da captação neuronal não modifica a amplitude da resposta à estimulação nervosa (Nilsson 1984), e no canal deferente de Rato e de Ratinho, onde a inibição da captação neuronal reduz a amplitude da resposta contráctil de origem neurogénica, facto atribuído a uma

sobre-activação dos receptores- α_2 pré-juncionais (Marshall *et al.* 1977; Brown *et al.* 1980).

Por interromper a auto-inibição, o bloqueio dos receptores- α_2 pré-juncionais, pode aumentar, também, de duas a cinco vezes a libertação de noradrenalina (Rand *et al.* 1975; Starke *et al.* 1975; Stjärne e Brundin 1977; Kahan *et al.* 1984). Este aumento da libertação pode não se traduzir num aumento da resposta pós-juncional, uma vez que o sistema de captação neuronal pode compensar a maior quantidade de noradrenalina disponível. De acordo com esta hipótese está o facto de, nas arteríolas mesentéricas de Rato, a inibição dos receptores- α_2 pré-juncionais, só provocar um aumento na resposta contráctil à estimulação nervosa, quando a captação neuronal se encontra inibida (Nilsson *et al.* 1985).

O sistema de captação neuronal e a auto-inibição, mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais, poderão agir de uma forma reciprocamente vicariante e assim, controlar eficazmente a concentração de noradrenalina na neurofase. É natural que a eficácia com que interactuam seja tanto maior, quanto mais difícil for a difusão da noradrenalina da neurofase. Quando a difusão é lenta, mais tempo vai a noradrenalina permanecer sob a influência destes dois sistemas e menos provável será a sua acção pós-juncional.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que, nos tecidos em que a participação noradrenérgica é mais importante, a inibição da captação neuronal, ou dos auto-receptores- α_2 traduz-se num aumento mais significativo do efluxo de noradrenalina, do que nos tecidos em que o componente noradrenérgico é menos importante. Porém, quando um destes sistemas (captação neuronal ou auto-receptores) se encontra já bloqueado, a inibição do outro provoca um aumento adicional no efluxo de noradrenalina que é superior nos tecidos que apresentam uma menor participação noradrenérgica na resposta pós-juncional. Este facto é revelador da existência de uma vicariância entre a captação neuronal de noradrenalina e a auto-inibição mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais.

Tal como já atrás se discutiu, nos tecidos em que a importância relativa do componente noradrenérgico é menor, os receptores noradrenérgicos pós-juncionais estão localizados numa zona menos sensível às variações da concentração de noradrenalina na neurofase, nomeadamente, às produzidas pela inibição da captação neuronal. Se existir, também, um controlo mais eficiente sobre a libertação, menores condições existirão para a noradrenalina atingir os receptores pós-juncionais e contribuir para a resposta contráctil à estimulação nervosa.

Na porção epididimal do canal deferente de Rato e na artéria da orelha de Coelho, tecidos onde a participação noradrenérgica é mais significativa, os receptores- α pós-juncionais não só se localizam numa biofase mais influenciável por variações na concentração de noradrenalina na neurofase, como o controlo exercido, pelos mecanismos pré-juncionais, sobre a libertação se revelou menos eficiente. Esta conjugação de factores aumenta as probabilidades da noradrenalina atingir os respectivos receptores pós-juncionais e de participar na resposta à estimulação nervosa.

Como já se referiu e é bem conhecido, a importância relativa do componente noradrenérgico depende das características da estimulação eléctrica. À medida que a frequência de estimulação aumenta, mais importância o componente noradrenérgico adquire (Kennedy *et al.* 1986; Burnstock e Warland 1987; Schwartz e Malik 1989).

É possível que, com o aumento da frequência de estimulação, possa ocorrer uma redução da eficácia dos mecanismos pré-juncionais. Tal pode contribuir para aumentar a facilidade com que a noradrenalina escapa da neurofase e justificar o aumento na importância do componente noradrenérgico com a frequência de estimulação.

O grau de auto-inibição depende da concentração de noradrenalina na fenda sináptica (Enero e Langer 1973; Cubeddu e Weiner 1975). Uma elevação da frequência de estimulação seria um dos procedimentos possíveis para induzir um maior grau de auto-inibição. No entanto, à medida que a frequência de estimulação aumenta, torna-se progressivamente menor o aumento da libertação que os antagonistas- α induzem (ver Langer 1977), o que sugere que, à medida que a frequência aumenta, menor é a eficiência desta auto-inibição.

O sistema de captação neuronal é, também, susceptível de ser influenciado pela frequência de estimulação. Tratando-se de um sistema saturável, um aumento na concentração de noradrenalina na neurofase pode levar a que se atinjam concentrações capazes de saturar este mecanismo de transporte. Por outro lado, trata-se de um sistema de simporte, em que o transporte da amina está acoplado ao de Na^+ (Sammet e Graefe 1979; Friedrich e Bönisch 1986). A despolarização da membrana neuronal, que acompanha a estimulação nervosa, por provocar uma redução no gradiente transmembranar de Na^+ pode induzir um bloqueio não competitivo da captação neuronal (Ungell e Graefe, 1987), efeito esse que será tanto mais marcado, quanto maior a

frequência de estimulação. De acordo com esta ideia está a redução na formação de 3,4-di-hidroxifenilglicol que acompanha o aumento da frequência de estimulação da veia safena de Cão (Brandão e colaboradores, comunicação pessoal).

Se o aumento da frequência de estimulação diminuir a eficiência da captação neuronal e da auto-inibição, serão maiores as probabilidades da noradrenalina escapar da neurofase e atingir os respectivos receptores pós-juncionais. Deste modo, com o aumento da frequência, não só se promoveriam maiores concentrações de noradrenalina na neurofase e, portanto, melhores condições para esta se difundir até aos receptores pós-juncionais, como, por diminuir a eficiência dos mecanismos de controlo, se aumentariam, também, as probabilidades da noradrenalina escapar da neurofase.

A modulação purinérgica da libertação de noradrenalina como factor condicionante da participação noradrenérgica

São vários os estudos que apontam para um envolvimento da adenosina, na modulação da libertação de noradrenalina, nos nervos simpáticos. A adenosina exógena inibe a libertação de noradrenalina, nomeadamente no coração, glândulas salivares e canal deferente de Rato, coração e canal deferente de Cobaia, tecido adiposo de Cão (Hedqvist e Fredholm 1976; Clanachan *et al.* 1977; Wakade e Wakade 1978; Khan e Malik 1980; Fredholm *et al.* 1982) e em diversos vasos, nomeadamente, na veia porta de Rato, na de Coelho, na veia safena de Cão, na artéria pulmonar e na aorta de Coelho (Enero e Saidman 1977; Verhaeghe *et al.* 1977; Su 1978; Wakade e Wakade 1978; Moylan e Westfall 1979; Husted e Nedergaard 1981).

A adenosina endógena, pelo menos em algumas condições, poderá activar este sistema de modulação. A inibição da captação de adenosina e/ou a inibição da sua desaminação, promove uma redução do efluxo de noradrenalina induzido pela estimulação eléctrica transmural da veia porta (Enero e Saidman 1977) e do canal deferente de Rato (Clanachan e Marshall 1980). Por outro lado, a inibição dos receptores da adenosina promove um aumento do efluxo de noradrenalina a partir da artéria pulmonar (Katsuragi e Su 1982), do rim de Coelho (Hedqvist *et al.* 1978) e da veia porta de Rato (Moylan e Westfall 1979).

Embora o efeito inibitório da adenosina seja o mais bem conhecido (ver Fredholm e Dunwiddie 1988), existem alguns resultados que sugerem que a adenosina pode exercer, também, uma acção facilitatória sobre a libertação de neurotransmissores.

Na artéria da orelha de Coelho, o efluxo de noradrenalina e de 3,4-dihidroxifenilglicol, induzidos pela estimulação nervosa, são aumentados pela adenosina (Miyahara e Suzuki 1987; Zhang *et al.* 1989).

Em fatias de cerebelo, o desacoplamento dos receptores A_1 à G_i , mediante o uso de toxina pertússica, transforma em facilitatória, a acção inibitória sobre a libertação de glutamato da fenilisopropiladenosina (Dolphin e Prestwich 1985). Este facto sugere o envolvimento de receptores da adenosina numa acção facilitatória, efeito que, em condições normais, poderá ser encoberto pelo efeito inibitório.

Ribeiro e colaboradores, utilizando a junção frénico-diafragma de Rato e recorrendo a agonistas e antagonistas selectivos, demonstraram a co-existência, a nível pré-juncional, de receptores de tipo A_1 e A_2 . Os receptores de tipo A_2 medeiam um efeito facilitatório sobre a libertação de acetilcolina (Correia-de-Sá *et al.* 1991).

No presente trabalho, os resultados obtidos demostram que, nos tecidos em que o componente noradrenérgico é menos importante, a adenosina endógena exerce um efeito inibitório sobre a libertação de noradrenalina.

Apesar de alguns trabalhos indicarem a existência, a nível pré-juncional, de receptores para ATP, susceptíveis de inibirem a libertação de noradrenalina (Shinozuka *et al.* 1988 1990; von Kügelgen *et al.* 1989), a modulação observada no nosso estudo parece ser devida à adenosina e não ao ATP. Esta conclusão fundamenta-se no facto do dipiridamol, um inibidor da captação de adenosina (Wu e Phillis 1984), acentuar o efeito evidenciado pelo antagonista dos receptores da adenosina.

Nestas condições, a modulação purinérgica é mais um sistema de modulação que, pelos seus efeitos inibitórios, poderá condicionar uma menor acumulação de noradrenalina na neurofase, contribuindo, também, para tornar menos provável a difusão da noradrenalina para a biofase onde se localizam os receptores- α pós-juncionais.

Confronto da hipótese aqui sugerida com outras já existentes

Burnstock e colaboradores têm defendido a hipótese de que, as diferenças na importância relativa da participação noradrenérgica e purinérgica na resposta pós-juncional, se devem a diferenças no conteúdo em noradrenalina e ATP das vesículas, ou dos nervos (ver Burnstock 1990a). Segundo os mesmos autores, o facto de, num dado tecido, o componente noradrenérgico aumentar mais com a frequência de estimulação do que aumenta o componente purinérgico, dever-se-ia à existência de subpopulações de vesículas com diferente proporção de ATP e noradrenalina. Com frequências de estimulação baixas seriam mobilizadas as vesículas mais ricas em ATP. Aumentando a frequência mobilizar-se-iam as mais ricas em noradrenalina (Burnstock e Warland 1987; Ellis e Burnstock 1990).

