

Maria de Fátima Moreira Martel

**SISTEMAS DE METABOLIZAÇÃO
EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS**

Estudo experimental no fígado de Rato e aorta de Coelho

Porto 1994

Maria de Fátima Moreira Martel

SISTEMAS DE METABOLIZAÇÃO
EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS
Estudo experimental no fígado de Rato e aorta de Coelho

Porto 1994

Maria de Fátima Moreira Martel

SISTEMAS DE METABOLIZAÇÃO
EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS
Estudo experimental no fígado de Rato e aorta de Coelho

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

Porto 1994

Art.º 48º, § 3º- A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 19 337)

O trabalho experimental e a execução gráfica foram parcialmente subsidiados pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica

A candidata auferiu de uma Bolsa de Doutoramento da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (Programa Ciência)

CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Efectivos

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís da Rocha Tomé Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Celso Renato Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Henrique José Ferreira G. Lecour de Menezes
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães

Doutor Manuel Teixeira Amarante Junior
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira dos Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria

Professores Jubilados

Doutor Abel José da Costa Sampaio Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Aos Professores

Maria Isabel Amorim Azevedo
Walter Friedrich Alfred Osswald

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

Martel F, Azevedo I, Osswald W (1993) Extraneuronal uptake and O-methylation of ^3H -adrenaline in the rabbit aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 347:363-370

Martel F, Azevedo I, Osswald W (1993) Uptake and metabolism of ^3H -adrenaline and ^3H -noradrenaline by isolated hepatocytes and liver slices of the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 348:450-457

Martel F, Azevedo I, Osswald W (1994) Uptake of ^3H -catecholamines by rat liver cells occurs mainly through a system which is distinct from uptake₁ or uptake₂. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 349 (em publicação)

Martel F, Azevedo I, Osswald W (1994) The fate of ^3H -catecholamines in isolated hepatocytes and liver slices of the rat. J Auton Pharmacol 14:22

Martel F, Russ H, Azevedo I, Schömig E (1994) Uptake of ^3H -MPP⁺ by cultured rat hepatocytes. Enviado para publicação.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	18
I. ESTUDO DA CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS	18
1. Aorta de Coelho	18
1.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	18
1.2. EXPERIÊNCIAS DE INCUBAÇÃO COM ADRENALINA- ³ H	18
1.2.1. Inibição da captação neuronal e da MAO: estudo do conteúdo do tecido em adrenalina- ³ H e sua O-metilação	18
1.2.2. Inibição da captação neuronal, da MAO e da COMT: estudo do conteúdo do tecido em adrenalina- ³ H	19
1.2.3. Efeito de fármacos	19
1.3. EXPERIÊNCIAS DE INCUBAÇÃO COM ADRENALINA- ³ H SEGUIDA DE INCUBAÇÃO EM MEIO SEM AMINA- ³ H	20
1.3.1. Inibição da captação neuronal, da MAO e da COMT: estudo do efluxo de adrenalina- ³ H	20
1.3.2. Determinação dos compartimentos de distribuição de adrenalina- ³ H	20
1.3.3. Efeito de fármacos e influência da temperatura	22
1.3.4. Saturabilidade dos compartimentos de distribuição de adrenalina- ³ H	22
1.4. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
1.5. FÁRMACOS UTILIZADOS	23
2. Fígado de Rato	24
2.1. FATIAS DE FÍGADO	24
2.1.1. Preparação do material	24
2.1.2. Experiências de incubação com noradrenalina- ³ H: estudo do conteúdo do tecido em noradrenalina- ³ H e sua metabolização	24
2.1.2.1. Efeito de fármacos	25
2.1.2.2. Influência da temperatura	25
2.1.3. Determinação do espaço extracelular	25
2.2. HEPATÓCITOS ISOLADOS EM SUSPENSÃO	26
2.2.1. Preparação do material	26
2.2.2. Determinação do peso médio dos hepatócitos	28
2.2.3. Experiências de incubação com noradrenalina- ³ H ou adrenalina- ³ H	28

2.2.3.1. Estudo do conteúdo dos hepatócitos em amina- ³ H e sua metabolização	28
2.2.3.1.1. Efeito de fármacos	29
2.2.3.1.2. Influência da temperatura	29
2.2.3.1.3. Dependência do sódio	30
2.2.3.1.4. Determinação da actividade das enzimas (k _{enzima}) MAO e COMT	30
2.2.3.2. Inibição da MAO e da COMT: estudo do conteúdo dos hepatócitos em amina- ³ H	30
2.2.3.2.1. Efeito de fármacos	31
2.2.3.2.2. Dependência do sódio e influência da despolarização da membrana celular	32
2.3. FÍGADO PERFUNDIDO	32
2.3.1. Experiências de perfusão com noradrenalina- ³ H: estudo do conteúdo do tecido em noradrenalina- ³ H, sua metabolização e excreção	32
2.3.2. Efeito de fármacos	33
2.4. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
2.5. FÁRMACOS UTILIZADOS	34
3. Preparação do material para doseamento das aminas- ³ H e dos seus metabólitos- ³ H	35
4. Doseamento da radioactividade	35
II. ESTUDO DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP ⁺ EM FÍGADO DE RATO	36
1. Culturas primárias de hepatócitos	36
1.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	36
1.2. EXPERIÊNCIAS DE INCUBAÇÃO COM MPP ⁺ - ³ H: ESTUDO DO CONTEÚDO DOS HEPATÓCITOS EM MPP ⁺ - ³ H	38
1.2.1. Efeito de fármacos	39
1.2.2. Saturabilidade da captação de MPP ⁺ - ³ H	39
1.3. DETERMINAÇÃO DO VOLUME MÉDIO DOS HEPATÓCITOS	39
1.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	39
1.5. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
1.6. FÁRMACOS UTILIZADOS	41
2. Hepatócitos isolados em suspensão	41
2.1. PREPARAÇÃO DO MATERIAL	41
2.2. EXPERIÊNCIAS DE INCUBAÇÃO COM MPP ⁺ - ³ H: ESTUDO DO CONTEÚDO DOS HEPATÓCITOS EM MPP ⁺ - ³ H	42
2.2.1. Efeito de fármacos	42

2.2.2. Dependência do sódio	43
2.3. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	43
2.4. CÁLCULOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
2.5. FÁRMACOS UTILIZADOS	44
3. Doseamento da radioactividade	44
RESULTADOS	46
I. CAPTAÇÃO E O-METILAÇÃO EXTRANEURONIAL DE ADRENALINA EM AORTA DE COELHO	46
1. Captação extraneuronal de adrenalina- ³ H: conteúdo do tecido em adrenalina- ³ H e sua O-metilação (MAO inibida)	46
1.1. EFEITO DE INIBIDORES DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS (<i>UPTAKE</i> ₂)	47
2. Captação extraneuronal de adrenalina- ³ H: conteúdo do tecido em adrenalina- ³ H (MAO e COMT inibidas)	49
2.1. EFEITO DE INIBIDORES DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS (<i>UPTAKE</i> ₂)	50
3. Compartimentos de distribuição extraneuronal de adrenalina- ³ H	51
3.1. EFEITO DA CORTICOSTERONA E OXITETRACICLINA	54
3.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	54
3.3. SATURABILIDADE DOS COMPARTIMENTOS DE DISTRIBUIÇÃO DE ADRENALINA- ³ H	54
II. CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS EM FÍGADO DE RATO	55
1. Captação de noradrenalina- ³ H por fatias de fígado: conteúdo do tecido em noradrenalina- ³ H e sua metabolização	56
1.1. EFEITO DE INIBIDORES DA MAO E DA COMT	57
1.2. EFEITO DE INIBIDORES DA CAPTAÇÃO NEURONIAL (<i>UPTAKE</i> ₁) E DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL (<i>UPTAKE</i> ₂) DE CATECOLAMINAS	58
1.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	58
2. Captação de adrenalina- ³ H e noradrenalina- ³ H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em amina- ³ H e sua metabolização	60
2.1. CURVAS TEMPO DE INCUBAÇÃO-CAPTAÇÃO DE ADRENALINA- ³ H E NORADRENALINA- ³ H	60

2.2. EFEITO DE INIBIDORES DA MAO E DA COMT	63
2.3. EFEITO DE INIBIDORES DA CAPTAÇÃO NEURONIAL ($UPTAKE_1$) E DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL ($UPTAKE_2$) DE CATECOLAMINAS	64
2.4. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	66
2.5. DEPENDÊNCIA DO SÓDIO	66
2.6. ACTIVIDADE DA MAO E DA COMT (K_{MAO} E K_{COMT})	67
3. Captação de adrenalina-^3H e noradrenalina-^3H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em amina-^3H (MAO e COMT inibidas)	67
3.1. CURVA TEMPO DE INCUBAÇÃO-CONTEÚDO EM NORADRENALINA- ^3H	68
3.2. EFEITO DA DESIPRAMINA, CORTICOSTERONA, PROBENECIDE, CIANINA 863 E BILIRRUBINA	69
3.3. DEPENDÊNCIA DO SÓDIO E INFLUÊNCIA DA DESPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA CELULAR	70
4. Captação de noradrenalina-^3H por fígado perfundido: conteúdo do tecido em noradrenalina-^3H, sua metabolização e excreção	71
4.1. PERFUSÃO DO FÍGADO COM NORADRENALINA- ^3H	71
4.2. EFEITO DE INIBIDORES DA MAO E DA COMT	74
4.3. EFEITO DA CORTICOSTERONA	75
III. CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP^+ EM FÍGADO DE RATO	76
1. Captação de MPP^+-^3H por culturas primárias de hepatócitos: conteúdo dos hepatócitos em MPP^+-^3H	76
1.1. CURVA TEMPO DE INCUBAÇÃO-CONTEÚDO EM MPP^+ - ^3H	76
1.2. EFEITO DA CORTICOSTERONA, DECÍNIO 22, CIANINA 863, CLONIDINA, QUININA, QUINIDINA E O-METILISOPRENALINA	77
1.3. EFEITO DO TETRAETILAMÓNIO E DO TAUROCOLATO DE SÓDIO	79
1.4. SATURABILIDADE DA CAPTAÇÃO DE MPP^+ - ^3H	80
2. Captação de MPP^+-^3H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em MPP^+-^3H	81
2.1. CURVA TEMPO DE INCUBAÇÃO-CONTEÚDO EM MPP^+ - ^3H	81
2.2. EFEITO DO DECÍNIO 22	82
2.3. EFEITO DA NORADRENALINA	83
2.4. DEPENDÊNCIA DO SÓDIO	84

DISCUSSÃO	85
I. CAPTAÇÃO E O-METILAÇÃO EXTRANEURONIAL DE ADRENALINA EM AORTA DE COELHO	85
II. CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS EM FÍGADO DE RATO	93
III. CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP⁺ EM FÍGADO DE RATO	112
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	122
RESUMO	127
SUMMARY	131
BIBLIOGRAFIA	135
AGRADECIMENTOS	159

Abreviaturas:

Cianina 863- cloreto de 1-etil-2-([1,4-dimetil-2-fenil-6-pirimidinilideno]metil) quinolina

COMT- catecol-O-metiltransferase

Decínio 22- iodeto de 1,1'-dietil-2,2'-cianina

DMSO- dimetilsulfóxido

DOCA- acetato de desoxicorticosterona

DOMA- ácido 3,4-di-hidroximandélico

DOPEG- 3,4-di-hidroxifenilglicol

HEPES- ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanossulfónico

MAO- monoaminoxidase

MN- metanefrina

MPP⁺- 1-metil-4-fenipiridínio

NMN- normetanefrina

OMDA- 4-hidroxi-3-metil-fenilglicol + ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico

Ro 01-2812- 3,5-dinitropirocatecol

Tolcapone- 3,4-di-hidroxi-4'-metil-5-nitrobenzofenona

Tris- tris-(hidroximetil)-amino metano

U-0521- 3,4-di-hidroxi-2-metil-propiofenona

INTRODUÇÃO

As catecolaminas são os principais neurotransmissores do sistema nervoso simpático-adrenal: as respostas fisiológicas resultantes da estimulação do sistema nervoso simpático são geralmente mediadas pela noradrenalina libertada pelos terminais nervosos noradrenérgicos e pela adrenalina e noradrenalina libertadas pela medula suprarrenal.

As acções fisiológicas das catecolaminas podem ser classificadas em várias categorias: (1) acções periféricas excitatórias (exemplos: as acções no músculo liso dos vasos sanguíneos, no músculo cardíaco e em algumas glândulas exócrinas); (2) acções periféricas inibitórias (exemplos: as acções no músculo liso da parede intestinal e dos brônquios); (3) acções metabólicas (exemplos: aumento da taxa de glicogenólise no fígado e no músculo esquelético e aumento da taxa de lipólise no tecido adiposo); (4) acções endócrinas (exemplos: modulação da secreção de insulina, glicagina, renina e hormonas da hipófise); (5) acções no sistema nervoso central (exemplo: estimulação respiratória), e (6) acções pré-sinápticas, que resultam na estimulação ou na inibição da libertação de neurotransmissores.

A terminação das acções fisiológicas das catecolaminas é efectuada por sistemas de metabolização, constituídos pela combinação de um sistema de captação, responsável pela remoção das catecolaminas da biófase ou da circulação sanguínea, seguido de metabolização intracelular pela MAO e/ou pela COMT (por ex. Trendelenburg 1986,1988). Estão descritos, para a noradrenalina, três "sistemas de metabolização" distintos (Trendelenburg 1990):

1) *uptake*₁ neuronal, associado à MAO intraneuronal e à captação vesicular, presente em terminais nervosos noradrenérgicos centrais e periféricos e em células PC-12 (células derivadas de feocromocitoma de Rato) (revisão por Graefe e Bönisch 1988).

2) *uptake*₂ extraneuronal, associado à MAO e/ou à COMT intracelulares, presente em diversos tecidos não neuroniais periféricos, como no músculo liso vascular e não vascular, no miocárdio e em glândulas salivares (revisão por Trendelenburg 1988), em diversos tipos de células em cultura derivadas de tecidos não neuroniais periféricos, como células traqueais de embrião de Boi (Powis 1973a), células Caki-1, derivadas de um carcinoma renal humano (Schömig e Schönfeld 1990) e células FL, derivadas do epitélio amniótico humano (de la Lande *et al.* 1991; Marino *et al.* 1993), e ainda em células em cultura derivadas de tecidos não neuroniais do sistema nervoso central: células HTZ 146, derivadas de um glioma humano (Staudt *et al.* 1993).

3) *uptake*₁ extraneuronal, associado à MAO e/ou à COMT intracelulares, presente em vários tecidos não neuroniais periféricos, como por exemplo no endotélio pulmonar (Bryan-Lluka *et al.* 1992), no endométrio e na placenta (Kennedy e de la Lande 1988) e nas fibras de Purkinje cardíacas (Azevedo *et al.* 1983) de Rato, no endométrio (Kennedy e de la Lande 1986,1987), na polpa dentária (Parker *et al.* 1987; de la Lande *et al.* 1990), e na mucosa oral e nasal (de la Lande *et al.* 1987) de Coelho, e no endométrio de Ratinho (de la Lande *et al.* 1991), e ainda em células em cultura derivadas de tecidos não neuroniais do sistema nervoso central: células astrogliais (Pelton *et al.* 1981).

O *uptake*₁ é um sistema de captação com alta afinidade (baixo K_m) para as catecolaminas, inibido pela cocaína e por antidepressores tricíclicos e completamente dependente da presença de sódio e de cloro no meio extracelular. A ordem de afinidade das catecolaminas para o *uptake*₁ é dopamina > noradrenalina > adrenalina; a isoprenalina não é praticamente transportada pelo *uptake*₁ (excepto em condições de inibição da COMT e do *uptake*₂; Azevedo e Osswald 1976) (revisões por Bönisch *et al.* 1984; Graefe e Bönisch 1988).

O *uptake*₂ é um sistema de captação com baixa afinidade (alto K_m) para as catecolaminas, inibido por três classes de compostos: corticosteróides (Iversen e Salt 1970; Salt 1972; Nicol e Rae 1972), derivados O-metilados das catecolaminas (Burgen e Iversen 1965, Salt 1972, Mireylees e Foster 1973; Bönisch *et al.* 1974) e β -haloalquilaminas (Iversen *et al.* 1972). O *uptake*₂ não é dependente da presença de sódio ou cloro no meio extracelular (Bönisch *et al.* 1985), é inibido por tratamentos que provocam despolarização da membrana celular (Gillespie e Towart 1973; Anning *et al.* 1980; Bryan e O'Donnell 1984; Bönisch *et al.* 1985; Ludwig *et al.* 1986; Trendelenburg 1987; Schömig *et al.* 1992) e é potenciado por tratamentos que hiperpolarizam a membrana celular (Trendelenburg 1987; Bryan-Lluka e Vuocolo 1992; Schömig *et al.* 1992). A ordem de afinidade das catecolaminas para o *uptake*₂ é isoprenalina > adrenalina > noradrenalina > dopamina (revisões por Trendelenburg 1986, 1988).

O fígado é um órgão que desempenha um papel muito importante na inactivação de catecolaminas circulantes (Kopin 1985), captando e metabolizando a noradrenalina e a adrenalina circulantes de um modo bastante eficaz (Hertting e LaBrosse 1962; Zimon *et al.* 1967; Lightman e Hems 1973; Steinberg *et al.* 1988), o que está de acordo com a conhecida abundância da MAO e da COMT, as principais enzimas metabolizadoras de catecolaminas, neste órgão (revisões por Axelrod 1966; Gorkin 1966; Kopin 1972,1985).

Não obstante a captação e metabolização hepáticas serem reconhecidas como muito importantes na eliminação de catecolaminas circulantes, muito poucos estudos foram realizados no sentido de caracterizar estes processos (Hertting *et al.* 1961; Hertting e LaBrosse 1962; Zimon *et al.* 1967; Lightman e Hems 1973; Garceau e Yamaguchi 1982; Steinberg *et al.* 1988; Acevedo *et al.* 1990), e os mecanismos envolvidos na captação de catecolaminas para as células do parênquima hepático, bem como o posterior destino das mesmas no fígado (nomeadamente, metabolização e/ou excreção) permanecem mal caracterizados.

Decidiu-se, por isso, estudar as características da captação e metabolização hepática de catecolaminas, em diversas preparações de fígado (fatias de fígado, fígado perfundido, hepatócitos isolados em suspensão e culturas primárias de hepatócitos), e recorrendo a diferentes substratos - adrenalina- ^3H , noradrenalina- ^3H , e MPP^+ - ^3H . O MPP^+ - ^3H é um composto que possui numerosas semelhanças com as catecolaminas, entre as quais se pode salientar o facto de este composto ser transportado, tal como as catecolaminas, pelo *uptake*₁, pelo *uptake*₂, pelo transportador de cationes orgânicos localizado na membrana apical de células tubulares renais, e pelo transportador vesicular de células cromafins (Sokol *et al.* 1987; Daniels e Reinhard 1988; Lazaruk e Wright 1990; Kopin 1992; Russ *et al.* 1992; Staudt *et al.* 1993), e que apresenta algumas vantagens, em relação às próprias catecolaminas, para o estudo dos sistemas de transporte destas amins (Sayre 1989; Russ *et al.* 1992).

Paralelamente, pareceu de interesse incluir neste estudo a caracterização da captação extraneuronal de catecolaminas num vaso sanguíneo, pois os vasos sanguíneos, presentes em quase todos os órgãos, possuem os mecanismos de captação e de metabolização responsáveis pela inactivação de catecolaminas, e são mesmo considerados como um dos principais locais de inactivação de catecolaminas circulantes (Vane 1969; Osswald e Branco 1973; Osswald 1980). De facto, os vasos sanguíneos estão equipados com sistemas de metabolização de catecolaminas bastante eficazes na captação e degradação enzimática tanto da noradrenalina libertada das terminações nervosas noradrenérgicas (localizadas na região adventício-medial ou na média do vaso), como das catecolaminas circulantes (adrenalina directamente lançada da medula suprarrenal para a circulação e noradrenalina libertada pelas terminações nervosas noradrenérgicas e que escapou à captação e metabolização, difundindo para a circulação) (Osswald 1990).

O *uptake*₂ foi demonstrado pela primeira vez no coração de Rato há quase 30 anos (Iversen 1965) e, desde essa altura, muitos estudos foram conduzidos no sentido da caracterização deste sistema de captação de catecolaminas. Actualmente, o *uptake*₂ encontra-se razoavelmente caracterizado em diversos vasos sanguíneos de

várias espécies animais (artéria da orelha de Coelho: Gillespie e Towart 1973, Head *et al.* 1980; artéria aorta de Coelho: Kalsner 1969, Kalsner e Nickerson 1969, Levin 1974, Trendelenburg 1974; veia safena de Cão: Paiva e Guimarães 1978; artéria mesentérica de Cão: Garrett e Branco 1977; arteríolas e vénulas coronárias de Rato: Azevedo *et al.* 1983; veia porta de Rato: Hedner *et al.* 1981), incluindo a humana (artéria uterina: Branco *et al.* 1992a; veia safena: Branco *et al.* 1992b).

A aorta de Coelho é um dos tecidos em que a captação e metabolização extraneuronal de catecolaminas têm sido mais estudadas (Kalsner 1969; Kalsner e Nickerson 1969; Levin 1974; Trendelenburg 1974; Kalsner 1975; Eckert *et al.* 1976; Henseling *et al.* 1976; Levin e Wilson 1977; Henseling *et al.* 1978; Henseling 1980; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983; Barone *et al.* 1987; revisão por Trendelenburg 1988); no entanto, a captação extraneuronal de catecolaminas neste tecido possui características ainda não completamente esclarecidas. De acordo com a hipótese actualmente compartilhada por vários autores, para além do sistema de captação extraneuronal *uptake*₂, bastante activo, associado às enzimas MAO e COMT (Levin 1974; revisão por Trendelenburg 1988), existe na aorta de Coelho captação extraneuronal de catecolaminas independente do *uptake*₂ (Williams e Hudgins 1973; Eckert *et al.* 1976; Henseling 1980; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983; Sweet e Levin 1983; Henseling 1983a), sem metabolização das catecolaminas (Williams e Hudgins 1973; Eckert *et al.* 1976; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983), cuja natureza não é conhecida.

Decidiu-se, por isso, investigar a captação extraneuronal de catecolaminas na aorta de Coelho. O objectivo do estudo foi, por um lado, caracterizar com precisão o *uptake*₂, e depois disso, caracterizar a captação extraneuronal de catecolaminas que é independente do *uptake*₂. Foram utilizados diferentes tipos de abordagem experimental, em que se avaliou o efeito de inibidores do *uptake*₂ (e também de outros compostos) sobre a O-metilação (com o *uptake*₁ e a MAO inibidos, mas a COMT funcionante) sobre o conteúdo (com o *uptake*₁, a MAO e a COMT inibidos), e sobre a distribuição compartimental extraneuronal de catecolaminas (com o *uptake*₁, a MAO e a COMT inibidos).

As experiências foram realizadas com adrenalina-³H por 3 motivos fundamentais: 1) a maioria dos estudos sobre captação e metabolização extraneuronais de catecolaminas tem sido efectuada com noradrenalina, havendo relativamente pouca informação relativamente à adrenalina; 2) a adrenalina tem, em comparação com a noradrenalina, maior afinidade para o *uptake*₂ e para a COMT (por ex. Guimarães e Paiva 1977; Brandão *et al.* 1980; Grohmann 1987;

revisão por Trendelenburg 1988), sendo portanto um melhor substrato para estudos sobre captação extraneuronal e O-metilação de catecolaminas; 3) a captação extraneuronal de catecolaminas desempenha um papel mais importante na inativação de catecolaminas circulantes do que na inativação de catecolaminas libertadas pelos terminais nervosos noradrenérgicos (Trendelenburg 1988), e a adrenalina existe fundamentalmente na circulação, enquanto que a noradrenalina é a catecolamina libertada das varicosidades noradrenérgicas.

MATERIAL E MÉTODOS

I. ESTUDO DA CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS

1. Aorta de Coelho

1.1 Preparação do material

As aortas de Coelho foram obtidas de animais machos adultos de raça New Zealand, com 2 a 3 kg de peso, mortos por sangria após concussão da nuca. Depois da remoção da aorta torácica, esta era colocada imediatamente em solução de Krebs-Henseleit, oxigenada com 95% O₂ e 5% CO₂, e a 4°C, com a seguinte composição (em mmol/l): 113 NaCl, 4,7 KCl, 1,18 KH₂PO₄, 24,6 NaHCO₃, 11,5 (+)-glicose, 3,15 CaCl₂, 1,18 MgSO₄, 0,57 ácido ascórbico e 0,045 EDTA dissódico. A aorta era limpa, aberta longitudinalmente e cortada em sete a oito tiras com aproximadamente 20-40 mg cada.

1.2. Experiências de incubação com adrenalina-³H

Nestas experiências, as tiras de aorta de Coelho foram sempre incubadas em 2 ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, oxigenada com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂ e sob agitação constante.

Em cada série de experiências incubou-se sempre uma amostra da solução de Krebs-Henseleit com adrenalina-³H, sem qualquer tecido presente. Determinou-se a radioactividade total e a adrenalina-³H e seus metabólitos-³H numa alíquota desta amostra, que foi utilizada como padrão de radioactividade e para a correcção da contaminação pela adrenalina-³H das diversas fracções de metabólitos-³H e da degradação espontânea da adrenalina-³H.

1.2.1. Inibição da captação neuronal e da MAO: estudo do conteúdo do tecido em adrenalina-³H e sua O-metilação

A MAO e a captação neuronal foram inibidas com pargilina e desipramina, respectivamente, do seguinte modo: os tecidos eram incubados com 500 µmol/l de pargilina durante 30 minutos, lavados com solução de Krebs-Henseleit durante 5 minutos por 3 vezes e incubados em seguida com 1 µmol/l de desipramina durante

30 minutos. No final deste período, os tecidos eram incubados durante 15 minutos com adrenalina- ^3H numa concentração de 50 nmol/l, estando a desipramina também presente neste período.

No final da incubação com adrenalina- ^3H , removia-se os tecidos, que eram rapidamente lavados em solução de Krebs-Henseleit a 4°C, secos em papel de filtro, pesados e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A solução de incubação era acidificada com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l.

Determinou-se a radioactividade total e a adrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H em alíquotas do extracto ácido do tecido e no líquido de incubação, não se efectuando correcção em relação à amina- ^3H presente no espaço extracelular. As determinações da radioactividade total permitiram avaliar a recuperação de radioactividade no processo de separação da adrenalina- ^3H dos seus metabólitos- ^3H . A recuperação foi de $84,8 \pm 1,8\%$ (média $\pm$ erro padrão da média; $n=11$).

1.2.2. Inibição da captação neuronal, da MAO e da COMT: estudo do conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H

A captação neuronal e a MAO foram inibidas do modo acima descrito (secção 1.1.2.1.). A COMT foi inibida com 2 $\mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812, presente durante os 30 minutos anteriores e durante os 15 minutos de incubação com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H .

No final da incubação com adrenalina- ^3H , os tecidos eram removidos, lavados rapidamente em solução de Krebs-Henseleit a 4°C, secos em papel de filtro, pesados e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A solução de incubação era acidificada com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l.

A radioactividade total e a adrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H foram determinados em alíquotas do extracto ácido do tecido e no líquido de incubação. Não se efectuou correcção em relação à amina- ^3H presente no espaço extracelular. A recuperação da radioactividade recolhida após o processo de separação da adrenalina- ^3H dos seus metabólitos- ^3H em relação à radioactividade total foi de $85,9 \pm 1,1\%$ (média $\pm$ erro padrão da média; $n=4$).

1.2.3. Efeito de fármacos

Para estudar o efeito da inibição do *uptake*₂, em experiências com a COMT funcionante ou com a COMT inibida, os inibidores do *uptake*₂ foram adicionados à solução de Krebs-Henseleit 30 minutos antes da incubação com adrenalina- ^3H e permaneceram até final da experiência.

Usou-se como inibidores da captação extraneuronal (*uptake*₂): 17 β -estradiol, DOCA, corticosterona, progesterona, testosterona, metanefrina, fosfato e hemisuccinato de hidrocortisona. Os fármacos foram usados em concentrações que variaram de 1,11 a 90 μ mol/l (17 β -estradiol), de 1,48 a 120 μ mol/l (corticosterona, DOCA, progesterona, testosterona, fosfato e hemisuccinato de hidrocortisona) e de 8 a 72 μ mol/l (metanefrina), com aumentos de concentração de 3 vezes.

1.3. Experiências de incubação com adrenalina-³H seguida de incubação em meio sem amina-³H

1.3.1. Inibição da captação neuronal, da MAO e da COMT: estudo do efluxo de adrenalina-³H

Incubou-se tiras de aorta em 2 ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, oxigenada com 95% O₂ e 5% CO₂, permanentemente agitada e contendo 50 nmol/l de adrenalina-³H durante 15 minutos. A captação neuronal, a MAO e a COMT estavam inibidas (como descrito na secção I.1.2.2.). No final do período de incubação, as tiras eram transferidas para 5 ml de solução de Krebs-Henseleit sem adrenalina-³H (denominada solução de "lavagem"), a 37°C, oxigenada e sob agitação constante, contendo 1 μ mol/l de desipramina e 2 μ mol/l de Ro 01-2812. A solução de "lavagem" era renovada todos os minutos (até aos 9 minutos), depois cada 2 minutos (até aos 17 minutos), cada 3 minutos (até aos 20 minutos), cada 5 minutos (até aos 60 minutos) e cada 10 minutos (até aos 100 minutos), verificando-se, durante este período, o efluxo da radioactividade previamente captada pelo tecido para a solução de "lavagem". Todas as soluções de "lavagem" eram posteriormente acidificadas com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l. No final da experiência, os tecidos eram removidos, e após lavagem rápida em solução de Krebs-Henseleit a 4°C, eram secos em papel de filtro, pesados e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l.

Determinou-se a radioactividade total em alíquotas de todas as amostras de solução de "lavagem" e do extracto ácido do tecido.

Em cada série de experiências incubou-se nas mesmas condições uma amostra da solução de Krebs-Henseleit com adrenalina-³H, sem qualquer tecido presente. Determinou-se a radioactividade total numa alíquota desta amostra, que foi utilizada como padrão de radioactividade.

1.3.2. Determinação dos compartimentos de distribuição de adrenalina-³H

O efluxo de radioactividade proveniente das tiras de aorta originou curvas exponenciais multifásicas que foram consideradas o resultado do somatório de várias curvas exponenciais simples, correspondentes a efluxos originados em diferentes compartimentos de distribuição da adrenalina- ^3H .

A função da curva exponencial multifásica pode ser expressa pela seguinte equação:

$$Y_t = A \cdot e^{-k_1 \cdot t} + B \cdot e^{-k_2 \cdot t} + \dots + Z \cdot e^{-k_n \cdot t}$$

Y_t indica a velocidade de efluxo total no tempo t ; $A, B \dots Z$ são as velocidades iniciais de efluxo (i.e., velocidades no tempo zero) e $k_1, k_2 \dots k_n$ as taxas constantes de efluxo, para cada um dos efluxos regidos por exponenciais simples.

Para analisar as curvas de efluxo usou-se a técnica de "peeling" descrita por Henseling *et al.* (1976). Esta técnica baseia-se no facto de que em representação semilogarítmica, os valores de uma equação exponencial simples originam uma recta. Durante a fase final do efluxo de radioactividade a curva apresenta um declínio rectilíneo, havendo assim razão para admitir que, nessa fase, o efluxo de radioactividade provém apenas de um compartimento. Foi então determinada a linha de regressão que melhor se adaptava aos pontos experimentais, começando com os 3 ou 4 últimos valores da curva. Os valores precedentes da curva foram sucessivamente incluídos até se encontrar um valor experimental que se desviava claramente da linha de regressão. Subtraiu-se em seguida aos valores experimentais não incluídos na regressão os valores da linha de regressão e a curva resultante foi analisada do mesmo modo. Para cada linha de regressão determinou-se os seguintes valores: velocidade inicial de efluxo ($A, B, \dots, Z$), taxa constante de efluxo ($k_1, k_2, \dots, k_n$), tempo de semi-vida ($t/2 = \ln 2/k$) e tamanho do compartimento ($T = \text{velocidade inicial de efluxo}/k$).

Caracterizou-se deste modo, na aorta de Coelho, 3 compartimentos (compartimentos I, II e III). A Figura 1 mostra um exemplo de como se efectuou a análise compartimental.

Foi ainda determinada a actividade total presente no tecido no início da "lavagem" (soma do efluxo total de radioactividade e da radioactividade presente no tecido no fim da experiência) e a soma do tamanho de todos os compartimentos (T_{total}). Se existir uma "fracção fixa" (isto é, radioactividade que ficou no tecido e que não contribuiu para o efluxo), estes dois valores (actividade total e T_{total}) serão necessariamente diferentes.

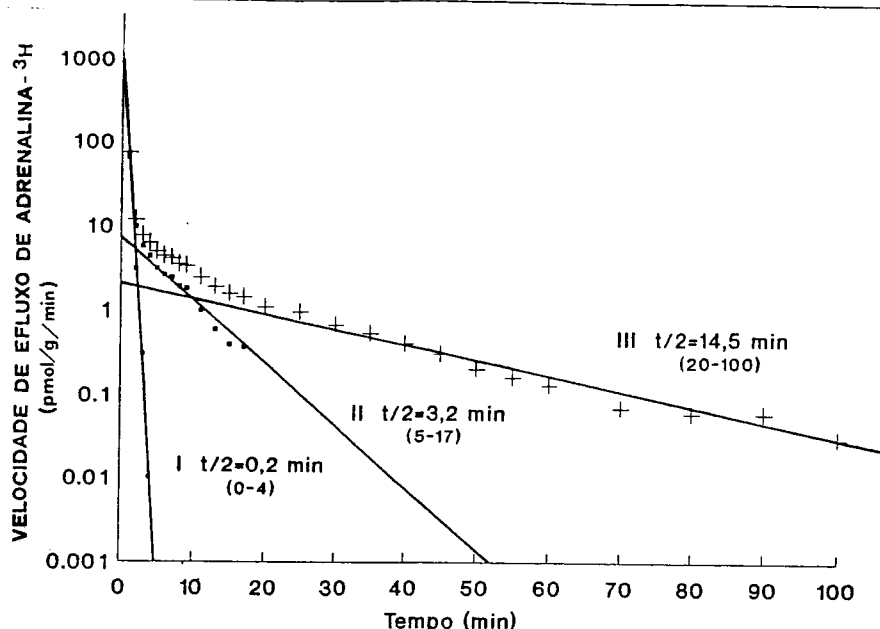


Figura 1. Exemplo da análise compartimental de uma curva de efluxo de adrenalina- ^3H de uma experiência controle. A tira de aorta foi incubada em solução de Krebs-Henseleit a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos. A MAO, COMT e a captação neuronal foram inibidas com $500\text{ }\mu\text{mol/l}$ de pargilina, $2\text{ }\mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812 e $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ de desipramina, respectivamente. Ordenada: velocidade de efluxo de adrenalina- ^3H ; os valores experimentais estão indicados com o símbolo + e valores obtidos após o "peeling" estão indicados com pontos (em pmol/g/minuto ; escala logarítmica). Abcissa: tempo (minutos) desde o início da incubação com solução de "lavagem". Iniciou-se a análise pelo compartimento III. Depois do "peeling", determinou-se o compartimento II, e depois o compartimento I (ver texto). Estão indicados os tempos de semi-vida dos compartimentos (minutos) e, entre parêntesis, os tempos entre os quais se determinou as linhas de regressão.

1.3.3. Efeito de fármacos e influência da temperatura

Realizou-se experiências na presença de $120\text{ }\mu\text{mol/l}$ de corticosterona, de $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ de oxitetraciclina ou de ambas as substâncias, que se adicionou à solução de Krebs-Henseleit 30 minutos antes da incubação com adrenalina- ^3H e que se manteve até final da experiência.

Para se estudar a influência da temperatura na distribuição compartimental de adrenalina- ^3H , algumas tiras de aorta foram incubadas em solução de Krebs-Henseleit a 4°C a partir dos 30 minutos antes da incubação com adrenalina- ^3H e até final da experiência.

1.3.4. Saturabilidade dos compartimentos de distribuição de adrenalina- ^3H

Para estudar a saturabilidade dos vários compartimentos de distribuição da adrenalina- ^3H , incubou-se tiras de aorta com concentrações de adrenalina- ^3H que variaram de 5 a 1000 $\mu\text{mol/l}$ (5, 50, 500 e 1000 $\mu\text{mol/l}$). Todas estas concentrações de adrenalina- ^3H foram obtidas por combinação de adrenalina- ^3H com (-)-adrenalina.

1.4. Cálculos e análise estatística

Os resultados estão expressos como médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média ou como médias geométricas com os respectivos intervalos a 95% de confiança. n representa o nº de experiências.

Os valores de CI_{50} dos fármacos para a O-metilação de adrenalina- ^3H (concentração de fármaco necessária para produzir 50% de redução na formação de $\text{MN-}^3\text{H}$) e para o conteúdo em adrenalina- ^3H (concentração de fármaco necessária para produzir 50% da redução máxima no conteúdo de adrenalina- ^3H) correspondem à média geométrica dos valores de CI_{50} obtidos em cada experiência. Os valores individuais de CI_{50} foram determinados ajustando os resultados experimentais obtidos aos parâmetros da equação de De Lean *et al.* (1978), através de regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados baseado no algoritmo de Marquardt (Motulsky e Ransnas 1987), calculada automaticamente (Graphpad Inplot[®], Graphpad Software Inc., San Diego, USA).

A análise estatística da diferença entre dois grupos experimentais foi efectuada usando o teste t de Student (para valores emparelhados ou independentes). A análise estatística das diferenças entre múltiplos grupos experimentais foi feita pela análise de variância (ANOVA) para valores independentes, seguida das comparações *post hoc* entre pares de grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

1.5. Fármacos utilizados

Adrenalina- ^3H ((-)-[N-metil- ^3H]-adrenalina; actividade específica 69,4-70,1 Ci/mmol) (New England Nuclear Chemicals, Dreieich, Alemanha); (-)-adrenalina (Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham, Reino Unido); cloridrato de desipramina (Ciba-Geigy, Basileia, Suíça); corticosterona (Fluka AG, Buchs SG, Suíça); DOCA (Organon, Holanda); Ro 01-2812 (F. Hoffman La Roche, Basileia, Suíça); cloridrato de oxitetraciclina, cloridrato de pargilina, 17β -estradiol, ($\pm$)-metanefrina, progesterona, sal dissódico de fosfato de hidrocortisona, sal sódico de hemissucinato de hidrocortisona, testosterona (Sigma, S. Luís, Mo., EUA). Todos

os outros reagentes utilizados foram produtos *pro analysi*. Os fármacos foram sempre preparados no dia da experiência e mantidos a 4°C até à sua utilização.