Esta hipótese assenta, fundamentalmente, em descrições que referem que alguns neuromoduladores influenciam de forma distinta o efluxo de ATP e de noradrenalina. De entre esses neuromoduladores contam-se a prostaglandina E₂ (PGE₂), as angiotensinas II e III e o péptido codificado por gene semelhante ao da calcitonina (CGRP; calcitonin gene-related peptide).

No canal deferente de Cabaia, Ellis e Burnstock (1990) demonstraram que a PGE₂ aumenta o efluxo de ATP, induzido pela estimulação eléctrica a 2 Hz, mas reduz o de noradrenalina. Sobre o efluxo induzido pela estimulação a 20 Hz, a PGE₂ não modifica, significativamente, o efluxo de ATP enquanto que continua a reduzir o efluxo de noradrenalina.

Este conjunto de resultados foi atribuído a diferenças, na distribuição de ATP e noradrenalina, pelas varicosidades existentes nos nervos simpáticos. A PGE₂ facilitaria a exocitose das vesículas que contêm mais ATP e inibiria a exocitose das vesículas que contêm mais noradrenalina. À medida que a frequência de estimulação aumenta, o efeito facilitatório diminuiria, sem se alterar o efeito inibitório. Deste modo, a modulação sobre as vesículas que contêm mais ATP, só se poderia observar com baixas frequências de estimulação.

No canal deferente de Cabaia, a angiotensina II aumenta o efluxo de ATP e de noradrenalina, induzido pela estimulação eléctrica (frequência de 2 Hz). Porém, a 20 Hz, a angiotensina II apenas aumenta o efluxo de noradrenalina.

A angiotensina III, o metabolito activo da angiotensina II, reduz o efluxo de ATP, mas aumenta o de noradrenalina, induzido pela estimulação eléctrica a 2 Hz, enquanto que, a 20 Hz, apenas o efluxo de noradrenalina é influenciado.

Estes resultados foram interpretados, também, pela diferente distribuição do ATP e da noradrenalina pelas vesículas simpáticas. A exocitose dessas vesículas seria modulada de forma diferente pelas angiotensinas. A angiotensina III facilitaria a exocitose das vesículas que contêm mais noradrenalina e inibiria a exocitose das que contêm mais ATP. A modulação da exocitose, das vesículas que contêm mais ATP, seria mais eficiente para as baixas frequências de estimulação (Ellis e Burnstock 1989b).

Ainda no canal deferente de Cabaia, o CGRP reduz o efluxo de ATP induzido pela estimulação eléctrica a 2 Hz, mas não influencia o efluxo de noradrenalina. O efluxo de ATP, induzido pela estimulação eléctrica a 20 Hz, já não é, significativamente, reduzido pelo CGRP.

Estes resultados foram, também, considerados como indicadores da existência de distintos compartimentos de armazenagem de ATP e de noradrenalina, sujeitos a diferentes processos de modulação (Ellis e Burnstock 1989a). O CGRP seria um modulador exclusivo da exocitose das vesículas que contêm mais ATP.

Todos estes resultados foram obtidos no canal deferente de Cabaia, o que levanta a questão de que possam ser exclusivos deste tecido. De facto, no canal deferente de Coelho, a PGE₂ apresenta efeitos diferentes dos observados no de Cabaia: o componente noradrenérgico e o componente purinérgico são inibidos de igual modo (Trachte 1985).

Porém, esta discordância de resultados pode ser explicada, não pelas diferenças teciduais, mas pelas diferenças dos protocolos utilizados. Enquanto que Trachte avaliou apenas as respostas pós-juncionais, os outros investigadores (Ellis e Burnstock 1989a, b, 1990) fornecem dados para uma análise mais global, uma vez que avaliaram, simultaneamente, a influência dos neuromoduladores sobre as respostas pós-juncionais à estimulação nervosa, sobre as respostas a agonistas exógenos e sobre o efluxo de ATP e de noradrenalina. Contudo, a explicação proposta por estes autores é questionável em alguns pontos fundamentais.

Alegam estes autores que, no canal deferente de Cabaia, todo o ATP presente no efluxo tem origem neuronal e que a técnica usada para o doseamento de ATP [a de Stanley e Williams (1969), que utiliza o sistema luciferina-luciferase], permite excluir as interferências das purinas libertadas de estruturas não neuronais (Ellis e Burnstock 1989b). Estes pressupostos, essenciais para a interpretação que fazem dos resultados, são muito discutíveis.

Sabe-se que a estimulação nervosa induz a libertação de purinas, em quantidades proporcionais à intensidade da resposta (Luchelli-Fortis *et al.* 1979). De entre essas purinas ocorre, também, libertação de ATP (Su 1975; Westfall *et al.* 1987; Vizi e Burnstock 1988; Sedaa *et al.* 1990). Apesar da argumentação em contrário, o canal deferente de Cobia não parece ser um tecido onde o ATP tenha, exclusivamente, uma proveniência neuronal. Westfall e colaboradores (1978) demonstraram, neste tecido, que se a resposta contráctil à estimulação eléctrica for impedida, há uma redução significativa no efluxo de purinas. Este facto é muito a favor de que uma parte do ATP, presente no efluxo, tem origem não neuronal.

Por outro lado, a utilização da técnica da luciferina-luciferase permite, de facto, quantificar o efluxo de ATP de modo mais selectivo. Tratando-se de uma reacção específica para o ATP, os outros nucleotídeos ou nucleosídeos da adenina não interferem no doseamento, o que não se consegue evitar quando se utiliza a marcação com adenosina tritiada. Porém, a selectividade do método termina aí. Qualquer molécula de ATP presente no efluxo, independentemente da sua origem neuronal ou extra-neuronal, reage com a luciferina. Não é possível, por isso, afirmar que, com este método, se anula a interferência do ATP extra-neuronal.

Nem tão pouco as interferências do ATP de origem extra-neuronal são de desprezar. Na artéria aorta de Coelho, as estruturas não neuronais, mesmo excluindo o endotélio, participam para o efluxo de nucleosídeos e nucleotídeos de adenina, com uma contribuição mais de duas vezes superior à contribuição das estruturas neuronais (Sedaa *et al.* 1990). O ATP de origem pós-juncional pode vir das células do músculo liso (Westfall *et al.* 1978; 1987; Levitt e Westfall 1982) ou resultar da activação dos receptores- α pós-juncionais (Vizi e Burnstock 1988; Sedaa *et al.* 1990; Shinozuka *et al.* 1991).

A diversidade de procedências do ATP torna difícil a interpretação dos efeitos neuromoduladores com base no efluxo deste nucleotídeo. A interpretação ainda se torna mais difícil, quando esses neuromoduladores interferem com as respostas pós-juncionais ou têm um perfil farmacológico mal conhecido. É o caso de todos os neuromoduladores usados nos estudos que sustentam a hipótese da existência de diferentes vesículas, ou diferentes nervos, para o ATP e para a noradrenalina.

Em diversos tecidos a PGE₂ inibe a libertação de noradrenalina dos nervos simpáticos (Stjärne 1973). Além desta acção inibidora, a PGE₂ apresenta, também, uma acção amplificadora sobre as respostas pós-juncionais (von Euler e Hedqvist 1969; Ambache e Zar 1970; Ellis e Burnstock 1990).

A PGE₂ potencia a resposta pós-juncional à noradrenalina e ao α,β -metileno ATP. Se essa potenciação for exercida pelo mesmo mecanismo pelo qual a 5-hidroxitriptamina potencia a noradrenalina, é de esperar que quanto menor for a amplitude da resposta mais pronunciada seja a potenciação (ver Paiva 1989).

Ellis e Burnstock (1990a) não referem a tensão desenvolvida pela resposta à estimulação nervosa ou aos agonistas exógenos. A comparação entre a tensão desenvolvida pela contracção causada por um estímulo de 2 Hz e de 20 Hz é, também, impossível de fazer. No entanto, a avaliar pelos valores do efluxo de ATP e de noradrenalina, é de esperar que, a 20 Hz, a resposta contráctil seja mais ampla do que a 2 Hz, sendo, por isso, de esperar menor potenciação com esse estímulo. O que se observa no trabalho de Ellis e Burnstock (1990) é que a PGE₂ inibe tanto a libertação de noradrenalina produzida por 2 Hz, como a produzida por 20 Hz.

Porém, a PGE₂, por amplificar a resposta pós-juncional, poderá promover um aumento no efluxo de ATP de origem não neuronal. O ATP proveniente das estruturas pós-juncionais poderá mascarar a redução na libertação de ATP neuronal. Com a resposta causada pelo estímulo a 20 Hz há condições menos favoráveis para a PGE₂ potenciar a resposta pós-juncional (e gerar ATP extra-neuronal). Nestas condições, o aumento de ATP, com origem pós-juncional, poderá não ser suficiente para compensar uma diminuição da libertação de ATP neuronal.

A angiotensina II aumenta, significativamente, a amplitude da resposta contráctil do canal deferente de Cobaia à estimulação eléctrica, à noradrenalina e ao α,β -metileno ATP (Ellis e Burnstock 1989b). A angiotensina aumenta, por um lado, a libertação de ATP e, por outro lado, amplifica as respostas pós-juncionais. A resposta contráctil induzida pela estimulação com 20 Hz é menos amplificada, do que a resposta induzida pela estimulação com 2 Hz. O facto da angiotensina II não aumentar o efluxo de ATP induzido pela estimulação com 20 Hz, pode apenas dever-se ao facto de haver uma menor amplificação da resposta pós-juncional ou, ao facto, do efluxo de ATP estar muito mais elevado, o que

dificultaria a observação de novos aumentos de efluxo.

A angiotensina III, ao contrário da angiotensina II, apenas aumenta o efluxo de noradrenalina, reduzindo o de ATP (Ellis e Burnstock 1989b). Porém, o componente purinérgico da resposta contráctil não é reduzido. Esta discordância poderá indicar que o componente do efluxo de ATP, que é de facto reduzida não é o directamente envolvido na resposta pós-juncional. Isto equivale a dizer que, apesar do efluxo de ATP ter diminuído mais de 3 vezes, a libertação neuronal de ATP poderá até ter aumentado. Por inibir a formação pós-juncional de purinas, a angiotensina III poderá impedir a influência inibitória desse modulador endógeno sobre a libertação (Trachte e Heller 1990; Shinozuka *et al.* 1991). Tal explicaria, porque é que a angiotensina III aumenta mais o efluxo de noradrenalina, do que a angiotensina II.