O Ro 01-2812 foi dissolvido em DMSO, posteriormente diluído com solução de incubação. A concentração final de DMSO na solução de incubação foi de 14 mmol/l; os controlos destas experiências continham idêntica concentração daquele agente. O 17 β -estradiol, a corticosterona, a DOCA, a progesterona e a testosterona foram dissolvidos em etanol, que foi depois diluído com solução de incubação. A concentração final de etanol na solução de incubação foi de 86 mmol/l; os controlos destas experiências continham idêntica concentração daquele agente.

2. Fígado de Rato

2.1. Fatias de fígado

2.1.1. Preparação do material

Ratos Wistar machos (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras) com peso compreendido entre os 200-300 g foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg de peso, administrado por via intraperitoneal (i.p.). O fígado era removido, colocado em solução de Krebs-Henseleit (composição, em mmol/l: 113 NaCl, 4,7 KCl, 1,18 KH₂PO₄, 24,6 NaHCO₃, 11,5 (+)-glicose, 3,15 CaCl₂, 1,18 MgSO₄, 0,57 ácido ascórbico e 0,045 EDTA dissódico) oxigenada com 95% O₂ e 5% CO₂ e arrefecida a 4°C, e cortado em fatias com aproximadamente 0,5 mm de espessura e 50 mg de peso.

2.1.2. Experiências de incubação com noradrenalina-³H: estudo do conteúdo do tecido em noradrenalina-³H e sua metabolização

As fatias de fígado (num total de 100-150 mg de peso) foram incubadas em 2 ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, oxigenada (95% O₂ e 5% CO₂) e sob agitação constante. Após uma pré-incubação de 15 minutos, as fatias de fígado eram transferidas para solução de Krebs-Henseleit contendo 200 nmol/l de noradrenalina-³H, e eram incubadas durante 15 minutos. No final deste período, os tecidos eram removidos, lavados rapidamente em solução de incubação a 4°C, secos rapidamente em papel de filtro, pesados e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A solução de incubação era acidificada com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l.

Determinou-se a radioactividade total e a noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H em alíquotas do extracto ácido do tecido e do líquido de incubação. A recuperação da radioactividade recolhida após o processo de separação da noradrenalina- ^3H dos seus metabólitos- ^3H em relação à radioactividade total foi de $93,1 \pm 1,0\%$ (média $\pm$ erro padrão da média; $n=14$).

Em cada série de experiências incubou-se nas mesmas condições uma amostra da solução de Krebs-Henseleit com noradrenalina- ^3H , sem qualquer tecido presente. Determinou-se a radioactividade total e a noradrenalina- ^3H e seus metabólitos numa alíquota desta amostra, que foi utilizada como padrão de radioactividade e para a correcção da contaminação pela noradrenalina- ^3H das diversas fracções de metabólitos- ^3H e da degradação espontânea da noradrenalina- ^3H .

2.1.2.1. Efeito de fármacos

Estudou-se o efeito de fármacos inibidores da metabolização de catecolaminas sobre o conteúdo e metabolização de noradrenalina- ^3H utilizando, como inibidor da MAO, a pargilina na concentração de $500 \mu\text{mol/l}$ e como inibidores da COMT, o Ro 01-2812 na concentração de $10 \mu\text{mol/l}$ ou o U-0521 na concentração de $50 \mu\text{mol/l}$.

O efeito da inibição do *uptake*₁ foi testado com a desipramina, na concentração de $10 \mu\text{mol/l}$, e o efeito da inibição do *uptake*₂ foi testado com a corticosterona, na concentração de $120 \mu\text{mol/l}$.

Quando utilizados, os fármacos estavam presentes durante os períodos de pré-incubação e de incubação, isoladamente ou em combinação.

2.1.2.2. Influência da temperatura

Para o estudo da influência da temperatura sobre o conteúdo e metabolização de noradrenalina- ^3H realizou-se, para além das experiências referidas em I.2.1.2., experiências de incubação com noradrenalina- ^3H em que todo o período de pré-incubação e incubação era efectuado a 4°C .

2.1.3. Determinação do espaço extracelular

O espaço extracelular das fatias de fígado foi determinado em experiências em que se incubou os tecidos durante 15 ou 60 minutos em 5 ml de solução de Krebs-Henseleit contendo 200 nmol/l de sorbitol- ^3H . Antes desta incubação

submeteu-se as fatias a uma pré-incubação de 15 minutos, em 5 ml de solução de Krebs-Henseleit. A pré-incubação e a incubação foram efectuadas a 4°C. No final da incubação com sorbitol-³H, as fatias eram removidas, lavadas rapidamente em solução de incubação a 4°C, secas em papel de filtro, pesadas e colocadas em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A solução de incubação era acidificada com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l. Determinou-se a radioactividade total em alíquotas do extracto ácido do tecido e do líquido de incubação.

Corrigiu-se todos os valores de adrenalina-³H intacta presente nos tecidos por subtracção do valor correspondente ao espaço extracelular, admitindo que a distribuição extracelular das catecolaminas marcadas é semelhante à do sorbitol-³H. O valor do volume do espaço extracelular encontrado foi $0,176 \pm 0,007$ ml/g após 15 minutos de incubação e $0,407 \pm 0,019$ ml/g após 60 minutos de incubação (média $\pm$ erro padrão da média; $n=4$). O valor de espaço extracelular usado para corrigir os valores de adrenalina-³H presente no tecido foi 0,176 ml/g.

2.2. Hepatócitos isolados em suspensão

2.2.1. Preparação do material

Ratos Wistar machos (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras), de peso compreendido entre os 200 e os 300 g foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg de peso, administrado por via i.p., juntamente com 1000 U.I. de heparina sódica.

Para a obtenção de hepatócitos isolados foi utilizada a técnica de perfusão do fígado com collagenase, *in situ* (Seglen 1976), com algumas modificações por nós introduzidas. Após anestesia do animal, canulava-se a veia porta e a veia cava, e o fígado era perfundido com 250 ml de solução de Krebs-Henseleit sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} , com a seguinte composição (em mmol/l): 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO_3 , 11 (+)-glicose, 1,18 KH_2PO_4 , contendo ainda 10,37 HEPES. Após esta perfusão inicial, que teve como finalidade remover o sangue do fígado e preparar o órgão para a acção da collagenase, perfundia-se o fígado com 200 ml de solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (em mmol/l): 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO_3 , 11 (+)-glicose, 1,18 KH_2PO_4 , 0,57 MgSO_4 , 2,51 CaCl_2 , contendo adicionalmente 50,36 HEPES (mmol/l) e 0,05% (p/v) de collagenase do tipo I. Os líquidos de perfusão eram infundidos sem recirculação a uma velocidade de 15-17 ml/minuto, utilizando-se uma bomba peristáltica (Harvard, Millis, Mass., EUA). O pH de todas as soluções usadas na perfusão era ajustado a 7,4 (com NaOH); as

soluções eram oxigenadas com uma mistura de 95% O₂ e 5% CO₂ e eram infundidas a 37°C.

No final da perfusão com collagenase, o fígado era removido cuidadosamente e colocado em solução de Krebs-Henseleit (com a seguinte composição, em mmol/l: 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO₃, 11 (+)-glicose, 1,18 KH₂PO₄, 0,57 MgSO₄, 2,51 CaCl₂, 0,57 MgSO₄, 0,3 ácido ascórbico e 0,045 EDTA dissódico) com pH 7,4, a 37°C e oxigenada. A cápsula do fígado era aberta, e o parênquima hepático era recolhido em solução de Krebs-Henseleit, obtendo-se uma suspensão de células muito rica. A suspensão celular era em seguida incubada a 37°C, com oxigenação e agitação constante, durante 10-15 minutos. Esta incubação tinha como principais objectivos (1) facilitar a recuperação das células do processo de isolamento, e (2) induzir uma forma esférica nos hepatócitos recém-isolados, facilitando a separação de células agregadas. Após esta incubação, procedia-se à purificação da suspensão celular, de modo a esta ficar a possuir, tanto quanto possível, apenas hepatócitos isolados e viáveis. O processo de purificação destinava-se, portanto, a eliminar da suspensão pequenos fragmentos de tecido, agregados celulares, células não parenquimatosas, células parenquimatosas não viáveis e organelos subcelulares, por meio de uma acção combinada de filtração e centrifugação diferencial. Todo este procedimento de purificação da suspensão celular era efectuado a 4°C e era constituído pelos seguintes passos:

1. Filtração através de uma rede de "nylon" com porosidade de 200 μ m
2. Centrifugação a 30 x G durante 5 minutos
3. Rejeição do sobrenadante e ressuspensão das células em solução de Krebs-Henseleit
4. Filtração através de uma rede de "nylon" com porosidade de 100 μ m

No final, a suspensão era mantida a 4°C até à sua utilização.

A viabilidade dos hepatócitos foi determinada pelo método da exclusão do azul de tripano. Resumidamente, adicionava-se uma solução de azul de tripano a 0,16% (preparada em soro fisiológico) à suspensão celular e observava-se as células ao microscópio óptico, numa câmara de contagem Neubauer (La Fontaine, Alemanha); as células viáveis excluem o azul de tripano enquanto que as células não viáveis, porque não excluem o corante, apresentam uma cor azul. Todas as suspensões que possuísem menos de 70% de células viáveis eram rejeitadas. A concentração dos hepatócitos na suspensão era determinada (na câmara de contagem) e, sempre que necessário, diluía-se a suspensão em solução de Krebs-Henseleit de modo a que a concentração final de hepatócitos na suspensão fosse aproximadamente de 2×10^6 células por ml.

2.2.2. Determinação do peso médio dos hepatócitos

Para a determinação do peso médio dos hepatócitos, desenhou-se hepatócitos isolados em suspensão, utilizando um microscópio óptico equipado com câmara clara e uma ampliação de 250 vezes. Mediu-se, para cada célula, o seu maior diâmetro e o diâmetro localizado na perpendicular àquele, e determinou-se seguidamente a média das duas medições (Weibel 1973). Considerou-se como volume médio de cada hepatócito o volume de uma esfera com um diâmetro igual ao valor daquela média. O peso médio de 10^6 hepatócitos foi calculado a partir do volume hepatocitário médio e do valor 1 para a densidade dos hepatócitos. O valor encontrado foi de $4,47 \pm 0,33$ mg/ 10^6 células (média $\pm$ erro padrão da média; $n=66$).

2.2.3. Experiências de incubação com noradrenalina- ^3H ou adrenalina- ^3H

2.2.3.1. Estudo do conteúdo dos hepatócitos em amina- ^3H e sua metabolização

Um ml de suspensão de hepatócitos isolados, contendo aproximadamente 2×10^6 células, era pré-incubado durante 5 minutos a 37°C , oxigenado com uma mistura de 95% O_2 e 5% CO_2 e continuamente agitado. No final desta pré-incubação, adicionava-se 1 ml de solução de Krebs-Henseleit (previamente aquecida a 37°C) contendo amina- ^3H (adrenalina- ^3H ou noradrenalina- ^3H) à suspensão celular. A concentração final de hepatócitos na suspensão era aproximadamente 10^6 células por ml e a concentração final de amina- ^3H na solução de incubação era 50 nmol/l para a adrenalina- ^3H e 50 ou 200 nmol/l para a noradrenalina- ^3H .

No final do período de incubação com a amina- ^3H , filtrava-se a suspensão através de uma membrana de nitrato de celulose com 25 mm de diâmetro e $0,8 \mu\text{m}$ de porosidade (Whatman, Mainstone, Reino Unido), separando-se deste modo as células, que ficavam retidas no filtro, do líquido de incubação. Os filtros eram em seguida lavados 4 vezes com 3 ml de solução de Krebs-Henseleit a 4°C e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A solução de incubação era recolhida e acidificada com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l.

A radioactividade total e a amina- ^3H e seus metabólitos- ^3H foram determinados em alíquotas do extracto ácido do filtro e do líquido de incubação. A recuperação da radioactividade recolhida após o processo de separação da amina-

^3H dos seus metabólitos- ^3H em relação à radioactividade total foi de $81,3 \pm 6,3\%$ (média $\pm$ erro padrão da média; $n=15$).

Em cada série de experiências incubou-se nas mesmas condições uma amostra do líquido de incubação com amina- ^3H , sem células. Essa amostra era processada do mesmo modo que as suspensões celulares, determinando-se a radioactividade total e a amina- ^3H e seus metabólitos- ^3H numa alíquota do extracto ácido do filtro (que funcionava como branco) e do líquido de incubação (que era usado como padrão de radioactividade e para a correcção da contaminação pela amina- ^3H das diversas fracções de metabólitos- ^3H e da degradação espontânea da amina- ^3H). Em cada série de experiências, incubou-se nas mesmas condições uma amostra da suspensão de hepatócitos, mas sem exposição à amina marcada. A concentração final de células viáveis nesta suspensão foi usada no cálculo dos resultados.

Numa primeira série de experiências, incubou-se as suspensões de hepatócitos com as aminas- ^3H durante 5, 10, 15 e 30 min, de modo a determinar, para cada amina- ^3H , as curvas de captação (conteúdo e metabolização) da amina- ^3H em função do tempo. Em todas as experiências posteriores, a suspensão foi incubada com a amina- ^3H durante 15 minutos.

2.2.3.1.1. Efeito de fármacos

Foram realizadas experiências de incubação com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H , em que se estudou o efeito de fármacos inibidores da MAO e da COMT sobre o conteúdo e metabolização da amina- ^3H . Utilizou-se, como inibidor da MAO, a pargilina na concentração de 500 $\mu\text{mol/l}$, e como inibidor da COMT, o Ro 01-2812, na concentração de 2 $\mu\text{mol/l}$.

Foi ainda testado o efeito da desipramina (inibidor do uptake_1 , usado na concentração de 1 $\mu\text{mol/l}$) e da corticosterona (inibidor do uptake_2 , usado na concentração de 40 $\mu\text{mol/l}$), sobre o conteúdo e metabolização de 50 nmol/l de adrenalina- ^3H ou de 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H .

Os fármacos estavam presentes durante os períodos de pré-incubação e de incubação, isoladamente ou em combinação.

2.2.3.1.2. Influência da temperatura

Para o estudo da influência da temperatura no conteúdo e metabolização de noradrenalina- ^3H realizou-se, para além das experiências descritas em I.2.2.3.1.,

experiências de incubação com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H em que todo o período de pré-incubação e incubação foram efectuados a 4°C .

2.2.3.1.3. Dependência do sódio

A sensibilidade da captação (conteúdo e metabolização) de noradrenalina- ^3H pelos hepatócitos em relação ao sódio extracelular foi testada comparando as experiências descritas em I.2.2.3.1. com experiências de incubação com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H em que o meio de pré-incubação e o meio de incubação não continham sódio. Nestes meios, o cloreto de sódio e o hidrogenocarbonato de sódio (totalizando 162 mmol/l) foram substituídos por 162 mmol/l de cloreto de colina, de modo a manter a osmolaridade do meio constante. O pH destes meios foi ajustado a 7,4 com tampão Tris.HCl (pH 7,4).

2.2.3.1.4. Determinação da actividade das enzimas (k_{enzima}) MAO e COMT

Definiu-se taxas constantes para as enzimas MAO (k_{MAO}) e COMT (k_{COMT}) não saturadas como:

$$\frac{\text{velocidade de metabolização da amina-}^3\text{H no equilíbrio}}{\text{concentração intracelular de amina-}^3\text{H não metabolizada no equilíbrio}}$$

A velocidade de metabolização da amina- ^3H no equilíbrio corresponde à formação de metabólitos- ^3H da amina- ^3H por grama de células e por minuto, no equilíbrio. A concentração intracelular da amina- ^3H corresponde à amina- ^3H intacta presente nas células por ml de volume celular, no equilíbrio. Os dois parâmetros acima referidos foram determinados com base no conhecimento do peso dos hepatócitos. A actividade da MAO (k_{MAO}) foi determinada em condições de inibição da COMT; a actividade da COMT (k_{COMT}) foi determinada em condições de inibição da MAO (Grohmann 1987).

O valor de taxa constante de uma enzima é equivalente à razão V_{max}/K_m para essa enzima; esse valor é uma medida da actividade da enzima, sendo expresso em minuto^{-1} .

2.2.3.2. Inibição da MAO e da COMT: estudo do conteúdo dos hepatócitos em amina- ^3H

Um ml de suspensão de hepatócitos, com 2×10^6 células (ver secção I.2.2.1.), era pré-incubada durante 5 minutos a 37°C , oxigenada com uma mistura de 95% O_2 e 5% CO_2 e continuamente agitada. No final deste período, adicionava-se 1 ml de solução de Krebs-Henseleit (previamente aquecida a 37°C) contendo amina- ^3H (adrenalina- ^3H ou noradrenalina- ^3H) à suspensão celular. A concentração final de hepatócitos na suspensão era de 10^6 células por ml e a concentração final de amina- ^3H na solução de incubação era de 50 nmol/l para a adrenalina- ^3H e de 200 nmol/l para a noradrenalina- ^3H . Em todas as experiências, a MAO e a COMT estavam inibidas com 500 $\mu\text{mol/l}$ de pargilina e 2 $\mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812 (presentes durante o período de pré-incubação e de incubação).

A incubação dos hepatócitos isolados com as aminas- ^3H terminava por filtração rápida da suspensão através de uma membrana de nitrato de celulose com 25 mm de diâmetro e 0,8 μm de porosidade (Whatman, Mainstone, Reino Unido), separando-se deste modo as células, que ficam retidas no filtro, do líquido de incubação. Os filtros eram em seguida lavados 4 vezes com 3 ml de solução de Krebs-Henseleit a 4°C e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l.

O conteúdo em noradrenalina- ^3H das células era determinado doseando a radioactividade total em alíquotas do extracto ácido do filtro.

Em cada série de experiências foi incubada, nas mesmas condições, uma amostra do líquido de incubação com amina- ^3H , sem hepatócitos. Essa amostra era processada do mesmo modo que as suspensões celulares, determinando-se a radioactividade total numa alíquota do extracto ácido do filtro (que funcionava como branco) e do líquido de incubação (que era usado como padrão de radioactividade). Uma amostra da suspensão de hepatócitos era em cada série de experiências incubada nas mesmas condições, mas sem ser exposta à amina marcada. A concentração final de células viáveis nesta suspensão foi usada no cálculo dos resultados.

Numa primeira série de experiências, os hepatócitos em suspensão foram incubados com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H durante 5, 10, 15 e 30 min, para se determinar a curva do conteúdo em amina- ^3H nos hepatócitos em função do tempo. Em todas as experiências posteriores, as suspensões foram incubadas com as aminas- ^3H durante 15 minutos.

2.2.3.2.1. Efeito de fármacos

O efeito de diversos fármacos no conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas- ^3H foi estudado em experiências em que esses compostos (1 $\mu\text{mol/l}$ de desipramina, 40 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona, 100 $\mu\text{mol/l}$ de probenecide, 10

$\mu\text{mol/l}$ de cianina 863 e $200 \mu\text{mol/l}$ de bilirrubina) estavam presentes nos períodos de pré-incubação e de incubação com noradrenalina- ^3H e adrenalina- ^3H .

2.2.3.2.2. Dependência do sódio e influência da despolarização da membrana celular

Para se estudar a sensibilidade do conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas- ^3H em relação ao sódio extracelular, efectuou-se experiências com noradrenalina- ^3H e adrenalina- ^3H em que o meio de pré-incubação e o meio de incubação não continham aquele ião. Nestes meios, o cloreto de sódio e o hidrogenocarbonato de sódio (totalizando 162 mmol/l) foram substituídos por 162 mmol/l de cloreto de colina (experiências com noradrenalina- ^3H e adrenalina- ^3H) ou por 162 mmol/l de cloreto de lítio (experiências com noradrenalina- ^3H), mantendo-se deste modo a osmolaridade do meio. O pH destes meios foi ajustado a 7,4 com tampão Tris.HCl (pH 7,4).

Para estudar o efeito da despolarização da membrana celular no conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas- ^3H , as células foram despolarizadas por um aumento da concentração de cloreto de potássio (de 7 mmol/l para 50 mmol/l) das soluções de pré-incubação e de incubação. Para controlo dos efeitos inespecíficos do aumento da osmolaridade, fez-se experiências de controlo com quantidades equimolares (50 mmol/l) de cloreto de colina (experiências com noradrenalina- ^3H e adrenalina- ^3H), de cloreto de lítio ou de galactose (experiências com noradrenalina- ^3H) nas soluções de pré-incubação e de incubação.

2.3. Fígado perfundido

2.3.1. Experiências de perfusão com noradrenalina- ^3H : estudo do conteúdo do tecido em noradrenalina- ^3H , sua metabolização e excreção

Anestesiou-se Ratos Wistar (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras) com peso compreendido entre os 400 e os 500 g com pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso, administrado por via i.p.), administrando-se simultaneamente heparina sódica (1000 U.I. , via i.p.). Após anestesia do animal, o colédoco, a veia porta e a veia cava eram canulados, e o fígado era perfundido (através da veia porta) *in situ*, com solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4) a 37°C , com a seguinte composição (nmol/l): 113 NaCl, 4,7 KCl, 1,18 KH_2PO_4 , 24,6 NaHCO_3 , 11,5 (+)-glicose, 3,15 CaCl_2 , 1,18 MgSO_4 , 0,57 ácido ascórbico, 0,045 EDTA dissódico, 0,5 % (p/v) de albumina de soro bovino e $15 \mu\text{mol/l}$ de taurocolato de sódio. A velocidade de

perfusão era mantida entre os 14-16 ml/minuto, por meio de uma bomba peristáltica (Harvard, Millis, Mass., EUA) e o líquido de perfusão não era recirculado.

Os fígados eram inicialmente perfundidos durante 15 minutos com solução de Krebs-Henseleit, seguindo-se uma perfusão com solução de Krebs-Henseleit contendo noradrenalina- ^3H (2 nmol/l) durante 60 minutos. Durante o período inicial de perfusão (15 minutos) não se colhia amostras; no período experimental subsequente, o efluente venoso e a bile eram colhidos. O efluente venoso era colhido através da veia cava canulada, aos 5, 15, 25, 35, 45 e 55 minutos de perfusão com noradrenalina- ^3H , durante períodos de 1 minuto. Adicionalmente, colhia-se a bile através da cânula colocada no colédoco, durante 2 períodos de 30 minutos cada. As amostras de efluente e de bile eram acidificadas com 10% (v/v) de ácido perclórico 2 mol/l. No final da perfusão com noradrenalina- ^3H , o fígado era perfundido com 20 ml de solução de Krebs-Henseleit a 4°C, infundida rapidamente, de modo a remover a radioactividade localizada extracelularmente. O fígado era depois removido, cortado em pequenas porções, seco rapidamente em papel de filtro, pesado e colocado em 40 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l.

A radioactividade total e a noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H foram determinados em alíquotas do extracto ácido do tecido, do líquido de perfusão e da bile. A recuperação da radioactividade recolhida após o processo de separação da amina- ^3H dos seus metabólitos- ^3H em relação à radioactividade total foi de $89,0 \pm 1,1\%$ (média aritmética $\pm$ erro padrão da média; $n=12$).

Em cada uma das experiências processou-se, do mesmo modo que as amostras do efluente venoso, uma amostra do líquido de perfusão com noradrenalina- ^3H , determinando-se a radioactividade total e a noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H nesta amostra, que funcionava como padrão de radioactividade e era também usada para a correcção da contaminação pela noradrenalina- ^3H das diversas fracções de metabólitos- ^3H e da degradação espontânea da noradrenalina- ^3H .

2.3.2. Efeito de fármacos

Testou-se o efeito da inibição simultânea da MAO e da COMT sobre a captação e posterior destino da noradrenalina- ^3H , utilizando para esse efeito a pargilina e o tolcapone, respectivamente. Os ratos foram tratados com pargilina (75 mg/kg de peso corporal), administrada por via i.p. 3 horas antes da perfusão do fígado. O tolcapone estava presente no líquido de perfusão durante todo o período experimental, na concentração de 1 $\mu\text{mol/l}$.

Numa outra série experimental, testou-se o efeito da inibição da captação extraneuronal de catecolaminas (*uptake₂*) sobre a captação e posterior destino da noradrenalina-³H, utilizando para esse efeito a corticosterona (na concentração de 40 μ mol/l), presente durante todo o período experimental.

2.4. Cálculos e análise estatística

Os resultados foram expressos em médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média ou em médias geométricas com os respectivos intervalos a 95% de confiança. *n* representa o n° de experiências.

A razão célula:meio para a noradrenalina-³H e adrenalina-³H no final do período de incubação foi calculada com base no conhecimento do conteúdo em amina-³H dos hepatócitos (pmoles/10⁶ células), do peso dos hepatócitos, que foi determinado como 4,5 mg/10⁶ células (vêr secção I.2.2.2.) e da concentração da amina-³H no meio de incubação.

A análise estatística da diferença entre dois grupos experimentais fez-se pelo teste *t* de Student (para valores emparelhados ou independentes). A análise estatística das diferenças entre múltiplos grupos experimentais fez-se pela análise da variância (ANOVA) (para valores emparelhados ou independentes), sendo as comparações *post hoc* efectuadas com o teste Tukey HSD (para valores emparelhados ou independentes) (Hays 1988). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

2.5. Fármacos utilizados

Adrenalina-³H ((-)-[N-metil-³H]-adrenalina; actividade específica 78,1 Ci/mmol), noradrenalina-³H ((-)-[7-³H]-noradrenalina; actividade específica 12,4-13,8 Ci/mmol), sorbitol-³H ((+)-[1-³H(N)]-sorbitol; actividade específica 12,9 Ci/mmol) (New England Nuclear Chemicals, Dreieich, Alemanha); bilirrubina (Merck, Darmstadt, Alemanha); cloridrato de desipramina (Ciba-Geigy, Basileia, Suíça); corticosterona (Sigma, S. Luís, Mo., EUA); heparina sódica (Solupharm & CoKG, Melsungen, Alemanha); pentobarbital sódico (Siegfred, Zofingen, Suíça); Ro 01-2812 e tolcapone (F. Hoffman La Roche, Basileia, Suíça); U-0521 (Upjohn, Kalamazoo, Mi., EUA); albumina do soro bovino, azul de tripano, cianina 863, cloridrato de pargilina, collagenase do tipo I, HEPES, probenecide e taurocolato de sódio (Sigma, S. Luís, Mo., EUA). Todos os outros reagentes usados foram produtos *pro analysi*. Os fármacos foram preparados sempre no dia da experiência e mantidos a 4°C até à sua utilização.

O Ro 01-2812 e o tolcapone foram dissolvidos em DMSO, presente no meio de incubação numa concentração final de 14-70 mmol/l, e no meio de perfusão numa concentração final de 14 mmol/l; os controlos destas experiências continham idêntica concentração daquele agente. A corticosterona foi dissolvida em etanol, presente no meio de incubação e de perfusão numa concentração final de 86 e 17 mmol/l, respectivamente; os controlos destas experiências continham igual concentração daquele agente.

3. Preparação do material para doseamento das aminas- ^3H e dos seus metabólitos- ^3H

Após um período máximo de 48 horas em que as amostras (tecidos, células, líquidos de incubação, líquidos de perfusão, bile) foram conservadas a 4°C, determinou-se a radioactividade total, a amina- ^3H e os seus metabólitos- ^3H . Para a determinação da noradrenalina- ^3H ou adrenalina- ^3H e dos metabólitos- ^3H formados, usou-se alíquotas dos extractos ácidos dos tecidos (ou das células) e alíquotas dos líquidos de incubação, dos líquidos de perfusão ou da bile acidificados.

A adrenalina- ^3H ou noradrenalina- ^3H e os seus metabólitos- ^3H foram separados por cromatografia em colunas de alumina (óxido de alumínio 90, actividade II-III, Merck, Darmstadt, Alemanha) e de resina Dowex (Dowex-50Wx4-400, Sigma, S. Luís, Mo., EUA), segundo o método descrito por Graefe *et al.* (1973). Isolou-se 5 fracções: adrenalina ou noradrenalina, 3,4-dihidroxifenilglicol (DOPEG), ácido 3,4-di-hidroxi-mandélico (DOMA), metanefrina (MN) ou normetanefrina (NMN) e a fracção constituída pela soma do 4-hidroxi-3-metil-fenilglicol (MOPEG) com o ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico (VMA). Determinou-se a radioactividade de todas as fracções obtidas por separação cromatográfica.

4. Doseamento da radioactividade

A radioactividade das amostras foi medida por cintilometria líquida num contador de cintilações (LKB, modelo RackBeta 1209, Wallac Oy, Turku, Finlândia). Para cada amostra usou-se 8 ml de mistura de cintilação (OptiPhase "Hisafe" 3, LKB, Wallac Oy, Turku, Finlândia). As cintilações por minuto (c.p.m.) foram convertidas em pmoles sem correcção da taxa de recuperação.

Obteve-se, assim, o valor de amina- ^3H (noradrenalina- ^3H ou adrenalina- ^3H) presente no tecido ou nas células no fim da experiência (experiências de incubação)

ou presente no tecido e na bile no fim da experiência (experiências de perfusão), denominado "conteúdo" em amina- ^3H , e os valores dos metabólitos- ^3H formados durante todo o período experimental, presentes no tecido (ou células) e no líquido de incubação (experiências de incubação), ou presentes no tecido, no líquido de perfusão e na bile (experiências de perfusão) (expressos em pmoles/g de tecido ou em pmoles/ 10^6 células).

II. ESTUDO DA CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP^+ EM FÍGADO DE RATO

1. Culturas primárias de hepatócitos

1.1. Preparação do material

Ratos Wistar machos (Instituto Central de Criação de Animais para Experimentação, Hannover, Alemanha) com peso compreendido entre os 200-300 g foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg de peso, administrado por via i.p., juntamente com 1000 U.I. de heparina sódica.

Os hepatócitos isolados foram preparados utilizando a técnica descrita por Seglen (1976), que consiste na perfusão do fígado *in situ* com collagenase, sem recirculação do líquido, com algumas modificações introduzidas por nós.

Após anestesia do animal, canulava-se a veia porta e a veia cava, e perfundia-se o fígado (através da veia porta) com 250 ml de solução de Krebs-Henseleit sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} , com composição, em mmol/l: 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO_3 , 11 (+)-glicose, 1,18 KH_2PO_4 , contendo ainda 50,36 HEPES). No final desta perfusão, o fígado era perfundido com 200 ml de solução de Krebs-Henseleit com composição, em mmol/l: 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO_3 , 11 (+)-glicose, 1,18 KH_2PO_4 , 0,57 MgSO_4 , 2,51 CaCl_2 ; a solução continha ainda 50,36 (mmol/l) HEPES, 0,05% (p/v) de collagenase do tipo I e penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$). As soluções de perfusão eram infundidas utilizando uma bomba peristáltica (PLP 132100, Desaga, Heidelberg, Alemanha) e a velocidade de infusão era de 15-20 ml/minuto; as soluções de perfusão não eram recirculadas. Todas as soluções de perfusão possuíam um pH de 7,4 (ajustado com NaOH), estavam esterilizadas (por filtração através de filtros com 0,22 μm ; Millipore, Molsheim, França) e eram infundidas a 37°C. Todo o método era efectuado em condições de assepsia.

Após a perfusão com collagenase, o fígado era rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit a 37°C com a seguinte composição (em mmol/l): 137 NaCl, 5,37 KCl, 25 NaHCO_3 , 11 (+)-glicose, 1,18 KH_2PO_4 , 0,57

MgSO₄, 2,51 CaCl₂, 0,57 MgSO₄, 2,51 CaCl₂, 0,3 ácido ascórbico, 0,045 EDTA dissódico, contendo adicionalmente HEPES (50,36 mmol/l), penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml), a pH 7,4 e esterilizada.

Todos os procedimentos seguintes eram efectuados numa câmara de fluxo laminar. As células isoladas ou agregados de um pequeno número de células eram obtidos por simples ruptura da cápsula do fígado e agitação ligeira do mesmo e as suspensões assim obtidas eram em seguida sujeitas ao seguinte procedimento, efectuado a 4°C, com a finalidade de purificar a suspensão celular, de modo a esta possuir, tanto quanto possível, apenas hepatócitos isolados viáveis:

1. Filtração através de uma rede de "nylon" com porosidade de 100 µm
2. Centrifugação a 30 x G durante 5 minutos (5 vezes)
3. Rejeição do sobrenadante e ressuspensão das células em solução de Krebs-Henseleit

No final da última centrifugação, as células eram ressuspensas em meio de cultura L₁₅-Leibovitz (Gibco, Eggenstein, Alemanha) suplementado com soro bovino fetal (10% v/v), insulina (5 µg/ml), penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml). A suspensão celular era em seguida distribuída por placas de cultura (placas de Petri de plástico com um diâmetro de 60 mm; Nunc, Roskilde, Dinamarca) previamente revestidas com colagénio, e as placas eram colocadas a incubar a 37°C numa incubadora (com 95% ar, 5% CO₂ e 99% de humidade relativa).

Uma vez colocadas a incubar, as células viáveis aderiam rapidamente ao fundo da placa. Após um período de 3 horas de incubação, o meio de cultura era removido e substituído por meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mix F-12 (1:1), suplementado com soro bovino fetal (5% v/v), dexametasona (100 nmol/l), penicilina (100 U.I./ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Por esta altura, observava-se já numerosos aglomerados ou fiadas de células contendo frequentemente 2-3 núcleos, o que demonstra uma multiplicação celular bastante activa.

O meio de cultura era substituído todos os dias e geralmente ao fim de 2-3 dias estabelecia-se uma monocamada celular confluenta nas placas de cultura (Figura 2). Cada placa de cultura com uma monocamada celular confluenta continha cerca de 1,75 mg de proteínas celulares.

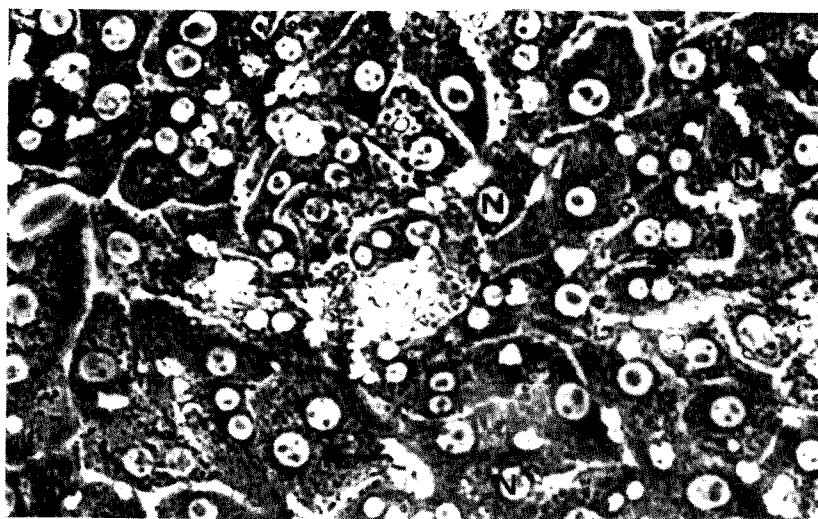


Figura 2. Hepatócitos de Rato em cultura primária. Aspecto de uma cultura com 2 dias, podendo observar-se uma monocamada celular confluenta perfeitamente formada. As células, com uma forma poligonal, apresentam frequentemente 2 núcleos (setas). N-núcleo. (Ampliação: 250x.)

1.2. Experiências de incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$: estudo do conteúdo dos hepatócitos em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$

As experiências de incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ foram efectuadas em culturas de hepatócitos em que a monocamada celular confluenta estava perfeitamente formada.

As células eram pré-incubadas a 37°C durante 20 minutos numa solução nutritiva contendo (em mmol/l): 125 NaCl, 4,8 KCl, 5,6 (+)-glicose, 1,2 CaCl_2 , 1,2 KH_2PO_4 , 1,2 MgSO_4 e 25 HEPES.NaOH (pH 7,4). Em seguida, as células eram incubadas a 37°C com 3 ml de solução nutritiva contendo 100 nmol/l de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$. A incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ era finalizada removendo rapidamente a solução de incubação e lavando as células com 3,5 ml de solução nutritiva a 4°C por 4 vezes. Após a lavagem, as células eram solubilizadas com Triton X-100 (0,1% (v/v), dissolvido em Tris.HCl (5 mmol/l, pH 7,4)) e a radioactividade total era determinada em alíquotas do extracto de Triton X-100 contendo as células solubilizadas. Em cada uma das experiências incubou-se uma amostra do líquido de incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, sem células. Essa amostra era processada do mesmo modo que as células, determinando-se a radioactividade total numa alíquota desta amostra, que funcionou como padrão de radioactividade.

Numa primeira série de experiências, determinou-se as curvas de variação temporal do conteúdo das células em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, incubando as culturas de hepatócitos com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ durante 1, 4, 10, 20, 40 e 90 minutos. Em todas as experiências subsequentes, a suspensão foi incubada com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ durante 2 minutos.

1.2.1. Efeito de fármacos

A influência do decínio 22 sobre o conteúdo dos hepatócitos em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ foi estudada determinando a curva de variação temporal do conteúdo celular de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ (tal como descrito na secção II.1.2.) na presença, durante a pré-incubação e incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, de $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ daquele composto.

Quando o efeito de diversos fármacos sobre a captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ foi testado, os compostos estavam presentes na solução de pré-incubação e de incubação. Foram testados a corticosterona, o decínio 22, a cianina 863, a quinina, a quinidina, a clonidina e a O-metilisoprenalina. Estes fármacos foram testados em diversas concentrações, com aumentos de concentração de 3 vezes. Foi testado também o efeito do tetraetilamónio e do taurocolato de sódio, na concentração de $100\text{ }\mu\text{mol/l}$.

1.2.2. Saturabilidade da captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$

Para se determinar as constantes cinéticas do sistema de transporte envolvido na captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ pelos hepatócitos, as células foram incubadas com concentrações de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ que variaram de 2 a $64\text{ }\mu\text{mol/l}$. A captação não-específica de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ foi determinada na presença de $300\text{ }\mu\text{mol/l}$ de quinina. A captação específica de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ foi definida como a fracção da captação total sensível a $300\text{ }\mu\text{mol/l}$ de quinina.