O CGRP inibe o componente purinérgico da resposta contráctil à estimulação nervosa, assim como, a resposta ao α,β -metileno ATP (Ellis e Burnstock 1989a). É possível que a diminuição no efluxo de ATP se deva também à redução da resposta pós-juncional. A redução provocada pelo CGRP na amplitude do componente purinérgico, da resposta contráctil à estimulação nervosa pode ser a causa e não a consequência da redução no efluxo de ATP.

A comparação entre a participação purinérgica e a noradrenérgica, em respostas induzidas por estímulos não eléctricos, pode também ser usada como apoio para a hipótese que defende a existência de vesículas com mais ATP e outras com mais noradrenalina. Recentemente, Bültman e colaboradores demonstraram que, na artéria ileocólica de Coelho, respostas pós-juncionais com a mesma amplitude, induzidas por estimulação eléctrica e por agonistas nicotínicos, apresentavam, em ambos os casos, um componente purinérgico e um noradrenérgico. Porém, enquanto que na resposta à estimulação eléctrica, o componente purinérgico predominava, na resposta à nicotina predominava o noradrenérgico (Bültmann *et al.* 1991).

Estes resultados poderão sugerir que, com a nicotina, se mobilizam vesículas com um conteúdo mais rico em noradrenalina do que as mobilizadas pela estimulação eléctrica. Tal, explicaria a maior importância do componente noradrenérgico nas respostas induzidas pela nicotina.

A libertação induzida pela nicotina foi atribuída à activação de receptores pré-juncionais, do que resultaria uma despolarização, a entrada de Ca^{2+} e a exocitose dos neurotransmissores (ver Bültmann *et al.* 1991). Porém, a

libertação pela nicotina não parece ser induzida por um mecanismo apenas. Envolve uma libertação sensível à tetrodotoxina e dependente do Ca^{2+} , mas também, uma libertação não dependente da despolarização, provavelmente por um mecanismo semelhante ao da tiramina (ver Starke 1977).

Nestas circunstâncias, não é de estranhar que a nicotina produza uma resposta com participação noradrenérgica diferente da produzida pela estimulação eléctrica. A libertação induzida pela nicotina deverá ser mais rica em noradrenalina, uma vez que, além da activação da exocitose (que mobiliza noradrenalina e ATP), vai deslocar a noradrenalina das vesículas. Com uma mistura de neurotransmissores mais rica em noradrenalina é normal que o componente noradrenérgico seja mais significativo, não sendo necessário alegar a mobilização de diferentes populações de vesículas.

Na situação actual, embora não se possa negar definitivamente, não é muito consistente a hipótese que pretende explicar a diferente participação noradrenérgica e purinérgica com base na heterogeneidade do conteúdo das vesículas em noradrenalina e em ATP. Por mais aliciante que seja a ideia de que há vesículas preferencialmente purinérgicas e outras preferencialmente noradrenérgicas, não há suporte experimental que a prove.

Neste estudo, pensamos ter demonstrado que os mecanismos classicamente conhecidos poderão justificar porque é que a importância da participação noradrenérgica pode variar de tecido para tecido e, também, com as características da estimulação nervosa.

Resumo

Este estudo realizou-se com o objectivo de tentar explicar, porque é que, em alguns tecidos em que a noradrenalina e o ATP actuam como co-transmissores, é o componente noradrenérgico que predomina na resposta contráctil à estimulação nervosa, enquanto que em outros, é o componente purinérgico o predominante.

Utilizaram-se quatro tecidos diferentes: a porção epididimal do canal deferente de Rato, a artéria da orelha de Coelho (tecidos onde predomina o componente noradrenérgico), a porção prostática do canal deferente de Rato e a artéria jejunal de Coelho (tecidos onde predomina o componente purinérgico).

Em todos os tecidos foram determinados: o conteúdo em noradrenalina, a acumulação e a fracção de libertação de noradrenalina- ^3H , a influência da inibição da captação neuronal sobre o efeito pós-juncional de algumas aminas simpaticomiméticas, a influência da inibição da captação neuronal e da auto-inibição (mediada pelos receptores- α_2 pré-juncionais) sobre a fracção de libertação da noradrenalina- ^3H , a influência da inibição dos receptores e da captação de adenosina sobre a libertação de noradrenalina. Apenas no canal deferente de Rato, avaliou-se, ainda, a influência da inibição da captação neuronal sobre o efeito pré-juncional de algumas aminas simpaticomiméticas e realizou-se um estudo ultra-estrutural.

O conteúdo em noradrenalina foi de $17,4 \pm 1,1$, $23,2 \pm 1,2$, $3,1 \pm 0,2$ e $4,8 \pm 0,8$ $\mu\text{g.g}^{-1}$ ($n=12$), na porção epididimal, na porção prostática, na artéria da orelha e na artéria jejunal, respectivamente. As diferenças entre os conteúdos da porção prostática e da porção epididimal, por um lado e entre os da artéria da orelha e os da jejunal, por outro, foram estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

A quantidade de noradrenalina- ^3H acumulada nos tecidos, após incubação durante uma hora, num meio contendo $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de noradrenalina- ^3H , foi de

$1,28 \pm 0,12$, $1,90 \pm 0,16$, $5,76 \pm 0,35$ e $4,82 \pm 0,82 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n=6$), na porção prostática, na porção epididimal, na artéria jejunal e na artéria da orelha, respectivamente. A quantidade de noradrenalina- ^3H acumulada na porção epididimal foi estatisticamente superior à acumulada na porção prostática; igualmente, a acumulação de noradrenalina- ^3H foi maior na artéria jejunal do que na artéria da orelha ($P < 0,05$).

As fracções de libertação de noradrenalina- ^3H , induzidas pela estimulação eléctrica dos tecidos foram ($\times 10^{-5}$) $1,88$ ($1,76 - 2,01$), $2,01$ ($1,57 - 2,55$) ($n=6$), $1,22$ ($0,85 - 1,74$) ($n=6$) e $1,53$ ($1,13 - 2,07$) ($n=6$), na porção prostática, na porção epididimal, na artéria jejunal e na artéria da orelha, respectivamente.

A inibição da captação neuronal potenciou, mais intensamente, os efeitos pós-juncionais da noradrenalina, adrenalina e α -metilnoradrenalina, na porção epididimal do que na porção prostática do canal deferente de Rato (respectivamente, 9,3 e 2,8 vezes para a noradrenalina, 6,5 e 2,2 vezes para a adrenalina e 4,1 e 1,5 vezes para a α -metilnoradrenalina). Nas artérias, a inibição da captação neuronal aumentou os efeitos à noradrenalina apenas na artéria da orelha (cerca de 3,0 vezes e à noradrenalina cerca de 2,3 vezes à adrenalina), não aumentando as respostas a estas aminas na artéria jejunal.

A inibição da captação neuronal aumentou de forma semelhante, na porção epididimal e na porção prostática, os efeitos da adrenalina e da α -metilnoradrenalina mediados pelos receptores- α_2 pré-juncionais (respectivamente, 73 e 94 vezes, para a adrenalina e 35 e 41 vezes, para a α -metilnoradrenalina).

A inibição da captação neuronal aumentou significativamente, a fracção de libertação de noradrenalina- ^3H , apenas na porção epididimal e na artéria da orelha. Com a captação neuronal inibida, as fracções de libertação foram, na porção epididimal de $4,27$ ($3,22 - 5,67$), enquanto que na artéria da orelha, foram de $2,45$ ($2,13 - 2,82$), respectivamente.

O bloqueio dos receptores- α_2 pré-juncionais causou um aumento da fracção de libertação, quer nas preparações com a captação neuronal operante, quer nas preparações com a captação neuronal inibida. Porém, ampliou mais o efeito exercido pelo bloqueio da captação neuronal na porção prostática, do que na porção epididimal e na artéria jejunal mais do que na da orelha. Os aumentos da fracção de libertação, induzidos pelo bloqueio da auto-inibição, foram, na porção epididimal de 1,6 e 2,2 vezes; na porção prostática foram de 1,4 e 2,4 vezes; na artéria da orelha foram de 1,6 e 1,6 vezes; na artéria jejunal foram de 1,41 e 2,8

vezes, respectivamente, sem e com a captação neuronal inibida.

O bloqueio dos receptores da adenosina modificou, em todos os tecidos, o efluxo de noradrenalina induzido por estimulação eléctrica. Porém, enquanto que na porção prostática e na artéria jejunal, o efluxo aumentou, respectivamente, 2,2 e 1,3 vezes, na porção epididimal e na artéria da orelha o efluxo diminuiu, respectivamente, 1,3 e 1,5 vezes. Por outro lado, o bloqueio da captação da adenosina produziu efeitos antagónicos aos do antagonista dos receptores da adenosina. Na porção prostática e na artéria jejunal esse bloqueio reduziu o efluxo de noradrenalina 1,5 e 1,2 vezes, respectivamente. Na porção epididimal e na artéria da orelha, a inibição da captação de adenosina aumentou o efluxo da noradrenalina, respectivamente, 1,3 e 1,6 vezes.

O estudo ultra-estrutural revelou uma maior abundância das varicosidades e de fendas estreitas na porção prostática, mas não revelou formações exclusivas em nenhuma das porções do canal deferente.

Concluiu-se que, nos tecidos que apresentam uma fraca contribuição noradrenérgica na resposta contráctil à estimulação eléctrica, os receptores- α pós-juncionais são menos influenciados pela noradrenalina libertada ou porque estão mais longe das varicosidades ou porque o acesso da noradrenalina, libertada das varicosidades, é mais difícil. Propõe-se que a maior ou menor facilidade da noradrenalina libertada atingir os receptores- α pós-juncionais pode ser um dos parâmetros que condiciona a importância relativa da participação noradrenérgica e a variação desta importância de tecido para tecido.

Summary

This study was undertaken in an attempt to explain why in some tissues, where noradrenaline and ATP act as cotransmitters, the noradrenergic component predominates, while in others, the predominant component is the purinergic one.

Four different tissues were used in these experiments: the epididymal portion of the rat vas deferens and the rabbit ear artery, tissues where the noradrenergic component predominates, and the prostatic portion of the rat vas deferens and the rabbit jejunal artery, where the purinergic component predominates.

The noradrenaline content, the capacity to accumulate ^3H -noradrenaline, the fractional release of noradrenaline elicited by electrical stimulation, and the influence exerted by inhibition of neuronal uptake and of autoreceptors on noradrenaline outflow, were studied. Additionally, the influence exerted by the inhibition of adenosine receptors, and of adenosine uptake, on the release of noradrenaline was also studied. In different kind of experiments, the influence exerted by inhibition of neuronal uptake on pre- (only in the vas deferens) and postjunctional effects of adrenaline and α -methylnoradrenaline (and/or noradrenaline) was compared in the different tissues. A ultrastructural study was also performed in the prostatic and in the epididymal portions of the rat vas deferens.

The noradrenaline content of the tissues was 17.4 and 23.2 for the epididymal and the prostatic portions of the rat vas deferens, respectively, and 3.1 and 4.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n=12$), for the ear and jejunal arteries of the rabbit, respectively. The differences between the contents of the prostatic and of the epididymal portions on the one hand and between the contents of the jejunal and of the ear arteries, on the other hand, were significant ($P<0.05$).

After incubation of the tissues with 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ^3H -noradrenaline, during 60 min, the accumulation of noradrenaline was: 1.28 ± 0.12 , 1.90 ± 0.16 , 5.76 ± 0.35 , and $4.82 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($n=6$), for the prostatic and the epididymal portions of the rat vas deferens, and for the jejunal and the ear arteries of the rabbit, respectively. The ^3H -noradrenaline accumulation in the epididymal portion was higher than in the prostatic portion as well as the accumulation in the jejunal was higher than in the ear arteries ($P<0.05$).

The fractional release of ^3H -noradrenaline evoked by electrical stimulation ($\times 10^{-5}$) was: 1.88 (1.76 - 2.01), 2.01 (1.57 - 2.55), 1.22 (0.85 - 1.74), and 1.53 (1.13 - 2.07) ($n=6$), in the prostatic and in the epididymal portions of the rat vas deferens and in the jejunal and in the ear arteries of the rabbit, respectively.

Inhibition of neuronal uptake enhanced the postjunctional effect of noradrenaline, adrenaline and α -methylnoradrenaline more in the epididymal than in the prostatic portions of the rat vas deferens (9.3 and 2.8 times respectively, for noradrenaline, 6.5 and 2.2 times, respectively, for adrenaline, and 4.1 and 1.5 times, respectively, for α -methylnoradrenaline). In the arterial tissues, inhibition of neuronal uptake enhanced the effect of noradrenaline 3.0 and that of adrenaline by 2.3 times in the ear artery, while it did not modify the responses to these amines in the jejunal artery.

Inhibition of neuronal uptake caused very pronounced and similar enhancements of prejunctional effects of the amines in the epididymal and in the prostatic portions (73 and 94 times, respectively, for adrenaline, and 35 and 41 times, respectively, for α -methylnoradrenaline).

The inhibition of neuronal uptake increased the fractional release of ^3H -noradrenaline, induced by electrical stimulation, only in the epididymal portion of the rat vas deferens and in the ear artery. However, in tissues with the neuronal uptake of noradrenaline inhibited, blockade of α_2 -autoreceptors caused an additional and identical increase of noradrenaline release in both portions of the rat vas deferens. On the rabbit arteries, blockade of α_2 -autoreceptors caused a larger increase of noradrenaline release in the jejunal than on the ear artery.

Inhibition of adenosine receptors caused a significant increase of noradrenaline release upon electrical stimulation from the prostatic portion of the rat vas deferens and from the jejunal artery while it decreased noradrenaline release from the epididymal portion of the rat vas deferens and from the jejunal artery. The opposite effect was caused by inhibition of adenosine uptake: a decrease of noradrenaline release in the prostatic portion of the rat vas deferens and in the jejunal artery and an increase of noradrenaline release in the epididymal portion and in the ear artery.

The ultrastructural study shown that the density of varicosities is higher in the prostatic than in the epididymal portion of the rat vas deferens. Furthermore, the proportion of varicosities which are intimately connected to muscle cells (at a distance lower than 20 nm) is also higher in the prostatic portion.

We conclude that, in tissues where neurogenic contractions have a poor noradrenergic component, postjunctional α -adrenoceptors are less influenced by noradrenaline released from sympathetic varicosities, because they are more distant from the varicosities, or because the access of released noradrenaline is more difficult. It is suggested that the more or less difficult access of released noradrenaline to postjunctional α -adrenoceptors can help to explain why the relative importance of the noradrenergic component varies from tissue to tissue.

Bibliografia

- Aberer W, Kostron H, Huber E, Winkler H (1978) A characterization of the nucleotide uptake by chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J* 172: 353-360
- Aberer W, Stitzel R, Winkler H, Huber E, (1979) Accumulation of [^3H] ATP in small dense core vesicles of superfused vasa deferentia. *J Neurochem* 33: 797-801
- Allcorn RJ, Cunnane TC, Kirkpatrick K (1986) Actions of α,β -methylene ATP and 6-hydroxypamine on sympathetic neurotransmission in the vas deferens of the guinea-pig, rat and mouse: support for co-transmission. *Br J Pharmacol* 89 : 647-659
- Ambache N, Zar MA (1970) An inhibitory effect of prostaglandin E_2 on neuromuscular transmission in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol (Lond)* 208: 30P-32P
- Ambache N, Zar M, Aboo M (1971) Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol (Lond)* 216: 359-389
- Ambache N, Dunk LP, Verney J, Zar A (1972) Inhibition of post-ganglionic motor transmission in vas deferens by indirectly acting sympathomimetic drugs. *J Physiol (Lond)* 227: 433-456

- Angus J (1982) Sympathetic vasoconstriction - no role for α -adrenoceptors ?
Trends Pharmacol Sci 3: 464-465
- Åstrand P, Stjärne L (1989) ATP as a sympathetic cotransmitter in rat vasomotor nerves - further evidence that individual release sites respond to nerve impulses by intermittent release of single quanta. Acta Physiol Scand 136: 355-365
- Bentley GA, Smith G (1967) Effects of alpha adrenergic receptor blocking drugs on the response of vas deferens and arterial muscle to sympathetic drugs and stimulation. Circ Res 20-21, sup 3: 101-108
- Bevan JA, Ljung B (1973) Longitudinal propagation of myogenic activity in rabbit arteries and in the rat portal vein. Acta Physiol Scand 90: 703-715
- Bevan JA, Purdy RE (1973) Variations in adrenergic innervation and contractile responses of the rabbit saphenous artery. Circ Res 32: 746-571
- Bevan JA, Su C (1971) Distribution theory of resistance of neurogenic vasoconstriction to alpha-receptor blockade in the rabbit. Circ Res 28:179-187
- Bevan JA, Su C (1973) Sympathetic mechanisms in blood vessels: nerve and muscle relationships. Ann Rev Pharmacol 13: 269-285
- Bevan JA, Su C (1974) Variation of intra- and perisynaptic adrenergic transmitter concentrations with width of synaptic cleft in vascular tissue. J Pharmacol Exp Ther 190: 30-38
- Bevan JA, Török J (1970) Movement of norepinephrine through the media of rabbit aorta. Circ Res 27: 325-331
- Bevan JA, Bevan RD, Duckles SP (1980) Adrenergic regulation of vascular smooth muscle. In: Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV Jr (eds) Vascular smooth muscle. American Physiological Society, Bethesda (Handbook of physiology, vol II, sect 2), pp 515-566

- Blakeley AGH, Cunnane TC (1979) The packeted release of transmitter from the sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens: an electrophysiological study. *J Physiol (Lond)* 296: 85-96
- Blakeley AGH, Brown DA, Cunnane TC, French AM, McGrath JC, Scott NC (1981) Effects of nifedipine on electrical and mechanical responses of rat and guinea-pig vas deferens. *Nature* 294: 759-761
- Blaschko H, Born GVR, D'Lorio A, Eade NR (1956) Observations on the distribution of catecholamines and adenosine triphosphate in the bovine adrenal medula. *J Physiol (Lond)* 133: 548-557
- Brizzolara AL, Burnstock G (1990) Evidence for noradrenergic-purinergic cotransmission in the hepatic artery of the rabbit. *Br J Pharmacol* 100: 835-839
- Brown J, Doxey JC, Handley S (1980) Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists and of antidepressant drugs on pre- and postsynaptic α -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 67: 33-40
- Bulloch JM, McGrath JC (1988) Blockade of vasopressor and vas deferens responses by α,β -methylene ATP in the pithed rat. *Br J Pharmacol* 94: 103-108
- Bulloch JM, Starke K (1990) Presynaptic α_2 -autoinhibition in a vascular neuroeffector junction where ATP and noradrenaline act as co-transmitters. *Br J Pharmacol* 99: 279-284
- Bültmann R, von Kügelgen I, Starke K (1991) Noradrenaline and ATP as cotransmitters of nicotine-evoked vasoconstriction in rabbit ileocolic arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (em publicação)
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-581
- Burnstock G (1976) Do some nerves release more than one transmitter? *Neuroscience* 1: 239-248

- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L (eds) Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. Raven Press, New York, pp 107-118
- Burnstock G (1990a) Co-transmission. Arch Int Pharmacodyn 304: 7-33
- Burnstock G (1990b) Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. Neurochem Int 17: 357-368
- Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? Gen Pharmacol 16: 433-440
- Burnstock G, Warland JJI (1987) A pharmacological study of the rabbit saphenous artery in vitro: a vessel with a large purinergic contractile response to sympathetic nerve stimulation. Br J Pharmacol 90: 111-120
- Burnstock G, Campbell G, Satchell DG, Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. Br J Pharmacol 40: 668-688
- Burnstock G, Cocks T, Crowe R, Kasakov L (1978) Purinergic innervation of the guinea pig urinary bladder. Br J Pharmacol 63: 125-138
- Burnstock G, Crowe R, Wong HK (1979) Comparative pharmacological and histochemical evidence for purinergic inhibitory innervation of the portal vein of the rabbit, but not guinea-pig. Br J Pharmacol 65: 377-388
- Burnstock G, Crowe R, Kennedy C, Török J (1984) Indirect evidence that purinergic modulation of perivascular adrenergic neurotransmission in the portal vein is a physiological process. Br J Pharmacol 82: 359-368
- Cambridge B (1981) UK-14,304, a potent and selective α_2 agonist for the characterization of α -adrenoceptor subtypes. Eur J Pharmacol 72: 413-415