1.3. Determinação do volume médio dos hepatócitos

As células foram incubadas a 4°C durante 2 minutos em 3 ml de solução nutritiva contendo água- ^3H ($4,1 \times 10^{-8}\text{ Ci/ml}$) e sorbitol- ^{14}C ($100\text{ }\mu\text{mol/l}$; $2,2 \times 10^{-9}\text{ Ci/ml}$). No final da incubação, o meio de incubação era removido e as células eram solubilizadas com Triton X-100 (0,1% (v/v), dissolvido em Tris.HCl 5 mmol/l , pH 7,4). Determinava-se a radioactividade total em alíquotas do extracto de Triton X-100 contendo as células solubilizadas. O volume das células em cultura foi calculado como a diferença entre o volume total ocupado pela água- ^3H e o volume ocupado pelo sorbitol- ^{14}C (considerado como espaço extracelular) e o valor encontrado foi de $2,5 \pm 0,5\text{ }\mu\text{l/mg}$ de proteína (média $\pm$ erro padrão da média; $n=10$).

1.4. Determinação de proteínas

As proteínas totais dos hepatócitos foram calculadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951).

1.5. Cálculos e análise estatística

As médias aritméticas são apresentadas com erros padrão da média e as médias geométricas são apresentadas com intervalos a 95% de confiança. n representa o nº de experiências.

A análise da captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ ao longo do tempo de incubação baseou-se num modelo unicompartmental e foi efectuada ajustando os valores experimentais obtidos aos parâmetros da equação (1), através de regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados baseado no algoritmo de Marquadt (Motulsky e Ransnas 1987), calculada automaticamente (Wilkinson 1989).

$$C_i/C_o = k_{in}/k_{out} (1 - e^{-k_{out} \cdot t}) \quad (1)$$

C_i e C_o representam a concentração intracelular e extracelular de substrato, respectivamente, e a razão C_i/C_o denomina-se factor de acumulação. Os factores de acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nas células foram calculados a partir dos valores de conteúdo de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nos hepatócitos, do volume médio dos hepatócitos e da concentração extracelular de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$. O volume médio dos hepatócitos foi determinado tal como descrito na secção II.1.3. k_{in} representa a taxa constante de influxo de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos (expressa em $\mu\text{l}/(\text{mg de proteína} \cdot \text{minuto})$) e k_{out} representa a taxa constante de efluxo de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ dos hepatócitos (expressa em minuto^{-1}). t representa o tempo de incubação; A_{max} corresponde ao factor de acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ no equilíbrio (C_i/C_o quando t tende para ∞).

A análise da curva de saturação do transporte de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos foi efectuada por ajustamento dos valores experimentais obtidos à equação de Michaelis-Menten, através de regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados baseado no algoritmo de Marquardt (Motulsky e Ransnas 1987), calculada automaticamente (Wilkinson 1989).

As CI_{50} (concentração de inibidor necessária para reduzir a 50% a velocidade inicial de transporte de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$) foram determinadas ajustando os resultados experimentais obtidos aos parâmetros da equação de Hill para inibição em múltiplos locais (Segel 1975, equação VIII-9), através de regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados baseado no algoritmo de Marquardt (Motulsky e Ransnas 1987), calculada automaticamente (Wilkinson 1989). Cada experiência

foi analisada separadamente; as CI_{50} estão expressas como médias geométricas e os coeficientes de Hill estão expressos como médias aritméticas. As CI_{50} obtidas são praticamente idênticos aos K_i , pois a concentração de $MPP^+ -^3H$ utilizada é muito inferior ao K_m do transportador (Cheng e Prussoff 1973).

Para comparação das diferenças entre dois grupos, utilizou-se o teste t de Student (para valores independentes). A análise estatística da diferença entre múltiplos grupos foi efectuada pela análise de variância (ANOVA) (para valores independentes) seguido do teste Tukey HSD (para valores independentes). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

1.6. Fármacos utilizados

$MPP^+ -^3H$ (acetato de N-[metil- ^3H]-4-fenilpiridínio; actividade específica 83 Ci/mmol), sorbitol- ^{14}C ((+)-[^{14}C]-sorbitol; actividade específica 0,35 Ci/mmol) e $H_2O -^3H$ (New England Nuclear Chemicals, Bad Homburg, Alemanha); cloridrato de O-metilisoprenalina (Boehringer, Ingelheim, Alemanha); colagénio do tipo R (Serva, Heidelberg, Alemanha); heparina sódica (Thrombophob[®], Nordmark, Uetersen, Alemanha); HEPES e Tris (Roth, Karlsruhe, Alemanha); MPP^+ (iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio; Research Biochemicals, Biotrend, Colónia, Alemanha); pentobarbital sódico (Narcoren[®], Thone-Merieux, Laupheim, Alemanha); solução de penicilina/estreptomicina (Gibco, Eggenstein, Alemanha); sulfato de quinidina (Merck, Darmstadt, Alemanha); cianina 863, cloridrato de clonidina, colagenase do tipo I, decínio 22, dexametasona, insulina, hemissulfato de quinina, soro bovino fetal, taurocolato de sódio e tetraetilamónio (Sigma, Deisenhofen, Alemanha).

A corticosterona foi dissolvida em etanol. A concentração final deste solvente no líquido de incubação foi de 17 mmol/l. Os controlos destas experiências continham igual concentração de etanol.

2. Hepatócitos isolados em suspensão

2.1. Preparação do material

Utilizou-se ratos Wistar machos (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras) com peso compreendido entre os 200-300 g, que foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg de peso, administrado por via i.p., juntamente com 1000 U.I. de heparina sódica. Os hepatócitos isolados foram

preparados de acordo com o método descrito por Seglen (1976) com algumas modificações introduzidas por nós, conforme descrito na secção I.2.2.1.

2.2. Experiências de incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$: estudo do conteúdo dos hepatócitos em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$

1 ml de suspensão de hepatócitos isolados, com uma concentração de células de aproximadamente 2×10^6 células por ml, era pré-incubada durante 5 minutos a 37°C , oxigenada com uma mistura de 95% O_2 e 5% CO_2 e continuamente agitada. No final deste período, adicionava-se à suspensão celular 1 ml de solução de incubação (previamente aquecida a 37°C) contendo $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$. A concentração final de hepatócitos na suspensão era de aproximadamente 10^6 células por ml e a concentração final de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ na solução de incubação era de 100 nmol/l. A incubação dos hepatócitos com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ terminava com uma rápida filtração da suspensão através de uma membrana de nitrato de celulose com 25 mm de diâmetro e $0,8 \mu\text{m}$ de porosidade (Whatman, Maidstone, Reino Unido). Os filtros eram em seguida lavados 4 vezes com 3 ml de solução de incubação a 4°C e colocados em 2 ml de ácido perclórico 0,2 mol/l. A radioactividade total era determinada em alíquotas do extracto ácido do filtro contendo as células.

Em cada uma das experiências incubou-se e processou-se, do mesmo modo que as suspensões celulares, uma amostra do líquido de incubação com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, sem células. Determinava-se a radioactividade total numa alíquota do extracto ácido do filtro (que era usada como branco) e do líquido de incubação (que funcionava como padrão de radioactividade). Em cada série de experiências, incubou-se nas mesmas condições uma amostra da suspensão de hepatócitos, mas sem exposição à amina marcada. A concentração final de células viáveis nesta suspensão foi usada no cálculo dos resultados.

Numa primeira série experimental, incubou-se as suspensões de hepatócitos isolados com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ durante 1, 4, 10, 20, 40 e 90 minutos, de modo a determinar-se a variação temporal do conteúdo dos hepatócitos em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$. Em todas as experiências posteriores, as suspensões de hepatócitos isolados foram incubadas com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ durante 2 ou 15 minutos.

2.2.1. Efeito de fármacos

Para se estudar a influência do decínio 22 sobre o conteúdo das células em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, determinou-se a curva de variação temporal do conteúdo celular de

MPP⁺-³H, como descrito na secção II.2.2., na presença (durante a pré-incubação e incubação) de 1 μ mol/l de decínio 22.

O efeito da (-)-noradrenalina no conteúdo dos hepatócitos em MPP⁺-³H foi estudado em experiências em que as células foram incubadas com MPP⁺-³H (durante 2 ou 15 minutos) na presença de 100 ou 200 μ mol/l da amina (durante a pré-incubação e incubação).

2.2.2. Dependência do sódio

Para se caracterizar o sistema de transporte do MPP⁺-³H para os hepatócitos, estudou-se o efeito da ausência do sódio extracelular no conteúdo dos hepatócitos em MPP⁺-³H, em experiências de incubação com MPP⁺-³H durante 15 minutos, em que o meio de pré-incubação e o meio de incubação não continham este ião. O cloreto de sódio e o hidrogenocarbonato de sódio desses meios (totalizando 162 mmol/l) foram substituídos por 162 mmol/l de cloreto de colina, mantendo-se deste modo a osmolaridade do meio. O pH dos meios foi ajustado a 7,4 com NaOH.

2.3. Determinação de proteínas

A concentração proteica da suspensão de hepatócitos foi determinada pelo método de Bradford e colaboradores (1976).

2.4. Cálculos e análise estatística

Os resultados estão apresentados como médias aritméticas ($\pm$ erros padrão da média). *n* representa o n^o de experiências.

A análise da captação de MPP⁺-³H nos hepatócitos ao longo do tempo de incubação baseou-se num modelo unicompartmental e foi efectuada ajustando os valores experimentais obtidos aos parâmetros da equação (1), através de regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados baseado no algoritmo de Marquardt (Motulsky e Ransnas 1987), calculada automaticamente (Graphpad Inplot[®], Graphpad Software Inc., San Diego, USA).

$$C_t = k_{in}/k_{out} (1 - e^{-k_{out} \cdot t}) \quad (1)$$

C_t representa o conteúdo de MPP⁺-³H nas células (em pmoles/mg de proteína celular), k_{in} representa a taxa constante de influxo de MPP⁺-³H para os

hepatócitos (expressa em $\mu\text{l}/(\text{mg de proteína} \cdot \text{minuto})$) e k_{out} representa a taxa constante de efluxo de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ dos hepatócitos (expressa em minuto^{-1}). t representa o tempo de incubação; C_{max} define-se como o conteúdo de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ no equilíbrio (C_t quando t tende para ∞).

A razão célula:meio para o $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ no final do período de incubação foi calculada com base no conhecimento do conteúdo em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ dos hepatócitos (em $\text{pmoles}/10^6$ células), do peso dos hepatócitos, que foi determinado como sendo $4,5 \text{ mg}/10^6$ células (ver secção I.2.2.2.) e da concentração de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ no meio de incubação.

A análise da diferença entre dois grupos foi efectuada utilizando o teste t de Student (para valores independentes). A análise estatística da significância da diferença entre múltiplos grupos foi efectuada pela análise de variância (ANOVA) (para valores independentes) seguida do teste Tukey HSD (para valores independentes). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

2.5. Fármacos utilizados

$\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ (acetato de N-[metil- ^3H]-4-fenilpiridínio; actividade específica $80 \text{ Ci}/\text{mmol}$) (New England Nuclear Chemicals, Dreieich, Alemanha); heparina sódica (Solupharm & CoKG, Melsungen, Alemanha); MPP^{+} (iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio; Research Biochemicals, Biotrend, Colónia, Alemanha); pentobarbital sódico (Siegfred, Zofingen, Suíça); bitartarato de (-)-noradrenalina, colagenase do tipo I, decínio 22 e HEPES (Sigma, S. Luís, Mo., EUA). Todos os outros reagentes usados foram produtos *pro analysi*. Os fármacos foram preparados sempre no dia da experiência e mantidos a 4°C até à sua utilização.

3. Doseamento da radioactividade

Em experiências com culturas primárias de hepatócitos, a radioactividade das amostras foi medida por cintilometria líquida num contador de cintilações (LKB, modelo RackBeta 1417, Wallac Oy, Turku, Finlândia). Para cada amostra usou-se 6 ml de mistura de cintilação (Rotising Ecoplus, Roth, Karlsruhe, Alemanha). As cintilações por minuto (c.p.m.) foram convertidas em pmoles sem correcção da taxa de recuperação. Obteve-se, assim, o valor de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ presente nas células no fim da incubação, denominado "conteúdo" em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ (expresso em pmoles/mg de proteína celular).

Em experiências com suspensões de hepatócitos isolados, a radioactividade das amostras foi medida por cintilometria líquida num contador de cintilações

(LKB, modelo RackBeta 1209, Wallac Oy, Turku, Finlândia). Para cada amostra usou-se 8 ml de mistura de cintilação (OptiPhase "Hisafe" 3, LKB, Wallac Oy). As cintilações por minuto (c.p.m.) foram convertidas em pmoles sem correcção da taxa de recuperação. Obteve-se, assim, o valor de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ presente nas células no fim da incubação, denominado "conteúdo" em $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ (expresso em pmoles/mg de proteína celular ou em pmoles/ 10^6 células).

RESULTADOS

I. CAPTAÇÃO E O-METILAÇÃO EXTRANEURONIAL DE ADRENALINA EM AORTA DE COELHO

Para a totalidade das experiências realizadas, calculou-se os seguintes parâmetros:

- conteúdo em adrenalina-³H- quantidade de adrenalina-³H presente no tecido no final da incubação.

- formação de metabólito-³H- quantidade de metabólito-³H formado durante a incubação, presente no tecido e no líquido de incubação.

- captação de adrenalina-³H- soma do conteúdo em adrenalina-³H do tecido e do total de metabólitos-³H formados.

I. Captação extraneuronal de adrenalina-³H: conteúdo do tecido em adrenalina-³H e sua O-metilação (MAO inibida)

Incubou-se tiras de aorta de Coelho a 37°C durante 15 minutos com 50 nmol/l de adrenalina-³H, estando a captação neuronal e a MAO inibidas com desipramina (1 μ mol/l) e pargilina (500 μ mol/l), respectivamente. Deste modo, estudou-se a captação extraneuronal (conteúdo e O-metilação) de adrenalina-³H.

As tiras de aorta incubadas com adrenalina-³H captaram uma quantidade apreciável de amina-³H (Figura 3). Do total de adrenalina-³H captada pelo tecido, 199 ± 17 pmoles/g ($n=4$), cerca de 80% foi metabolizado. A MN-³H, formada pela acção da COMT, foi o metabólito mais abundante, correspondendo a 85% do total de metabolização. Os metabólitos desaminados e O-metilados (OMDA-³H) formaram-se em pequena quantidade e praticamente não houve formação de metabólitos desaminados (DOPEG-³H e DOMA-³H) (Figura 3). A restante amina captada (36 ± 7 pmoles/g; $n=4$) permaneceu na aorta sob a forma de amina intacta, obtendo-se uma razão tecido/meio para a adrenalina-³H de 0,72 ml/g, o que significa que não houve acumulação de adrenalina-³H no tecido.

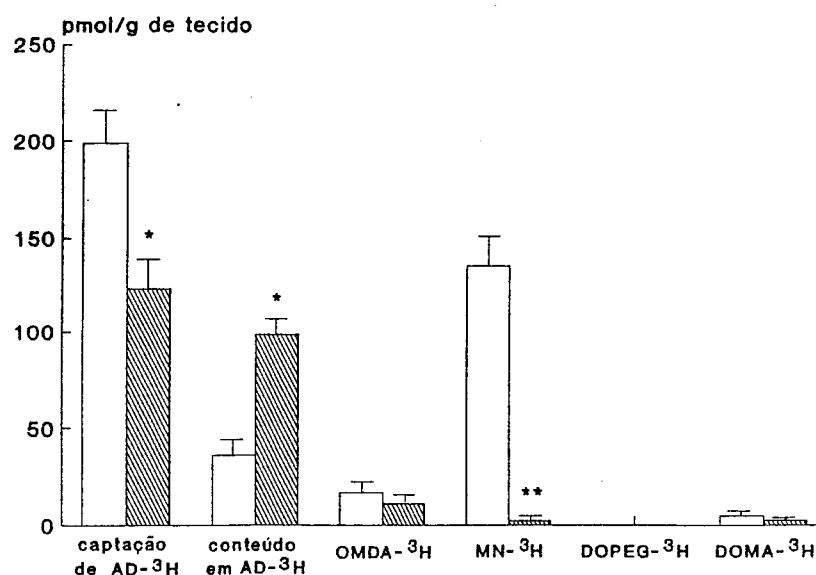


Figura 3. Captação (conteúdo em adrenalina-³H e metabólitos-³H formados) de adrenalina-³H por tiras de aorta incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina-³H durante 15 minutos. As tiras foram tratadas com desipramina (1 µmol/l) e com pargilina (500 µmol/l), de modo a inibir-se a captação neuronal e a MAO, respectivamente. As experiências foram realizadas na ausência (□ ; n=4) ou na presença (▨ ; n=4) do inibidor da COMT, Ro 01-2812 (2 µmol/l). AD-adrenalina. Os resultados estão apresentados em pmoles/g de tecido (médias aritméticas ± erro padrão da média). Estatisticamente diferente do controle: **P*<0,01, ***P*<0,005 (teste t de Student para valores emparelhados).

1.1. Efeito de inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas (*uptake*₂)

Estudou-se o efeito de vários inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂, na O-metilação e conteúdo de adrenalina-³H. Todos os inibidores testados, com a exceção do fosfato de hidrocortisona, reduziram significativamente a O-metilação de adrenalina-³H. As concentrações de cada um dos inibidores necessárias para reduzir em 50% a formação de MN-³H, as *CI*₅₀, estão apresentadas na Tabela 1. A ordem decrescente de potência dos diferentes inibidores foi: corticosterona-testosterona-17β-estradiol-DOCA-progesterona-metanefrina.

Para além de reduzirem a O-metilação de adrenalina-³H, todos os inibidores do *uptake*₂, com exceção do fosfato de hidrocortisona, produziram um aumento da ordem dos 50% no conteúdo em adrenalina-³H do tecido (Figura 4).

A captação de adrenalina-³H pelas tiras de aorta foi reduzida por todos os inibidores, mas essa redução não ultrapassou os 50% (resultados não apresentados). Como seria de esperar, o fosfato de hidrocortisona não teve qualquer efeito inibitório sobre este parâmetro.

Tabela 1. Influência de alguns inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂, na O-metilação de adrenalina-³H em tiras de aorta incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina-³H durante 15 minutos. A captação neuronal e a MAO foram inibidas com desipramina (1 µmol/l) e pargilina (500 µmol/l), respectivamente. Estão apresentadas as CI₅₀ relativas à inibição da formação de MN-³H (médias geométricas e respectivos intervalos de confiança a 95%).

	CI ₅₀ (µmol/l)	n
Corticosterona	0,88 (0,01-7,98)	5
Testosterona	4,03 (0,55-29,53)	4
17β-estradiol	4,83 (3,34-6,98)	3
DOCA	11,22 (6,00-20,97)	3
Progesterona	15,87 (7,71-32,65)	4
Metanefrina	39,64 (20,69-75,93)	3

O fosfato de hidrocortisona, ensaiado em concentrações de 1,48 até 120 µmol/l (n=3), não teve efeito inibitório na formação de metanefrina-³H.

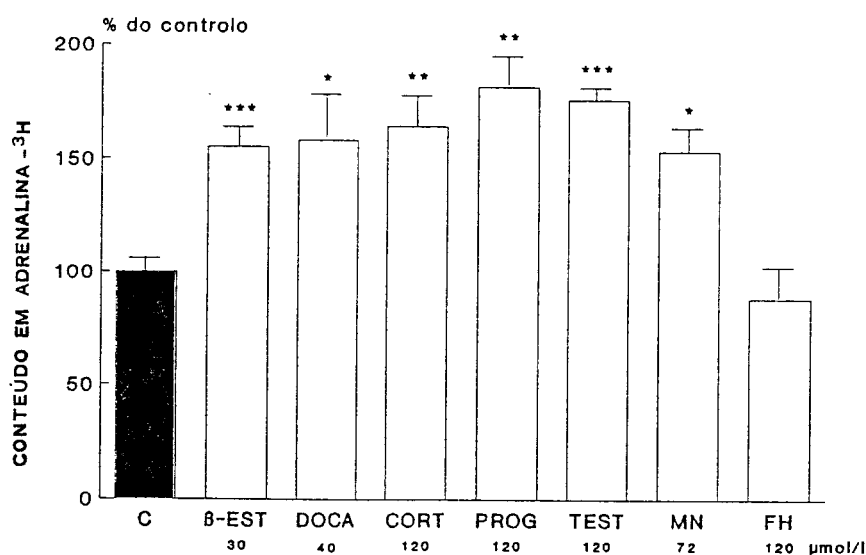


Figura 4. Influência de inibidores do *uptake*₂ no conteúdo em adrenalina-³H de tiras de aorta incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina-³H durante 15 minutos, com a captação neuronal e a MAO inibidas com desipramina (1 µmol/l) e pargilina (500 µmol/l), respectivamente. Estão apresentadas as médias aritméticas ($\pm$ erro padrão da média) da percentagem do controle (C), obtidas com a concentração de inibidor que produziu um efeito máximo. A média da adrenalina-³H presente nos controles foi de $29,8 \pm 1,8$ pmoles/g de tecido (n=17). n=4 para o 17β-estradiol (B-EST), DOCA, progesterona (PROG) e testosterona (TEST); n=5 para a corticosterona (CORT); n=3 para a metanefrina (MN) e fosfato de hidrocortisona (FH). Estatisticamente diferente do respectivo controle: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (teste ANOVA seguido do teste t de Student para valores emparelhados).

O etanol, solvente da maioria dos inibidores e presente na solução de incubação numa concentração de 86 mmol/l, não teve efeitos significativos no conteúdo e metabolização de adrenalina- ^3H , à excepção de um pequeno aumento na fracção OMDA- ^3H verificado na presença deste solvente (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da presença de 86 mmol/l de etanol no líquido de incubação sobre o conteúdo e metabolização de adrenalina- ^3H por tiras de aorta incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos. A MAO e a captação neuronal foram inibidas com 500 $\mu\text{mol/l}$ de pargilina e 1 $\mu\text{mol/l}$ de desipramina, respectivamente. Os resultados estão apresentados como médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo sem etanol: $*P < 0,05$ (teste t de Student para valores emparelhados).

	Controlo sem etanol (pmoles/g de tecido)	Controlo com etanol
captação de adrenalina- ^3H	158,1 $\pm$ 5,3	182,3 $\pm$ 9,2
conteúdo em adrenalina- ^3H	26,7 $\pm$ 1,4	30,4 $\pm$ 4,3
OMDA- ^3H	4,3 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 0,9 *
MN- ^3H	116,2 $\pm$ 3,1	133,1 $\pm$ 14,0
DOPEG- ^3H	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02
DOMA- ^3H	2,8 $\pm$ 1,4	4,7 $\pm$ 3,6
<i>n</i>	4	4

2. Captação extraneuronal de adrenalina- ^3H : conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H (MAO e COMT inibidas)

Para estudar a influência de inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂, no conteúdo extraneuronal de adrenalina- ^3H , inibiu-se a captação neuronal (com 1 $\mu\text{mol/l}$ de desipramina), a MAO (com 500 $\mu\text{mol/l}$ de pargilina) e a COMT (com 2 $\mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812) em tiras de aorta de Coelho incubadas a 37°C durante 15 minutos com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H .

A inibição da COMT pelo Ro 01-2812 originou uma redução muito marcada na O-metilação da adrenalina- ^3H (a formação de MN- ^3H foi reduzida para 1,6% do controlo) e um aumento no conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H (para 275% do controlo); o resultado global da inibição da COMT foi o de uma redução de cerca de 40% na captação de adrenalina- ^3H pelas tiras de aorta (Figura 3).

Em experiências preliminares efectuadas nestas condições experimentais (Figura 3), verificou-se que cerca de 80% do total de adrenalina- ^3H captada (soma do conteúdo de adrenalina- ^3H presente no tecido e de metabólitos- ^3H formados,

presentes no tecido e no líquido de incubação) correspondia a adrenalina- ^3H presente no tecido, pelo que posteriormente se considerou a radioactividade total do tecido como equivalente ao conteúdo em adrenalina- ^3H .

Nestas condições, o conteúdo de adrenalina- ^3H na aorta foi de 123 ± 17 pmoles/g de tecido ($n=4$), o que origina a uma razão tecido/meio de 2,47 ml/g, havendo pois acumulação de adrenalina- ^3H no tecido (Figura 3).

2.1. Efeito de inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas (*uptake*₂)

Estudou-se o efeito de vários inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂, no conteúdo de adrenalina- ^3H . Todos os inibidores do *uptake*₂ reduziram de forma significativa o conteúdo em adrenalina- ^3H na aorta de Coelho, com a excepção do fosfato e do hemisuccinato de hidrocortisona. No entanto, a redução no conteúdo de adrenalina- ^3H produzida nunca foi superior a 50%, ou seja, cerca de 50% do conteúdo extraneuronal de adrenalina- ^3H no tecido não foi sensível aos inibidores do *uptake*₂ (Figura 5).

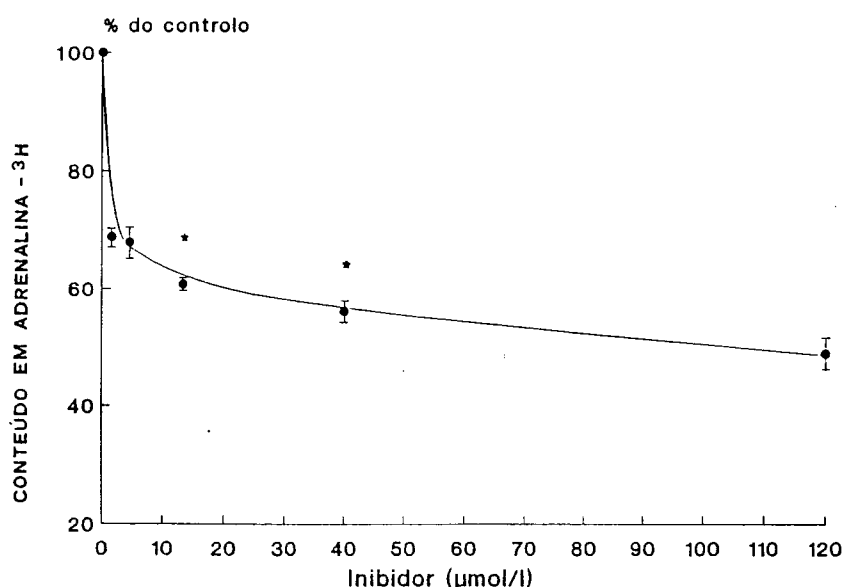


Figura 5. Redução no conteúdo em adrenalina- ^3H de tiras de aorta produzida por inibidores do *uptake*₂, utilizando como exemplo a corticosterona. As tiras de aorta foram incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos. A captação neuronal, a MAO e a COMT foram inibidas com desipramina (1 µmol/l), pargilina (500 µmol/l) e Ro 01-2812 (2 µmol/l), respectivamente. Os resultados estão apresentados como percentagem do respectivo controlo (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=3-4$). Estatisticamente diferente da concentração de inibidor imediatamente inferior: * $P < 0,05$ (teste t de Student para valores independentes).

Por esse motivo, foram calculadas as concentrações dos inibidores que produziram 50% da redução máxima (conseguida com esses inibidores) na quantidade de adrenalina- ^3H na aorta. Essas concentrações, as CI_{50} , foram calculadas assumindo que a redução máxima produzida pelos inibidores do *uptake* $_2$ correspondia a 100% de redução, ou seja, descontou-se do total de adrenalina- ^3H presente no tecido a fracção que foi resistente aos inibidores do *uptake* $_2$ (Tabela 3). A ordem decrescente de potência dos inibidores foi: corticosterona-17 β -estradiol-DOCA-progesterona-testosterona-metanefrina.

Tabela 3. Influência de inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake* $_2$, no conteúdo em adrenalina- ^3H de tiras de aorta incubadas a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos. A captação neuronal, a MAO e a COMT foram inibidas com desipramina (1 $\mu\text{mol/l}$), pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$) e Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$), respectivamente. Estão apresentadas as CI_{50} relativas à redução do conteúdo de adrenalina- ^3H no tecido (médias geométricas com os respectivos intervalos a 95% de confiança).

	CI_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	n
Corticosterona	2,73 (0,51-14,48)	4
17 β -estradiol	15,39 (2,54-93,15)	4
DOCA	30,27 (11,48-79,84)	4
Progesterona	35,29 (21,36-58,28)	4
Testosterona	37,76 (20,14-70,79)	4
Metanefrina	61,80 (35,00-109,12)	5

O fosfato e o hemisuccinato de hidrocortisona, testados até uma concentração de 120 $\mu\text{mol/l}$ ($n=3$), não reduziram a quantidade de adrenalina- ^3H presente no tecido.

A presença, no meio de incubação, de 86 mmol/l de etanol (solvente da maioria dos inibidores estudados), não teve um efeito significativo no conteúdo do tecido em amina- ^3H que foi, na ausência e na presença daquele agente, $98,8 \pm 3,6$ pmoles/g ($n=8$) e $91,3 \pm 3,7$ pmoles/g ($n=18$), respectivamente.

3. Compartimentos de distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H

A distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H em aorta de Coelho foi estudada incubando os tecidos a 37°C durante 15 minutos em solução de Krebs-Henseleit com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H , com subsequente incubação durante 100 minutos em solução de Krebs-Henseleit (denominada solução de "lavagem").

Inibiu-se a captação neuronal com 1 $\mu\text{mol/l}$ de desipramina, a MAO com 500 $\mu\text{mol/l}$ de pargilina e a COMT com 2 $\mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812 e verificou-se, em experiências preliminares (secção I.1.2.2), que nestas condições experimentais a quantidade de metabólitos- ^3H formados não excedia os 20% do total de radioactividade. Por essa razão, considerou-se que os valores de radioactividade total eram equivalentes a valores de adrenalina- ^3H .

O efluxo de adrenalina- ^3H proveniente das tiras originou curvas exponenciais multifásicas, que foram analisadas pelo modo descrito por Henseling *et al.* (1976) (Figura 6).

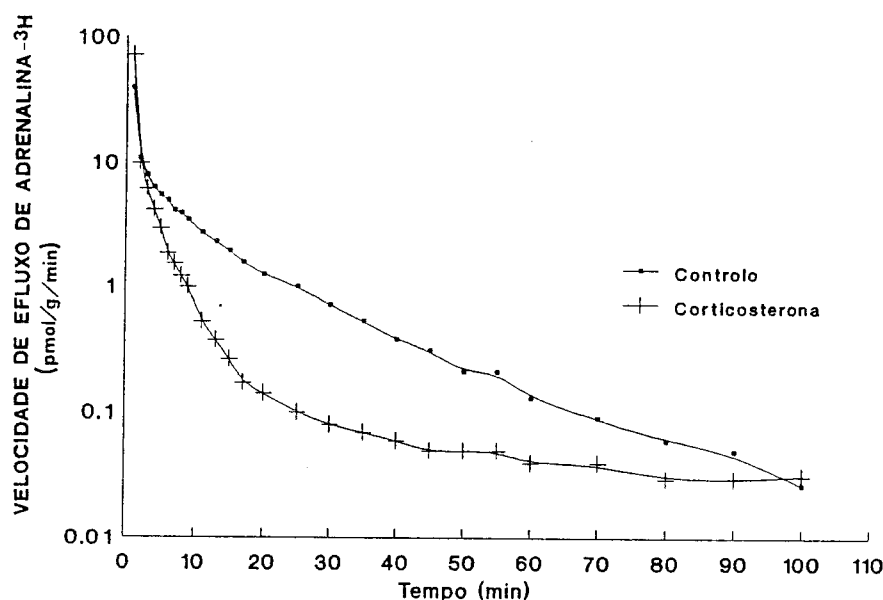


Figura 6. Efluxo de adrenalina- ^3H proveniente de duas tiras de aorta incubadas a 37°C em solução de Krebs-Henseleit com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos, e posteriormente incubadas em solução de Krebs-Henseleit durante 100 minutos. A MAO, a captação neuronal e a COMT foram inibidas com pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$), desipramina (1 $\mu\text{mol/l}$) e Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$), respectivamente. Uma das tiras foi tratada com 120 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona. Ordenada: velocidade de efluxo de adrenalina- ^3H (em pmoles/g/minuto, escala logarítmica); abcissa: tempo (minutos) após o início da incubação em meio sem adrenalina- ^3H .

A análise compartimental do efluxo de adrenalina- ^3H nas tiras controlo mostrou que a amina se distribuiu em três compartimentos extraneuronais: o compartimento I, com um tempo de semi-vida de 0,4 minutos, o compartimento II, com um tempo de semi-vida de 3,7 minutos e o compartimento III, com um tempo de semi-vida de 14,9 minutos. A distribuição relativa da amina- ^3H nos três compartimentos foi de 42% no compartimento III e de 28% e 30% nos compartimentos I e II, respectivamente (Tabela 4). Não existiu fracção fixa, pois a soma do tamanho dos três compartimentos ($121,2 \pm 6,3$ pmoles/g de tecido) não foi

significativamente diferente da actividade total ($138,7 \pm 5,5$ pmoles/g de tecido) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da corticosterona ($120 \mu\text{mol/l}$), oxitetraciclina ($100 \mu\text{mol/l}$) e abaixamento da temperatura (4°C) na distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H . A distribuição compartimental de adrenalina- ^3H foi determinada por análise do efluxo de radioactividade proveniente de tiras de aorta incubadas em solução de Krebs-Henseleit durante 100 minutos, após uma incubação inicial em solução de Krebs-Henseleit com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos (estando a MAO, a captação neuronal e a COMT inibidas com $500 \mu\text{mol/l}$ de pargilina, $1 \mu\text{mol/l}$ de desipramina e $2 \mu\text{mol/l}$ de Ro 01-2812, respectivamente). Os resultados estão apresentados em pmoles/g de tecido (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média), excepto os tempos de semi-vida que estão apresentados em minutos (médias geométricas com limites a 95 % de confiança).

	Controlo	Corticosterona	Corticosterona + Oxitetraciclina	4°C
Actividade total	$138,7 \pm 5,4$	$105,6 \pm 4,1^{***}$	$103,4 \pm 4,4$	$102,6 \pm 10,6^*$
T_{total}	$121,2 \pm 6,3$	$88,7 \pm 2,6^{***}$	$87,3 \pm 4,0$	$84,5 \pm 7,1^{**}$
Compartimento I				
Tamanho	$33,4 \pm 2,5$	$52,1 \pm 2,2^{***}$	$43,9 \pm 3,3$	$43,8 \pm 4,8$
Tempo de semi-vida	0,37 (0,26-0,53)	0,48 (0,43-0,54)	0,47 (0,41-0,55)	0,52 (0,41-0,67)
Compartimento II				
Tamanho	$36,8 \pm 2,8$	$28,6 \pm 1,8^*$	$32,8 \pm 2,7$	$33,4 \pm 2,7$
Tempo de semi-vida	3,8 (3,4-4,2)	2,4 *** (2,2-2,6)	2,5 (2,1-2,9)	4,0 (3,4-4,8)
Compartimento III				
Tamanho	$51,4 \pm 1,6$	$8,0 \pm 0,4^{***}$	$6,9 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,7^{***}$
Tempo de semi-vida	14,9 (13,3-16,7)	49,4 *** (45,8-53,2)	42,6 (30,7-59,2)	17,0 (14,2-20,4)
n	5	6	5	4

A actividade total representa a soma do efluxo total de adrenalina- ^3H com a adrenalina- ^3H presente no tecido no final da experiência e T_{total} representa a soma do tamanho de todos os compartimentos de distribuição da adrenalina- ^3H .

Corticosterona ou 4°C : os asteriscos indicam haver diferença significativa em relação ao controlo (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,0005$; teste ANOVA seguido de teste t de Student para valores independentes)

Corticosterona + oxitetraciclina: não há diferenças significativas em relação à corticosterona

3.1. Efeito da corticosterona e oxitetraciclina

Estudou-se o efeito da corticosterona, sozinha ou em combinação com oxitetraciclina, na distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H .

Os tecidos tratados com 120 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona (inibidor da captação extraneuronal, *uptake₂*) captaram menos adrenalina- ^3H que os controlos. A redução no conteúdo em adrenalina- ^3H (ou seja, na actividade total) resultou de uma redução na quantidade de amina- ^3H presente nos compartimentos II e III (o tamanho desses compartimentos foi reduzido para 78% e 16% do controlo, respectivamente), embora se tenha observado um aumento na quantidade de adrenalina- ^3H presente no compartimento I, cujo tamanho aumentou para 156% do controlo. A corticosterona produziu ainda um aumento significativo (de 15 para 49 minutos) no tempo de semi-vida do compartimento III (Tabela 4).

Na presença de 120 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona, 100 $\mu\text{mol/l}$ de oxitetraciclina (proposto inibidor da ligação de catecolaminas a proteínas estruturais como o colagénio e elastina) não causou alterações significativas na captação extraneuronal e distribuição compartimental da adrenalina- ^3H (Tabela 4).

3.2. Influência da temperatura

A incubação das tiras de aorta a 4°C provocou uma diminuição no conteúdo extraneuronal de adrenalina- ^3H (actividade total), resultante de uma diminuição muito acentuada na quantidade de adrenalina- ^3H presente no compartimento III (o tamanho deste compartimento foi reduzido para 14% do controlo). Os compartimentos I e II não foram significativamente afectados, embora se verificasse um ligeiro aumento (31%) no tamanho do compartimento I (Tabela 4).

3.3. Saturabilidade dos compartimentos de distribuição de adrenalina- ^3H

A incubação de tiras de aorta com concentrações de adrenalina que variaram de 5 a 1000 $\mu\text{mol/l}$ mostrou que, para concentrações de adrenalina- ^3H superiores a 500 $\mu\text{mol/l}$, os compartimentos II e III apresentaram alguma saturação, ao contrário do compartimento I, que não mostrou ficar saturado até uma concentração de 1000 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito do aumento da concentração de adrenalina- ^3H nas constantes cinéticas derivadas de curvas de efluxo de radioactividade proveniente de tiras de aorta incubadas a 37°C durante 15 minutos em solução de Krebs-Henseleit com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H e posteriormente incubadas durante 100 minutos em solução de Krebs-Henseleit. As tiras foram tratadas com pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$), desipramina (1 $\mu\text{mol/l}$) e Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$). Os resultados estão apresentados em nmoles/g de tecido (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média), excepto os tempos de semi-vida que estão apresentadas em minutos (médias geométricas com limites a 95 % de confiança).