- Campbell G (1987) Cotransmission. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 27: 51-70
- Casteels R, Kitamura K, Kuriyama H, Suzuki H (1977) The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J Physiol (Lond)* 271: 41-62
- Cheung DW (1982) Two components in the cellular response of the rat tail artery to nerve stimulation. *J Physiol (Lond)* 328: 461-468
- Clanachan AS, Marshall RJ (1980) Potentiation of the effects of adenosine on isolated cardiac and smooth muscle by diazepam. *Br J Pharmacol* 71: 459-466
- Clanachan AS, Johns A, Paton DM (1977) Presynaptic inhibitory actions of adenine nucleotides and adenosine on neurotransmission in the rat vas deferens. *Neuroscience* 2: 597-602
- Correia-de-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA (1991) Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. *Br J Pharmacol* (em publicação)
- Cubeddu LX, Weiner N (1975) Nerve-stimulation mediated overflow of norepinephrine and dopamine- β -hydroxylase III. Effects of norepinephrine depletion on the alpha presynaptic regulation of release. *J Pharmacol Exp Ther* 192: 1-4
- Cubeddu LX, Barnes EM, Langer SZ, Weiner N (1974) Release of norepinephrine and dopamine- β -hydroxylase by nerve stimulation I. Role of neuronal and extraneuronal uptake and of alpha presynaptic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 190: 431-450
- Cunnane TC, Stjärne L (1984) Transmitter secretion from individual varicosities of guinea-pig and mouse vas deferens: highly intermittent and monoquantal. *Neuroscience* 13: 1-20

- Dale HH (1935) Pharmacology and nerve endings. *Proc R Soc Med* 28: 319-332
- Daly JW, Padgett W, Shanib MT, Butts-Lamb P, Waters J (1985) 1,3-Dialkyl-8-(p-sulphophenyl)xanthine: potent water soluble antagonist for A₁- and A₂-adenosine receptors. *J Med Chem* 28: 487-496
- Dolphin AC, Prestwich SA (1985) Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release. *Nature* 316: 148-150
- Douglas WW, Poisner AM (1966) Evidence that the secreting adrenal chromaffin cell releases catecholamines directly from ATP-rich granules. *J Physiol (Lond)* 183: 236-248
- Droogmans G, Raemackers L, Casteels R (1977) Electro and pharmacomechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery. *J Gen Physiol* 70: 129-148
- Duval N, Hicks PE, Langer SZ (1985) Inhibitory effects of α,β -methylene ATP on nerve-mediated contractions of the nictitating membrane in reserpinised cats. *Eur J Pharmacol* 110: 373-377
- Edwards FR, Hards D, Hirst GDS, Silverberg GD (1989) Noradrenaline (gamma) and ATP responses of innervated and non-innervated rat cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 96: 785-788
- Elliot TR (1905) The action of adrenalin. *J Physiol* 32: 401-467
- Ellis JL, Burnstock G (1989a) Modulation of neurotransmission in the guinea-pig vas deferens by capsaicin: involvement of calcitonin gene-related peptide and substance P. *Br J Pharmacol* 98: 707-713
- Ellis JL, Burnstock G (1989b) Angiotensin neuromodulation of adrenergic and purinergic co-transmission in the guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* 97: 1157-1164
- Ellis JL, Burnstock G (1990) Modulation by prostaglandin E₂ of ATP and noradrenaline co-transmission in the guinea-pig vas deferens. *J Auton Pharmacol* 10: 363-372

- Enero MA, Langer SZ (1973) Influence of reserpine-induced depletion of noradrenaline on the negative feed-back mechanism for transmitter release during nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 49: 214-225
- Enero MA, Saidman BQ (1977) Possible feedback inhibition of noradrenaline release by purine compounds. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 297: 39-46
- Esterhuizen AC, Graham JDP, Lever JD, Spriggs TLB (1968) Catecholamine and acetylcholinesterase distribution in relation to noradrenaline release. An enzyme histochemical and autoradiographic study on the innervation of the cat nictitating membrane. *Br J Pharmacol* 32: 46-56
- Farnebo LO, Hamberger B (1971) Drug-induced changes in the release of ^3H -noradrenaline from field stimulated rat iris. *Br J Pharmacol* 43: 97-106
- Fedan JS, Hogaboom GK, O'Donnel JP, Colby J, Westfall DP (1981) Contribution by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 69: 41-53
- Fedan JS, Hogaboom GK, Westfall DP, O'Donnel JP (1982) Comparison of contractions of the smooth muscle of the guinea-pig vas deferens induced by ATP and related nucleotides. *Eur J Pharmacol* 81 : 193-204
- Fedan JS, Hogaboom GK, O'Donnell JP, Westfall DP (1985) Use of photoaffinity labels as P_2 -antagonists. In: Paton DM (ed) *Methods used in adenosine research*. Plenum Press, New York (Methods in pharmacology, vol. 6) pp 279-292
- Folkow B, Häggendal J, Lisander B (1967) Extent of release and elimination of noradrenaline at peripheral nerve terminals. *Acta Physiol Scand* 72, supp 307: 1-38
- Forsyth KM, Bjur RA, Westfall DP (1991) Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 821-826

- Fredholm BB (1976) Release of adenosine-like material from isolated perfused dog adipose tissue following sympathetic stimulation and its inhibition by adrenergic α -receptor blockade. *Acta Physiol Scand* 96: 422-430
- Fredholm BB, Dunwiddie TV (1988) How does adenosine inhibit transmitter release? *TIPS* 9: 130-134
- Fredholm BB, Hedqvist P (1978) Release of ^3H -purines from [^3H]-adenine labelled rabbit kidney following sympathetic nerve stimulation, and its inhibition by α -adrenoceptor blockade. *Br J Pharmacol* 64: 239-245
- Fredholm BB, Sollevi A (1981) The release of adenosine and inosine from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation and noradrenaline. *J Physiol (Lond)* 313: 351-367
- Fredholm BB, Fried G, Hedqvist P (1982) Origin of adenosine released from rat vas deferens by nerve stimulation. *Eur J Pharmacol* 79: 233-243
- Fredrich U, Bönisch H (1986) The neuronal noradrenaline transport system of PC-12 cells: kinetic analysis of the interaction between noradrenaline, Na^+ and Cl^- in transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333: 246-252
- French AM, Scott NC (1983) Evidence to support the hypothesis that ATP is a co-transmitter in rat vas deferens. *Experientia* 39: 264-266
- Friel DD (1988) An ATP-sensitive conductance in single smooth muscle cells from rat vas deferens. *J Physiol (Lond)* 401: 361-380
- Furness JB (1974) Transmission to the longitudinal muscle of the guinea-pig vas deferens: the effect of pretreatment with guanethidine. *Br J Pharmacol* 50: 63-68
- Geffen LB, Livett BG (1971) Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol Rev* 51: 98-157

- Gillespie JS, McGrath JC (1975) The effects of lysergic acid diethylamide on the response to field stimulation of the rat vas deferens and the rat and cat anococcygeus muscles. *Br J Pharmacol* 54: 481-488
- Gonçalves J, Carvalho F, Guimarães S (1989) Uptake inhibitors do not change the effect of imidazoline α_2 -adrenoceptor agonists on transmitter release evoked by single pulse stimulation in mouse vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 339: 288-292
- Graefe K-H, Bönisch H (1988) The transport of amines across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurones. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (Handbook of experimental pharmacology, vol 90/I), pp 193-245
- Grant TL, Flavahan NA, Grieg J, McGrath JC, McKean CG, Reid JL (1985) Attempts to uncover subtypes of α -adrenoceptors and associated mechanisms by using sequential administration of blocking drugs. *Clin Sci* 68, supp 10: 25-30
- Guimarães S (1982) Two adrenergic biophases in blood vessels. *Trends Pharmacol Sci* 3: 159-161
- Guimarães S (1984) The distribution of α and β -adrenoceptors in relation to nerve endings and catechol-O-methyl transferase. *Intern Angio* 3: 47-48
- Guimarães S, Paiva MQ (1981a) Two distinct adrenoceptor biophases in the vasculature: one for α and the other for β -agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 195-199
- Guimarães S, Paiva MQ (1981b) Two different biophases for adrenaline released by electrical stimulation or tyramine from sympathetic nerve endings of the dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 200-204
- Guimarães S, Trendelenburg U (1985) Deviation supersensitivity and inhibition of saturable sites of loss. *Trends Pharmacol Sci* 6: 371-374

- Guimarães S, Azevedo I, Cardoso W, Oliveira MC (1975) Relation between the amount of smooth muscle of venous tissue and the degree of supersensitivity caused by inhibition of catechol-O-methyl transferase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 286: 401-412
- Guimarães S, Brandão F, Paiva MQ (1978) A study of the adrenoceptor-mediated feedback mechanisms by using adrenaline as a false transmitter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305: 185-188
- Hedlund H, Fändriks L, Delbro B, Fasth S (1983) Blockade of non-cholinergic, non-adrenergic colonic contraction in response to pelvic nerve stimulation by large doses of α,β -methylene ATP. *Acta Physiol Scand* 119: 451-454
- Hedqvist P, Fredholm BB (1976) Effects of adenosine on adrenergic neurotransmission: prejunctional inhibition and postjunctional enhancement. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 293: 217-223
- Hedqvist P, Moawad, A (1975) Presynaptic α - and β -adrenoceptor mediated control of noradrenaline release in human oviduct. *Acta Physiol Scand* 95: 494-496
- Hedqvist P, Fredholm BB, Olundh S (1978) Antagonistic effects of theophylline and adenosine on adrenergic neuroeffector transmission in the rabbit kidney. *Circ Res* 43: 592-598
- Hermann W, Graefe K-H (1977) Relationship between the uptake of ^3H -($\pm$)-metaraminol and the density of adrenergic innervation in isolated rat tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 296: 99-110
- Hillarp N-A, Hogberg B, Nilson B (1955) Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow. *Nature* 176: 1032-1033
- Hirst GDS (1977) Neuromuscular transmission in arterioles of guinea-pig submucosa. *J Physiol (Lond)* 273: 263-275

- Hirst GDS, Jobling P (1989) The distribution of γ -adrenoceptors and P₂ purinoceptors in mesenteric arteries and veins of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 96: 993-999
- Hirst GDS, Neild TO (1980) Evidence for two populations of excitatory receptors for noradrenaline on arteriolar smooth muscle. *Nature* 283: 767-768
- Hirst GDS, Neild TO (1981) Localization of specialized noradrenaline receptors at neuromuscular junctions on arterioles of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 313: 343-350
- Hogaboom GK, O'Donnell JP, Fedan JS (1980) Purinergic receptors: photoaffinity analog of adenosine triphosphate is a specific adenosine triphosphate antagonist. *Science* 208: 1273-1276
- Holman ME, Surprenant A (1979) Some properties of the excitatory junction potentials recorded from saphenous arteries of rabbits. *J Physiol (Lond)* 287: 337-351
- Holman ME, Surprenant A (1980) An electrophysiological analysis of the effects of noradrenaline and α -receptor antagonists on neuromuscular transmission in mammalian muscular arteries. *Br J Pharmacol* 71: 651-661
- Holman ME, Karby CB, Suthers MB, Wilson JAF (1968) Some properties of the smooth muscle of rabbit portal vein. *J Physiol (Lond)* 196: 111-132
- Holton P (1959) The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol (Lond)* 145: 494-504
- Holton FA, Holton P (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol (Lond)* 126: 124-140
- Hotta Y (1969) Some properties of junctional and extrajunctional receptors in the vas deferens of the guinea-pig. *Agents Actions* 1: 13-21

- Hourani SMO, Welford LA, Cusack NJ (1985) L-AMPPCP, an ATP receptor agonist in guinea-pig bladder, is inactive on taenia coli. *Eur J Pharmacol* 108: 197-200
- Hourani SMO, Loizou GD, Cusack NJ (1986) Pharmacological effects of 1-AMPPCP on ATP receptors in smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 131: 99-103
- Hourani SMO, Welford LA, Loizou GD, Cusack NJ (1988) Adenosine 5'-(2-fluorodiphosphate) is a selective agonist at P₂-purinoceptors mediating relaxation of smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 147: 131-136
- Hughes J, Vane JR (1967) An analysis of the responses of the isolated portal vein of the rabbit to electrical stimulation and to drugs. *Br J Pharmacol* 30: 46-66
- Hughes J, Vane JR (1970) Relaxations of the isolated portal vein of the rabbit induced by nicotine and electrical stimulation. *Br J Pharmacol* 39: 476-489
- Hung CR, Su C (1982) Purinergic component in neurogenic relaxation of rabbit portal vein. *Fed Proc* 41:1650
- Husted S, Nedergaard OA (1981) Inhibition of adrenergic neuroeffector transmission in rabbit pulmonary artery and aorta by adenosine and adenine nucleotides. *Acta Pharmacol Toxicol* 49: 334-353
- Itoh T, Kitamura K, Kuriyama H (1983) Roles of extrajunctional receptors in the response of guinea-pig mesenteric and rat tail arteries to adrenergic nerves. *J Physiol (Lond)* 345: 409-422
- Johansson B, Ljung B, Malmfors T, Olson L (1970) Prejunctional supersensitivity in rat portal vein as related to its pattern of innervation. *Acta Physiol Scand* S349: 5-16
- Kahan T, Hjemdahl P, Dahlöf C (1984) Relationship between the overflow of endogenous and radiolabelled noradrenaline from canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol Scand* 122: 571-582

- Karashima T, Kuriyama H (1981) Electrical properties of smooth muscle cell membrane and neuromuscular transmission in the guinea-pig basilar artery. *Br J Pharmacol* 74: 495-504
- Kasakov L, Burnstock G (1983) The use of the slowly degradable analog, α,β -methylene ATP to produce desensitization of P_2 -purinoceptor: effect on non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig bladder. *Eur J Pharmacol* 86: 291-294
- Kasakov L, Ellis J, Kirkpatrick K, Milner P, Burnstock G (1988) Direct-evidence for concomitant release of noradrenaline, adenosine triphosphate and neuropeptide Y from sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *J Auton Nerv Syst* 22: 75-82
- Katsuragi T, Su C (1980) Purine release from vascular adrenergic nerves by high potassium and a calcium ionophore, A-23187. *J Pharmacol Exp Ther* 215: 685-690
- Katsuragi T, Su C (1982) Release of purines and noradrenaline by ouabain and potassium chloride from vascular adrenergic nerves. *Br J Pharmacol* 77: 625-629
- Keller F, Zimmermann H (1983) Ecto-adenosine triphosphatase activity at the cholinergic nerve endings of the Torpedo electric organ. *Life Sci* 33: 2635-2641
- Kenakin T (1980) On the importance of agonist concentration-gradients within isolated tissues. Increased maximal responses of rat vasa deferentia to (-)-noradrenaline after blockade of neuronal uptake. *J Pharm Pharmacol* 32: 833-838
- Kennedy C, Burnstock G (1985) Evidence for two types of P_2 -purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 111: 49-56

- Kennedy C, Saville V, Burnstock G. (1986) The contributions of noradrenaline and ATP to the responses of the rabbit central ear artery to sympathetic nerve stimulation depend on the parameters of stimulation. *Eur J Pharmacol* 122: 291-300
- Khan MT, Malik KV (1980) Inhibitory effect of adenosine and adenine nucleotides on potassium-evoked efflux of [^3H]-noradrenaline from the rat isolated heart: lack of relationship to prostaglandins. *Br J Pharmacol* 68: 551-561
- Kirkpatrick K, Burnstock G (1987) Sympathetic nerve-mediated release of ATP from the guinea-pig vas deferens is unaffected by reserpine. *Eur J Pharmacol* 138: 207-214
- Kirpekar SM, Puig M (1971) Effect of flow stop on noradrenaline release from normal spleens and spleens treated with cocaine, phentolamine or phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 43: 359-369
- Kostron H, Winkler H, Peer LJ, König P (1977) Uptake of adenosine triphosphate by isolated adrenal chromaffin granules: a carrier-mediated transport. *Neuroscience* 2: 159-166
- Kreutzberg GW, Heymann D, Reddington (1986) 5'-Nucleotidase in the nervous system. In: Kreutzberg GW, Reddington M, Zimmermann H (eds) *Cellular Biology of Ectoenzymes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, pp 147-164
- Kuriyama H, Makita Y (1983) Modulation of noradrenergic transmission in the guinea-pig mesenteric artery: an electrophysiological study. *J Physiol (Lond)* 335: 609-627
- Kuriyama H, Makita Y (1984) The presynaptic regulation of noradrenaline release differs in mesenteric arteries of the rabbit and guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 351: 379-396

- Kuriyama H, Suyama A (1983) Multiple actions of cocaine on neuromuscular transmission and smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol (Lond)* 337: 631-654
- Lagercrantz H, Stjärne L (1974) Evidence that most noradrenaline in sympathetic large dense core vesicles is stored without ATP. *Nature* 249: 843-845
- Laher I, Khayal MA, Bevan JA (1986) Norepinephrine-sensitive, phenoxybenzamine-resistant receptor sites associated with contraction in rabbit arterial but not venous smooth muscle: possible role in adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther* 237: 364-368
- Langer SZ (1977) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br J Pharmacol* 60: 481-497
- Langer SZ, Pinto JEB (1976) Possible involvement of a transmitter different from norepinephrine in the residual responses to nerve stimulation of the cat nictitating membrane after pretreatment with reserpine. *J Pharmacol Exp Ther* 196: 697-713
- Langer SZ, Adler E, Enero MA, Stefano FJE (1971) The role of the α -receptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation. *Proceeds. of the XXVth International Congress of Physiological Sciences*, p 335, Munich
- Langer SZ, Adler-Graschinski E, Enero MA (1974) Positive feed-back mechanisms for the regulation of noradrenaline release by nerve stimulation. In: *Proceedings of Jerusalem Satellite Symposia. XXVI International Congress of Physiological Sciences*, p 81
- Lee FL (1967) The relation between norepinephrine content and response to sympathetic nerve stimulation of various organs of cats pretreated with reserpine. *J Pharmacol Exp Ther* 156: 137-141
- Levitt B, Westfall DP (1982) Factors influencing the release of purines and norepinephrine in the rabbit portal vein. *Blood Vessels* 19 : 30-40

- Loewi O (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. Pfluegers Arch 189: 239-242
- Luchelli-Fortis MA, Langer SZ (1975) Selective inhibition by hydrocortisone of ^3H -normetanephrine formation during ^3H transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 287: 261-275
- Luchelli-Fortis MA, Freedholm BB, Langer SZ (1979) Release of radioactive purines from cat nictitating membrane labeled with ^3H -adenine. Eur J Pharmacol 58: 389-397
- MacDonald A, McGrath JC (1980) The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. Br J Pharmacol 71: 445-458
- MacKenzie I, Manzini S, Burnstock G (1988) Regulation of voltage-dependent excitatory responses to α,β -methylene ATP, ATP and non-adrenergic nerve stimulation by dihydropyridines in the guinea-pig vas deferens. Neuroscience 27: 317-332
- Marshall I, Nasmyth PA, Shepperson NB (1977) Pre-synaptic α -adrenoceptors and the inhibition by uptake blocking agents of the twitch response of the mouse vas deferens. Br J Pharmacol 59: 511P
- Markus RP, Avellar MCW (1990) Relationship between neuronal uptake and release of noradrenaline in the rat vas deferens. Eur J Pharmacol 183: 1488
- McGrath JC (1978) Adrenergic and "non-adrenergic" components in the contractile response of the vas deferens to a single indirect stimulus. J Physiol (Lond) 283: 23-39
- Meldrum LA, Burnstock G (1983) Evidence that ATP acts as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. Eur J Pharmacol 92: 161-163

- Mishima S, Miyahara H, Suzuki H (1984) Transmitter release modulated by α -adrenoceptor antagonists in the rabbit mesenteric artery: a comparison between noradrenaline outflow and electrical activity. *Br J Pharmacol* 83: 537-547
- Moura D (1988) Liberação, por diferentes estímulos, da noradrenalina endógena e de aminas exógenas incorporadas pelo terminal simpático. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
- Moura D, Azevedo I, Guimarães S (1990) Differential distribution in, and release from, sympathetic nerve endings of endogenous noradrenaline and recently incorporated catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 153-159
- Moylan RD, Westfall TC (1979) Effect of adenosine on adrenergic neurotransmission in the superfused rat portal vein. *Blood Vessels* 16: 302-310
- Muramatsu I (1986) Evidence for sympathetic, purinergic transmission in the mesenteric artery of the dog. *Br J Pharmacol* 87: 478-480
- Muramatsu I, Fujiwara M, Miura A, Sakakibara Y (1981) Possible involvement of adenine nucleotides in sympathetic neuroeffector mechanisms of dog basilar artery. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 401-409
- Miyahara H, Suzuki H (1987) Pre- and post-junctional effects of adenosine triphosphate on noradrenergic transmission in the rabbit ear artery. *J Physiol (Lond)* 389: 423-440
- Nagy A, Schuster TA, Rosenberg MD (1983) Adenosine triphosphatase activity at the surface of chicken brain synaptosomes. *J Neurochem* 40: 226-234
- Nakanishi H, Takeda H (1973) The possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission between the hypogastric nerve terminal and seminal vesicle in the guinea-pig. *Jap J Physiol* 23: 479-490