	5 $\mu\text{mol/l}$	50 $\mu\text{mol/l}$	500 $\mu\text{mol/l}$	1000 $\mu\text{mol/l}$
Actividade total	15,0 $\pm$ 0,3	138,6 $\pm$ 8,7	1415,5 $\pm$ 52,4	2643,9 $\pm$ 309,9
T _{total}	13,0 $\pm$ 0,1	150,1 $\pm$ 10,7	1263,5 $\pm$ 111,2	2289,1 $\pm$ 326,9
Compartimento I				
Tamanho	5,2 $\pm$ 0,04	73,0 $\pm$ 7,8	514,9 $\pm$ 124,7	1048,5 $\pm$ 271,2
Tempo de semi-vida	0,49 (0,38-0,64)	0,26 (0,18-0,36)	0,42 (0,32-0,56)	0,49 (0,33-0,79)
Compartimento II				
Tamanho	3,3 $\pm$ 0,6	33,7 $\pm$ 5,3	337,3 $\pm$ 34,3	571,9 $\pm$ 92,4
Tempo de semi-vida	3,78 (3,45-4,13)	3,27 (2,71-3,94)	4,20 (3,64-4,85)	4,69 (4,10-5,36)
Compartimento III				
Tamanho	4,6 $\pm$ 0,5	43,5 $\pm$ 2,4	411,3 $\pm$ 30,5	668,7 $\pm$ 37,6
Tempo de semi-vida	14,2 (13,7-14,8)	13,6 (11,9-15,5)	17,1 (13,1-22,4)	18,2 (6,5-51,0)
n	3	3	5	3

A actividade total representa a soma do efluxo total de adrenalina- ^3H com a adrenalina- ^3H presente no tecido no final da experiência e T_{total} representa a soma do tamanho de todos os compartimentos de distribuição de adrenalina- ^3H .

II. CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS EM FÍGADO DE RATO

Para estudar a captação e posterior destino de catecolaminas no fígado de Rato, efectuou-se experiências em três tipos de preparações: fatias de fígado, hepatócitos isolados em suspensão e fígado perfundido.

Para a totalidade das experiências realizadas calculou-se os seguintes parâmetros:

- conteúdo em amina- ^3H - quantidade de amina- ^3H presente no tecido (ou nas células, ou na bile) no final da experiência.

- formação de metabólito- ^3H - quantidade total de metabólito- ^3H formado durante o período experimental, presente no tecido (ou nas células) e no líquido de incubação (experiências de incubação) ou presente no tecido, na bile e no efluente venoso (experiências de perfusão).

- captação de amina- ^3H - em experiências de incubação: soma do conteúdo em amina- ^3H (do tecido ou das células) com o total de metabólitos- ^3H formados; em experiências de perfusão: soma do conteúdo em amina- ^3H (no tecido e na bile), com o total de metabólitos- ^3H formados.

1. Captação de noradrenalina- ^3H por fatias de fígado: conteúdo do tecido em noradrenalina- ^3H e sua metabolização

As fatias de fígado incubadas a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H captaram e metabolizaram esta amina. Do total de noradrenalina- ^3H captada, $550,1 \pm 24,7$ pmoles/g de tecido ($n=12$), cerca de 91% foi metabolizada, tendo a restante amina- ^3H permanecido intacta no tecido. Os metabólitos desaminados e O-metilados (OMDA- ^3H) corresponderam a 57% do total de metabolização, seguidos pelo DOMA- ^3H , que correspondeu a 36%. Os restantes metabólitos (DOPEG- ^3H e NMN- ^3H) representaram apenas 5% e 1,3%, respectivamente, do total de metabólitos (Figura 7).

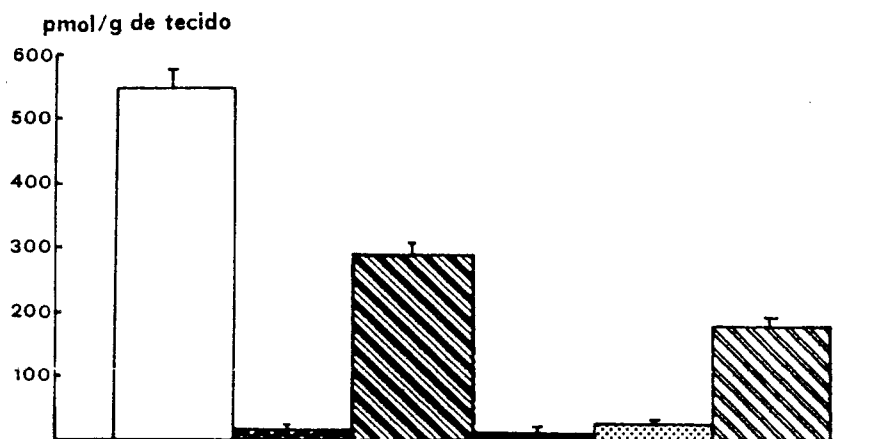


Figura 7. Captação de noradrenalina- ^3H (conteúdo em noradrenalina- ^3H e metabólitos- ^3H formados) por fatias de fígado incubadas a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H . Os resultados estão expressos em pmoles/g de tecido (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=12$). Captação de noradrenalina- ^3H (□), conteúdo em noradrenalina- ^3H no tecido (▤) e quantidades de OMDA- ^3H (▨), NMN- ^3H (■), DOPEG- ^3H (▤) e DOMA- ^3H (▧) formados.

Não existiu acumulação de noradrenalina- ^3H nas fatias de fígado, pois a razão tecido/meio para a noradrenalina- ^3H foi de 0,08 ml/g. Os valores de noradrenalina- ^3H presente no tecido foram corrigidos em relação à quantidade de amina- ^3H presente no espaço extracelular obtido para o mesmo tempo de incubação (0,176 ml/g). Este valor de espaço extracelular foi mais baixo do que o valor obtido após 60 minutos de incubação (ver secção I.2.1.3. dos Métodos). No entanto, o facto do espaço extracelular estar possivelmente subvalorizado (o que originaria uma razão tecido/meio para a noradrenalina- ^3H maior) é irrelevante, pois verificou-se que não existe acumulação da amina- ^3H no tecido.

1.1. Efeito de inibidores da MAO e da COMT

A inibição da MAO pela pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$) reduziu em 57% a captação de noradrenalina- ^3H (200 nmol/l) pelas fatias de fígado. As formações de DOPEG- ^3H , DOMA- ^3H e OMDA- ^3H foram bastante reduzidas (em 98%, 97% e 51%, respectivamente) e, simultaneamente, verificou-se um aumento (para 802%) na formação de NMN- ^3H (Figura 8).

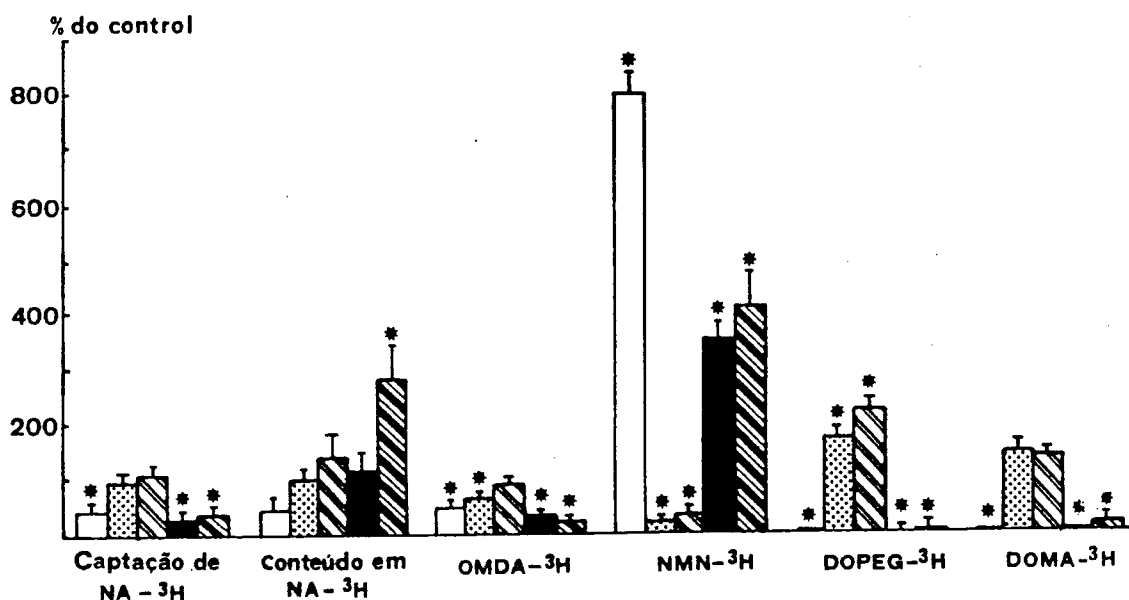


Figura 8. Influência do inibidor da MAO, pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$), e dos inibidores da COMT, Ro 01-2812 (10 $\mu\text{mol/l}$) e U-0521 (50 $\mu\text{mol/l}$), na captação de noradrenalina- ^3H por fatias de fígado incubadas a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H . NA- noradrenalina. Os resultados estão expressos em percentagem dos respectivos controlos (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Pargilina (□, $n=3$), Ro 01-2812 (▤, $n=6$), U-0521 (▨, $n=4$), pargilina+Ro 01-2812 (■, $n=5$), pargilina+U-0521 (▩, $n=4$). Estatisticamente diferentes dos respectivos controlos: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes).

A inibição da COMT foi tentada com dois inibidores diferentes: o Ro 01-2812 (10 $\mu\text{mol/l}$) e o U-0521 (50 $\mu\text{mol/l}$). O Ro 01-2812 reduziu a formação de NMN- ^3H (em 79%) e de OMDA- ^3H (em 33%) e aumentou a formação de DOPEG- ^3H (para 175%). O U-0521 teve um efeito parcialmente semelhante ao do Ro 01-2812: reduziu a formação de NMN- ^3H (em 71%) e aumentou a formação de DOPEG- ^3H (para 226%). No entanto, este fármaco não afectou a formação de OMDA- ^3H (Figura 8).

A inibição simultânea da MAO e da COMT pela combinação de pargilina+Ro 01-2812 ou de pargilina+U-0521 reduziu a captação e o metabolismo da noradrenalina- ^3H . As reduções na captação de noradrenalina- ^3H (de 68%-64%) e nas formações de DOPEG- ^3H (de 98-97%), de DOMA- ^3H (de 97-86%) e de OMDA- ^3H (de 70-76%) foram o resultado do somatório dos efeitos inibitórios de cada um dos fármacos. Em relação à formação de NMN- ^3H , contudo, houve um balanço entre a redução produzida pelo Ro 01-2812 ou pelo U-0521 e o aumento produzido pela pargilina, e este metabólito foi formado numa quantidade intermédia entre estes dois efeitos. A única diferença entre o efeito das duas combinações de inibidores enzimáticos consistiu num aumento (para 285%) no conteúdo de noradrenalina- ^3H no tecido observado na presença de pargilina+U-0521 (Figura 8).

1.2. Efeito de inibidores da captação neuronal (*uptake*₁) e da captação extraneuronal (*uptake*₂) de catecolaminas

Testou-se a influência de 10 $\mu\text{mol/l}$ de desipramina (inibidor da captação neuronal de catecolaminas, *uptake*₁) ou de 120 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona (inibidor da captação extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂) na captação de 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H por fatias de fígado (Tabela 6).

A desipramina reduziu a formação de NMN- ^3H (em 44%) e de OMDA- ^3H (em 26%) e aboliu a noradrenalina- ^3H presente no tecido. A corticosterona reduziu também a formação de NMN- ^3H (em 44%) e de OMDA- ^3H (em 38%) mas não teve qualquer efeito sobre o conteúdo de noradrenalina- ^3H no tecido (Tabela 6).

1.3. Influência da temperatura

A incubação de fatias de fígado com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H a 4°C produziu uma redução muito acentuada na captação e na metabolização da amina- ^3H e aboliu completamente a quantidade de noradrenalina- ^3H presente no tecido, em comparação ao verificado com a incubação a 37°C (Tabela 7).

Tabela 6. Efeito do inibidor do *uptake*₁, desipramina (10 μ mol/l), e do inibidor do *uptake*₂, corticosterona (120 μ mol/l), na captação de noradrenalina-³H por fatias de fígado incubadas a 37°C com 200 nmol/l de noradrenalina-³H durante 15 minutos. Os resultados estão expressos em médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo (desipramina) ou do controlo com etanol (corticosterona): * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes).

	Controlo	Desipramina	Controlo com etanol	Corticosterona
	(pmoles/ g de tecido)			
captação de noradrenalina- ³ H	539,3 $\pm$ 32,3	423,6 $\pm$ 66,6	503,7 $\pm$ 91,7	397,8 $\pm$ 52,1
conteúdo em noradrenalina- ³ H	14,0 $\pm$ 3,4	0,0 $\pm$ 0,0 *	13,6 $\pm$ 6,9	7,9 $\pm$ 5,1
OMDA- ³ H	277,9 $\pm$ 19,2	205,7 $\pm$ 34,0 *	285,2 $\pm$ 37,9	177,1 $\pm$ 21,1 *
NMN- ³ H	6,2 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,7 *	7,2 $\pm$ 1,3	4,0 $\pm$ 0,5 *
DOPEG- ³ H	24,4 $\pm$ 2,1	16,2 $\pm$ 2,8	18,4 $\pm$ 3,5	18,7 $\pm$ 2,5
DOMA- ³ H	178,9 $\pm$ 13,1	183,9 $\pm$ 31,0	171,5 $\pm$ 42,5	157,4 $\pm$ 24,1
<i>n</i>	9	4	5	6

Tabela 7. Efeito da incubação a 4°C na captação de noradrenalina-³H por fatias de fígado incubadas durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina-³H. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo incubado a 37°C e apresentam médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo a 37°C: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes)

	4°C	
	(percentagem do controlo)	
captação de noradrenalina- ³ H	8,3 $\pm$ 0,5	*
conteúdo em noradrenalina- ³ H	0,0 $\pm$ 0,0	*
DOPEG- ³ H	19,2 $\pm$ 6,5	*
DOMA- ³ H	7,1 $\pm$ 1,4	*
NMN- ³ H	42,6 $\pm$ 9,3	*
OMDA- ³ H	4,6 $\pm$ 0,5	*
<i>n</i>	3	

2. Captação de adrenalina- ^3H e noradrenalina- ^3H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em amina- ^3H e sua metabolização

Numa primeira fase experimental, procedeu-se à determinação do perfil temporal de captação e posterior destino de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H captadas por hepatócitos isolados em suspensão.

2.1. Curvas tempo de incubação-captação de adrenalina- ^3H e noradrenalina- ^3H

Adrenalina- ^3H

Os hepatócitos isolados incubados a 37°C com adrenalina- ^3H (50 nmol/l) removeram e metabolizaram a amina- ^3H . A captação de adrenalina- ^3H pelas células aumentou de uma forma linear até aos 15 minutos de incubação. As formações de OMDA- ^3H e de MN- ^3H aumentaram durante todo o período de incubação; pelo contrário, a quantidade de adrenalina- ^3H nas células e a formação de DOPEG- ^3H e DOMA- ^3H atingiram um equilíbrio a partir dos 5 minutos de incubação (Figura 9).

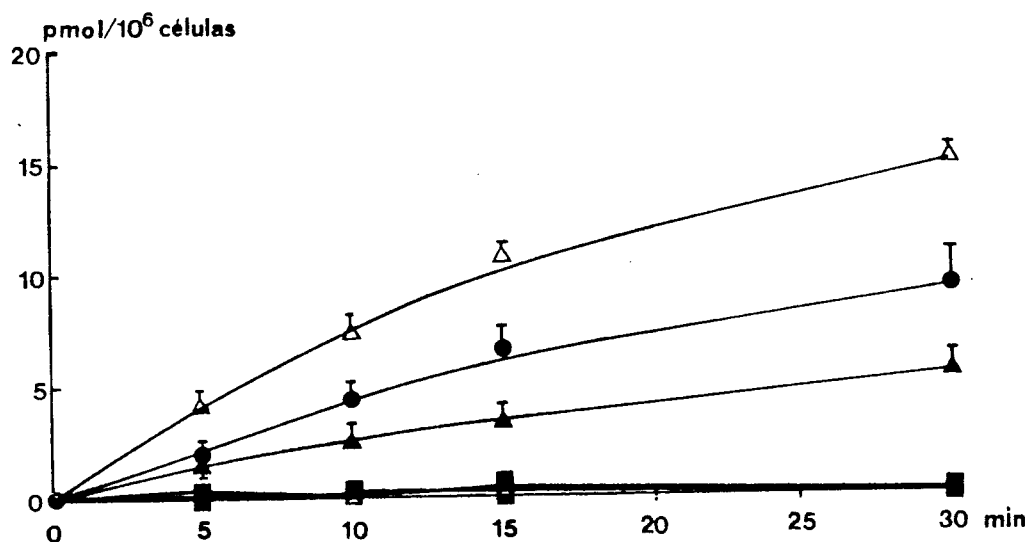


Figura 9. Curva tempo de incubação-captação de adrenalina- ^3H (conteúdo em adrenalina- ^3H e metabólitos- ^3H formados) por hepatócitos isolados (10^6 células/ml) incubados a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H . Ordenada: captação de adrenalina- ^3H (Δ), conteúdo em adrenalina- ^3H ($\square$) e quantidade de OMDA- ^3H ($\bullet$), MN- ^3H ($\blacktriangle$), DOPEG- ^3H ($\blacksquare$) e DOMA- ^3H ($\circ$) formados. Abcissa: duração da incubação com adrenalina- ^3H (minutos). Os resultados estão apresentados em pmoles/ 10^6 células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=9-10$).

Após 15 minutos de incubação, apenas 4% da amina removida estava presente intacta nos hepatócitos; a quase totalidade (96%) tinha sido metabolizada. Os metabólitos mais abundantes foram os desaminados e O-metilados (OMDA- ^3H), constituindo 63% do total de metabolização, seguidos do metabólito O-metilado (MN- ^3H) (34%). Os metabólitos desaminados (DOPEG- ^3H e DOMA- ^3H) formaram-se em pequena quantidade (0,2 e 2,6%, respectivamente) (Figuras 9 e 10). A razão células/meio para a adrenalina- ^3H após 15 minutos de incubação foi calculada tal como descrito (secção I.2.4. dos Métodos). Essa razão foi de 1,17 ml/g, o que significa que praticamente não houve acumulação da amina- ^3H nas células.

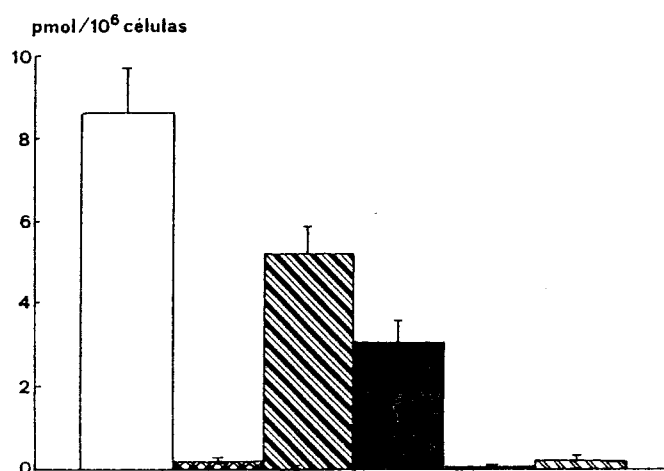


Figura 10. Captação de adrenalina- ^3H por hepatócitos isolados (10^6 células/ml) incubados a 37°C durante 15 minutos com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H . Captação de adrenalina- ^3H (□), conteúdo em adrenalina- ^3H (▨) e quantidades de OMDA- ^3H (▤), MN- ^3H (■), DOPEG- ^3H (▦) e DOMA- ^3H (▩) formados. Os resultados estão expressos em pmoles/ 10^6 células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média, $n=10$).

Noradrenalina- ^3H

Os hepatócitos isolados incubados a 37°C com noradrenalina- ^3H nas concentrações de 50 e 200 nmol/l removeram e metabolizaram a amina- ^3H , como se pode ver nas Figuras 11A e 11B, respectivamente. As captações de 50 nmol/l e de 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H aumentaram de uma forma linear até aos 15 e aos 5 minutos de incubação, respectivamente. A quantidade de noradrenalina- ^3H presente nas células (e de DOPEG- ^3H e NMN- ^3H formados) manteve-se constante a partir dos 5 minutos de incubação, ao contrário das formações de OMDA- ^3H e de DOMA- ^3H , que aumentaram durante todo o período de incubação. A quantidade de noradrenalina- ^3H captada pelas células incubadas com 50 nmol/l de noradrenalina- ^3H foi semelhante à quantidade de adrenalina- ^3H captada pelas células incubadas com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H (Figura 9) Os hepatócitos

incubados com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H captaram cerca de quatro vezes mais amina- ^3H do que as células incubadas com 50 nmol/l de noradrenalina- ^3H (Figuras 11A e 11B).

Ao fim de 15 minutos de incubação com 50 e com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H , cerca de 98% da amina- ^3H captada tinha sido metabolizada, sendo o padrão de metabolização semelhante para as duas concentrações de noradrenalina estudadas. Os metabólitos desaminados e O-metilados (OMDA- ^3H) e o metabólito desaminado DOMA- ^3H foram os mais abundantes, constituindo 56% e 36% do total de metabólitos formados, respectivamente. A NMN- ^3H e o DOPEG- ^3H representaram apenas 1,5% e 6,4% do total de metabolização, respectivamente (Figuras 11 e 12).

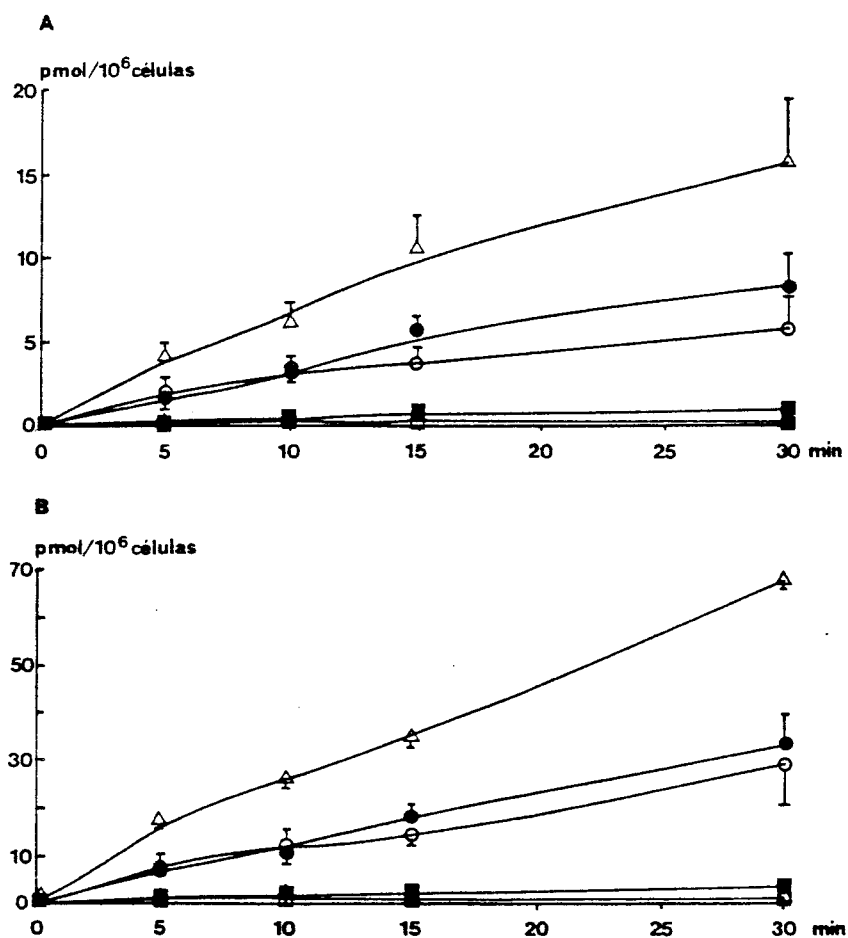


Figura 11. Curvas tempo de incubação-captção de noradrenalina- ^3H (conteúdo em noradrenalina- ^3H e metabólitos- ^3H formados) por hepatócitos isolados (10^6 células/ml) incubados a 37°C com 50 nmol/l de noradrenalina- ^3H (Painel A, $n=3$) ou com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H (Painel B, $n=4-5$). Ordenadas: captção de noradrenalina- ^3H (Δ), conteúdo em noradrenalina- ^3H ($\square$) e quantidades de OMDA- ^3H ($\bullet$), NMN- ^3H ($\blacktriangle$), DOPEG- ^3H ($\blacksquare$) e DOMA- ^3H ($\circ$) formados. Abcissas: duração da incubação com noradrenalina- ^3H (minutos). Os resultados estão apresentados em pmoles/ 10^6 células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média).

A razão células:meio para a noradrenalina- ^3H após 15 minutos de incubação foi determinada (como descrito na secção I.2.4. dos Métodos) e os valores encontrados foram 0,95 e 1,02 ml/g para, respectivamente, a concentração mais baixa e mais alta de noradrenalina- ^3H , não havendo pois acumulação de noradrenalina- ^3H nas células.

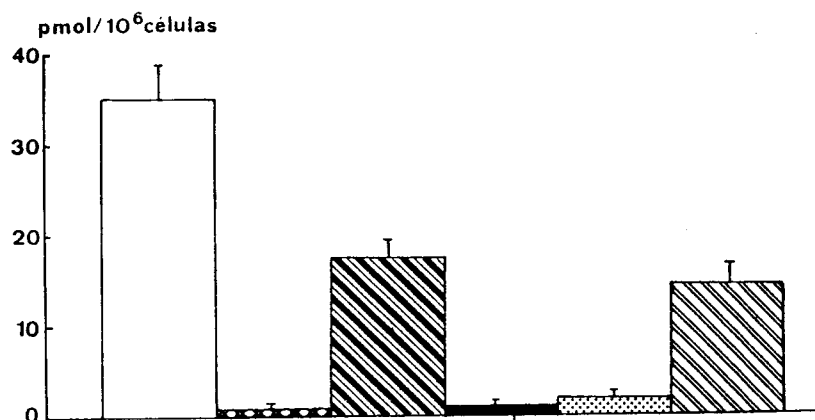


Figura 12. Captação de noradrenalina- ^3H por hepatócitos isolados incubados a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H . Captação de noradrenalina- ^3H (□), conteúdo em noradrenalina- ^3H (▤) e quantidades de OMDA- ^3H (▨), NMN- ^3H (■), DOPEG- ^3H (▩) e DOMA- ^3H (▨) formados. Os resultados estão expressos em pmoles/10⁶ células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=10$)

2.2. Efeito de inibidores da MAO e da COMT

Como se pode ver na Figura 13, a inibição da MAO (com 500 $\mu\text{mol/l}$ de pargilina) reduziu marcadamente a desaminação de 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H : verificou-se uma redução marcada na formação de OMDA- ^3H (de 61%) e de DOMA- ^3H (de 85%) e uma quase completa inibição (redução de 92%) na formação de DOPEG- ^3H . A formação de NMN- ^3H , pelo contrário, foi bastante aumentada (para 562%). Concomitantemente, a pargilina reduziu marcadamente (em 62%) a captação da amina- ^3H pelas células.

Os efeitos do inibidor da COMT (Ro 01-2812, 2 $\mu\text{mol/l}$) consistiram numa redução na formação de NMN- ^3H (de 77 %) e num aumento da formação de DOPEG- ^3H (para 173%). A adição conjunta de pargilina e Ro 01-2812 ao meio de incubação reduziu de forma acentuada a captação (em 80%) e a metabolização (desaminação e O-metilação) de noradrenalina- ^3H (Figura 13).

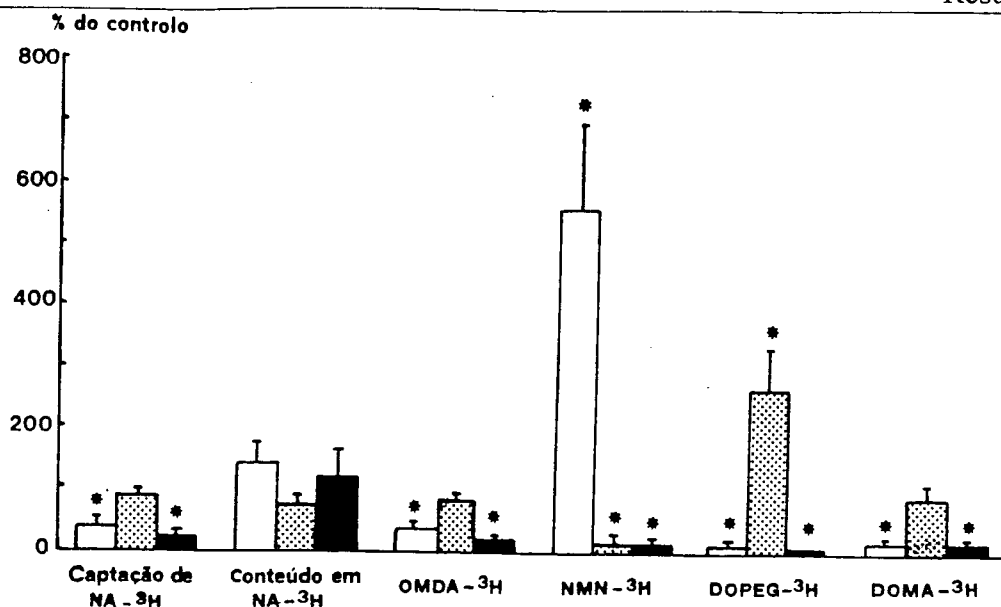


Figura 13. Influência do inibidor da MAO, pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$), e do inibidor da COMT, Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$), na captação de noradrenalina- ^3H por hepatócitos isolados incubados a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l desta amina- ^3H . Pargilina (□, $n=4$), Ro 01-2812 (▨, $n=5$), pargilina+Ro 01-2812 (■, $n=4$). NA- noradrenalina. Os resultados estão expressos em percentagem do respectivo controlo (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Estatisticamente diferente do controlo: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores emparelhados).

2.3. Efeito de inibidores da captação neuronal (uptake_1) e da captação extraneuronal (uptake_2) de catecolaminas

Adrenalina- ^3H

A desipramina (inibidor do uptake_1 ; 1 $\mu\text{mol/l}$), reduziu em 44% a captação de 50 nmol/l de adrenalina- ^3H pelos hepatócitos, com uma redução na formação do metabólito O-metilado MN- ^3H (de 25%) e dos metabólitos O-metilados e desaminados OMDA- ^3H (de 57%). A corticosterona (inibidor do uptake_2 ; 40 $\mu\text{mol/l}$) produziu efeitos semelhantes aos obtidos com a desipramina. Este composto reduziu também (em 29%) a captação de adrenalina- ^3H , e a formação de MN- ^3H (em 16%) e dos metabólitos OMDA- ^3H (em 37%) (Tabela 8).

Tabela 8. Efeito do inibidor do uptake_1 (desipramina, 1 $\mu\text{mol/l}$), e do inibidor do uptake_2 (corticosterona, 40 $\mu\text{mol/l}$), na captação de adrenalina- ^3H por hepatócitos isolados incubados a 37°C com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H durante 15 minutos. Os resultados estão expressos em médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo (desipramina) ou do controlo com etanol (corticosterona): * $P < 0,05$ (Teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para resultados emparelhados).

	Controlo	Desipramina	Controlo com etanol	Corticosterona
	(pmoles/10 ⁶ células)			
captação de adrenalina- ³ H	8,61 ± 1,05	4,82 ± 0,73 *	8,17 ± 0,93	5,80 ± 0,65 *
conteúdo em adrenalina- ³ H	0,18 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,26 ± 0,06	0,28 ± 0,08
OMDA- ³ H	5,25 ± 0,63	2,28 ± 0,52 *	4,73 ± 0,65	2,98 ± 0,45 *
MN- ³ H	3,06 ± 0,51	2,30 ± 0,41 *	2,76 ± 0,40	2,31 ± 0,33 *
DOPEG- ³ H	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,15 ± 0,05	0,02 ± 0,01
DOMA- ³ H	0,20 ± 0,09	0,17 ± 0,09	0,27 ± 0,14	0,21 ± 0,08
<i>n</i>	8	8	8	8

Noradrenalina-³H

Do mesmo modo que verificado em relação à adrenalina-³H, a desipramina e a corticosterona produziram efeitos semelhantes sobre a captação e metabolização de 200 nmol/l de noradrenalina-³H por hepatócitos isolados (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito do inibidor do *uptake*₁ (desipramina, 1 μmol/l), e do inibidor do *uptake*₂ (corticosterona, 40 μmol/l), na captação de noradrenalina-³H por hepatócitos isolados incubados a 37°C com 200 nmol/l de noradrenalina-³H durante 15 minutos. Os resultados estão apresentados como médias aritméticas ± erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo (desipramina) ou do controlo com etanol (corticosterona e desipramina+corticosterona): **P* < 0,05 (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para resultados emparelhados).

	Controlo	Desipramina	Controlo com etanol	Corticosterona	Desipramina + Corticosterona
	(pmoles/10 ⁶ células)				
captação de noradrenalina- ³ H	35,3 ± 4,8	32,4 ± 3,6	38,7 ± 5,4	31,6 ± 3,6	23,3 ± 4,0 *
conteúdo em noradrenalina- ³ H	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2
OMDA- ³ H	17,6 ± 1,9	12,8 ± 1,2 *	19,6 ± 2,5	13,6 ± 0,5 *	9,7 ± 2,1
NMN- ³ H	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1 *	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,1 *	0,6 ± 0,2
DOPEG- ³ H	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,6	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,6
DOMA- ³ H	14,5 ± 2,9	16,6 ± 2,6	15,9 ± 2,9	15,6 ± 3,3	11,2 ± 2,3 *
<i>n</i>	5	5	5	5	4

Esses efeitos consistiram numa redução na formação de NMN-³H (de 19 e 31%, respectivamente) e de OMDA-³H (de 22 e 29%, respectivamente). Quando a desipramina e a corticosterona foram adicionadas simultaneamente ao líquido de incubação, observou-se uma redução na formação de OMDA-³H (de 49%) e na captação de noradrenalina-³H (de 35%) (Tabela 9).

2.4. Influência da temperatura

A incubação a 4°C de hepatócitos isolados com 200 nmol/l de noradrenalina-³H resultou numa diminuição muito acentuada na captação e na metabolização da amina-³H, em relação aos valores obtidos com a incubação a 37°C (Tabela 10).

Tabela 10. Efeito da incubação a 4°C na captação de noradrenalina-³H por hepatócitos isolados incubados durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina-³H. Os resultados estão expressos em percentagem do controlo incubado a 37°C e representam médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média. Estatisticamente diferente do controlo: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para resultados emparelhados)

	4°C (percentagem do controlo)	
captação de noradrenalina- ³ H	19,7 $\pm$ 6,5	*
conteúdo em noradrenalina- ³ H	32,0 $\pm$ 14,0	
OMDA- ³ H	12,3 $\pm$ 5,1	*
NMN- ³ H	27,5 $\pm$ 8,7	*
DOPEG- ³ H	23,0 $\pm$ 18,9	*
DOMA- ³ H	20,4 $\pm$ 8,5	*
<i>n</i>	5	

2.5. Dependência do sódio

Quando se incubou suspensões de hepatócitos isolados com 200 nmol/l de noradrenalina-³H em solução de Krebs-Henseleit sem sódio (estando o hidrogenocarbonato e o cloreto de sódio substituídos por uma quantidade equimolar de cloreto de colina) durante 15 minutos, verificou-se uma redução bastante marcada na captação de noradrenalina-³H (de 94%), no conteúdo em amina-³H (de 92%) e na formação de metabólitos-³H (de 90%-98%), em relação ao que se verifica na presença de sódio. Em condições de ausência de sódio no meio de

incubação, a adição de 40 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona não produziu qualquer efeito nos parâmetros estudados (Figura 14).

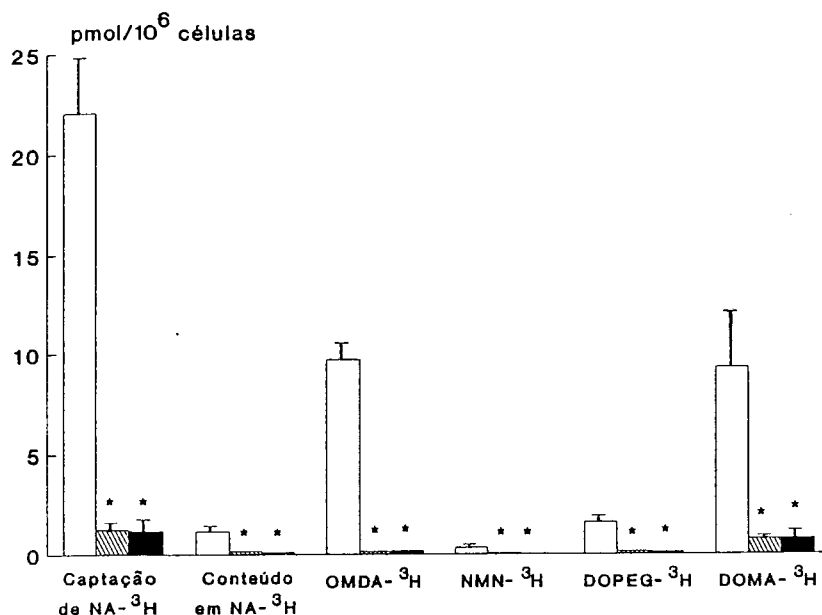


Figura 14. Influência da ausência de sódio na captação de noradrenalina-³H e no efeito da corticosterona na captação de noradrenalina-³H. Os hepatócitos isolados em suspensão foram incubados durante 15 minutos, a 37°C, com 200 nmol/l de noradrenalina-³H, em solução de Krebs-Henseleit normal (□ ; n=5), sem sódio (▨ ; n=5) e sem sódio, na presença de 40 μmol de corticosterona (■ ; n=5). A ausência de sódio na solução de incubação foi obtida substituindo o sódio do meio por uma quantidade equimolar de colina. NA- noradrenalina. Os resultados estão apresentados em pmoles/10⁶ células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Significativamente diferente do controle: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores emparelhados).

2.6. Actividade da MAO e da COMT (k_{MAO} e k_{COMT})

A taxa constante para a COMT (k_{COMT}) foi de $0,70 \pm 0,15 \text{ minuto}^{-1}$ ($n=4$), o que significa que, num minuto, aproximadamente 70% da noradrenalina-³H captada pelos hepatócitos foi O-metilada. A taxa constante para a MAO (k_{MAO}) foi de $2,27 \pm 0,14 \text{ minuto}^{-1}$ ($n=5$), ou seja, em cada minuto cerca de 230% da noradrenalina-³H captada foi desaminada.

3. Captação de adrenalina-³H e noradrenalina-³H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em amina-³H (MAO e COMT inibidas)

Em toda esta série de experiências a degradação enzimática das catecolaminas pela MAO e/ou pela COMT foi inibida pela presença, no meio de incubação, de pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$) e de Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$). As

concentrações dos inibidores enzimáticos utilizadas reduzem muito eficazmente o metabolismo das duas catecolaminas, neste modelo experimental (ver secção II.2.2.).