- Nakazawa K, Matsuki N (1987) Adenosine triphosphate-activated inward current in isolated smooth muscle cells from rat vas deferens. *Pflügers Arch* 409: 644-646
- Neil TO, Hirst GDS (1984) The γ -connection - a reply. *Trends Pharmacol Sci* 5: 56-57
- Nilsson H (1984) Different nerve responses in consecutive sections of the arterial system. *Acta Physiol Scand* 121: 353-361
- Nilsson H, Sjöblom N, Folkow B (1985) Interaction between prejunctional α_2 -receptors and neuronal transmitter reuptake in small mesenteric arteries from the rat. *Acta Physiol Scand* 125: 245-252
- Njus D, Radda GK (1978) Bioenergetic processes in chromaffin granules. A new perspective on some old problems. *Biochim Biophys Acta* 463: 219-244
- Osswald W, Guimarães S (1983) Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 96: 53-122
- Paiva MQ (1989) Acções pré e pós-juncionais da 5-hidroxitriptamina a nível vascular: interacções com o mediador adrenérgico. Tese. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
- Paiva MQ, Guimarães S (1984) The kinetic characteristics of the extraneuronal O-methylating system of the dog saphenous vein and the supersensitivity to catecholamines caused by its inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327: 48-55
- Philippu A, Matthaei H (1988) Transport and storage of catecholamines in vesicles. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, (Handbook of Experimental Pharmacology, vol 90/I) pp 1-42

- Proença J, Paiva MQ, Guimarães S (1988) The guinea-pig trachea O-methylating system is more effective in modulating β_2 - than β_1 -adrenoceptor-mediated responses to isoprenaline. *J Pharm Pharmacol* 40: 76-77
- Raiteri M, Bonenno G, Marchi M, Maura G (1984) Is there a functional link between neurotransmitter uptake mechanisms and presynaptic receptors? *J Pharmacol Exp Ther* 231: 671-677.
- Ramme D, Regenold JT, Starke K, Busse R, Illes P (1987) Identification of the neuroeffector transmitter in jejunal branches of the rabbit mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336: 267-273
- Rand MJ, McCulloch MW, Story DF (1975) Pre-junctional modulation of noradrenergic transmission by noradrenaline, dopamine and acetylcholine. In: Davies DS, Reid JL (eds) *Central action of drugs in blood pressure regulation*. Pitman Medical, London, pp 94-132
- Ribeiro JA (1978) ATP; related nucleotides and adenosine on neurotransmission. *Life Sci* 22: 1373-1380
- Ribeiro JA (1979) Purinergic modulation of transmitter release. *J Theor Biol* 80: 259-270
- Ribeiro JA, Sebastião AM (1985) On the type of receptor involved in the inhibitory action of adenosine at the neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 84: 911-918
- Ribeiro JA, Sebastião AM (1986) Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor. *Prog Neurobiol* 26: 179-209
- Ribeiro JA, Sebastião AM (1987) On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *J Physiol (Lond)* 384: 571-585

- Richards JG, Da Prada M (1977) Uranaffin reaction: a new cytochemical technique for the localization of adenine nucleotides in organelles storing biogenic amines. *J Histochem Cytochem* 25: 1322-1336
- Sallés J, Badia A (1991) Mechanisms underlying the differential sensitivity to α_1 -adrenoceptor activation in the bisected rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 102: 439-445
- Sammet S, Graefe K-H (1979) Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and Na^+ in neuronal uptake: kinetic evidence for co-transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 309: 99-107
- Saville VL, Burnstock G (1988) Use of reserpine and 6-hydroxydopamine support evidence for purinergic cotransmission in the rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol* 155: 271-277
- Schlicker E, Urbanek E, Göthert M (1989) ATP, α,β -methylene ATP and suramin as tools for characterization of vascular $\text{P}_{2\text{x}}$ receptors in pithed rat. *J Auton Pharmacol* 9: 371-380
- Schümann HJ (1958) Über der noradrenaline und ATP - Gehalt sympathetischer nerven. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 233: 296-300
- Schwartz DD, Malik KU (1989) Renal periarterial nerve stimulation-induced vasoconstriction at low frequencies is primarily due to release of purinergic transmitter in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 764-771
- Schöming E, Schönfeld C-L, Halbrügge T, Graefe K-H, Trendelenburg U (1990) The heterogeneity of the neuronal distribution of exogenous noradrenaline in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 160-170
- Sebastião AM, Ribeiro JA (1988) On the adenosine receptor and adenosine inactivation at the rat diaphragm neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 94: 109-120

- Sebastião AM, Ribeiro JA (1989) 1,3,8- and 1,3,7- substituted xanthines: relative potency as adenosine receptor antagonists at the frog neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 96: 211-219
- Sebastião AM, Ribeiro JA (1990) Interactions between adenosine and phorbol esters or lithium at the frog neuromuscular junction. *Br J Pharmacol* 100: 55-62
- Sedaa KO, Bjur RA, Shinozuka K, Westfall DP (1990) Nerve and drug-induced release of adenine nucleosides and nucleotides from rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 1060-1067
- Shimada SG, Stitt JT (1984) An analysis of the purinergic component of active muscle vasodilatation obtained by electrical stimulation of the hypothalamus in rabbits. *Br J Pharmacol* 83: 577-589
- Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP (1988) Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 221-227
- Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP (1990) Effects of α,β -methylene ATP on the prejunctional purinoceptors of the sympathetic nerves of the rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 254: 900-903
- Shinozuka K, Sedaa KO, Bjur RA, Westfall DP (1991) Participation by purines in the modulation of norepinephrine release by methoxamine. *Eur J Pharmacol* 192: 431-434
- Sjöblom-Widfelt N, Gustafsson H, Nilsson H (1990) Transmitter characteristics of small mesenteric arteries from the rat. *Acta Physiol Scand* 138: 203-212
- Smith AD (1972) Subcellular localization of noradrenaline in sympathetic neurons. *Pharmacol Rev* 24: 435-457

- Smith CB, Trendelenburg U, Langer SZ, Tsai TH (1966) The relation of retention of norepinephrine- H^3 to the norepinephrine content of the nictitating membrane of the spinal cat during development of denervation supersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 151: 87-94
- Sneddon P, Burnstock G (1984a) Do you need γ -receptors? *Trends Pharmacol Sci* 5: 264-265
- Sneddon P, Burnstock G (1984b) Inhibition of excitatory junction potentials in guinea-pig vas deferens by α,β -methylene ATP: further evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters. *Eur J Pharmacol* 100: 85-90
- Sneddon P, Burnstock G (1984c) ATP a co-transmitter in rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 106: 149-152
- Sneddon P, Westfall DP (1984) Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol (Lond)* 347: 561-580
- Sneddon P, Westfall DP, Fedan JS (1982) Cotransmitters in the motor nerves of the guinea-pig vas deferens: electrophysiological evidence. *Science* 218: 693-695
- Soares-da-Silva P (1988) Dualidade das funções da dopamina no sistema nervoso simpático periférico. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
- Stanley PE, Williams SG (1969) Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal Biochem* 29: 381-392
- Starke K (1971) Influence of α -receptor stimulants on noradrenaline release. *Naturwissenschaften* 58: 420

- Starke K (1972) Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 274: 18-45
- Starke K (1977) Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 77: 1-124
- Starke K (1987) Presynaptic α -autoreceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 274: 18-45
- Starke K, Langer SZ (1979) A note on terminology for presynaptic receptors. In: Langer SZ, Starke K, Dubocovich ML (eds) *Presynaptic receptors*. Pergamon, Oxford, pp 1-3
- Starke K, Montel H (1973a) Involvement of α -receptors in clonidine-induced inhibition of transmitter release from central monoamine neurones. *Neuropharmacology* 12: 1073-1080
- Starke K, Montel H (1973b) Alpha-receptor mediated modulation of transmitter release from central noradrenergic neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 279: 53-60.
- Starke K, Borowski E, Endo T (1975) Preferential blockade of presynaptic α -adrenoceptors by yohimbine. *Eur J Pharmacol* 34: 385-388
- Stjärne L (1972) The synthesis, uptake and storage of catecholamines in the adrenal medulla. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) *Catecholamines*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, (Handbook of Experimental Pharmacology, vol33) pp 231-269
- Stjärne L (1973) Inhibitory effect of prostaglandin E₂ on noradrenaline secretion from sympathetic nerves as a function of external calcium. *Prostaglandins* 3: 105-109

- Stjärne L (1986) New paradigm: sympathetic transmission by multiple messengers and lateral interaction between monoquantal release sites? *Trends Neurosci* 9: 547-548
- Stjärne L, Alberts P (1985) Influence of temperature on stimulus-secretion coupling in the sympathetic nerves and on neuromuscular transmission, in guinea-pig vas deferens. *Acta Physiol Scand* 125: 181-194
- Stjärne L, Åstrand P (1984) Discrete events measure single quanta of adenosine 5'-triphosphate secreted from sympathetic nerves of guinea-pig and mouse vas deferens. *Neuroscience* 13: 21-28
- Stjärne L, Åstrand P (1985) Relative pre-and postjunctional roles of noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate as neurotransmitters of the sympathetic nerves of guinea-pig and mouse vas deferens. *Neuroscience* 14: 929-946
- Stjärne L, Brundin J (1977) Frequency-dependence of [^3H]noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: modification by factors interfering with α - or β -adrenoceptor or prostaglandin E_2 mediated control. *Acta Physiol Scand* 101: 199-210
- Stjärne L, Lishajko F (1966) Comparison of spontaneous loss of catecholamines and ATP in vitro from isolated bovine adrenomedullary, vesicular gland, vas deferens and splenic nerve granules. *J Neurochem* 13: 1213-1216
- Stjärne L, Lundberg JM, Åstrand P (1986) Neuropeptide Y - a cotransmitter with noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the sympathetic nerves of the mouse vas deferens? A biochemical, physiological and electropharmacological study. *Neuroscience* 18: 151-166
- Stone TW (1981) Differential blockade of ATP, noradrenaline and electrically evoked contractions of the rat vas deferens by nifedipine. *Eur J Pharmacol* 74: 373-376
- Su C (1975) Neurogenic release of purine compounds in blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 195: 159-166