3.1. Curva tempo de incubação-conteúdo em noradrenalina- ^3H

A curva de variação temporal do conteúdo de noradrenalina- ^3H nos hepatócitos isolados durante a incubação a 37°C com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H está apresentada na Figura 15. A quantidade de noradrenalina- ^3H presente nos hepatócitos isolados aumentou de uma forma linear durante os primeiros minutos de incubação. Após 15 minutos de incubação, o conteúdo de noradrenalina- ^3H nas células atingiu um equilíbrio, mantendo-se posteriormente constante (até final da incubação). Por esta razão, em todas as experiências posteriores os hepatócitos isolados foram incubados durante 15 minutos com as amins- ^3H .

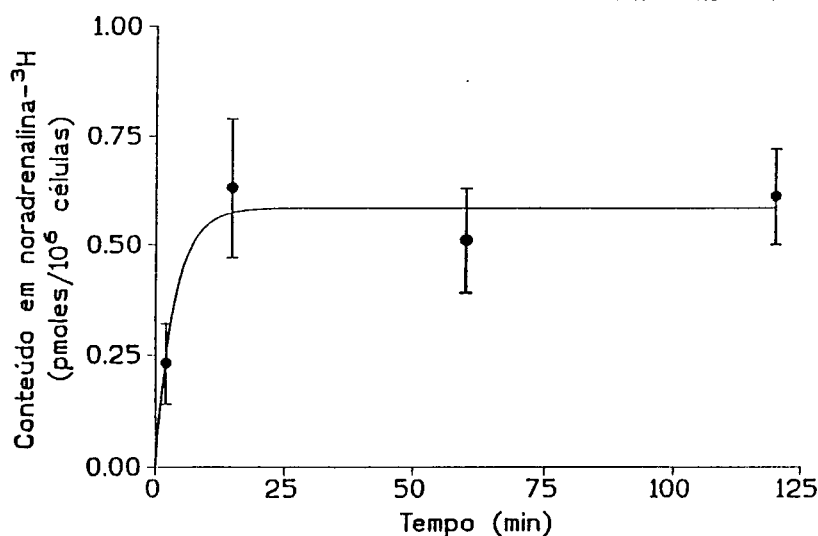


Figura 15. Conteúdo em noradrenalina- ^3H de hepatócitos isolados em suspensão. As células, numa concentração de 10^6 células/ml, foram incubadas a 37°C com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H . Ordenada: conteúdo em noradrenalina- ^3H , expressa em pmoles/ 10^6 células (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=3-7$). Abcissa: tempo de incubação (minutos). Uma curva exponencial de saturação foi ajustada aos resultados experimentais.

Após 15 minutos de incubação a 37°C com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H ou com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H , a quantidade de noradrenalina- ^3H presente nas células foi de $0,63 \pm 0,16$ pmoles/ 10^6 células ($n=4$) e a quantidade de adrenalina- ^3H foi de $0,13 \pm 0,03$ pmoles/ 10^6 células ($n=4$). As razões células:meio encontradas para as duas catecolaminas (ver secção I.2.4. dos Métodos) foram de $0,7\text{ ml/g}$ para a noradrenalina- ^3H e de $0,6\text{ ml/g}$ para a adrenalina- ^3H , não havendo portanto acumulação das amins- ^3H nas células.

3.2. Efeito da desipramina, corticosterona, probenecide, cianina 863 e bilirrubina

De modo a caracterizar o sistema de transporte responsável pela captação de catecolaminas- ^3H (50 nmol/l de adrenalina- ^3H ou 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H) por hepatócitos isolados, estudou-se o efeito de conhecidos inibidores de vários sistemas de transporte de compostos orgânicos sobre o conteúdo das células em aminas- ^3H (Figura 16).

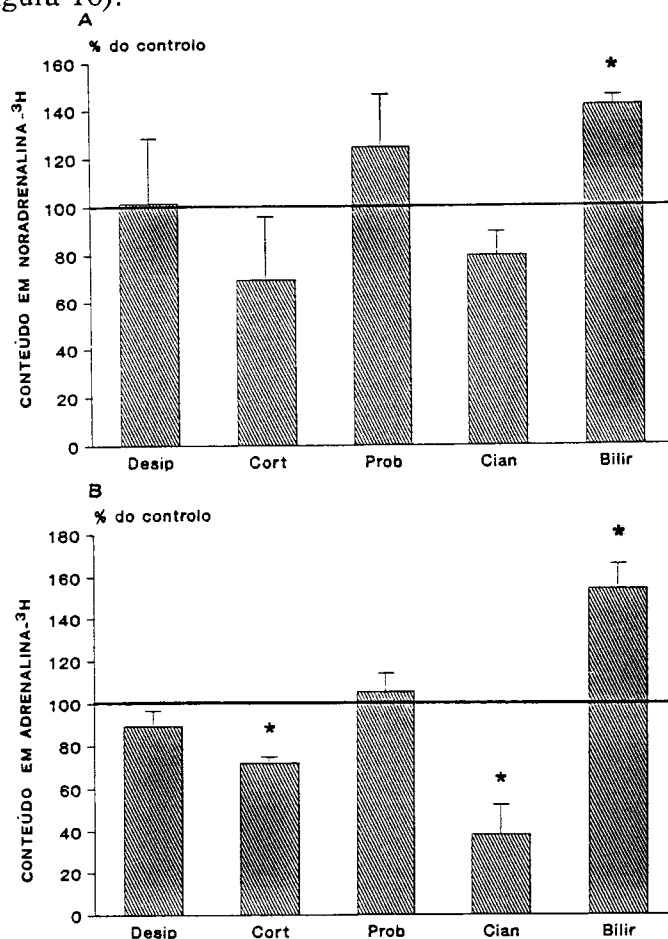


Figura 16. Efeito de inibidores de diferentes sistemas de transporte de compostos orgânicos no conteúdo em noradrenalina- ^3H (Painel A, $n=3-5$) ou em adrenalina- ^3H (Painel B, $n=3-4$) de hepatócitos isolados. Os hepatócitos em suspensão (10^6 células/ml) foram incubados a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina- ^3H (Painel A) ou com 50 nmol/l de adrenalina- ^3H (Painel B). Desip: desipramina 1 $\mu\text{mol/l}$; Cort: corticosterona 40 $\mu\text{mol/l}$; Prob: probenecide 100 $\mu\text{mol/l}$; Cian: cianina 863 10 $\mu\text{mol/l}$ e Bilir: bilirrubina 200 $\mu\text{mol/l}$. Os resultados estão apresentados em percentagem dos respectivos controlos (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). A quantidade de noradrenalina- ^3H e adrenalina- ^3H nos controlos foi de $0,70 \pm 0,13$ pmoles/ 10^6 células ($n=7$) e $0,15 \pm 0,02$ pmoles/ 10^6 células ($n=8$), respectivamente. Estatisticamente diferente do respectivo controlo: * $P < 0,05$ (Painel A: teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para resultados independentes; Painel B: teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para resultados emparelhados).

O inibidor do *uptake*₁ desipramina (na concentração de 1 $\mu\text{mol/l}$) não afectou o conteúdo quer de noradrenalina-³H quer de adrenalina-³H nas células isoladas. A corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$), inibidor do *uptake*₂, reduziu ligeiramente (em 28%) o conteúdo em adrenalina-³H das células, sem contudo alterar o conteúdo em noradrenalina-³H.

O probenecide (100 $\mu\text{mol/l}$), inibidor do transporte renal de aniões orgânicos, não teve qualquer efeito no conteúdo em catecolaminas-³H nas células hepáticas. A cianina 863, inibidor do transporte renal de catiões orgânicos (na concentração de 10 $\mu\text{mol/l}$) reduziu em 62% o conteúdo em adrenalina-³H dos hepatócitos mas não afectou significativamente o conteúdo em noradrenalina-³H.

Testou-se ainda o efeito da bilirrubina (200 $\mu\text{mol/l}$), que é substrato de um transportador hepático de aniões orgânicos. Esta substância aumentou de uma forma marcada (em 50%) a quantidade quer de adrenalina-³H quer de noradrenalina-³H presente nos hepatócitos.

3.3. Dependência do sódio e influência da despolarização da membrana celular

A caracterização do sistema de captação de catecolaminas pelas células hepáticas foi prosseguida estudando a dependência desse sistema em relação ao sódio, bem como o efeito da despolarização da membrana celular (Figura 17).

Incubou-se hepatócitos em meio de incubação sem sódio, sendo o cloreto e o hidrogenocarbonato de sódio substituídos por quantidades equimolares de cloreto de colina (em experiências com 200 nmol/l de noradrenalina-³H ou com 50 nmol/l de adrenalina-³H) ou de cloreto de lítio (em experiências com 200 nmol/l de noradrenalina-³H). A ausência de sódio no meio de incubação originou uma redução muito acentuada no conteúdo das duas aminas-³H nas células: essa redução foi de 85-97% para a noradrenalina-³H e de 95% para a adrenalina-³H. A redução no conteúdo de noradrenalina-³H foi semelhante para ambas as substituições de sódio utilizadas (Figura 17).

Numa outra série de experiências, os hepatócitos foram incubados em meio contendo 50 mmol/l de cloreto de potássio, o que induz despolarização da membrana celular. A despolarização da membrana celular não afectou a captação das aminas-³H (Figura 17). Os controlos destas experiências continham 50 mmol/l de cloreto de colina, cloreto de lítio ou galactose (em experiências com noradrenalina-³H) ou 50 mmol/l de cloreto de colina (em experiências com adrenalina-³H). O conteúdo em aminas-³H nas células incubadas nestas condições de elevada osmolaridade do meio não foi significativamente diferente do conteúdo nas células incubadas num meio com osmolaridade normal (Figuras 16 e 17).

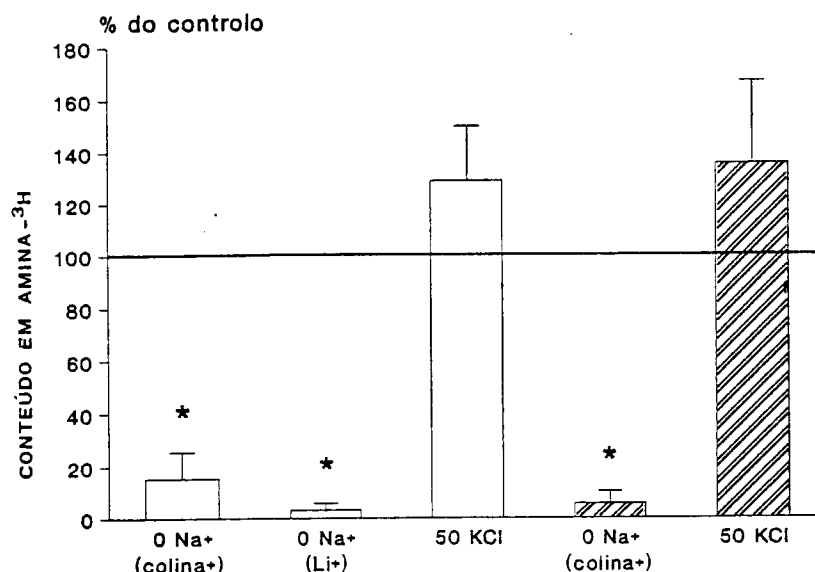


Figura 17. Efeito da ausência de sódio ou da despolarização da membrana celular no conteúdo em catecolaminas-³H de hepatócitos isolados. As células (10^6 células/ml) foram incubadas a 37°C durante 15 minutos com 200 nmol/l de noradrenalina-³H (colunas vazias, $n=4-6$) ou com 50 nmol/l de adrenalina-³H (colunas a tracejado, $n=3-4$) nas seguintes condições: 0 Na⁺ (colina⁺): ião sódio substituído por uma quantidade equimolar de colina⁺; 0 Na⁺ (Li⁺): ião sódio substituído por quantidade equimolar de Li⁺; 50 KCl: as células foram despolarizadas com 50 mmol/l de KCl (os controles continham 50 mmol/l de cloreto de colina, de LiCl ou de galactose; o conteúdo em aminas-³H destes controles não foi significativamente diferente do conteúdo em aminas-³H nos controles com osmolaridade normal do meio). Os resultados estão apresentados em percentagem dos respectivos controles (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). A quantidade de noradrenalina-³H e adrenalina-³H nos controles foi de $0,60 \pm 0,12$ pmoles/ 10^6 células ($n=7$) e $0,11 \pm 0,02$ pmoles/ 10^6 células ($n=8$), respectivamente. Estatisticamente diferente do respectivo controlo: * $P < 0,05$ (colunas vazias: teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes; colunas a tracejado: teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores emparelhados)

4. Captação de noradrenalina-³H por fígado perfundido: conteúdo do tecido em noradrenalina-³H, sua metabolização e excreção

4.1. Perfusão do fígado com noradrenalina-³H

A captação hepática e o posterior destino da noradrenalina-³H (conteúdo, metabolização, excreção) foram estudados em experiências de perfusão de fígado *in situ*. A captação de noradrenalina-³H pelo fígado ao fim dos 60 minutos de perfusão com 2 nmol/l de noradrenalina-³H, calculada como a soma da noradrenalina-³H e metabólitos-³H presentes no fígado (no final da perfusão) com a noradrenalina-³H e metabólitos-³H presentes na bile (no final da perfusão) e com

o total de metabólitos- ^3H presentes no efluente venoso (durante toda a perfusão), foi de $40,2 \pm 6,9$ pmoles/g/60 minutos ($n=5$). A captação de noradrenalina- ^3H pelo fígado correspondeu a cerca de 25% da taxa de influxo de noradrenalina- ^3H na veia porta ($160,2 \pm 11,4$ pmoles/g/60 minutos; $n=5$), o que significa que aproximadamente 25% da noradrenalina- ^3H presente no líquido de perfusão foi captada pelo fígado durante uma única passagem por este órgão. Como se pode ver na Figura 18, a quantidade de noradrenalina- ^3H infundida e a quantidade de noradrenalina- ^3H presente no efluente venoso mantiveram-se paralelas ao longo de todo o período de perfusão, o que significa que a velocidade de captação de noradrenalina- ^3H pelo fígado atingiu o equilíbrio muito rapidamente (durante os primeiros 5 minutos da perfusão).

A contribuição para a captação de noradrenalina- ^3H pelo fígado durante os 60 minutos de perfusão foi a seguinte: metabólitos- ^3H no efluente venoso: $57 \pm 5\%$; radioactividade no fígado: $41 \pm 5\%$; radioactividade na bile: $1,1 \pm 0,3\%$ ($n=5$).

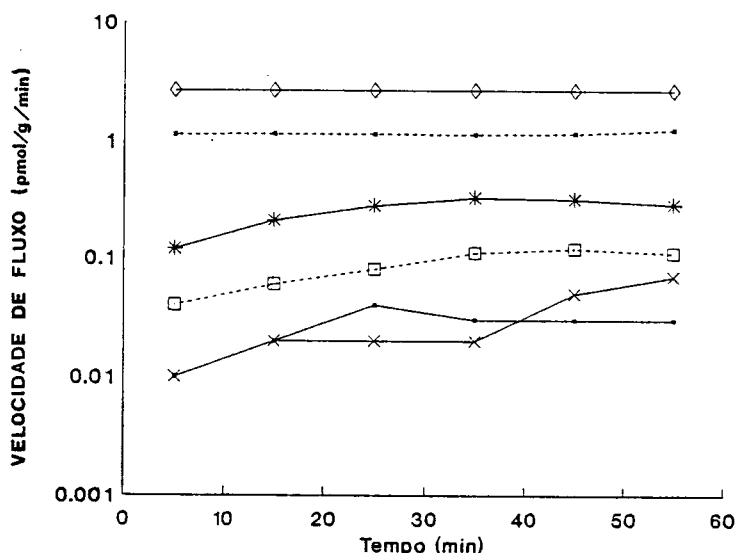


Figura 18. Influxo de noradrenalina- ^3H e efluente de noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H em fígados perfundidos durante 60 minutos com solução de Krebs-Henseleit a 37°C contendo 2 nmol/l de noradrenalina- ^3H . Ordenada: velocidade de influxo de noradrenalina- ^3H ($\diamond$) na veia porta, e velocidade de efluente de noradrenalina- ^3H ($\bullet$), OMDA- ^3H ($\ast$), NMN- ^3H ($\square$), DOPEG- ^3H ($\times$) e DOMA- ^3H ($\bullet$) no efluente venoso, expressas em pmoles/g/minuto; escala logarítmica (médias aritméticas; $n=5$). Abcissa: tempo de perfusão (minutos).

Relativamente ao destino da noradrenalina- ^3H captada pelo fígado, verificou-se que 87% da noradrenalina- ^3H captada foi metabolizada, 13% permaneceu intacta no fígado e 0,014% foi excretada intacta para a bile. Em relação à metabolização da noradrenalina- ^3H captada, 29% dos metabólitos formados permaneceram no fígado, 70% foram encontrados no efluente venoso e

apenas 1% foram excretados para a bile (Figura 19). Ao fim dos 60 minutos de perfusão, os metabólitos formados em maior quantidade foram os metabólitos OMDA- ^3H , correspondendo a 72,5% do total de metabolização. Seguiram-se-lhes a NMN- ^3H (15,8%), o DOPEG- ^3H (6,1%) e o DOMA- ^3H (5,6%) (Figura 19).

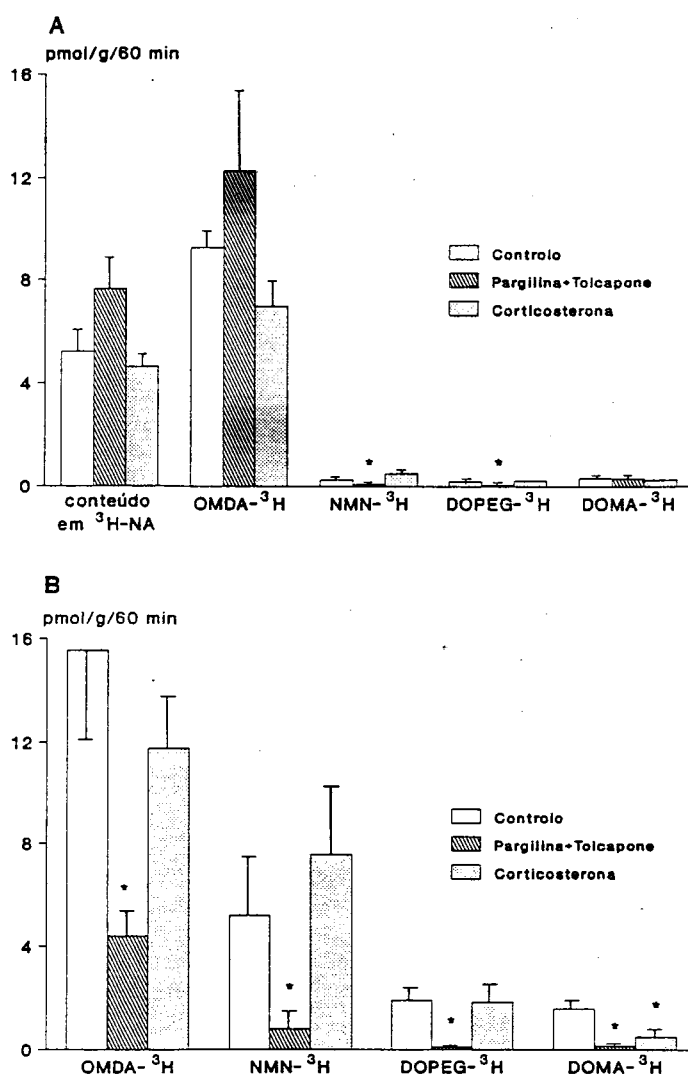


Figura 19. Captação de noradrenalina- ^3H por fígados perfundidos durante 60 minutos com solução de Krebs-Henseleit a 37°C contendo 2 nmol/l de noradrenalina- ^3H . Os fígados não foram sujeitos a qualquer tratamento (Controlo; $n=5$), foram tratados com pargilina (75 mg/kg peso, i.p., 3 horas antes da perfusão) e tolcapone (1 $\mu\text{mol/l}$) (Pargilina+Tolcapone; $n=4$) ou foram tratados com corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) (Corticosterona; $n=3$). **Painel A:** conteúdo em noradrenalina- ^3H e respectivos metabólitos- ^3H no fígado; **Painel B:** metabólitos- ^3H formados presentes no efluente venoso. Os resultados estão expressos em pmoles/g/60 minutos (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Estatisticamente diferente do controlo: * $P<0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes).

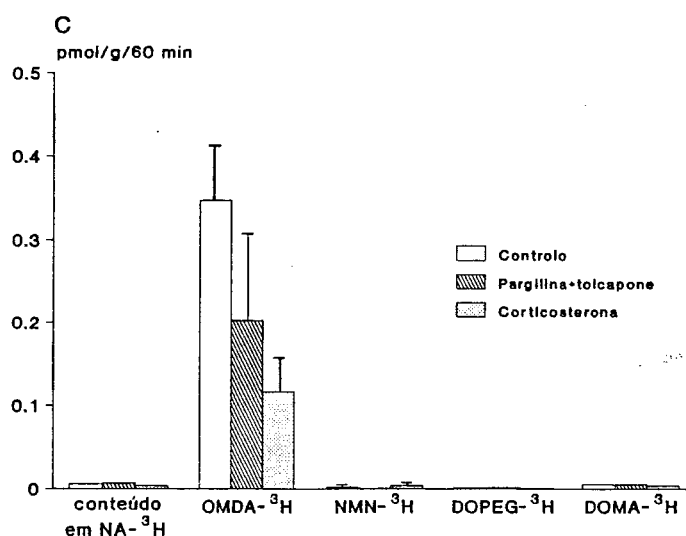


Figura 19. Captação de noradrenalina-³H por fígados perfundidos durante 60 minutos com solução de Krebs-Henseleit a 37°C contendo 2 nmol/l de noradrenalina-³H. Os fígados não foram sujeitos a qualquer tratamento (Controlo; $n=5$), foram tratados com pargilina (75 mg/kg peso, i.p., 3 horas antes da perfusão) e tolcapone (1 μ mol/l) (Pargilina+Tolcapone; $n=4$) ou foram tratados com corticosterona (40 μ mol/l) (Corticosterona; $n=3$). Painel C: conteúdo em noradrenalina-³H e respectivos metabólitos-³H na bile. Os resultados estão expressos em pmoles/g/60 minutos (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média).

A quantidade de noradrenalina-³H presente no fígado no final da perfusão, $5,2 \pm 0,9$ pmol/g ($n=5$), originou uma razão tecido:meio de 2,6 ml/g; ou seja, o fígado acumulou noradrenalina-³H (Figura 19A).

Na Figura 18 pode ver-se a velocidade de efluxo dos metabólitos da noradrenalina-³H para o efluente venoso ao longo de toda a perfusão. Os metabólitos OMDA-³H foram os mais abundantes; a taxa de efluxo destes metabólitos para o efluente venoso atingiu o equilíbrio ao fim de 20-30 minutos de perfusão. Seguiu-se-lhe a NMN-³H; a velocidade de efluxo deste metabólito atingiu o equilíbrio ao fim de 30-40 minutos de perfusão. Os metabólitos desaminados formaram-se em pequena quantidade: a velocidade de efluxo do DOPEG-³H não atingiu o equilíbrio durante os 60 minutos de perfusão e a velocidade de efluxo do DOMA-³H equilibrou aos 20-30 minutos de perfusão.

4.2. Efeito de inibidores da MAO e da COMT

Nesta série de experiências, a MAO e a COMT foram inibidas por meio de um tratamento dos animais com 75 mg/kg de pargilina, administrada por via i.p. 3 horas antes do início da perfusão, e pela presença de 1 μ mol/l de tolcapone no líquido de perfusão, respectivamente.

A captação de 2 nmol/l de noradrenalina- ^3H pelo fígado com a MAO e a COMT inibidas, $26,0 \pm 4,9$ pmoles/g/60 minutos ($n=4$), não foi significativamente diferente da captação da amina- ^3H nos controlos. Sabendo que a taxa de influxo de noradrenalina- ^3H na veia porta nesta série experimental foi de $128,8 \pm 18,1$ pmoles/g/60 minutos ($n=4$), conclui-se que aproximadamente 20% da noradrenalina- ^3H infundida foi removida do líquido de perfusão durante a sua passagem pelo fígado.

Por comparação do padrão de captação (conteúdo, metabolização e excreção) de noradrenalina- ^3H nestas condições experimentais com o padrão obtido nas experiências controlo verificou-se que a inibição da MAO e da COMT: (1) reduziu a quantidade de NMN- ^3H e DOPEG- ^3H presentes no fígado, sem contudo alterar a quantidade de OMDA- ^3H e de DOMA- ^3H (Figura 19A); (2) reduziu a quantidade de todos os metabólitos- ^3H presentes no efluente venoso (Figura 19B); (3) não produziu alteração no conteúdo em noradrenalina- ^3H do fígado, que nestas condições experimentais foi de $7,6 \pm 1,2$ pmoles/g (Figura 19A) e (4) não alterou o conteúdo em noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H na bile (Figura 19C).

O resultado global da inibição da MAO e da COMT na captação, metabolização e excreção de noradrenalina- ^3H pelo fígado de Rato foi o de uma redução bastante marcada nas quantidades de NMN- ^3H (de 83%, $P < 0,05$), de DOPEG- ^3H (de 92%, $P < 0,05$) e de DOMA- ^3H (de 77%, $P < 0,05$) formados. Contudo, a inibição da MAO e da COMT não modificou a captação total de noradrenalina- ^3H pelo fígado, a formação de OMDA- ^3H , o conteúdo em noradrenalina- ^3H no fígado, bem como a quantidade de noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H presentes na bile (teste Tukey HSD para valores independentes) (Figura 19).

4.3. Efeito da corticosterona

Numa outra série de animais, estudou-se o efeito de um inibidor da captação extraneuronal de catecolaminas (*uptake*₂), a corticosterona, sobre a captação de noradrenalina- ^3H (2 nmol/l). Os fígados perfundidos na presença de 40 $\mu\text{mol/l}$ de corticosterona não apresentaram qualquer alteração significativa do padrão de captação, metabolização e excreção de noradrenalina- ^3H . A única diferença observada foi a de uma redução (de 68%) na quantidade de DOMA- ^3H presente no efluente venoso (teste Tukey HSD para valores independentes) (Figura 19).

III. CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP^+ EM FÍGADO DE RATO

O estudo da captação de MPP^+ em fígado de Rato foi abordado utilizando 2 tipos de preparações: culturas primárias de hepatócitos e hepatócitos isolados em suspensão.

Para a totalidade das experiências efectuadas calculou-se o seguinte parâmetro:

- conteúdo em MPP^3H - quantidade de MPP^+-^3H presente nas células no final da incubação.

1. Captação de MPP^+-^3H por culturas primárias de hepatócitos: conteúdo dos hepatócitos em MPP^+-^3H

1.1. Curva tempo de incubação-conteúdo em MPP^+-^3H

A curva tempo de incubação-conteúdo em MPP^+-^3H nos hepatócitos em cultura foi determinada com incubação das células a 37°C com 100 nmol/l deste composto durante diferentes períodos, que variaram de 1 a 90 minutos. O conteúdo das células em MPP^+-^3H foi determinado na ausência ou na presença de decínio 22 (na concentração de $1\text{ }\mu\text{mol/l}$). Os factores de acumulação de MPP^+-^3H nas células foram calculados tal como descrito (secção II.1.5. dos Métodos).

Na ausência de decínio 22, verificou-se que o MPP^+-^3H se acumulou rapidamente nas células (Figura 20). Os valores experimentais de conteúdo em MPP^+-^3H foram ajustados aos parâmetros de uma equação exponencial de saturação (ver Métodos) e calculou-se desse modo a taxa constante de influxo de MPP^+-^3H para os hepatócitos (k_{in}) que foi de $16,1 \pm 3,2\text{ }\mu\text{l}/(\text{mg de proteína} \cdot \text{minuto})$, a taxa constante de efluxo de MPP^+-^3H dos hepatócitos (k_{out}) que foi de $0,113 \pm 0,027\text{ minuto}^{-1}$ e o factor de acumulação de MPP^+-^3H no equilíbrio (A_{max}) que foi de $56,4 \pm 3,8$ ($n=24$). Por outras palavras, uma quantidade de hepatócitos correspondente a 1 miligrama de proteínas removeu o MPP^+-^3H de $16,1\text{ }\mu\text{l}$ de meio de incubação por minuto, e no mesmo espaço de tempo 11,3% do MPP^+-^3H intracelular saiu das células.

Na presença de $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ de decínio 22, a acumulação de MPP^+-^3H foi significativamente reduzida (Figura 20). A análise do perfil temporal de acumulação de MPP^+-^3H mostrou que o decínio 22 reduziu a taxa constante de influxo (k_{in}) para $3,7 \pm 1,1\text{ }\mu\text{l}/(\text{mg de proteína} \cdot \text{minuto})$ ($P < 0,02$), a taxa constante de efluxo (k_{out}) para $0,054 \pm 0,021\text{ minuto}^{-1}$ ($P < 0,05$) e A_{max} para $27,3 \pm 3,9$ ($P < 0,005$) (teste t de Student para valores independentes; $n=4$). Ou seja, o

decínio 22 reduziu quer a entrada de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos, quer a sua posterior saída das células.

Na ausência de decínio 22, o factor de acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nos hepatócitos aumentou linearmente até cerca dos 10 minutos de incubação (Figura 20). Em todas as experiências subsequentes, os hepatócitos foram incubados com $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ durante 2 minutos, de modo a determinar-se velocidades iniciais de captação.

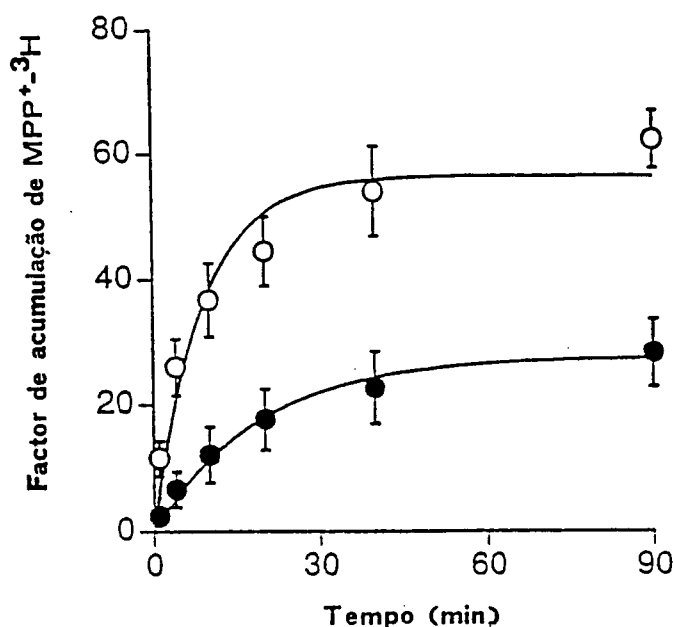


Figura 20. Acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ em hepatócitos em cultura incubados a 37°C com 100 nmol/l de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, na ausência (○) ou na presença de $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ de decínio 22 (●). Ordenada: factor de acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nas células (corresponde à concentração intracelular de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ /concentração extracelular de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$). Abcissa: tempo de incubação (minutos). Os resultados experimentais (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=4$) foram ajustados a uma curva exponencial de saturação.

1.2. Efeito da corticosterona, decínio 22, cianina 863, clonidina, quinina, quinidina e O-metilisoprenalina

No sentido de caracterizar o mecanismo responsável pelo transporte de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos em cultura, estudámos o efeito de vários compostos, com acção inibitória em relação ao transporte extraneuronal de catecolaminas (*uptake*₂) e em relação ao transporte renal de catiões orgânicos, sobre a captação deste composto. Os hepatócitos em cultura foram incubados durante 2 minutos a 37°C com 100 nmol/l de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, medindo-se deste modo velocidades iniciais de captação, na ausência ou na presença de várias concentrações dos compostos

(Figura 21). Nas experiências controle, a acumulação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ nas células foi de $0,96 \pm 0,03$ pmol/(mg de proteína.minuto) ($n=30$).

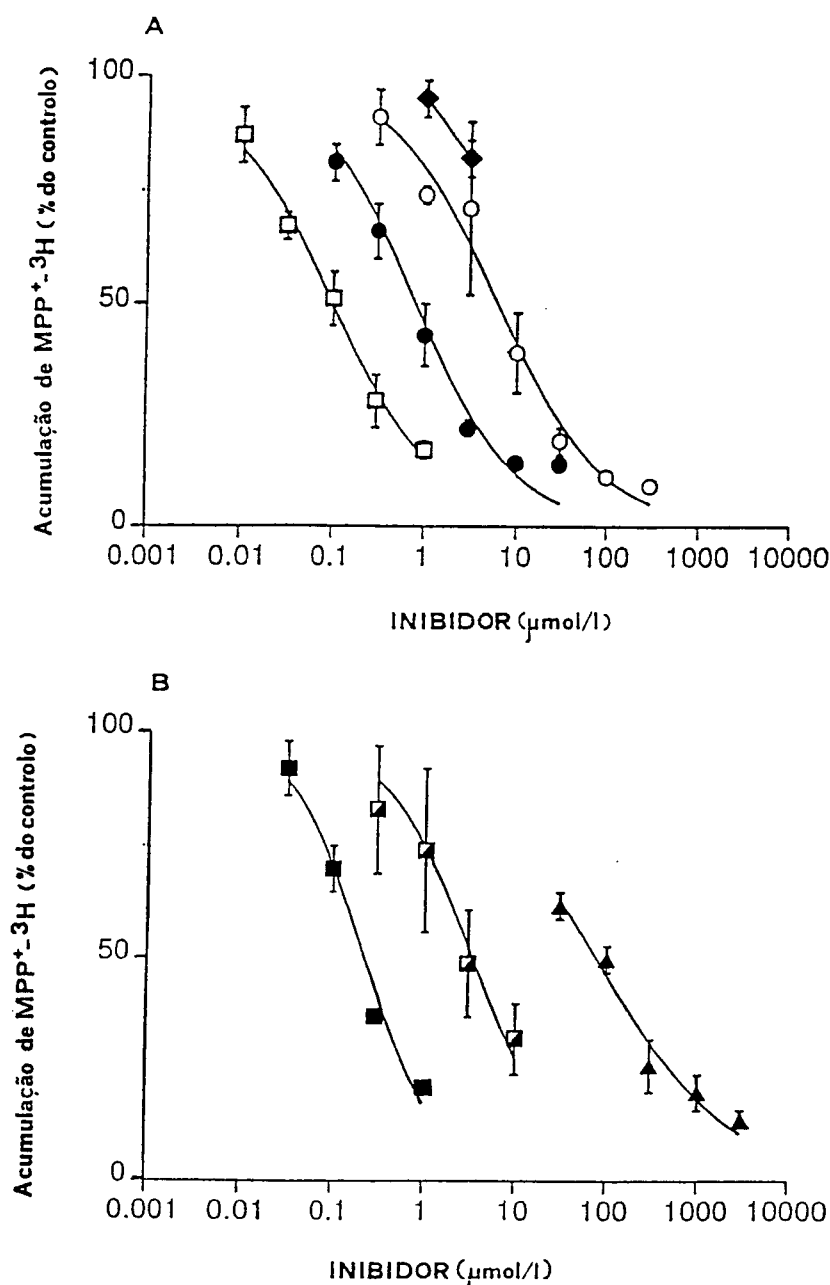


Figura 21. Inibição da captação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ em hepatócitos em cultura. As células foram incubadas a 37°C durante 2 minutos com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$, na ausência ou na presença de vários compostos, medindo-se deste modo velocidades iniciais de captação. Os resultados estão expressos como acumulação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ (em percentagem do respectivo controlo; médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=4$). **Painel A:** cianina 863 ($\square$), quinina ($\bullet$), quinidina ($\circ$), corticosterona ($\blacklozenge$); **Painel B:** decínio 22 ($\blacksquare$), clonidina ($\square$), O-metilisoprenalina ($\blacktriangle$).

As CI_{50} dos diferentes compostos para a inibição da captação de $MPP^{+}-^3H$ foram calculadas a partir das respectivas curvas de inibição (Figura 21) e estão apresentadas na Tabela 11. A cianina 863 foi o inibidor mais potente da captação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos. A corticosterona foi muito menos potente: 3 $\mu\text{mol/l}$ deste composto apenas reduziu a captação de $MPP^{+}-^3H$ para $82 \pm 4\%$ do controlo.

Tabela 11. Inibição da captação de $MPP^{+}-^3H$ por hepatócitos em cultura. As células foram incubadas a 37°C durante 2 minutos com 100 nmol/l de $MPP^{+}-^3H$, na ausência ou na presença de vários compostos, medindo-se deste modo velocidades iniciais de captação. Estão apresentados os CI_{50} (médias geométricas com os respectivos intervalos de confiança a 95%) e os coeficientes de Hill (n_{Hill} ; médias aritméticas com os respectivos erros padrão da média).

	CI_{50} ($\mu\text{mol/l}$)		n_{Hill}	n
Cianina 863	0,097	(0,071, 0,14)	$0,73 \pm 0,09$	4
Decínio 22	0,23	(0,18, 0,29)	$1,05 \pm 0,12$	4
Quinina	0,79	(0,49, 1,3)	$0,80 \pm 0,13$	4
Clonidina	3,4	(1,3, 9,1)	$0,89 \pm 0,33$	4
Quinidina	6,2	(3,7, 10,1)	$0,75 \pm 0,14$	4
O-metilisoprenalina	78	(57, 110)	$0,58 \pm 0,06$	4
Corticosterona	> 3			4

1.3. Efeito do tetraetilamónio e do taurocolato de sódio

As características do sistema de transporte envolvido na captação de $MPP^{+}-^3H$ por hepatócitos foram subsequentemente estudadas ensaiando o efeito do catião monovalente tetraetilamónio e do sal biliar taurocolato de sódio sobre a captação daquele composto. As células em cultura foram incubadas a 37°C durante 2 minutos com 100 nmol/l de $MPP^{+}-^3H$, determinando-se desse modo velocidades iniciais de captação, na ausência ou na presença de 100 $\mu\text{mol/l}$ de tetraetilamónio, ou de 100 $\mu\text{mol/l}$ de taurocolato de sódio. Como se pode ver na Figura 22, tanto o tetraetilamónio como o taurocolato de sódio reduziram significativamente (em cerca de 50%) a captação de $MPP^{+}-^3H$ para os hepatócitos.

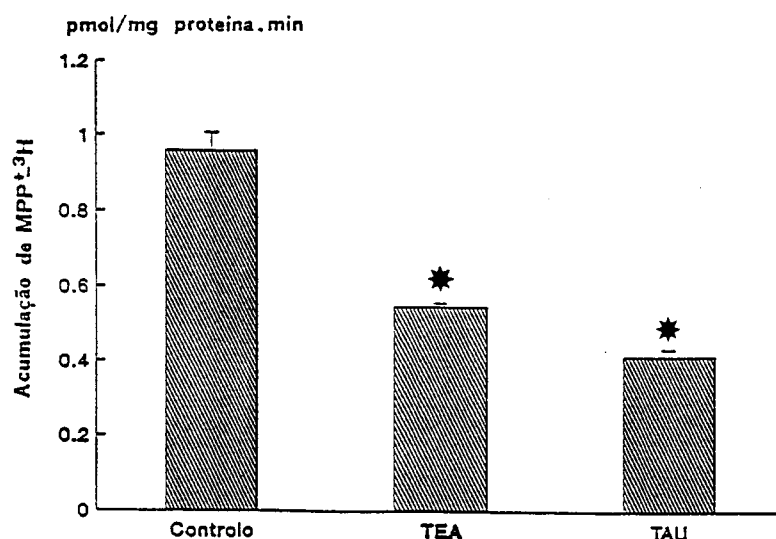


Figura 22. Efeito do catião monovalente tetraetilamónio (TEA) e do sal biliar taurocolato de sódio (TAU) na captação de MPP⁺-³H em culturas de hepatócitos. As células foram incubadas a 37°C durante 2 minutos com 100 nmol/l de MPP⁺-³H, medindo-se deste modo velocidades iniciais de captação, na ausência (Controlo, $n=9$) ou na presença de 100 μ mol/l de TEA ($n=4$) ou de 100 μ mol/l de TAU ($n=4$). Os resultados estão expressos como acumulação de MPP⁺-³H (em pmoles/mg de proteína.minuto; médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Estatisticamente diferente do controlo: * $P<0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes).

1.4. Saturabilidade da captação de MPP⁺-³H

Determinou-se as características cinéticas do transporte responsável pela captação de MPP⁺-³H por hepatócitos em cultura (Figura 23). Para isso, incubou-se as células a 37°C durante 2 minutos (de modo a medir as velocidades iniciais de captação) com concentrações de MPP⁺-³H que variaram de 2 a 64 μ mol/l. A captação específica de MPP⁺-³H foi definida como a fracção da captação total que foi sensível a 300 μ mol/l de quinina, que mostrou ser um potente inibidor da captação de MPP⁺-³H para os hepatócitos (ver secção III.1.3.). Por análise não linear da curva de saturação da captação específica de MPP⁺-³H (ver secção II.1.5. dos Métodos), foram calculados os seguintes parâmetros: o K_m - 12,6 (9,3, 17,0) μ mol/l, e o V_{max} - 40,1 $\pm$ 2,6 pmol/(mg proteína.minuto) ($n=4$).

O gráfico de Scatchard (Figura 23) foi linear, o que significa que o transporte de MPP⁺-³H para os hepatócitos obedeceu à cinética de Michaelis-Menten.

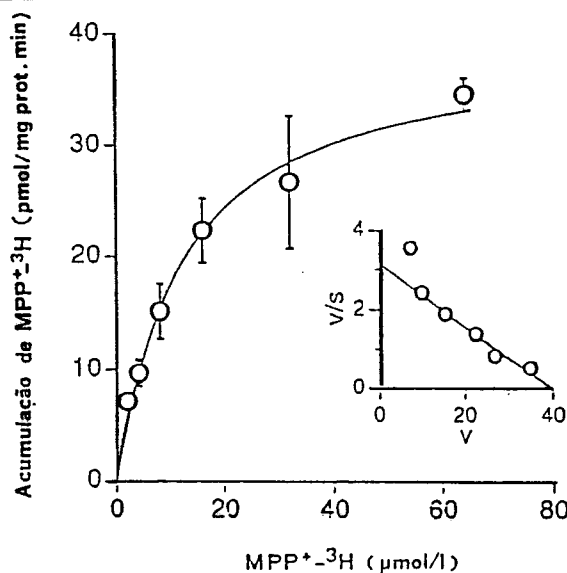


Figura 23. Saturação da captação específica de MPP⁺-³H por hepatócitos em cultura. As células foram incubadas a 37°C durante 2 minutos com várias concentrações de MPP⁺-³H, medindo-se deste modo velocidades iniciais de captação. A captação específica de MPP⁺-³H foi definida como a fracção da captação total de MPP⁺-³H que foi sensível a 300 μmol/l de quinina. A quinina é um potente inibidor da captação de MPP⁺-³H para os hepatócitos, com uma CI₅₀ de 0,79 μmol/l. Os resultados estão expressos como acumulação de MPP⁺-³H (em pmoles/mg proteína.minuto; médias aritméticas ± erro padrão da média; n=4). Inserido na figura: gráfico de Scatchard.

2. Captação de MPP⁺-³H por hepatócitos isolados em suspensão: conteúdo dos hepatócitos em MPP⁺-³H

2.1. Curva tempo de incubação-conteúdo em MPP⁺-³H

A curva tempo de incubação-conteúdo em MPP⁺-³H de suspensões de hepatócitos isolados foi determinada em experiências em que se incubou as células a 37°C com 100 nmol/l de MPP⁺-³H durante diferentes períodos, que variaram de 1 a 90 minutos.

Verificou-se que o MPP⁺-³H se acumulou rapidamente nas células (Figura 24). Os valores experimentais de captação de MPP⁺-³H foram ajustados aos parâmetros de uma equação exponencial de saturação (ver Métodos) e calculou-se desse modo a taxa constante de influxo de MPP⁺-³H para os hepatócitos (k_{in}) que foi de $5,0 \pm 0,4 \mu l / (mg \text{ de proteína} \cdot \text{minuto})$, a taxa constante de efluxo de MPP⁺-³H dos hepatócitos (k_{out}) que foi de $0,048 \pm 0,011 \text{ minuto}^{-1}$ e o conteúdo de MPP⁺-³H no equilíbrio (C_{max}) que foi $10,1 \pm 0,9 \text{ pmoles/mg proteína}$ ($n=36$). Por outras palavras, uma quantidade de hepatócitos correspondente a 1 miligrama de proteínas removeu o MPP⁺-³H de 5 μl de meio de incubação por minuto, e simultaneamente 4,8% do MPP⁺-³H intracelular saiu das células.

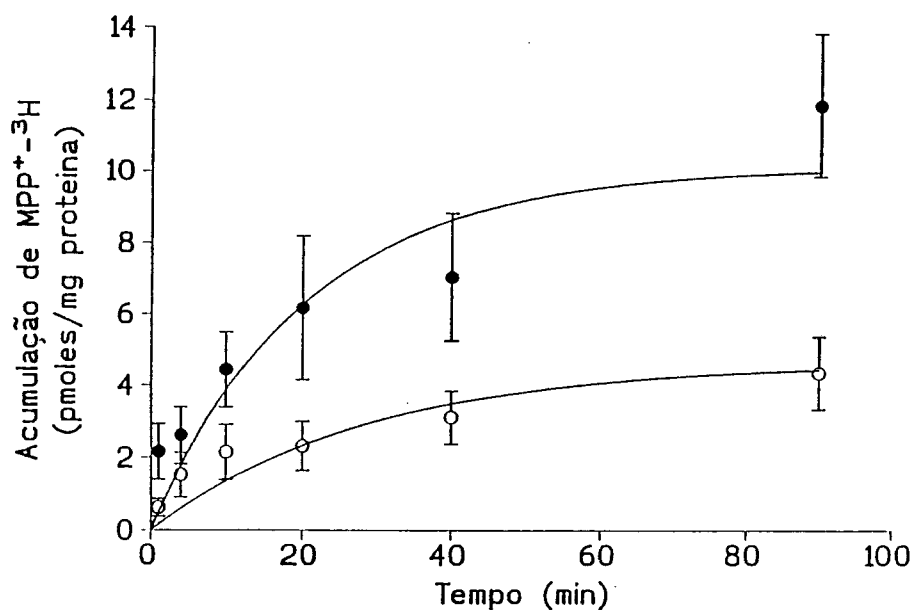


Figura 24. Acumulação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ por suspensões de hepatócitos isolados incubados a 37°C com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$, na ausência (●) ou na presença de 1 $\mu\text{mol/l}$ de decínio 22 (○). Ordenada: acumulação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ (pmoles/mg proteína). Abcissa: tempo de incubação (minutos). Os resultados experimentais (médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média; $n=6$) foram ajustados a uma curva exponencial de saturação.

No equilíbrio, a razão células:meio (calculada como descrito na secção II.2.4. dos Métodos) foi de 21,0 ml/g, o que significa que as células acumularam $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$. A acumulação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ nos hepatócitos aumentou linearmente até cerca dos 15 minutos de incubação (Figura 24). Em todas as experiências subsequentes, os hepatócitos foram incubados com $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ durante 2 minutos ou 15 minutos.

2.2. Efeito do decínio 22

A curva de variação temporal da acumulação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ pelas células isoladas foi também determinada na presença de decínio 22, na concentração de 1 $\mu\text{mol/l}$. Nestas condições, a acumulação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ foi significativamente reduzida (Figura 24). A análise da curva (por ajustamento dos dados experimentais aos parâmetros de uma curva exponencial de saturação) mostrou que o decínio 22 reduziu, para o $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$, a taxa constante de influxo (k_{in}) para $1,6 \pm 0,2 \mu\text{l}/(\text{mg de proteína} \cdot \text{minuto})$ ($P < 0,001$) e C_{max} para $4,9 \pm 0,5$ ($P < 0,005$) (teste t de Student para valores independentes; $n=6$). A taxa constante de efluxo do $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ não foi contudo significativamente reduzida pelo decínio 22 (k_{out} de

$0,035 \pm 0,008$ minuto⁻¹). O decínio 22 reduziu portanto a entrada de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos.

2.3. Efeito da noradrenalina

A hipótese de as catecolaminas e o $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ utilizarem o mesmo sistema de transporte para os hepatócitos foi posta à prova incubando as suspensões celulares a 37°C com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ durante 2 minutos (de modo a medir as velocidades iniciais de captação) na presença de 100 ou de 200 $\mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina, ou durante 15 minutos na presença de 100 $\mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina. Como se pode ver na Figura 25, a (-)-noradrenalina não teve qualquer efeito sobre a captação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ pelos hepatócitos.

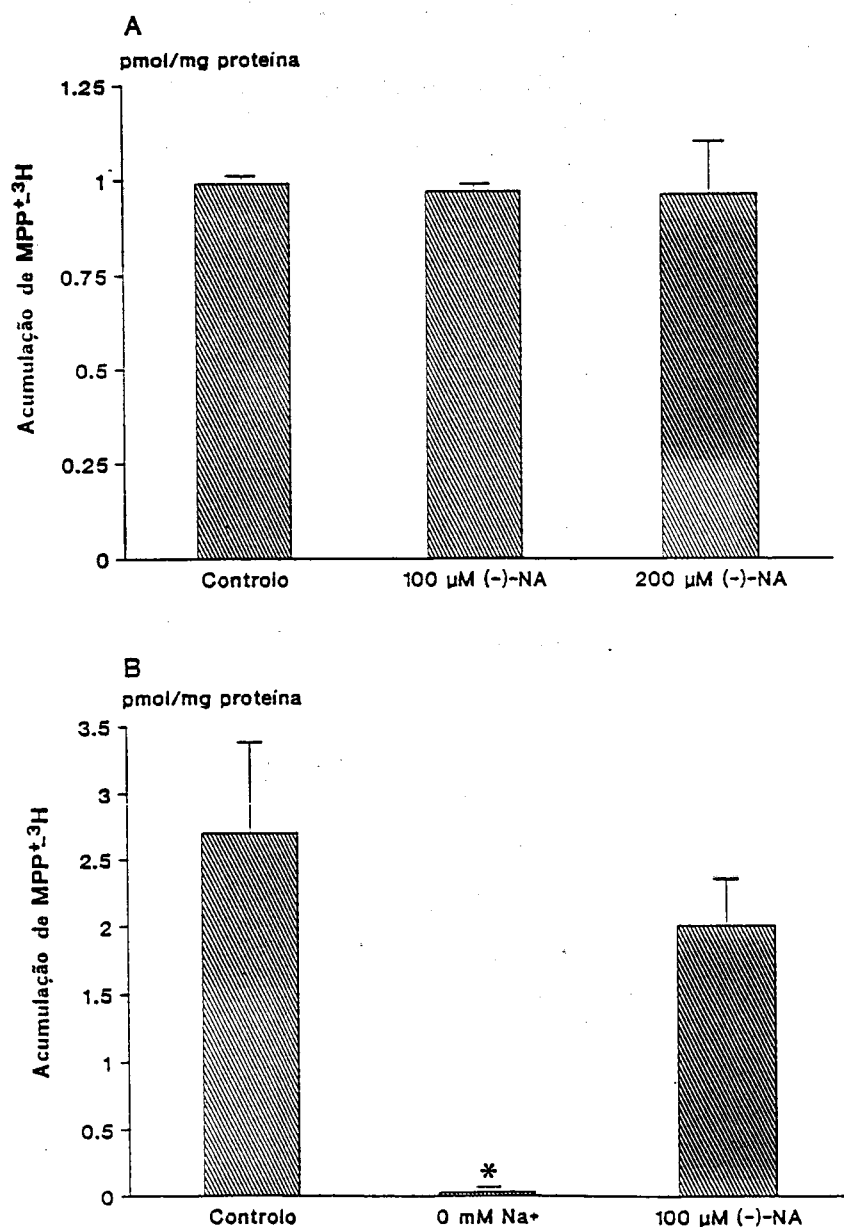


Figura 25. Efeito da noradrenalina e da ausência de sódio na acumulação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ por hepatócitos isolados em suspensão. **Painel A:** as células foram incubadas com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ durante 2 minutos, a 37°C, em meio de incubação normal (Controlo, $n=4$), em meio de incubação normal contendo 100 $\mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina (100 μM (-)-NA; $n=4$) ou em meio de incubação normal contendo 200 $\mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina (200 μM (-)-NA; $n=4$). **Painel B:** as células foram incubadas com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ durante 15 minutos, a 37°C, em meio de incubação normal (Controlo, $n=6$), em meio de incubação sem sódio (0 mM Na⁺; $n=4$) ou em meio de incubação normal contendo 100 $\mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina (100 μM (-)-NA; $n=4$). O meio de incubação sem sódio foi obtido por substituição de todo o sódio do meio por quantidade equimolar de colina. Os resultados estão expressos como acumulação de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ (em pmoles/mg de proteína; médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média). Estatisticamente diferente do controlo: * $P < 0,05$ (teste ANOVA seguido do teste Tukey HSD para valores independentes).

2.4. Dependência do sódio

A dependência do sistema de transporte de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ para as células hepáticas isoladas em relação ao sódio foi estudada em experiências em que as suspensões de hepatócitos foram incubadas com 100 nmol/l de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ durante 15 minutos, a 37°C, em solução de Krebs-Henseleit sem sódio (estando este ião substituído por uma quantidade equimolar de colina). Verificou-se, nestas condições experimentais, uma redução muito significativa (de 99%) na quantidade de $\text{MPP}^+ \text{-}^3\text{H}$ acumulada nos hepatócitos, em relação ao que se verifica na presença de sódio (Figura 25B).

DISCUSSÃO

I. CAPTAÇÃO E O-METILAÇÃO EXTRANEURONIAL DE ADRENALINA EM AORTA DE COELHO

O sistema extraneuronal de O-metilação de catecolaminas é constituído pela combinação de um sistema de captação (*uptake*₂) com a enzima COMT intracelular (Trendelenburg 1988). Como o *uptake*₂ e a COMT funcionam em série na eliminação de catecolaminas extracelulares, o resultado da inibição do *uptake*₂ depende obviamente do estado funcional da COMT. Assim, quando a COMT se encontra funcionante (e não saturada), a catecolamina localizada nos tecidos extraneuronais é metabolizada por esta enzima, e consequentemente a inibição do *uptake*₂ origina uma redução na O-metilação da amina (exemplos: Eckert *et al.* 1976 (aorta de Coelho); Bönisch *et al.* 1974 (coração de Rato); Cornish e Goldie 1980 (artéria coronária e aurícula de Gato); Paiva e Guimarães 1978 (veia safena de Cão); Head *et al.* 1980 (artéria de orelha de Coelho)). Por outro lado, quando a COMT se encontra inibida (ou saturada), a catecolamina localizada nos tecidos extraneuronais permanece intacta, e consequentemente a inibição do *uptake*₂ origina uma redução no conteúdo do tecido em catecolamina (exemplos: Bönisch *et al.* 1974 (coração de Rato); Eckert *et al.* 1976 (aorta de Coelho); Branco e Osswald 1980 (veia safena de Cão); Head *et al.* 1980 (artéria da orelha de Coelho)).

A aorta de Coelho possui um *uptake*₂ bastante activo (Levin 1974; revisão por Trendelenburg 1988), sendo um dos tecidos em que a captação e metabolização extraneuronal de catecolaminas está mais estudada (Kalsner 1969; Kalsner e Nickerson 1969; Levin 1974; Trendelenburg 1974; Kalsner 1975; Eckert *et al.* 1976; Henseling *et al.* 1976; Levin e Wilson 1977; Henseling *et al.* 1978; Henseling 1980; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983; Barone *et al.* 1987). Contudo, existem neste tecido aspectos relativos à captação extraneuronal de catecolaminas que não se encontram ainda completamente esclarecidos. Na realidade, o efeito da inibição do *uptake*₂ sobre a captação e metabolização de catecolaminas apresenta características interessantes. Quando a COMT está funcionante (e a MAO está inibida), a inibição do *uptake*₂ origina uma redução bastante acentuada na subsequente O-metilação da amina pelo tecido (Williams e Hudgins 1973; Eckert *et al.* 1976; Branco *et al.* 1981; Henseling 1983b) mas o efeito da inibição do *uptake*₂ sobre o conteúdo do tecido em amina-³H é muito variável, tendo sido descrito quer como redução (Branco *et al.* 1981; Levin e

(Williams e Hudgins 1973; Henseling 1980; Levin e Wilson 1983). Por outro lado, quando a MAO e a COMT estão inibidas, a inibição do *uptake*₂ origina uma redução na quantidade de amina presente no tecido, mas essa redução é geralmente apenas parcial (Eckert *et al.* 1976; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983; Henseling 1980; Henseling 1983a; Henseling 1984; Abrahamsen e Nedergaard 1985).

No presente estudo, avaliou-se o efeito de uma série de compostos descritos como inibidores da captação extraneuronal de catecolaminas sensível a corticosteroides (*uptake*₂) sobre o conteúdo e sobre a O-metilação de adrenalina-³H. Para o estudo da influência destes compostos sobre a O-metilação de adrenalina-³H, realizou-se experiências em condições que favoreciam a captação extraneuronal da adrenalina-³H seguida da O-metilação (captação neuronal e MAO inibidas). Por outro lado, para o estudo da influência destes compostos sobre o conteúdo extraneuronal de adrenalina-³H, realizou-se experiências em que a acumulação extraneuronal de adrenalina-³H estava favorecida (captação neuronal, MAO e COMT inibidas).

A MAO e a COMT, as principais enzimas responsáveis pela metabolização de catecolaminas, são abundantes e funcionantes na aorta de Coelho (Kalsner e Nickerson 1969; Verity *et al.* 1972, Levin 1974; Levin e Wilson 1977; Henseling *et al.* 1978) e, sempre que necessário, os tecidos foram tratados com pargilina ou Ro 01-2812 de modo a inibir a MAO ou a COMT, respectivamente.

O tratamento prévio dos tecidos com pargilina (500 μ mol/l), um inibidor não selectivo da MAO do tipo A e B (Fuller e Hemrick 1978; Parsons e Rainbow 1984), inibiu de um modo bastante eficaz esta enzima, como se observa pela quase completa ausência de formação dos metabólitos desaminados, o DOPEG-³H e o DOMA-³H, na presença deste composto. O efeito inibitório da pargilina em relação à desaminação de noradrenalina-³H na aorta de Coelho (Levin e Wilson 1977; Henseling *et al.* 1978), foi confirmado, neste estudo, em relação à desaminação de adrenalina-³H.

O Ro 01-2812, inibidor da COMT utilizado, inibiu esta enzima de um modo bastante eficaz, confirmando, neste tecido, as propriedades inibitórias deste composto (Zürcher *et al.* 1988). O Ro 01-2812 originou uma redução quase total na formação de MN-³H, concomitante com um aumento do conteúdo em adrenalina-³H nas tiras de aorta, de acordo com o conhecido facto de que a inibição de um local de perda importante para a amina (neste caso, a COMT) induz um aumento na quantidade de amina intacta no tecido (revisão por Trendelenburg 1988).

O tratamento simultâneo das tiras de aorta com pargilina e Ro 01-2812 reduziu de uma forma muito marcada a metabolização da adrenalina- ^3H mas, mesmo com a MAO e a COMT inibidas, cerca de 20% do total de radioactividade presente nas tiras correspondeu a metabólitos- ^3H da adrenalina- ^3H . Este facto foi também observado com a noradrenalina- ^3H nesta mesma estrutura, usando pargilina e U-0521 (Henseling *et al.* 1978).

Em condições de funcionamento da COMT (com o *uptake*₁ e a MAO inibidos) a artéria aorta de Coelho revelou uma boa capacidade de captação e O-metilação extraneuronal de adrenalina- ^3H . Nestas condições, verificou-se que 80% da adrenalina- ^3H captada pelo tecido foi metabolizada, sendo os metabólitos- ^3H O-metilados responsáveis pela quase totalidade da metabolização observada. Esta observação está de acordo com a conhecida capacidade de captação e metabolização extraneuronal de catecolaminas deste tecido (Kalsner e Nickerson 1969; Levin 1974; Trendelenburg 1974; Kalsner 1975; Levin e Wilson 1983; Henseling 1984; Abrahamsen e Nedergaard 1985; Barone *et al.* 1987).

Nestas condições experimentais, todos os inibidores do *uptake*₂ reduziram a O-metilação de adrenalina- ^3H de uma forma dependente da concentração, sendo a redução máxima na formação de MN- ^3H praticamente total. O fosfato de hidrocortisona constituiu excepção, pois não evidenciou qualquer efeito. Calculou-se as CI_{50} dos inibidores (relativos à inibição da formação de MN- ^3H) e verificou-se que a corticosterona foi o inibidor mais potente (apresentando uma CI_{50} de 0,88 $\mu\text{mol/l}$) seguido, por ordem decrescente de potência, da testosterona, 17 β -estradiol, DOCA, progesterona e metanefrina.

Em condições de inibição da COMT (com o *uptake*₁ e a MAO também inibidos) aproximadamente 80% da adrenalina- ^3H captada pela aorta correspondeu a adrenalina- ^3H intacta presente no tecido. Verificou-se, nestas condições experimentais, que os inibidores do *uptake*₂ reduziram o conteúdo em adrenalina- ^3H da aorta de Coelho de uma forma dependente da concentração. Estas experiências revelaram, contudo, um aspecto interessante: a redução no conteúdo em adrenalina- ^3H produzida pelos inibidores do *uptake*₂ nunca foi superior a cerca de 50% do total de adrenalina- ^3H presente no tecido. Ou seja, estes resultados sugeriam a existência de um compartimento responsável por cerca de 50% da captação extraneuronal de adrenalina- ^3H na aorta de Coelho independente do *uptake*₂. As CI_{50} dos inibidores do *uptake*₂ em relação à redução do conteúdo em adrenalina- ^3H foram calculadas assumindo que o máximo de redução produzido pelos fármacos correspondia a 100% de redução. Após este ajustamento, determinou-se então as CI_{50} , e verificou-se que a ordem de potência dos inibidores foi praticamente idêntica à ordem de potência dos mesmos em relação à inibição da

O-metilação da amina- ^3H : a corticosterona foi o inibidor mais potente, e a hidrocortisona não apresentou, mais uma vez, qualquer efeito. No entanto, os inibidores do *uptake*₂ foram menos potentes a reduzir o conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H (com a COMT inibida) do que a reduzir a sua O-metilação (com a COMT intacta), pois as CI_{50} foram mais altas no primeiro caso do que no segundo.

O efeito inibitório relativamente ao *uptake*₂, observado com os esteróides e com o derivado O-metilado da adrenalina, confirma uma vez mais as propriedades inibitórias destes compostos sobre a captação extraneuronal de catecolaminas (esteróides: Iversen e Salt 1970, Salt 1972, Nicol e Rae 1972; Williams e Hudgins 1973; metanefrina: Burgen e Iversen 1965, Broadley e Paton 1990), sendo importante referir que os mineralocorticóides (corticosterona e DOCA) reduziram o conteúdo em adrenalina- ^3H (com a COMT inibida) e a sua O-metilação (com a COMT funcionante) tão eficazmente como os esteróides sexuais (progesterona, testosterona e 17β -estradiol); pelo contrário, a hidrocortisona não mostrou efeito inibitório (até uma concentração de $120\text{ }\mu\text{mol/l}$).

A observação de que os inibidores do *uptake*₂ quase aboliram a formação de MN- ^3H (quando a COMT estava funcionante) mas reduziram apenas parcialmente o conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H (quando a COMT estava inibida), juntamente com a observação de que, para todos esses inibidores, a potência inibitória em relação à O-metilação da adrenalina- ^3H (COMT intacta) foi maior do que a potência inibitória em relação ao conteúdo em adrenalina- ^3H do tecido (COMT inibida), sugere que a O-metilação da adrenalina- ^3H é totalmente dependente duma captação prévia da amina- ^3H através do *uptake*₂, ao contrário do conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H , que é apenas parcialmente dependente duma captação prévia da amina- ^3H através do *uptake*₂. Os resultados obtidos podem ser então interpretados da seguinte forma: na aorta de Coelho, a O-metilação das catecolaminas ocorre exclusivamente num compartimento a que as aminas têm acesso através do *uptake*₂, enquanto que a distribuição das catecolaminas no tecido apresenta um comportamento mais complexo, ocorrendo em dois compartimentos, um dependente do *uptake*₂ e onde existe COMT e outro independente do *uptake*₂ e onde não existe COMT. Assim, quando a COMT está funcionante (e não saturada, pois a concentração de catecolamina utilizada é inferior ao K_m da enzima), toda a adrenalina- ^3H que é captada pelo tecido através do *uptake*₂ é subsequentemente O-metilada. Nestas condições, a adrenalina- ^3H presente no tecido está localizada no compartimento não dependente do *uptake*₂, e que não possui COMT; quando a COMT está inibida (ou saturada), a adrenalina- ^3H localiza-se em dois compartimentos, um deles dependente e o outro independente do *uptake*₂. Esta proposta de interpretação é reforçada por duas linhas de observações:

1) com o *uptake*₂ maximamente inibido (*uptake*₁ e MAO também inibidos), o conteúdo em adrenalina-³H do tecido na ausência (45 pmol/g) ou na presença (43 pmol/g) do inibidor da COMT é semelhante, demonstrando que o compartimento independente do *uptake*₂ em que a adrenalina-³H se distribui não possui COMT;

2) com a COMT funcionante (*uptake*₁ e MAO inibidos), verificou-se uma divergência no efeito da inibição do *uptake*₂ em relação à O-metilação da adrenalina-³H (redução) e ao conteúdo do tecido em adrenalina-³H (aumento). Esta observação demonstra que a distribuição de adrenalina-³H no compartimento independente do *uptake*₂ (e sem COMT) é favorecida quando se inibe o *uptake*₂. Uma divergência semelhante no efeito dos inibidores do *uptake*₂ relativamente à O-metilação e ao conteúdo em catecolaminas foi anteriormente referida nesta mesma estrutura (Eckert *et al.* 1976), e também na veia safena de Cão (Paiva e Guimarães 1978) e nas artérias coronárias e na aurícula de Gato (Cornish e Goldie 1980). No entanto, nestas condições experimentais, o efeito de inibidores do *uptake*₂ sobre o conteúdo em amina-³H na aorta de Coelho foi descrito quer como redução, como aumento ou ainda como não alteração (ver acima). Uma possível explicação para a discrepância de efeitos observados nos diferentes estudos realizados com aorta de Coelho relaciona-se muito provavelmente com a concentração de catecolamina utilizada. No nosso estudo, utilizámos uma concentração de adrenalina-³H (50 nmol/l) que não satura a COMT. No entanto, o uso de concentrações de catecolamina suficientemente altas para saturar a COMT, que tem um K_m de 0,76 e 2,3 μ mol/l para a (-)-adrenalina e para a (-)-noradrenalina, respectivamente, no coração de Rato (Grohmann e Trendelenburg 1985), e um K_m de 3,7 μ mol/l para a (-)-noradrenalina, na aorta de Coelho (Henseling 1983b), origina acumulação das catecolaminas não só no compartimento independente do *uptake*₂ mas também no compartimento que contém a COMT (compartimento dependente do *uptake*₂). Assim, a impossibilidade de observar um aumento da amina-³H no tecido após inibição do *uptake*₂ deve-se provavelmente à existência de mascaramento dos resultados, por haver simultaneamente um aumento da amina-³H no compartimento independente do *uptake*₂ e uma diminuição da amina-³H no compartimento dependente do *uptake*₂.

A existência, na aorta de Coelho, de um compartimento extraneuronal de captação de catecolaminas independente do *uptake*₂ (Williams e Hudgins 1973; Eckert *et al.* 1976; Henseling 1980; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983; Sweet e Levin 1983; Henseling 1983a) e onde essas aminas não são metabolizadas (Williams e Hudgins 1973; Eckert *et al.* 1976; Branco *et al.* 1981; Levin e Wilson 1983) foi previamente sugerido por vários autores.

Os resultados anteriores apontavam portanto para a existência, na aorta de Coelho, de captação extraneuronal de adrenalina- ^3H não dependente do *uptake*₂, captação essa quantitativamente importante, e em relação à qual não existia indicações sobre a sua natureza bioquímica e morfológica, nem sobre a sua importância fisiológica. No sentido de aprofundarmos os conhecimentos sobre esta captação extraneuronal de catecolaminas independente do *uptake*₂, realizou-se experiências com uma metodologia que nos permitia isolar e quantificar os diferentes locais de distribuição extraneuronal da amina- ^3H , através da análise compartimental de curvas de efluxo de radioactividade proveniente de tiras previamente incubadas com adrenalina- ^3H , em condições de inibição do *uptake*₁, da MAO e da COMT. Essa análise revelou a existência de três compartimentos extraneuronais de distribuição de adrenalina- ^3H : o compartimento I, com um tempo de semi-vida inferior a 1 minuto, o compartimento II, com um tempo de semi-vida de 4 minutos, e o compartimento III, com um tempo de semi-vida de 15 minutos. É interessante notar que a distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H na aorta de Coelho por nós descrita é muito semelhante à distribuição extraneuronal de noradrenalina- ^3H encontrada por Henseling e colaboradores (1976) no mesmo tecido. Aqueles autores descrevem três compartimentos de distribuição extraneuronal de noradrenalina-($\pm$)- ^3H , com tempos de semi-vida de menos do que 1 minuto, 3 minutos e 11 minutos, referindo que o compartimento com menor semi-vida correspondia à distribuição extracelular da amina- ^3H no tecido, e que os outros dois compartimentos eram sensíveis à corticosterona, embora a sensibilidade fosse maior no compartimento com uma semi-vida maior.

No presente estudo, o compartimento III de distribuição de adrenalina- ^3H mostrou-se profundamente sensível à corticosterona e ao abaixamento da temperatura de incubação (para 4°C), o que permite concluir que a distribuição de adrenalina- ^3H neste compartimento é dependente do *uptake*₂. O bloqueio do *uptake*₂ pela corticosterona não só reduziu marcadamente (em 78%) o tamanho deste compartimento como aumentou o seu tempo de semi-vida (em 35 minutos). O efeito da corticosterona sobre o tempo de semi-vida do compartimento III é explicado pelo facto de os inibidores do *uptake*₂ inibirem não só a entrada das catecolaminas para o compartimento dependente do *uptake*₂, como também a sua posterior saída deste compartimento (Eckert *et al.* 1976; Trendelenburg 1988). O tempo de semi-vida deste compartimento (15 minutos) está de acordo com os tempos de semi-vida do compartimento extraneuronal dependente do *uptake*₂ referidos anteriormente nesta estrutura (Eckert *et al.* 1976) e também no coração de Rato (Iversen 1965; Bönisch *et al.* 1974) e de Coelho (Lindmar e Löffelholz 1974).

Nos vasos sanguíneos, a captação extraneuronal de catecolaminas sensível aos esteróides (*uptake*₂) e relacionada com a metabolização das catecolaminas está associada, tal como foi demonstrado com base em estudos de microscopia de fluorescência (Gillespie e Towart 1973; O'Donnell e Reid 1984) e de autoradiografia (Branco *et al.* 1981), com as células musculares lisas da média. Parece pois lógico admitir que a captação extraneuronal de adrenalina-³H sensível aos esteróides e associada à O-metilação da amina-³H na aorta de Coelho se localiza nas células musculares lisas da média.

A adrenalina-³H distribuída no compartimento II corresponde, muito provavelmente, a adrenalina-³H ligada ao colagénio e à elastina, ligação essa que pode corresponder à ligação das aminas a grupos aniónicos presentes na superfície das proteínas ou a alguma forma de ligação hidrofóbica (Gillespie 1976). Existem vários factos que suportam esta hipótese. Em primeiro lugar, a distribuição de adrenalina-³H no compartimento II foi apenas parcialmente sensível à corticosterona (em cerca de 15%), não foi afectada pelo abaixamento da temperatura de incubação (indicando que não há envolvimento de um sistema de captação activo) e este compartimento possui um tempo de semi-vida relativamente curto, indicativo de uma ligação reversível. Parece portanto que a grande maioria da adrenalina-³H distribuída neste compartimento não depende de uma prévia captação através do *uptake*₂ e que o ligeiro efeito exercido pela corticosterona na distribuição de adrenalina-³H neste compartimento provavelmente reflecte o facto de que uma pequena fracção da amina-³H captada pelo *uptake*₂ foi incluída neste compartimento. Sabendo que a aorta de Coelho é um vaso onde o colagénio e a elastina representam uma grande fracção volumétrica (Bierring e Kobayasi 1963; Branco *et al.* 1981), e que as catecolaminas se ligam não só ao colagénio e à elastina purificados (Powis 1973b) mas que também se ligam reversivelmente a essas proteínas estruturais em diversos órgãos (Avakian e Gillespie 1968; Clarke *et al.* 1969; O'Donnell e Saar 1973; Branco *et al.* 1981), parece-nos possível que de facto a ligação da adrenalina-³H ao colagénio e à elastina seja responsável pela amina-³H distribuída no compartimento II. Esta hipótese é reforçada pelo facto de que está bem demonstrada a insensibilidade da ligação de catecolaminas ao colagénio e à elastina aos inibidores do *uptake*₂ e ao frio (Avakian e Gillespie 1968; O'Donnell e Saar 1973; Gillespie e Towart 1973; Powis 1973b; Branco *et al.* 1981). No sentido de resolvermos esta questão, foram realizadas experiências em que se estudou o efeito da oxitetraciclina sobre a distribuição extraneuronal de adrenalina-³H. A oxitetraciclina foi descrita por Powis (1973b) como possuindo efeito inibitório sobre a ligação de catecolaminas ao colagénio e à elastina. Não se observou qualquer efeito desta tetraciclina sobre a distribuição compartimental de

adrenalina- ^3H , o que, contudo, julgamos não invalidar a nossa teoria. O próprio Powis (1973b), e também Eckert *et al.* (1976), Henseling (1983a) e Levin e Wilson (1983) não observaram efeitos inibitórios deste composto em relação à acumulação de catecolaminas em vasos sanguíneos isolados, e muitos outros autores não verificaram qualquer efeito da oxitetraciclina nas respostas fisiológicas de vasos isolados a catecolaminas exógenas ou à estimulação simpática (Guimarães *et al.* 1975; Kalsner 1976; Brine *et al.* 1979; Paton 1980).

O compartimento I, que apresenta um tempo de semi-vida muito curto, corresponde à adrenalina- ^3H distribuída no espaço extracelular (Eckert *et al.* 1976). Verificou-se que a corticosterona provocou um aumento na quantidade de adrenalina- ^3H presente neste compartimento, e que o abaixamento da temperatura de incubação produziu um efeito qualitativamente semelhante ao da corticosterona, embora quantitativamente menos marcado. Estas duas observações conduzem à conclusão de que a inibição do *uptake*₂ provoca um aumento na concentração de adrenalina- ^3H no espaço extracelular, e portanto, na biófase. Este aumento na concentração de adrenalina- ^3H no espaço extracelular observado após inibição do *uptake*₂ sugere que o *uptake*₂ cria um gradiente de concentração para as catecolaminas no tecido, e pode explicar a potenciação da resposta dos tecidos às catecolaminas observada após inibição do *uptake*₂ (Kalsner 1969; Kaumann 1972, Graefe e Trendelenburg 1974; Foster *et al.* 1983; Guimarães *et al.* 1985; Guimarães e Trendelenburg 1985; Barone *et al.* 1987).

Dos resultados apresentados pode então concluir-se que, na aorta de Coelho:

1) os corticosteróides, os esteróides sexuais e o derivado O-metilado da adrenalina- ^3H inibem eficazmente a captação extraneuronal de adrenalina- ^3H através do *uptake*₂; a corticosterona foi o inibidor mais potente e, inesperadamente, a hidrocortisona não apresentou qualquer efeito inibitório;

2) a O-metilação de adrenalina- ^3H é totalmente dependente de uma prévia captação de adrenalina- ^3H pelo tecido através do *uptake*₂. Pelo contrário, o conteúdo extraneuronal de adrenalina- ^3H é apenas parcialmente dependente do *uptake*₂, confirmando uma hipótese que foi já levantada por alguns autores;

3) a formação do metabólito O-metilado (quando a COMT está funcionando e não se encontra saturada) é um índice mais sensível do $uptake_2$ do que o conteúdo do tecido em amina intacta (quando a COMT está inibida);

4) a captação extraneuronal de adrenalina- ^3H independente do $uptake_2$ corresponde muito provavelmente à ligação da amina- ^3H ao colagénio e à elastina;

5) a inibição do $uptake_2$ produz um aumento na concentração de adrenalina- ^3H no espaço extracelular, o que significa que o $uptake_2$ cria um gradiente de concentração de adrenalina- ^3H nesse espaço e, conseqüentemente, influencia a resposta fisiológica do tecido a este transmissor.

II. CAPTAÇÃO E METABOLIZAÇÃO EXTRANEURONIAL DE CATECOLAMINAS EM FÍGADO DE RATO

É relativamente antiga a noção de que o fígado desempenha um papel bastante importante na remoção de catecolaminas circulantes (Lund 1951; Axelrod 1959; Vendasalu 1960, Hertting e LaBrosse 1962; Carlsson e Waldeck 1963; Zimon *et al.* 1967). Utilizando o modelo do fígado perfundido, foi demonstrado que este órgão remove e inactiva metabolicamente a noradrenalina e a adrenalina circulantes de um modo muito eficaz (Hertting e LaBrosse 1962; Zimon *et al.* 1967; Lightman e Hems 1973; Steinberg *et al.* 1988). A grande capacidade metabolizadora do fígado em relação às catecolaminas está de acordo com a conhecida abundância da MAO e da COMT, as principais enzimas metabolizadoras daquelas substâncias, neste órgão (Axelrod e Tomchick 1958; Axelrod *et al.* 1959; Blaschko 1952; revisões por Axelrod 1966; Gorkin 1966; Kopin 1972; 1985).