- Su C (1978) Purinergic inhibition of adrenergic transmission in rabbit blood vessels. *J Pharmacol Exp Ther* 204: 351-361
- Su C (1983) Purinergic neurotransmission and neuromodulation. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 23: 397-411
- Su C, Bevan JA, Burnstock G (1971) [^3H]Adenosine: release during stimulation of enteric nerves. *Science* 173: 337-339
- Su C, Bevan J, Ursillo RC (1964) Electrical quiescence of pulmonary artery smooth muscle during sympathomimetic stimulation. *Circ Res* 15: 20-27
- Suzuki H (1981) Effects of endogenous and exogenous noradrenaline on the smooth muscle of guinea-pig mesenteric vein. *J Physiol (Lond)* 321: 495-512
- Suzuki H (1983) An electrophysiological study of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig main pulmonary artery. *J Physiol (Lond)* 336: 47-59
- Suzuki H, Kou K (1983) Electrical components contributing to the nerve-mediated contractions in the smooth muscles of the rabbit ear artery. *Jap J Physiol* 33: 743-756
- Suzuki H, Mishima S, Miyahara H (1984) Effects of reserpine on electrical responses evoked by perivascular nerve stimulation in the rabbit ear artery. *Biomed Res* 5: 259-266
- Swedin G (1971) Studies on neurotransmission mechanisms in the rat and guinea-pig vas deferens. *Acta Physiol Scand* 83: suppl 369
- Trachte GJ (1985) The influence of prostaglandins on neurotransmission in the isolated rabbit vas deferens. *Prostaglandins* 29: 47-59

- Trachte GJ, Heller LJ (1990) Adenosine receptor antagonism attenuates angiotensin II effects on adrenergic neurotransmission in the rabbit isolated vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 490-496
- Trendelenburg U (1972) Factors influencing the concentration of catecholamines at the receptors. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) *Catecholamines*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (Handbook of experimental pharmacology, vol 33) pp 726-761
- Trendelenburg U (1988) The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines I*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo (Handbook of experimental pharmacology, vol 90/1) pp 279-319
- Trendelenburg U, Muskus A, Fleming WW, Gomez-Alonso-de-la-Sierra B (1962) Modification by reserpine of the action of sympathomimetic amines in the spinal cats; a classification of sympathomimetic amines. *J Pharmacol Exp Ther* 138: 170-180
- Ungell A-L, Graefe K-H (1987) Failure of K^+ to affect the potency of inhibitors of the neuronal noradrenaline carrier in the rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335: 250-254
- Verhaeghe RH, Vanhoutte PM, Shepherd JT (1977) Inhibition of sympathetic neurotransmission in canine blood vessels by adenosine and adenine nucleotides. *Circ Res* 40: 208-215
- Verity MA, Bevan JA (1968) Fine structural study of the terminal effector plexus neuromuscular and intermuscular relationships in the pulmonar artery. *J Anat (Lond)* 103: 49-63
- Vizi SE, Burnstock G (1988) Origin of ATP release in the rat vas deferens: concomitant measurement of [^3H]noradrenaline and [^{14}C]ATP. *Eur J Pharmacol* 158: 69-77

- von Euler US (1954) Adrenaline and noradrenaline. *Pharmacological Reviews* 6: 15-22.
- von Euler US, Hedqvist P (1969) Inhibitory action of prostaglandins E₁ and E₂ on the neuromuscular transmission in the guinea-pig vas deferens. *Acta Physiol Scand* 77: 510-512
- von Euler US, Hedqvist P (1975) Evidence for α - and β_2 -receptors mediated inhibition of the twitch response in the guinea-pig vas deferens by noradrenaline. *Acta Physiol Scand* 93 : 572-578
- von Euler US, Lishajko F, Stjärne L (1963) Catecholamines and adenosine triphosphate in isolated adrenergic nerve granules. *Acta Physiol Scand* 59: 495-496
- von Kügelgen I, Starke K (1985) Noradrenaline and adenosine triphosphate as co-transmitters of neurogenic vasoconstriction in rabbit mesenteric artery. *J Physiol (Lond)* 367: 435-455
- von Kügelgen I, Schöffel, Starke K (1989) Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P₂-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 522-532
- Wakade AR, Krusz J (1972) Effect of reserpine, phenoxybenzamine and cocaine on neuromuscular transmission in the vas deferens of the guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 181: 310-317
- Wakade AR, Wakade TD (1978) Inhibition of noradrenaline release by adenosine. *J Physiol (Lond)* 282: 35-49
- Warland JJI, Burnstock G (1987) Effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the adrenergic and purinergic components of sympathetic nerve responses of the rabbit saphenous artery. *Br J Pharmacol* 92: 871-880
- Westfall DP, Stitzel RE, Rowe J (1978) The postjunctional effects and neural release of purine compounds in the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol* 50: 27-38

- Westfall DP, Colby J, Belis J (1979) A comparison of the effects of α -blocking agents on the mechanical responses of and release of ^3H -norepinephrine from the vas deferens of the guinea-pig, rat and human. *Pharmacologist* 21: 148-161
- Westfall DP, Sedaa K, Bjur RA (1987) Release of endogenous ATP from rat caudal artery. *Blood Vessels* 24: 125-127
- White TD (1982) Release of ATP from isolated myenteric varicosities by nicotinic agonists. *Eur J Pharmacol* 79: 333-334
- White TD, Leslie RA (1982) Depolarization induced release of adenosine 5'-triphosphate from isolated varicosities derived from myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *J Neurosci* 2: 206-215
- Williams M (1987) Purine receptors in mammalian tissues: pharmacology and functional significance. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 27: 315-345
- Winkler H (1977) The biogenesis of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 2: 657-683
- Winkler H (1988) Occurrence and mechanisms of exocytosis in adrenal medulla and sympathetic nerve. In: Trendelenburg U, Weiner N (eds) *Catecholamines*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. (Handbook of Experimental Pharmacology, vol90/1) pp 42-118
- Wu PH, Phillis JW (1984) Uptake by central nervous tissues as a mechanism for the regulation of extracellular adenosine concentrations. *Neurochem Int* 6: 613-632
- Yamamoto R, Cline Jr WH, Takasaki K (1988) Reassessment of the blocking activity of prazosin at low and high concentrations on sympathetic neurotransmission in the isolated mesenteric vasculature of rats. *J Auton Pharmacol* 8: 303-309

- Zhang G, Miyahara H, Suzuki H (1989) Inhibitory actions of adenosine differ between ear and mesenteric arteries in the rabbit. *Pflügers Arch* 415: 56-62
- Zier G, Drobny H, Valenta B, Singer EA (1988) Evidence against a functional link between noradrenaline uptake mechanisms and presynaptic alpha-2 adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 118-121

Agradecimentos

Se existe mérito, interesse ou utilidade nesta obra é justo aqui lembrar e agradecer a alguns dos muitos que tudo fizeram para que tal acontecesse. Se a obra não tem mérito, interesse ou utilidade que me desculpem por não ter sabido aproveitar o vosso empenho e generosidade.

As primeiras palavras vão para o Professor Serafim Guimarães, meu orientador. A influência que sobre mim exerceu iniciou-se muito antes de ter tido o prazer de o conhecer. Foi durante o meu tempo de aluno, da Licenciatura em Ciências Farmacêuticas, através do texto "A investigação e a Farmacologia em Portugal", inserido no livro "Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas". Foi um texto que li várias vezes, que me impressionou profundamente e que clarificou o rumo que pretendia dar à minha vida profissional. Por esta razão, foi com grande entusiasmo que, alguns anos mais tarde, conheci o Professor Serafim Guimarães e, com ele, comecei a colaborar. Este trabalho reflete muito daquilo que me tentou ensinar. Agradeço-lhe a forma como me responsabilizou, o saber que me dispensou, o grande empenhamento com me acompanhou, a amizade com que me honrou e a paciência com que sempre me escutou, mesmo quando não estávamos de acordo.

Ao Professor Alfredo Albuquerque agradeço o ter permitido que este trabalho fosse possível. Quando entrei para o Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia era, o Professor Alfredo Albuquerque, Bastonário da Ordem dos Farmacêuticos. De imediato assumiu que não reunia condições para me orientar e, com a grandeza que possui, tudo fez para que nada obstruísse o meu trabalho com quem considerou estar melhor colocado para me apoiar.

Ao Professor Walter Osswald quero manifestar a minha profunda admiração e reconhecimento, pela forma com que me recebeu no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina e por todo o apoio e estímulo que me tem concedido, da forma como só um Homem excepcional sabe fazer.

À Doutora Maria Quitéria Paiva quero agradecer-lhe por ter criado as condições para que tudo isto acontecesse, por me ter ensinado a trabalhar e a viver num laboratório de Farmacologia e por nunca me ter deixado recuar.

Ao Professor Daniel Moura agradeço a sua disponibilidade, a atenção com que me escutou, as críticas e o entusiasmo com que sempre me apoiou. Que me desculpe a incapacidade em lhe agradecer da forma magistral como ele o sabe fazer.

Ao Professor Patrício Soares da Silva agradeço o ensino da técnica de cromatografia líquida da alta resolução, as suas críticas e sugestões.

À Professora Isabel Azevedo devo todo o trabalho de análise ultra-estrutural incluído nesta dissertação e o interesse que sempre dedicou ao meu trabalho.

Ao Professor Fernando Brandão agradeço as críticas e as vivas discussões sobre a libertação de noradrenalina.

Ao Dr. Jorge Proença agradeço a solidariedade e o empenhamento com que apoiou este trabalho.

À Dra Carmina Sílvia e ao Dr Félix Carvalho agradeço a ajuda prestada, a sua excepcional dedicação e o apoio que me concederam durante a realização deste trabalho.

Da extraordinária equipa do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina, de quem sempre recebi toda a solidariedade, gostaria de manifestar o meu agradecimento aos Professores Eduardo Rodrigues Pereira, Helena Fernandes, Jorge Castro Tavares, Jorge Polónia e ainda aos Drs António Albino Teixeira, António Sarmento, Domingos Araújo, Manuel Vaz da Silva, Pedro Nunes, Nuno Borges e Paula Martel. Ao Dr José Guilherme agradeço as sugestões dadas para a execução gráfica deste trabalho.

Uma palavra de reconhecimento à Professora Margarida Caramona por todo o apoio prestado, nomeadamente na obtenção de diversos artigos citados neste trabalho.

O meu agradecimento à Sra Conceição Meireles, à Maria Fernanda Pereira e, em especial, à ajuda incansável da Maria do Céu Pereira. À Prazeres Cleto, Manuela Moura e Maria Luísa Vasques, agradeço o apoio técnico prestado. À Aida Camarinha, Eva Abrantes e Sr José Martins, agradeço o apoio de reprografia. Ao Srs Aldovino Sousa, Abílio Nunes e Mabilde Gomes agradeço o auxílio na preparação do material para as experiências realizadas no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina..

Ao Sr Diogo Silva, os meus agradecimentos pelo excepcional empenho na reprodução deste trabalho.

O meu reconhecimento e homenagem a todos Professores e colegas da Faculdade de Farmácia do Porto pelo apoio e solidariedade que sempre me manifestaram.

Por fim, a homenagem aos meus Pais e à Amélia, à Maria Luís e à Ana Miguel, a quem dedico este trabalho. São elas as mais sacrificadas por este meu vício.