No entanto, existe uma grande escassez de informação relativamente às características do(s) sistema(s) de metabolização hepática de catecolaminas. O conhecimento actual relativamente às características da metabolização hepática de catecolaminas é bastante incompleto (Hertting e LaBrosse 1962; Zimon *et al.* 1967; Steinberg *et al.* 1988) e, do mesmo modo, os estudos realizados até à data não caracterizaram convenientemente o(s) sistema(s) de captação de catecolaminas no fígado, embora indiquem que esse(s) sistema(s) parece(m) possuir algumas

características que o(s) distingue(m) quer do *uptake*₁, quer do *uptake*₂ (Lightman e Hems 1973; Steinberg *et al.* 1988; Acevedo *et al.* 1990).

No presente trabalho, procedeu-se ao estudo da captação e metabolização de catecolaminas pelo fígado de Rato, o qual foi abordado utilizando três tipos de modelos experimentais: incubação de fatias de fígado, incubação de hepatócitos isolados e perfusão de fígado.

Na maioria das experiências utilizou-se suspensões de hepatócitos isolados. A técnica de preparação de suspensões de hepatócitos isolados pelo método de perfusão do fígado com collagenase foi originalmente descrita por Howard e Pesch (1968) e posteriormente melhorada por Berry e Friend (1969) e por Seglen (1976). Esta técnica revelou-se bastante superior a todas as outras técnicas previamente utilizadas na preparação de hepatócitos isolados, pois origina suspensões com grande percentagem de células viáveis, morfológica (Howard *et al.* 1967; Berry e Friend 1969; Phillips *et al.* 1974; Wanson *et al.* 1979) bioquímica e funcionalmente (revisões por Seglen 1976, Klaassen e Stacey 1982), semelhantes às células *in vivo*. Os hepatócitos isolados em suspensão têm sido intensamente utilizados em estudos de fisiologia hepática e de toxicologia, como por exemplo, na caracterização da captação hepática de um grande número de compostos orgânicos, entre os quais se pode referir: a ubaína (Eaton e Klaassen 1978a), os ácidos biliares (Schwarz *et al.* 1975; Anwer *et al.* 1976; Iga e Klaassen 1982), os aminoácidos (LeCam e Freychet 1977; Joseph *et al.* 1978), a bilirrubina (Iga *et al.* 1979), e certos catiões orgânicos (Meijer *et al.* 1970; Eaton e Klaassen 1978b; Mol *et al.* 1988; Meijer *et al.* 1990).

A larga utilização dos hepatócitos isolados em suspensão em estudos de fisiologia e farmacologia hepática deve-se ao facto de este modelo apresentar, relativamente ao modelo *in vivo*, às fatias de fígado e ao fígado perfundido, muitas vantagens. Podemos salientar, por exemplo, (1) o facto de variáveis hemodinâmicas, factores neuro-humorais, diferentes tipos de células e vários compartimentos de distribuição do substrato, presentes nos modelos acima referidos, estarem essencialmente ausentes quando se utiliza hepatócitos isolados (o que facilita o cálculo de constantes cinéticas); (2) a existência de barreiras à difusão do substrato no tecido produz uma distribuição irregular do mesmo no espaço extracelular nos modelos acima referidos, o que não acontece quando se usa células isoladas; (3) a alta produtividade do processo de preparação das células isoladas permite obter (em experiências emparelhadas) uma quantidade de informação superior à que se obtém com os outros modelos experimentais referidos; (4) é possível variar a composição do meio extracelular de uma forma perfeitamente controlada. No entanto, existem também desvantagens quando se utiliza hepatócitos

isolados: por exemplo: (1) os hepatócitos isolados têm um período muito limitado de viabilidade, o que restringe o uso da suspensão celular a apenas algumas horas após a sua preparação, sendo necessário assegurar que a viabilidade da suspensão se mantém alta e constante ao longo de todo o período experimental; (2) a destruição da estrutura lobular provoca a destruição do microambiente em que os hepatócitos se encontram *in vivo* (ou seja, a presença de sangue no pólo sinusoidal das células e a presença de bile no pólo canalicular) e a perda da polaridade das células; (3) existe a possibilidade de uma população completamente homogênea de células não ser obtida durante o processo de isolamento (Klaassen e Stacey 1982), e que existam diferenças nas características das duas subpopulações de hepatócitos, tal como foi demonstrado relativamente à capacidade de captação de aminoácidos (Burger *et al.* 1989). Por último, reconhece-se que as células isoladas em suspensão possuem algumas diferenças em relação às células *in vivo*. Nomeadamente, algumas características da membrana celular estão modificadas (Solyom *et al.* 1972; Bonney 1974), e há alteração na capacidade de captação (Blom *et al.* 1982) e de metabolização (Thurman e Kaufmann 1980) de diversas substâncias nestas células.

Pelas razões referidas acima, julgou-se necessário realizar experiências não só com hepatócitos isolados, mas também com outros modelos experimentais de fígado. A comparação dos resultados obtidos utilizando os vários modelos e o interrelacionamento desses mesmos resultados permite uma visão mais integrada e um melhor entendimento do assunto em estudo.

Assim, realizou-se também experiências em fígado isolado perfundido, e em fatias de fígado *in vitro*. O modelo de fígado perfundido oferece algumas vantagens em relação às experiências *in vivo*: o fluxo de perfusão e a produção biliar podem ser estandardizados, não existe distribuição extrahepática de substrato, há menos interações com substratos endógenos e é possível obter um grande número de amostras de efluente venoso. Por último, a composição do líquido de perfusão pode ser manipulada facilmente (Blom *et al.* 1982). A incubação de fatias de fígado, pelo contrário, apresenta uma série de desvantagens que tornam este modelo pouco adequado, e que têm originado a sua cada vez menor utilização em experimentação (Klaassen e Stacey 1982). Como características desvantajosas deste modelo pode citar-se a existência de barreiras à difusão dos substratos, que origina uma distribuição irregular dos mesmos no tecido (e.g. Tredelenburg 1988), a presença de células destruídas na periferia do tecido e a deficiente oxigenação das células localizadas mais profundamente no tecido (Johnson *et al.* 1972). Por estes motivos, e também pelo facto de os hepatócitos isolados em suspensão ou os hepatócitos em cultura serem reconhecidamente modelos bastante satisfatórios e fáceis de obter, a

utilização das fatias de fígado tem sido substituída e é actualmente pouco utilizada. Neste estudo, a execução de experiências em fatias de fígado *in vitro* foi limitada, e os resultados obtidos com este modelo foram sempre comparados com os resultados encontrados com hepatócitos isolados ou fígado perfundido.

Verificou-se que as suspensões de hepatócitos isolados incubados com catecolaminas- ^3H captaram uma quantidade apreciável de amins- ^3H , que foram quase totalmente metabolizadas (96-98%). Para igual concentração de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H , os hepatócitos removeram e metabolizaram uma quantidade semelhante das duas amins- ^3H . No entanto, o padrão de metabolização da adrenalina- ^3H e da noradrenalina- ^3H foi substancialmente diferente. Embora os metabólitos da fracção OMDA- ^3H tenham sido, para as duas amins- ^3H , os mais abundantes (correspondendo a 63% e 56% do total de metabolização, respectivamente), o restante padrão de metabolização das duas amins- ^3H foi diferente. Nomeadamente, para a adrenalina- ^3H , a MN- ^3H foi o segundo metabólito mais abundante, enquanto que para a noradrenalina- ^3H , o segundo metabólito mais abundante foi o DOMA- ^3H . Os restantes metabólitos de cada uma das catecolaminas- ^3H foram formados apenas em quantidades vestigiais. Pode assim concluir-se que, nos hepatócitos, a adrenalina- ^3H é preferencialmente O-metilada, e que a noradrenalina- ^3H é preferencialmente desaminada, ou que, por outras palavras, a COMT desempenha um papel primordial na metabolização da adrenalina- ^3H , enquanto que para a metabolização da noradrenalina- ^3H , a MAO desempenha um papel mais importante. Este diferente padrão de metabolização das duas catecolaminas está de acordo com o facto de a COMT possuir uma maior afinidade para a adrenalina do que para a noradrenalina, e de, para a MAO, ocorrer o inverso (Grohmann 1987), podendo-se ainda acrescentar que na veia safena de Cão também foi observada uma diferença semelhante no padrão de metabolização destas duas amins- ^3H (Paiva e Guimarães 1978).

A comparação das quantidades de adrenalina- ^3H ou noradrenalina- ^3H removidas pelos hepatócitos em suspensão com as removidas por outras estruturas mostra que os hepatócitos em suspensão constituem um dos sistemas mais eficazes na remoção de catecolaminas até agora descritos. Na realidade, após ajustamento dos resultados obtidos em diversas estruturas (em relação à concentração de amina- ^3H usada, ao tempo de incubação com a amina- ^3H , à contribuição das células, nos tecidos, para o peso total da estrutura ($\pm 50\%$)), verificou-se que os hepatócitos isolados de Rato removem 2 e 4 vezes mais adrenalina- ^3H que a veia safena de Cão e a veia safena humana, respectivamente (Paiva e Guimarães 1978; Araújo *et al.* 1994) e 2 a 5 vezes mais noradrenalina- ^3H que o coração de Rato (Fiebig e Trendelenburg 1978), a veia safena de Cão (Paiva e Guimarães 1978), a artéria

uterina humana (Branco *et al.* 1992a), a veia safena humana (Branco *et al.* 1992b) e a artéria aorta de Coelho (Levin 1974; Henseling *et al.* 1978). É necessário referir que obviamente apenas considerámos, para comparação com os nossos resultados, os resultados obtidos em condições de inibição da captação neuronal e/ou desnervação simpática.

As fatias de fígado de Rato também removeram e metabolizaram grandes quantidades de noradrenalina- ^3H . A fracção de noradrenalina- ^3H captada que foi metabolizada, bem como o padrão de metabolização da amina- ^3H , foram bastante semelhantes ao verificado com os hepatócitos isolados. Assim, as fatias de fígado metabolizaram uma grande percentagem da noradrenalina- ^3H captada (91%), e os metabólitos mais abundantes foram os metabólitos da fracção OMDA- ^3H e o DOMA- ^3H . No entanto, as fatias de fígado removeram quantitativamente menos noradrenalina- ^3H que os hepatócitos isolados (cerca de 15 vezes menos). Vários factores contribuíram muito provavelmente para a menor capacidade das fatias para remover a catecolamina do meio de incubação, comparativamente aos hepatócitos isolados (ver acima). A existência de dificuldades de difusão da noradrenalina- ^3H no tecido foi evidenciada pela lentidão com que o sorbitol- ^3H do meio de incubação equilibrava com o tecido.

É interessante referir que o padrão de metabolização da noradrenalina- ^3H pelos hepatócitos de Rato (e pelas fatias de fígado) e por vasos humanos é bastante semelhante (artéria uterina: Branco *et al.* 1992a; veia safena: Branco *et al.* 1992b; artéria umbilical: Ferreira-de-Almeida *et al.* 1994), o mesmo acontecendo relativamente à adrenalina- ^3H (veia safena: Araújo *et al.* 1994).

A observação de que a adrenalina- ^3H e a noradrenalina- ^3H captadas pelas células hepáticas foram quase totalmente metabolizadas faz supor por si só que, nestas células, as enzimas metabolizadoras de catecolaminas são bastante activas. Esta suposição foi confirmada com o cálculo da actividade das enzimas MAO e COMT em hepatócitos isolados (k_{MAO} foi $2,27 \pm 0,14 \text{ minuto}^{-1}$ e k_{COMT} foi $0,70 \pm 0,15 \text{ minuto}^{-1}$). Quando comparados com outras estruturas do Rato, os valores de k_{MAO} e k_{COMT} dos hepatócitos confirmaram a grande capacidade de metabolização de catecolaminas que o fígado de Rato possui. De facto, a k_{COMT} dos hepatócitos isolados é 2 a 3 vezes superior à k_{COMT} do pulmão perfundido (Bryan-Lluka e O'Donnell 1992) e do coração perfundido (Grohmann 1987), respectivamente, e a k_{MAO} é 20 vezes superior à k_{MAO} do coração perfundido (Grohmann 1987).

A análise das curvas de variação temporal de captação e metabolização de adrenalina- ^3H e noradrenalina- ^3H pelos hepatócitos fornece algumas informações interessantes. Para a adrenalina- ^3H , a formação dos metabólitos mais abundantes (o

OMDA-³H e a MN-³H) aumentou durante todo o período de incubação, e a formação dos metabólitos menos abundantes (o DOPEG-³H e o DOMA-³H), não se alterou significativamente a partir dos 5 minutos de incubação. Isto sugere que os metabólitos desaminados (o DOPEG-³H e o DOMA-³H) são subsequentemente O-metilados de um modo bastante eficaz. Para a noradrenalina-³H, os metabólitos mais abundantes (o OMDA-³H e o DOMA-³H) aumentaram durante todo o período de incubação, e os metabólitos menos abundantes (a NMN-³H e o DOPEG-³H) mantiveram-se constantes a partir dos 5 minutos de incubação. Isto sugere que, após se formarem, a NMN-³H é subsequentemente desaminada e o DOPEG-³H é subsequentemente O-metilado, ambos de uma forma muito eficiente. Em concordância com esta hipótese estão as experiências de incubação com noradrenalina-³H realizadas na presença de inibidores enzimáticos. De facto, a inibição da MAO com pargilina provocou um aumento na formação de NMN-³H, e a inibição da COMT com Ro 01-2812 produziu um aumento na formação de DOPEG-³H. O mesmo fenómeno foi observado em experiências semelhantes realizadas com fatias de fígado, utilizando como inibidor da MAO a pargilina, e como inibidores da COMT o Ro 01-2812 ou o U-0521. Em relação às experiências em que se estudou o efeito da inibição da MAO e da COMT, é importante referir que os resultados obtidos com os hepatócitos isolados e com as fatias de fígado foram, de um modo geral, sobreponíveis. Existem apenas dois pontos que se julga importante comentar: em primeiro lugar, o efeito global da inibição simultânea da MAO e da COMT sobre a metabolização da noradrenalina-³H (tanto em hepatócitos isolados como em fatias de fígado) foi o de uma redução acentuada, em alguns casos mesmo uma abolição, na formação de todos os metabólitos-³H. Este efeito corresponde, logicamente, ao somatório dos efeitos inibitórios de cada um dos inibidores sobre os diferentes metabólitos. No entanto, em experiências com fatias de fígado, a inibição da MAO e da COMT (com pargilina e Ro 01-2812 ou com pargilina e U-0521) produziu um aumento na formação de NMN-³H, relativamente ao controlo. Esta observação, para além de completamente distinta do verificado relativamente a todos os outros metabólitos-³H neste modelo experimental e em relação a todos os metabólitos-³H no modelo dos hepatócitos isolados, está em desacordo com o que seria teoricamente esperado (ver acima). De momento, não temos explicação para este resultado. Em segundo lugar, a combinação de pargilina e U-0521 produziu um aumento significativo no conteúdo em noradrenalina-³H (nas fatias de fígado), o que não aconteceu quando se utilizou a combinação de pargilina e Ro 01-2812 (tanto em fatias de fígado como em hepatócitos isolados). Existem, em princípio, duas explicações possíveis para esta observação: ou o composto Ro 01-2812 possui, para além de efeitos inibitórios

sobre a COMT, efeitos inibitórios sobre a captação de noradrenalina pelas células, ou o composto U-0521 possui, para além de efeito inibitório sobre a COMT, um efeito inibitório sobre a saída de noradrenalina- ^3H das células. Não possuímos, de momento, bases para explicar a diferença de efeito do Ro 01-2812 e o U-0521 sobre o conteúdo de noradrenalina- ^3H nas fatias de fígado.

O conteúdo dos hepatócitos isolados em catecolaminas- ^3H intactas manteve-se relativamente constante a partir dos 5 minutos de incubação, e a concentração de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H nos hepatócitos foi apenas de 1,2 e 1,0 vezes a concentração da amina- ^3H no meio de incubação, respectivamente. Isto significa que não houve acumulação das catecolaminas- ^3H nas células. A inibição simultânea da MAO e da COMT, que causou uma redução muito acentuada da formação de todos os metabólitos- ^3H , não produziu alterações no conteúdo das células em catecolaminas- ^3H , e a razão células:meio para as duas aminas- ^3H manteve-se aproximadamente 1. A inexistência de acumulação de noradrenalina- ^3H nas células, mesmo após inibição da MAO e da COMT, foi também observada nas experiências com fatias de fígado, excluindo pois a possibilidade de que a falta de acumulação das catecolaminas- ^3H nos hepatócitos se deva a uma danificação da membrana celular produzida durante o processo de preparação das células isoladas. A inexistência de acumulação de catecolaminas no fígado de Rato, mesmo após inibição da MAO e da COMT, foi também referida por Lightman e Hems (1973), utilizando adrenalina- ^3H e o modelo do fígado perfundido. Mais recentemente, Acevedo e colaboradores (1990) referiram um conjunto de resultados em desacordo com os de Lightman e Hems (1973) e com os nossos. Estes autores mostraram que os hepatócitos isolados acumularam noradrenalina- ^3H linearmente até aos 15 minutos de incubação, existindo ao fim desse tempo uma razão células:meio de 8 para a amina- ^3H , e que a inibição da MAO e da COMT induziu um aumento de 42% no conteúdo das células em noradrenalina- ^3H . Não temos presentemente explicação para a discrepância entre os nossos resultados e os resultados referidos por Acevedo e colaboradores (1990). No entanto, a ausência de informação acerca da metabolização da noradrenalina- ^3H no referido trabalho dificulta a comparação com os nossos resultados.

A incapacidade dos hepatócitos acumularem catecolaminas intactas, mesmo com inibição da MAO e da COMT, pode dever-se à existência, nestas células, de um sistema de extrusão de catecolaminas muito eficiente. Assim, a aparente "incapacidade" que as células hepáticas têm de acumular catecolaminas pode dever-se à remoção muito activa dessas aminas para fora das células, impedindo desse modo a sua permanência nos hepatócitos. Ainda segundo esta hipótese, esse ou esses sistemas activos de excreção utilizados pelas catecolaminas seriam tão

eficazes, que mesmo em condições de inibição das principais enzimas metabolizadoras dessas aminas (o que induz obviamente um aumento na quantidade de aminas nas células), a quantidade de catecolaminas nas células não seria afectada significativamente. Como os hepatócitos são células responsáveis pela excreção de um grande número de compostos, endógenos e xenobióticos (revisão por Klaassen e Watkins 1984), é possível que as catecolaminas utilizem um ou mais sistemas responsáveis por essa excreção (ver adiante).

No sentido de aprofundar o conhecimento relativamente à captação e posterior destino das catecolaminas no fígado de Rato, realizou-se experiências de perfusão de fígado com noradrenalina- ^3H , estudando a captação de noradrenalina- ^3H no fígado perfundido e o seu posterior destino: conteúdo do fígado em amina- ^3H , metabolização da amina- ^3H e excreção biliar da amina- ^3H e/ou metabólitos- ^3H . Verificou-se que o fígado perfundido com noradrenalina- ^3H captou uma quantidade apreciável desta amina- ^3H , o que vem ao encontro dos resultados obtidos usando os modelos experimentais anteriormente referidos, e demonstra mais uma vez a grande capacidade que o fígado possui para remover catecolaminas da circulação. De facto, aproximadamente 25% da noradrenalina- ^3H infundida na veia porta foi removida pelo fígado durante uma única passagem por este órgão, tendo a velocidade de remoção da amina- ^3H pelo fígado atingido o equilíbrio muito rapidamente (ao fim de 5 minutos de perfusão). Este resultado é bastante similar ao verificado por Steinberg e colaboradores (1988), que relataram que 35% da noradrenalina- ^3H infundida na veia porta era removida pelo fígado de Rato numa só passagem, tendo a remoção de noradrenalina- ^3H pelo fígado atingido o equilíbrio ao fim de 5 minutos de perfusão. A comparação da captação de noradrenalina- ^3H pelo fígado perfundido com a captação por fatias de fígado ou hepatócitos isolados (ajustando os resultados de modo a igualar a concentração de amina- ^3H e o tempo de incubação ou perfusão) indica que o fígado perfundido captou aproximadamente duas vezes mais noradrenalina- ^3H que as fatias de fígado incubadas, mas captou aproximadamente 7 vezes menos noradrenalina- ^3H que os hepatócitos isolados.

Um ponto importante relativamente a estas experiências é a possibilidade de quantificar a excreção de noradrenalina- ^3H e/ou seus metabólitos- ^3H para a bile, informação essa que não era possível obter com qualquer dos modelos anteriormente utilizados. Esta informação revelava-se tanto mais importante quanto os resultados preliminares obtidos com os hepatócitos e com as fatias de fígado haviam levado à hipótese de que as catecolaminas pudessem ser excretadas activamente das células do parênquima hepático por um ou mais sistemas de transporte, impedindo desse modo a sua acumulação no interior das células. A

quantificação da excreção biliar da noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H mostrou que a quantidade de noradrenalina- ^3H e de metabólitos- ^3H que foram excretados para a bile foi muito reduzida, não excedendo 1% do total de amina- ^3H removida pelo fígado. Embora a quantidade de noradrenalina- ^3H e metabólitos- ^3H excretados para a bile (em relação ao total removido pelo fígado) não fosse muito diferente da percentagem referida por Steinberg e colaboradores (1988) (4,4%) num estudo muito semelhante ao nosso, esse valor foi significativamente mais baixo do que as quantidades de metabólitos da noradrenalina- ^3H (Zimon *et al.* 1967) ou da adrenalina- ^3H (Hertting e LaBrosse 1962) excretados para a bile após injeção intraportal rápida da amina- ^3H na veia porta, que corresponderam a cerca de 30% do total de amina- ^3H infundida. A diferença entre os nossos resultados (e os de Steinberg *et al.* (1988)) e os resultados referidos por Hertting e LaBrosse (1962) e por Zimon e colaboradores (1967) pode dever-se ao facto de nos primeiros dois estudos se ter efectuado perfusão do fígado com uma solução de Krebs-Henseleit, enquanto que nos dois últimos estudos o fígado foi perfundido com sangue. Como a velocidade de secreção da bile é obviamente dependente de um grande número de substâncias existentes em circulação, como por exemplo ácidos biliares (O'Maille e Richards 1977; Fischer *et al.* 1980), gastrina e histamina (Zaterka e Grossman 1966), glicagina (Dyck e Janowitz 1971; Barnhart e Combes 1975), e secretina (Nahrwold 1971), é provável que nos nossos estudos e nos de Steinberg e colaboradores (1988) a secreção de bile não se efectuasse em condições óptimas. Em concordância com esta hipótese está o facto de se ter verificado sistematicamente uma diminuição muito acentuada na produção de bile ao longo do período experimental, embora se tenha tentado evitar esse fenómeno pela adição, ao líquido de perfusão, do colerético taurocolato de sódio. É pois de admitir que a perfusão do fígado com uma solução nutritiva com composição não idêntica à do sangue não seja apropriada para o estudo da excreção de catecolaminas e/ou seus metabólitos para a bile. Esse comprometimento evidente da função biliar originou uma certa reserva na interpretação dos resultados referentes à bile, bem como na interpretação de outros resultados obtidos com fígado perfundido (ver adiante).

Do total de noradrenalina- ^3H captada pelo fígado durante os 60 minutos de perfusão, 87% foi metabolizada e apenas 13% permaneceu intacta no órgão. Em relação à metabolização da noradrenalina- ^3H captada, os metabólitos da fracção OMDA- ^3H foram de longe os mais abundantes (73% do total de metabolização), formando-se todos os outros numa quantidade bastante menor (NMN- ^3H : 16%; DOPEG- ^3H : 6%; DOMA- ^3H : 6%). É interessante notar que Steinberg e colaboradores (1988) referiram também que os metabólitos da fracção OMDA- ^3H

foram os mais abundantemente formados durante a perfusão do fígado de Rato com noradrenalina- ^3H .

A comparação do padrão de metabolização da noradrenalina- ^3H em experiências de perfusão e em experiências de incubação (de hepatócitos isolados ou de fatias de fígado) origina uma primeira conclusão: o padrão de metabolização hepática da noradrenalina- ^3H é diferente quando o fígado é perfundido com a amina- ^3H e quando se incubam fatias de fígado ou hepatócitos isolados com a amina- ^3H . A comparação das percentagens que cada metabólito representa em cada um dos tipos de experiência (perfusão e incubação) mostra que a diferença na metabolização de noradrenalina- ^3H entre essas experiências consiste principalmente numa menor formação de DOMA- ^3H e numa maior formação de NMN- ^3H nas experiências de perfusão, comparativamente às experiências de incubação. Esta diferença faz com que nas experiências de perfusão a ordem decrescente de importância dos diferentes metabólitos seja: OMDA- ^3H -NMN- ^3H -DOPEG- ^3H -DOMA- ^3H , enquanto que nas experiências de incubação (de fatias ou de células isoladas) essa ordem é: OMDA- ^3H -DOMA- ^3H -DOPEG- ^3H -NMN- ^3H . Pode discutir-se algumas hipóteses para explicar a diferença no padrão de metabolização da noradrenalina- ^3H pelo fígado nestas diversas situações experimentais:

1) nas experiências de incubação de hepatócitos isolados, a noradrenalina- ^3H encontra-se directamente em contacto com os hepatócitos, e a captação e metabolização da amina- ^3H ocorre exclusivamente nessas células. Nas experiências de incubação de fatias de fígado, a amina- ^3H é também principalmente captada e metabolizada pelos hepatócitos, embora haja possivelmente alguma captação e metabolização por células constituintes do tracto vascular hepático. No entanto, como a amina- ^3H não é infundida através desses vasos e apenas contacta com vasos localizados à periferia da fatia, essa captação deve ser relativamente pouco importante. Pelo contrário, nas experiências de perfusão, a noradrenalina- ^3H percorre todo o sistema vascular que conduz desde a veia porta até aos sinusóides, e depois, o sistema vascular que conduz desde os sinusóides até à veia cava, sistema vascular esse que possui locais de captação e de metabolização de catecolaminas, mais especificamente terminais nervosos simpáticos (Nobin *et al.* 1977; Hartmann e Beckh 1991) e células extraneuronais (tais como células endoteliais e células musculares lisas). A diferença na metabolização da noradrenalina- ^3H nos dois tipos de experiência pode residir no facto de que em experiências de incubação, a noradrenalina- ^3H é captada e metabolizada quase exclusivamente pelos hepatócitos, enquanto que em experiências de perfusão, a amina- ^3H é captada e metabolizada não só por hepatócitos, mas também pelas células constituintes do sistema vascular que a amina- ^3H percorre.

2) nas experiências de incubação de hepatócitos isolados, a noradrenalina- ^3H pode ser captada não só através da membrana sinusoidal, mas também através da membrana canalicular das células, pois os hepatócitos perderam a estrutura lobular e a polaridade. Pelo contrário, nas experiências de perfusão de fígado, apenas a membrana sinusoidal dos hepatócitos está exposta à noradrenalina- ^3H . Esta diferença na acessibilidade da amina- ^3H aos hepatócitos pode também contribuir para a diferença no padrão de metabolização de noradrenalina- ^3H nos dois tipos de experiência.

3) nas experiências de perfusão, a noradrenalina- ^3H e/ou os metabólitos- ^3H que saem dos hepatócitos para o espaço intersticial podem ser facilmente captados e metabolizados por hepatócitos que se encontrem na proximidade, o que não acontece nas experiências de incubação de hepatócitos.

4) existe ainda uma diferença importante entre os dois tipos de experiência: nas experiências de perfusão, a função de excreção biliar está muito provavelmente comprometida, o que certamente afecta a saída da noradrenalina- ^3H e/ou dos seus metabólitos- ^3H pela membrana apical das células, enquanto que nos hepatócitos isolados, as catecolaminas- ^3H e/ou os seus metabólitos- ^3H podem sair facilmente dos hepatócitos para o meio de incubação. É portanto possível que, nas experiências de perfusão, a presença da noradrenalina- ^3H e/ou dos seus metabólitos- ^3H durante mais tempo no interior das células permita uma metabolização adicional ou diferente dos mesmos.

No final da perfusão com noradrenalina- ^3H , a quantidade de noradrenalina- ^3H presente no fígado originou uma razão tecido:meio de 2,6, o que significa que o fígado acumulou noradrenalina- ^3H . Este resultado é semelhante ao verificado por Steinberg e colaboradores (1988). No entanto, está aparentemente em contradição com as observações anteriores obtidas com os hepatócitos isolados e com as fatias de fígado, em que não se verificou acumulação de amina- ^3H . É bastante provável que esta diferença no conteúdo do fígado em noradrenalina- ^3H observada entre os dois tipos de experiência, se deva, tal como a já referida diferença no padrão de metabolização da amina- ^3H , a diferenças inerentes à própria metodologia. Nomeadamente, existem dois factores que muito provavelmente contribuem para a existência de um maior conteúdo em noradrenalina- ^3H no fígado perfundido do que nas células (ou fatias) incubadas:

1) nas experiências de perfusão a noradrenalina- ^3H é captada não só pelos hepatócitos, como também pelos terminais nervosos simpáticos e por células extraneuronais existentes nos vasos que a amina- ^3H percorre (desde a veia porta até à veia cava).

2) a função biliar nos fígados perfundidos encontra-se certamente comprometida, o que dificulta a saída da noradrenalina- ^3H pela membrana apical dos hepatócitos.

As experiências de perfusão de fígado com noradrenalina- ^3H com inibição da MAO e da COMT foram realizadas inibindo a MAO através da administração i.p. de uma dose eficaz de pargilina (Breese e Traylor 1970; Soares-da-Silva e Caramona 1984) e inibindo a COMT com a adição à solução de perfusão de uma concentração de tolcapone ($1\text{ }\mu\text{mol/l}$) que inibe eficazmente esta enzima (K_i de 30 nmol/l ; Zürcher *et al.* 1990).

Nestas condições, verificou-se uma redução muito marcada na formação de todos os metabólitos- ^3H , com a excepção da fracção OMDA- ^3H , que não sofreu alteração na quantidade total formada (embora se verificasse uma redução na quantidade da fracção OMDA- ^3H no efluente venoso). Nas experiências de incubação, pelo contrário, todos os metabólitos- ^3H foram significativamente e profundamente reduzidos com aquele tratamento. A diferença entre o efeito da inibição da MAO e da COMT nas experiências de perfusão e nas experiências de incubação relaciona-se muito provavelmente com a diferença no padrão de metabolização da noradrenalina- ^3H nessas duas condições experimentais.

O fígado possui, para além da MAO e da COMT, sulfotransférases e glicuronosil transférases, enzimas capazes de metabolizar as catecolaminas e os seus metabólitos (revisão por Kopin 1985). Os metabólitos conjugados formados por acção dessas enzimas aparecem, após a separação cromatográfica, juntamente com os metabólitos desaminados e O-metilados (fracção OMDA- ^3H) e com os metabólitos O-metilados (fracção NMN- ^3H) (Steinberg *et al.* 1988). Os nossos resultados podem ser explicados por, quando o fígado é perfundido com noradrenalina- ^3H , se formarem metabólitos conjugados que aparecem na fracção OMDA- ^3H e que são, nestas experiências, percentualmente mais importantes do que nas experiências de incubação. Esta hipótese explica o facto da inibição da MAO e da COMT não alterar significativamente a fracção OMDA- ^3H em experiências de perfusão, enquanto que em experiências de incubação a inibição da MAO e da COMT reduz essa fracção para 20% do controlo. Como, nas experiências de perfusão, a inibição da MAO e da COMT quase aboliu a formação de NMN- ^3H , os metabólitos conjugados não devem contaminar esta fracção. Ainda segundo esta hipótese, a diminuição na formação de metabólitos desaminados e O-metilados após inibição da MAO e a COMT seria compensada por um aumento na formação de metabólitos conjugados, originando um resultado global de não alteração na fracção OMDA- ^3H . É importante referir que a inibição da MAO e da COMT produziu uma redução na fracção OMDA- ^3H no efluente venoso mas uma

tendência para um aumento dessa fracção no fígado, sendo portanto de admitir que os metabólitos O-metilados e desaminados se encontram principalmente no efluente venoso, enquanto que os metabólitos conjugados se encontram principalmente no fígado, o que apoia a hipótese de a função biliar estar comprometida neste modelo, pois sabe-se que na bile aparecem principalmente metabólitos conjugados das catecolaminas (Hertting e LaBrosse 1962, Zimon *et al.* 1967).

Nas experiências de perfusão, a inibição da MAO e da COMT não aumentou significativamente o conteúdo do fígado em noradrenalina- ^3H , um resultado que corrobora os resultados obtidos em experiências de incubação de fatias de fígado e de hepatócitos. Por último, a inibição das duas enzimas também não alterou significativamente o conteúdo em noradrenalina- ^3H e seus metabólitos- ^3H na bile, mas como a radioactividade na bile contribuiu minimamente para a remoção total de noradrenalina- ^3H e como quase certamente a excreção biliar está comprometida neste modelo, não se deu grande relevância a estes resultados.

Após ter sido caracterizada a captação e metabolização de noradrenalina- ^3H e de adrenalina- ^3H no fígado, utilizando para o efeito 3 preparações diferentes, realizou-se experiências com o objectivo de caracterizar qual ou quais os sistemas de transporte membranas responsáveis pela captação hepática de catecolaminas. Estas experiências foram também executadas nos 3 tipos de preparações referidos.

Numa primeira fase, estudou-se o efeito de inibidores do *uptake*₁ e do *uptake*₂, utilizando a desipramina e a corticosterona, respectivamente. Em experiências realizadas com hepatócitos isolados, verificou-se que tanto a desipramina (1 $\mu\text{mol/l}$) como a corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) reduziram parcialmente a formação de MN- ^3H ou NMN- ^3H e de OMDA- ^3H quando as células foram incubadas com adrenalina- ^3H ou noradrenalina- ^3H , respectivamente. O efeito dos dois inibidores foi não só qualitativa mas também quantitativamente semelhante. Em experiências realizadas com fatias de fígado incubadas com noradrenalina- ^3H , a desipramina (10 $\mu\text{mol/l}$) e a corticosterona (120 $\mu\text{mol/l}$) tiveram também efeitos inibitórios parciais em relação à formação de NMN- ^3H e de OMDA- ^3H , e os efeitos dos dois inibidores foram também quantitativamente semelhantes. Nesta preparação, a desipramina produziu ainda uma abolição no conteúdo em noradrenalina- ^3H do tecido, muito provavelmente por um efeito nos terminais nervosos simpáticos. Em concordância com os nossos resultados, Lightman e Hems (1973) e Steinberg e colaboradores (1988) descreveram, em fígado de Rato perfundido, efeitos inibitórios parciais da corticosterona relativamente à metabolização de, respectivamente, adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H .

No entanto, em experiências de perfusão do fígado com noradrenalina- ^3H , a corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) não teve qualquer efeito na captação, conteúdo,

metabolização e excreção da amina- ^3H , com a excepção de uma redução na quantidade de DOMA- ^3H presente no efluente venoso. Este resultado está em contradição com o verificado nas experiências de incubação (de fatias de fígado ou de hepatócitos isolados) e está também em contradição com os resultados de Lightman e Hems (1973) e de Steinberg e colaboradores (1988). Não possuímos explicação para a diferença de efeitos da corticosterona sobre a captação e metabolização de noradrenalina- ^3H em experiências de perfusão e em experiências de incubação. A ausência de efeito da corticosterona no primeiro tipo de experiências pode estar relacionada com o facto de que neste modelo as células não se encontram em condições fisiológicas, pois a função de excreção biliar está certamente comprometida, ou pode dever-se ao facto de se ter utilizado uma concentração de corticosterona insuficiente para induzir uma resposta.

No seu conjunto, esta primeira abordagem ao problema da caracterização da captação hepática de catecolaminas mostrou que, nas fatias de fígado, 21% da captação de noradrenalina- ^3H foi sensível à desipramina e 21% foi sensível à corticosterona, e que nos hepatócitos isolados 44% da captação de adrenalina- ^3H foi sensível à desipramina e 29% foi sensível à corticosterona, 8% da captação de noradrenalina- ^3H foi sensível à desipramina e 18% foi sensível à corticosterona, tendo a combinação de desipramina e corticosterona reduzido a captação de noradrenalina- ^3H em 40%. Estes resultados sugerem que tanto o *uptake*₁ como o *uptake*₂ estão presentes e funcionantes na membrana dos hepatócitos, embora a maior fracção (cerca de 60%) da captação de noradrenalina- ^3H por estas células não possa ser atribuída nem ao *uptake*₁ nem ao *uptake*₂. A grande capacidade de remoção de catecolaminas pelo fígado sugere que os hepatócitos possuem, para além do *uptake*₁ e do *uptake*₂, outro sistema de captação de catecolaminas bastante activo.

No sentido de aprofundar os conhecimentos relativamente ao(s) sistema(s) de transporte responsável(eis) pela captação hepática de catecolaminas, realizou-se uma série de experiências em que se testou o efeito de inibidores de vários sistemas de transporte de compostos orgânicos e ainda o efeito da ausência de sódio no meio de incubação e da despolarização da membrana celular, no conteúdo de hepatócitos isolados em adrenalina- ^3H e em noradrenalina- ^3H . Nestas experiências, o conteúdo das células em amina- ^3H foi calculado em condições de inibição das principais enzimas metabolizadoras, a MAO e a COMT, pois o conteúdo em amina- ^3H não-metabolizada depende da taxa de metabolização da amina- ^3H nas células. Foi previamente demonstrado, neste modelo experimental, que a inibição simultânea da MAO e da COMT com pargilina (500 $\mu\text{mol/l}$) e Ro 01-2812 (2 $\mu\text{mol/l}$), respectivamente, reduz de uma forma muito marcada a metabolização de

noradrenalina- ^3H pelos hepatócitos. Por isso, nestas experiências, considerou-se a radioactividade total presente nas células como catecolamina- ^3H não metabolizada.

Os hepatócitos incubados com noradrenalina- ^3H ou com adrenalina- ^3H removeram uma quantidade de amina- ^3H que originou, em condições de equilíbrio, uma razão células:meio de 0,6-0,7 ml/g, o que significa que não houve acumulação de aminas- ^3H (resultado em concordância com resultados anteriores; ver acima).

Estas experiências demonstraram, em primeiro lugar, que a captação de catecolaminas pelos hepatócitos possui características que a distinguem dos sistemas de captação de catecolaminas clássicos, o *uptake*₁ e o *uptake*₂, podendo os resultados ser resumidos nos seguintes pontos:

1) a captação de catecolaminas- ^3H pelos hepatócitos é dependente do sódio, pois a substituição do sódio do meio de incubação por lítio ou por colina praticamente aboliu as catecolaminas- ^3H nas células. É bem conhecida a dependência do *uptake*₁ em relação ao sódio extracelular (Bogdanski e Brodie 1966; Iversen e Kravitz 1966; Bönisch *et al.* 1984; revisão por Graefe e Bönisch 1988), contrariamente ao *uptake*₂, que é insensível a alterações extracelulares deste íon (Bönisch *et al.* 1985). No entanto, o inibidor do *uptake*₁ desipramina, numa concentração que inibe o *uptake*₁ completamente (1 $\mu\text{mol/l}$; Horn *et al.* 1971, Koe 1976), não afectou o conteúdo em adrenalina- ^3H ou em noradrenalina- ^3H nos hepatócitos. O efeito da ausência de sódio no meio, porque se mostrou bastante marcado, foi ainda investigado em experiências de incubação de hepatócitos em que a MAO e COMT estavam funcionantes. Estas experiências mostraram que a ausência de sódio no meio de incubação reduziu quase totalmente o conteúdo em noradrenalina- ^3H e a sua metabolização nas células e que, em condições de ausência de sódio no meio, a corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) não mostrou qualquer efeito inibitório. Ou seja, parece que a ausência de sódio do meio de incubação limita o acesso da amina- ^3H ao interior das células e, consequentemente, reduz o conteúdo das células em amina- ^3H e/ou a sua metabolização. A inexistência de efeito da corticosterona na ausência de sódio extracelular sugere que o sistema de transporte inibido pela corticosterona é sensível ao sódio.

2) a captação de catecolaminas- ^3H pelos hepatócitos é independente da polarização da membrana celular, pois a despolarização da membrana celular com 50 mmol/l de potássio no meio de incubação não afectou o conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas- ^3H . Pelo contrário, sabe-se que o *uptake*₂ é inibido pelo aumento da concentração de potássio extracelular (Gillespie e Towart 1973; Anning *et al.* 1980; Bryan e O'Donnell 1984; Trendelenburg 1987; Schömig *et al.* 1992) sendo a CI_{50} do potássio extracelular de cerca de 15 mmol/l (Bönisch *et al.* 1985; Ludwig *et al.* 1986), e sabe-se que o *uptake*₁ é também inibido pelo aumento

da concentração extracelular de potássio (Colburn *et al.* 1968; Bogdanski e Brodie 1969; Ungell e Graefe 1987). Por outro lado, a corticosterona ($40 \mu\text{mol/l}$), que é um potente inibidor do *uptake*₂ (Iversen e Salt 1970; Salt 1972), possuindo uma CI_{50} de $0,13 \mu\text{mol/l}$ em células Caki-1 (Schömig e Schönfeld 1990), teve um efeito inibitório modesto sobre o conteúdo em catecolaminas-³H dos hepatócitos, reduzindo em 30% o conteúdo em adrenalina-³H e não reduzindo significativamente o conteúdo em noradrenalina-³H.

Este conjunto de resultados sugere fortemente que a captação de catecolaminas-³H pelos hepatócitos ocorre principalmente através de um sistema que não corresponde nem ao *uptake*₁ nem ao *uptake*₂. Por esse motivo, a caracterização da captação de catecolaminas prosseguiu com o estudo do efeito de inibidores de outros sistemas de transporte de substâncias orgânicas sobre o conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas-³H.

O probenecide, um inibidor do transporte renal de aniões orgânicos, testado numa concentração reconhecida como inibitória ($100 \mu\text{mol/l}$; Kinsella *et al.* 1979), não teve qualquer efeito na captação de catecolaminas-³H pelos hepatócitos.

A cianina 863 ($10 \mu\text{mol/l}$), um potente inibidor do transporte renal de catiões orgânicos (Rennick *et al.* 1956), com uma CI_{50} de $0,11 \mu\text{mol/l}$ em células LLC-PK₁ (Schömig *et al.* 1993), reduziu em 62% o conteúdo dos hepatócitos em adrenalina-³H, sem contudo reduzir significativamente o conteúdo em noradrenalina-³H.

A bilirrubina, o produto da degradação metabólica da hemoglobina, aumentou (em cerca de 50%) o conteúdo em adrenalina-³H e em noradrenalina-³H nos hepatócitos. A bilirrubina é transportada activamente para o fígado e é também activamente excretada para a bile, utilizando um transportador hepático de aniões orgânicos (ver p. ex. Fevery e Blanckaert 1991).

É importante referir que todas estas experiências foram realizadas utilizando um tempo de incubação dos hepatócitos com a amina-³H de 15 minutos. Como a curva de variação temporal do conteúdo em noradrenalina-³H nas células mostrou que ao fim de 15 minutos de incubação o conteúdo em amina-³H tinha atingido o equilíbrio, com este tempo de incubação mediu-se o conteúdo em amina-³H no equilíbrio e não a velocidade inicial de captação da amina-³H. As velocidades iniciais de captação reflectem somente o transporte da amina-³H para os hepatócitos, enquanto que o conteúdo em amina-³H no equilíbrio é determinado pelo transporte da amina-³H para os hepatócitos e pelo transporte da amina-³H para fora dos hepatócitos. Por esta razão, os efeitos dos inibidores têm que ser interpretados do seguinte modo: uma redução no conteúdo em amina-³H nos hepatócitos pode dever-se a uma diminuição na entrada da amina-³H para as células

e/ou a um aumento na sua saída das células, e um aumento no conteúdo em amina-³H nos hepatócitos pode resultar de um aumento na entrada de amina-³H para as células e/ou de uma diminuição na sua saída das células.

Recentemente, Schömig e Schönfeld (1990) descreveram uma semelhança entre o *uptake*₂ e o sistema de transporte renal de catiões orgânicos (TRCO). Essa semelhança foi posteriormente reforçada pela comparação das características farmacológicas desses dois sistemas (Babin-Ebell *et al.* 1991, Russ *et al.* 1992, Schömig *et al.* 1993). Babin-Ebell e colaboradores (1991) mostraram que os corticosteróides inibem não só o *uptake*₂, mas também o TRCO, tendo a corticosterona uma potência inibitória semelhante em relação aos dois sistemas (0,13-0,24 μ mol/l, respectivamente), e Russ e colaboradores (1992) mostraram que inibidores do TRCO inibem também o *uptake*₂, sendo a potência inibitória da cianina 863 semelhante para os dois sistemas (0,11-0,16 μ mol/l, respectivamente). Nas nossas experiências, tanto a corticosterona como a cianina 863 reduziram o conteúdo dos hepatócitos em adrenalina-³H com uma potência muito menor do que a potência inibitória que possuem em relação ao *uptake*₂ e ao TRCO, facto que suporta a conclusão de que nem o *uptake*₂ nem o TRCO são responsáveis pela maior parte da captação hepática de catecolaminas-³H.

A diferença no efeito da corticosterona e da cianina 863 em relação ao conteúdo de noradrenalina-³H e de adrenalina-³H (ambas as substâncias reduziram parcialmente o conteúdo em adrenalina-³H mas não tiveram efeito inibitório significativo em relação ao conteúdo em noradrenalina-³H) pode ser devida à diferença nas concentrações das duas aminas-³H utilizadas (50 nmol/l de adrenalina-³H e 200 nmol/l de noradrenalina-³H), pois o K_m do sistema de transporte das aminas para e dos hepatócitos não é conhecido, ou pode dever-se ao facto das experiências com noradrenalina-³H terem apresentado maior variabilidade do que as experiências com adrenalina-³H, podendo essa variabilidade ter impedido que a corticosterona e a cianina 863 produzissem reduções significativas nas primeiras (de facto, as percentagens de redução produzidas pela corticosterona ou pela cianina 863 relativamente ao conteúdo em noradrenalina-³H e em adrenalina-³H nas células não foram significativamente diferentes; teste t de Student para valores independentes).

O aumento do conteúdo dos hepatócitos em catecolaminas-³H na presença de bilirrubina sugere que esta substância inibe muito provavelmente a saída das catecolaminas dos hepatócitos. Mostrou-se que os hepatócitos não acumulam catecolaminas, mesmo após inibição da MAO e da COMT, e sugeriu-se que essa incapacidade dos hepatócitos em acumularem catecolaminas se podia dever à existência de um sistema de transporte activo muito eficiente em remover as

catecolaminas das células. Como a bilirrubina é activamente segregada dos hepatócitos para a bile (revisão por Fevery e Blanckaert 1991), é pois possível que a bilirrubina aumente a quantidade de catecolaminas nos hepatócitos porque a bilirrubina e as catecolaminas competem para o mesmo sistema de transporte para fora das células.

Por último, há ainda a referir que os efeitos da desipramina e da corticosterona foram diferentes, quando a MAO e a COMT estavam intactas e quando essas duas enzimas estavam funcionantes. De facto, os efeitos desses dois inibidores sobre a metabolização das aminas-³H foram mais acentuados do que os efeitos sobre o conteúdo das células em aminas-³H (com a metabolização pela MAO e COMT inibida): a desipramina e a corticosterona reduziram parcialmente a metabolização das duas catecolaminas-³H, mas a desipramina não afectou os conteúdos em aminas-³H nas células, e a corticosterona reduziu apenas o conteúdo em adrenalina-³H (MAO e COMT inibidas). Muito provavelmente, esta discrepância deve-se ao facto de que, nos hepatócitos, a quantidade de metabólitos das aminas-³H formados é muito maior do que o conteúdo dos hepatócitos em aminas-³H; este é, mesmo em condições de inibição da MAO e da COMT, muito reduzido (ver acima) o que possivelmente torna os efeitos inibitórios sobre este parâmetro mais dificilmente perceptíveis.

Dos resultados anteriores pode então concluir-se que:

1) o fígado de Rato é um órgão muito eficiente na captação e metabolização de catecolaminas, tal como verificado em experiências de incubação de fatias de fígado, de hepatócitos isolados, e em experiências de perfusão do fígado *in situ*. Nestas últimas experiências, verificou-se que cerca de 25% da noradrenalina-³H infundida na veia porta era removida pelo fígado numa única passagem por este órgão;

2) os hepatócitos isolados revelaram-se bastante adequados em estudos de captação e biotransformação de catecolaminas. A eficiência dos hepatócitos isolados em captar e metabolizar as catecolaminas foi bastante superior à eficiência dos outros sistemas utilizados, o que se deve muito provavelmente ao facto das experiências com os hepatócitos isolados não serem complicadas pela presença de vários tipos de células, de barreiras à difusão do substrato e de factores neurohumorais ou hemodinâmicos. As fatias de fígado e o fígado perfundido revelaram-se menos adequados a estudos de captação de catecolaminas, devido à

existência de dificuldades de difusão do substrato no tecido e de problemas de oxigenação, no primeiro modelo, e ao facto da função biliar estar comprometida, no segundo modelo. Os hepatócitos isolados podem ser mesmo considerados um dos mais activos sistemas conhecidos na captação e metabolização de catecolaminas- ^3H ;

3) nos hepatócitos de Rato, a COMT desempenha um papel fundamental na metabolização de adrenalina e a MAO desempenha um papel fundamental na metabolização da noradrenalina;

4) apesar da remoção e metabolização hepática de catecolaminas ser bastante activa, os hepatócitos e as fatias de fígado não acumularam catecolaminas, mesmo após inibição das enzimas MAO e COMT;

5) a incapacidade dos hepatócitos acumularem catecolaminas deve-se provavelmente à existência de uma extrusão bastante activa dessas aminas através, pelo menos em parte, do transportador da bilirrubina;

6) finalmente, os resultados sugerem que a captação de catecolaminas pelo fígado de Rato ocorre maioritariamente por um sistema de captação distinto dos sistemas de captação de catecolaminas clássicos, o *uptake*₁ e o *uptake*₂, embora estes dois sistemas possam ser responsáveis por uma pequena percentagem da captação, e distinto também do sistema de transporte renal de aniões orgânicos e do sistema de transporte renal de catiões orgânicos. Esta conclusão baseia-se no conhecimento de que a captação hepática de catecolaminas é dependente da presença de sódio no meio extracelular, é independente da polaridade da membrana e é sensível à corticosterona e à cianina 863.

III. CAPTAÇÃO EXTRANEURONIAL DE MPP⁺ EM FÍGADO DE RATO

Os estudos realizados anteriormente, no sentido de caracterizar a captação hepática de catecolaminas, indicaram que esta parece processar-se principalmente através de um sistema de captação com características distintas dos sistemas clássicos de captação de catecolaminas, o *uptake*₁ e o *uptake*₂, (embora esses dois sistemas possam ser responsáveis por uma pequena fracção da captação), e com características também distintas das dos sistemas de captação de catiões orgânicos e de aniões orgânicos existentes no rim. Na tentativa de se caracterizar esse sistema de captação, estudou-se a possibilidade de envolvimento de um sistema hepático de transporte de catiões orgânicos.

O transporte activo de catiões orgânicos é um processo que ocorre em diversos locais do organismo, e que afecta de um modo marcado a distribuição e eliminação destes compostos. Sistemas de transporte de catiões orgânicos encontram-se caracterizados em diversos órgãos: no fígado (Klaassen e Watkins 1984; Meijer *et al.* 1990), no rim (Rennick 1981, Somogyi 1987), no intestino (Miyamoto *et al.* 1988), no plexo coróideu (Schanker 1972) e na placenta (Ganapathy *et al.* 1988).

O fígado é responsável pela eliminação (através de captação com subsequente metabolização e/ou excreção) de um grande número de catiões orgânicos endógenos e xenobióticos. Os catiões orgânicos (existentes na circulação sanguínea) que são captados através da membrana basolateral dos hepatócitos podem sofrer biotransformação enzimática e retornar à circulação sanguínea, com subsequente excreção urinária do(s) metabólito(s) do catião, e/ou podem sofrer biotransformação enzimática seguida de secreção do(s) metabólito(s) para a bile, havendo excreção do(s) metabólito(s) juntamente com as fezes, ou retorno do(s) metabólito(s) para o fígado através da circulação enterohepática (Meijer *et al.* 1990; McKinney e Hosford 1992).

A grande maioria dos catiões orgânicos corresponde a compostos que possuem um ou mais grupos de aminas primárias, secundárias ou terciárias e a compostos quaternários de amónio, que a pH fisiológico se encontram maioritariamente protonados. Como catiões orgânicos relevantes sujeitos a transporte hepatobiliar pode referir-se fármacos comuns como anestésicos locais, aminas psicotrópicas, anticolinérgicos, simpatomiméticos, simpatolíticos, antineoplásicos, antidepressores tricíclicos, antihistamínicos, bloqueadores neuromusculares, procainamida e cimetidina, e substâncias endógenas tais como a

colina, a tiamina e o ribosídeo da nicotinamida (Schanker 1968; Meijer *et al.* 1990).

A existência de transporte activo de catiões orgânicos para o fígado e de excreção biliar activa foi demonstrada há mais de 20 anos (Schanker e Solomon 1963; Solomon e Schanker 1963; Meijer *et al.* 1970; Hwang e Schanker 1973; Hugues *et al.* 1973). Desde essa altura, muito se aprendeu sobre esses processos (revisão por Klaassen e Watkins 1984; Meijer *et al.* 1990). No entanto, a maioria dos mecanismos envolvidos na captação hepática e na secreção biliar de catiões orgânicos permanece pouco conhecida e menos esclarecida do que, por exemplo, os processos responsáveis pelo transporte hepático de aniões orgânicos (Klaassen e Watkins 1984; Meijer *et al.* 1990) ou do que os processos responsáveis pelo transporte renal de catiões orgânicos (Rennick 1981; Somogyi 1987).

As experiências foram realizadas utilizando como substrato o composto 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺). O MPP⁺ é metabólito neurotóxico do 1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridínio (MPTP) e é responsável pela indução, no Homem e em animais de laboratório, do síndrome de parkinsonismo após administração de MPTP (Davis *et al.* 1979; Burns *et al.* 1983; Langston *et al.* 1983; Hallman *et al.* 1984; Heikkilä *et al.* 1984; Mytilineou e Cohen 1984).

Foram várias as razões que nos levaram a utilizar este composto para aprofundamento do estudo da captação hepática de catecolaminas.

Em primeiro lugar, o MPP⁺ e as catecolaminas possuem numerosas semelhanças estruturais e funcionais, entre as quais se pode salientar:

- 1) o MPP⁺ e as catecolaminas são pequenas moléculas orgânicas que a pH fisiológico se comportam como catiões;
- 2) O MPP⁺ e as catecolaminas possuem um grupo amina e um grupo fenílico, e as distâncias entre esses dois grupos é semelhante (0,43 e 0,39 nm, respectivamente;
- 3) o MPP⁺ é activamente transportado para neurónios catecolaminérgicos centrais pelo transportador neuronal de catecolaminas sensível à desipramina, *uptake*₁, (Javitch e Snyder 1984; Javitch *et al.* 1985; Melamed *et al.* 1985; Pileblad e Carlsson 1985; Sundström e Jonsson 1985; Mayer *et al.* 1986), sendo este transporte na realidade responsável pela acumulação selectiva de MPP⁺ nos neurónios catecolaminérgicos centrais, onde induz neurotoxicidade (Chiba *et al.* 1984; Heikkilä *et al.* 1985; Mytilineou *et al.* 1985);
- 4) o MPP⁺ é transportado pelo transportador extraneuronal de catecolaminas sensível à corticosterona, *uptake*₂, em células Caki-1 (Russ *et al.* 1992) e em células gliais em cultura (Staudt *et al.* 1993);

5) o MPP⁺ e as catecolaminas são transportados pelo transportador de catiões orgânicos presente na membrana apical de células tubulares renais (TRCO) (Rennick 1981; Sokol *et al.* 1987; Lazaruk e Wright 1990);

6) o MPP⁺ é captado por células cromafins da medula suprarrenal (Reinhard *et al.* 1987), acumulando-se nos grânulos cromafins, para onde é activamente captado utilizando o transportador vesicular de catecolaminas sensível à reserpina (Daniels e Reinhard 1988).

Em segundo lugar, existem duas desvantagens em utilizar catecolaminas em estudos de captação hepática. Por um lado, a eficiente metabolização destas aminas pela MAO e pela COMT hepáticas (nos hepatócitos o k_{MAO} é 2,27 minuto⁻¹ e o k_{COMT} é 0,7 minuto⁻¹) exige a utilização de inibidores destas enzimas em estudos de captação hepática, de modo a determinar correctamente o conteúdo das células em catecolaminas-³H. O MPP⁺, pelo contrário, não é praticamente metabolizado *in vivo* (Sayre 1989), e por essa razão os estudos sobre a captação de MPP⁺ não são complicados pela necessidade de usar inibidores enzimáticos. Por outro lado, e mais importante ainda, verificou-se que mesmo em condições de inibição da MAO e da COMT, o conteúdo dos hepatócitos em aminas-³H foi muito reduzido, não havendo mesmo acumulação de aminas-³H, o que torna os estudos sobre mecanismos de captação obviamente mais complicados. Havia pois vantagens em utilizar um composto com velocidade inicial de captação para os hepatócitos e factor de acumulação nos hepatócitos superiores aos das catecolaminas. Num estudo sobre a captação de MPP⁺ e de catecolaminas pelo *uptake*₂ em células Caki-1, mostrou-se que o MPP⁺-³H possui uma velocidade inicial de captação para as células e um factor de acumulação nas células 6 e 34 vezes superior, respectivamente, aos da noradrenalina-³H (Russ *et al.* 1992).

Por último, mostrou-se recentemente que o MPP⁺ é captado e acumulado em hepatócitos de Rato, onde induz toxicidade (Di Monte *et al.* 1987; Kass *et al.* 1988; Singh *et al.* 1988; Wu *et al.* 1990), embora se desconheça qual o sistema de transporte responsável por essa captação.

Por este conjunto de razões, resolveu estudar-se a captação de MPP⁺ por culturas de hepatócitos, e por hepatócitos isolados em suspensão. Os estudos pioneiros de Berry e Friend (1969) na preparação de suspensões de hepatócitos isolados, e os de Bissel *et al.* (1973) na preparação de culturas de hepatócitos, demonstraram a fiabilidade do uso de células parenquimatosas isoladas em estudos de fisiologia hepática. Actualmente, os hepatócitos isolados em suspensão e as culturas de hepatócitos são reconhecidos como modelos bastante adequados em estudos de fisiologia e de toxicologia hepática (Orrenius 1978; Greim 1980; Klaassen e Stacey 1982).

As vantagens na utilização de hepatócitos isolados em estudos de fisiologia hepática foram previamente referidas. Quanto à utilização de culturas de hepatócitos, esta apresenta basicamente as mesmas vantagens que o uso de células isoladas em suspensão, com a vantagem adicional de se poder realizar experiências numa população de células definida e facilmente manipulável por períodos de dias (Forte 1984). No entanto, tal como os hepatócitos isolados em suspensão, as células em cultura também possuem algumas características próprias. Na realidade, estudos sobre a ultraestrutura dos hepatócitos em cultura primária mostraram que, após 24 horas em cultura, as células apresentam uma forma poligonal e achatada, e restabelecem a polaridade biliar (Chapman *et al.* 1973; Wanson *et al.* 1977), e foi também demonstrado que, durante a cultura, as células sofrem desdiferenciação, perdendo funções específicas que existem no órgão intacto (Bissel 1976; Gebhardt *et al.* 1978; Jeejeebhoy e Phillips 1976; Wiebel e Singh 1980). Em particular, há modificação da actividade de algumas enzimas e do padrão de metabolização de xenobióticos e de compostos endógenos com o tempo em cultura (Bissel 1976; Fry e Bridges 1976; Junge *et al.* 1976; Guzelian *et al.* 1977; Bissel *et al.* 1978; Gebhardt e Mecke 1979; Wiebel e Singh 1980) e há também alteração nas características de captação de diversos compostos (Galivan 1979; Wolkoff *et al.* 1987).

Pareceu portanto interessante realizar as experiências nestes dois modelos de hepatócitos, de modo a comparar os resultados obtidos nas diferentes situações experimentais.

As experiências de incubação de hepatócitos em cultura com MPP+⁻³H mostraram que as células captaram grandes quantidades deste composto. Por análise da curva de variação temporal do conteúdo das células em MPP+⁻³H verificou-se que uma quantidade de hepatócitos correspondente a 1 mg de proteínas removeu o MPP+⁻³H de 16,1 μ l de meio de incubação por minuto, e que simultaneamente 11,3% do MPP+⁻³H intracelular saiu das células. O factor de acumulação de MPP+⁻³H no equilíbrio (calculado como a razão entre a concentração intracelular de MPP+⁻³H e a concentração extracelular de MPP+⁻³H) foi de 56,4, o que significa que, em situação de equilíbrio, os hepatócitos acumularam o MPP+⁻³H, sendo a concentração de MPP+⁻³H nas células cerca de 56 vezes superior à do meio de incubação. O valor de volume de água dos hepatócitos encontrado ($2,5 \pm 0,5$ μ l/mg de proteína) está completamente de acordo com o valor referido por Iga *et al.* (1979).

A comparação da eficiência da captação de MPP+⁻³H pelos hepatócitos com outros sistemas de transporte celulares fornece algumas indicações interessantes: a eficiência do transporte (k_{in}) de MPP+⁻³H para os hepatócitos é

inferior ao k_{in} do transportador neuronal de catecolaminas ($uptake_1$) em células PC12 (que remove a noradrenalina de 150 μ l de meio de incubação por minuto e por mg de proteína; Schömig *et al.* 1988) e é também inferior ao k_{in} do transportador de L-arginina em células OK (que remove a L-arginina de 130 μ l de meio de incubação por minuto e por mg de proteína; Schwegler *et al.* 1990), mas é semelhante ao k_{in} do transportador extraneuronal de catecolaminas ($uptake_2$) em células Caki-1 (que remove o MPP⁺ de 20,6 μ l de meio de incubação por minuto e por mg de proteína; Russ *et al.* 1992) e é superior ao k_{in} do transportador de glicose em células OK (que remove o α -metil-glicosídeo de 5,9 μ l de meio de incubação por minuto e por mg de proteína; Van den Bosch *et al.* 1989). Por outro lado, a comparação do factor de acumulação de MPP⁺-³H nos hepatócitos com o factor de acumulação de outros compostos orgânicos captados activamente por estas células fornece também algumas informações interessantes: o factor de acumulação do MPP⁺-³H nos hepatócitos foi inferior ao da ubaína (que é de 170; Schwenk *et al.* 1981), ao do taurocolato (que é >200; Schwarz *et al.* 1975) e ao da bilirrubina (que é de 100; Iga *et al.* 1979), mas foi superior ao do etobrometo de procainamida (que é de 18; Eaton e Klaassen 1978b) e ao do vecurónio e do pancurónio (que são de 16 e 0,5, respectivamente; Mol e Meijer 1990).

Em hepatócitos isolados em suspensão foi também determinada a curva de variação temporal do conteúdo de MPP⁺-³H. Verificou-se que uma quantidade de hepatócitos correspondente a 1 mg de proteínas removeu o MPP⁺-³H de 5,0 μ l de meio de incubação por minuto, saindo simultaneamente das células 4,8% do MPP⁺-³H intracelular por minuto. A razão células:meio para o MPP⁺-³H no equilíbrio foi de 21,0 ml/g de células; isto significa que, em situação de equilíbrio, os hepatócitos acumularam o MPP⁺-³H, sendo a concentração de MPP⁺-³H nas células 21 vezes superior à do meio de incubação.

Em comparação com os hepatócitos em cultura, é notória a menor capacidade dos hepatócitos em suspensão de transportar o MPP⁺-³H: a taxa constante de entrada e de saída deste composto foi quantitativamente inferior ao observado nas células em cultura, o que originou uma acumulação de MPP⁺-³H nas células isoladas também inferior à acumulação de MPP⁺-³H nas células em cultura. A explicação para esta diferença pode residir, em parte, na diferença de metodologia utilizada nos dois tipos de experiências. Nomeadamente, existem diferenças no processo de separação das células do meio de incubação (no primeiro caso através de filtragem da suspensão e no segundo caso por simples sucção do meio de incubação), no processo de extracção do MPP⁺-³H das células (no primeiro caso com Triton X-100 e no segundo caso com ácido perclórico), e mesmo diferenças nas condições de incubação das células (no primeiro caso, as

células foram oxigenadas e continuamente agitadas, e no segundo caso não). No entanto, parece que a melhor explicação para as diferenças observadas é a de que, nos dois tipos de modelos hepáticos, as células não possuem características fisiológicas completamente idênticas. De facto, a comparação da captação de diversos substratos por hepatócitos isolados em suspensão e por hepatócitos em cultura indica que, para alguns compostos, existe diferença na captação, enquanto que para outros compostos, essa diferença não se observa (Wolkoff *et al.* 1987; Follmann *et al.* 1990; Kukongviriyapan e Stacey 1989;1990). Por outro lado, o potencial de membrana dos hepatócitos em suspensão (-20 mV; Steen *et al.* 1991) é diferente do potencial de membrana dos hepatócitos em cultura (cerca de -30 mV; Fitz e Scharschmidt 1987). Com base no que foi atrás descrito, não é pois de estranhar que a capacidade de captação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos isolados e pelos hepatócitos em cultura não seja rigorosamente igual.

As características cinéticas da captação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos em cultura foram calculadas com a determinação de velocidades iniciais de captação de $MPP^{+}-^3H$ para hepatócitos incubados com concentrações crescentes de $MPP^{+}-^3H$ (de 2 a 64 $\mu\text{mol/l}$). A análise do componente saturável da captação revelou a existência de apenas um sistema de transporte, com um K_m de 12,6 $\mu\text{mol/l}$ e um V_{max} de 40,1 pmol/(mg de proteína.minuto). A comparação dos parâmetros cinéticos da captação de $MPP^{+}-^3H$ com a captação de outros catiões orgânicos no fígado mostrou que o K_m da captação de $MPP^{+}-^3H$ é semelhante ao K_m da captação do substrato típico do sistema de transporte do tipo I, o etobrometo de procainamida (54 $\mu\text{mol/l}$; Eaton e Klaassen 1978b), do substrato típico do sistema de transporte do tipo II, o vecurónio (15 $\mu\text{mol/l}$; Mol *et al.* 1988), e é também semelhante ao K_m do transporte de N-metilnicotinamida, um catião orgânico quaternário monovalente endógeno (12 $\mu\text{mol/l}$; Moseley *et al.* 1990).

O conhecimento actual relativamente aos mecanismos envolvidos na captação hepática de catiões orgânicos indica que existem pelo menos dois sistemas de captação diferentes, os sistemas do tipo I e do tipo II, distinguidos com base na especificidade em relação a substratos e a inibidores (Meijer *et al.* 1970; Meijer 1971; Mol *et al.* 1986,1988). Para além destes dois sistemas de transporte, o sistema de antiporte catião orgânico:protão, o transporte derivado do potencial de membrana e a endocitose adsorptiva podem também estar envolvidos na captação de catiões orgânicos (Meijer *et al.* 1990).

O sistema de transporte do tipo I transporta catiões orgânicos quaternários monovalentes, como por exemplo o etobrometo de procainamida, o trietilmetilamónio e o tributimetilamónio e transporta também provavelmente catiões orgânicos terciários, é inibido por substratos do sistema de transporte do

tipo II, mas não por glicosídeos cardíacos nem pelo sal biliar taurocolato. O sistema de transporte do tipo II transporta cátions orgânicos quaternários multivalentes com alto peso molecular, como por exemplo os relaxantes musculares vecurônio, hexaflurônio e d-tubocurarina, é fortemente inibido por glicosídeos cardíacos e pelo taurocolato e não é inibido por substratos do sistema de transporte do tipo I (revisão por Meijer *et al.* 1990). Para testar a possibilidade do $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ utilizar um destes sistemas de transporte hepáticos de cátions orgânicos, estudou-se o efeito de um inibidor do sistema de transporte do tipo II (taurocolato, 100 $\mu\text{mol/l}$), e o efeito de um cátion orgânico quaternário monovalente (tetraetilamônio, 100 $\mu\text{mol/l}$), sobre a acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$. Verificou-se que tanto o taurocolato como o tetraetilamônio reduziram a acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nos hepatócitos em cerca de 50%. Quando estes resultados são confrontados com a evidência de que o $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ é captado para os hepatócitos por um único transportador (ver abaixo), eles sugerem que o sistema de transporte do $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ possui características quer do sistema de transporte do tipo I, quer do sistema de transporte do tipo II.

Tal como referido anteriormente, o sistema de captação extraneuronal de catecolaminas (*uptake*₂) e o sistema de TRCO possuem algumas semelhanças nas suas características farmacológicas (Schömig e Schönfeld 1990): os esteróides inibem o *uptake*₂ e o TRCO com uma potência semelhante (Babin-Ebell *et al.* 1991), e o decínio 22, a cianina 863 e a quinina inibem também o *uptake*₂ e o TRCO com uma potência semelhante (Russ *et al.* 1992; Russ *et al.* 1993; Schömig *et al.* 1993).

Como se sabe que o $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ é transportado, tal como as catecolaminas, tanto pelo *uptake*₂ como pelo TRCO (ver acima), pareceu interessante estudar o efeito de inibidores destes dois sistemas de transporte na captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ pelos hepatócitos em cultura.

Todos os inibidores do *uptake*₂ e do TRCO inibiram de uma forma dependente da concentração a acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nos hepatócitos em cultura. O inibidor mais potente foi a cianina 863, seguida do decínio 22 e da quinina (CI_{50} de 97, 230 e 790 nmol/l , respectivamente). Todos os inibidores (com a excepção da corticosterona, que na concentração mais alta testada, 3 $\mu\text{mol/l}$, produziu apenas 18% de redução na acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$) produziram efeitos máximos que corresponderam praticamente a 100% de redução na acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$, ou seja, os inibidores reduziram a acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ quase completamente. Este facto, juntamente com a observação de que as curvas de inibição são monofásicas, indica que o $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ é transportado para os hepatócitos por um único sistema de transporte. Para um desses inibidores, o

decínio 22, foi determinado o seu efeito (utilizando uma concentração 4,4 vezes superior à sua CI_{50}) na curva de variação temporal da acumulação de $MPP^{+}-^3H$ nos hepatócitos, tanto em hepatócitos isolados em suspensão como em hepatócitos em cultura, sendo assim possível determinar o seu efeito sobre a entrada, sobre a acumulação, e sobre a saída de $MPP^{+}-^3H$. Verificou-se que, nas duas preparações, o decínio 22 reduziu significativamente a acumulação de $MPP^{+}-^3H$ nas células, inibindo a entrada e também a saída de $MPP^{+}-^3H$ das células (embora, nos hepatócitos em suspensão, a redução da saída de $MPP^{+}-^3H$ não tenha sido estatisticamente significativa). Isto significa que o decínio 22 inibiu o transporte de $MPP^{+}-^3H$ em ambas os sentidos transmembranares.

No entanto, as CI_{50} dos inibidores em relação à inibição da acumulação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos não se correlacionaram nem com as suas CI_{50} em relação à inibição do *uptake*₂, nem com as suas CI_{50} relativas à inibição do TRCO. Por exemplo, o decínio 22 foi 14 vezes mais potente a inibir o *uptake*₂ (CI_{50} de 16 nmol/l; Russ *et al.* 1993) e 40 vezes mais potente a inibir o TRCO (CI_{50} de 5,6 nmol/l; Schömig *et al.* 1993) do que a inibir o transporte de $MPP^{+}-^3H$ para os hepatócitos. Por sua vez, a corticosterona foi mais potente a inibir o *uptake*₂ (CI_{50} de 130 nmol/l; Schömig e Schönfeld 1990) e a inibir o TRCO (CI_{50} de 240 nmol/l; Babin-Ebell *et al.* 1991) do que a inibir o transporte de $MPP^{+}-^3H$ para os hepatócitos (3 μ mol/l deste composto apenas inibiram o transporte de $MPP^{+}-^3H$ em 18%). Estas diferenças nas potências dos inibidores sugerem que o mecanismo de transporte envolvido na captação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos não é nem o *uptake*₂ nem o TRCO. No entanto, o facto de todos os inibidores do *uptake*₂ e do TRCO testados reduzirem a acumulação de $MPP^{+}-^3H$ sugere também que existe alguma semelhança entre estes três sistemas de transporte.

Os resultados obtidos com o $MPP^{+}-^3H$ são bastante semelhantes aos resultados obtidos com as catecolaminas, no sentido em que tanto a captação hepática de $MPP^{+}-^3H$ como a de catecolaminas parece ocorrer maioritariamente através de um sistema de captação que não é nem o *uptake*₁, nem o *uptake*₂, nem o TRCO.

A captação de $MPP^{+}-^3H$ pelos hepatócitos isolados em suspensão mostrou-se dependente da presença de sódio no meio extracelular, pois a ausência deste ião do meio de incubação aboliu quase completamente a acumulação de $MPP^{+}-^3H$ nas células. Uma vez que se tinha verificado que as captações de noradrenalina-³H e de adrenalina-³H eram também dependentes do sódio extracelular, pode concluir-se que as captações hepáticas de MPP^{+} e de catecolaminas possuem também a característica comum de ambas serem absolutamente dependentes do sódio extracelular.

A hipótese de a captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ e de noradrenalina- ^3H ocorrerem através do mesmo sistema de transporte foi analisada testando o efeito da (-)-noradrenalina na acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ por hepatócitos isolados. Verificou-se que a (-)-noradrenalina (100 e 200 $\mu\text{mol/l}$) não afectou a acumulação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ nos hepatócitos. No entanto, este resultado não invalida a hipótese de que estas duas substâncias utilizem o mesmo transportador para serem captadas pelo fígado, pois as características cinéticas (nomeadamente, o K_m) da captação de noradrenalina- ^3H pelos hepatócitos não são conhecidas, sendo portanto possível que as concentrações de noradrenalina- ^3H utilizadas não saturem o transportador.

Em conclusão, os presentes resultados mostram que:

1) o $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ é transportado muito eficientemente para os hepatócitos de Rato, onde se acumula, utilizando um sistema de captação activo mediado por um transportador (tal como demonstrado em experiências *in vitro* com hepatócitos em cultura e com hepatócitos isolados em suspensão). O transporte do $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ para os hepatócitos em cultura apresentou um K_m de 12,6 $\mu\text{mol/l}$ e um V_{max} de 40,1 pmol/(mg proteína.minuto);

2) o sistema de transporte responsável pela captação de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ possui algumas características em comum com os transportadores hepáticos de catiões orgânicos do tipo I e do tipo II (não se podendo portanto identificar o transportador de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ com nenhum desses dois transportadores), e não parece efectuar-se através de outros transportadores de catiões orgânicos, tais como o TRCO, o transportador neuronal de catecolaminas, *uptake*₁, ou o transportador extraneuronal de catecolaminas, *uptake*₂. Esta conclusão baseou-se no estudo do efeito de uma série de compostos estruturalmente não relacionados e que interferem com diferentes sistemas de captação de compostos orgânicos. O transporte hepático de $\text{MPP}^{+}\text{-}^3\text{H}$ parece pois efectuar-se por um novo tipo de transportador membranar sensível a diversos compostos estruturalmente não relacionados (como por exemplo, compostos derivados da cianina, taurocolato e tetraetilamónio), e dependente da presença de sódio no meio extracelular;

3) a semelhança nas características da captação hepática de MPP^{+} e de catecolaminas sugere que estas substâncias utilizam o mesmo sistema de transporte.

Assim, a observação de que o MPP^+ e as catecolaminas utilizam sistemas de transporte comuns (uptake_1 , uptake_2 , TRCO, transporte vesicular de catecolaminas) é alargada também ao fígado, onde provavelmente estas duas substâncias são captadas através do mesmo sistema de transporte.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

As catecolaminas são os principais neurotransmissores do sistema nervoso simpático-adrenal, isto é, são os mediadores responsáveis pela maioria das respostas fisiológicas resultantes da estimulação deste sistema. O sistema nervoso simpático encontra-se normalmente activo, mas o seu grau de actividade varia de momento para momento e de órgão para órgão, efectuando-se ajustamentos constantes a um ambiente em permanente alteração (Lefkowitz *et al.* 1991). Os transmissores do sistema nervoso simpático têm que ser agentes bastante potentes, libertados rapidamente em resposta a uma necessidade imediata e, adicionalmente, eles têm que ser inactivados rapidamente após a sua libertação. A rápida inactivação das catecolaminas requer mecanismos complexos, pois esses transmissores são libertados para o espaço extracelular, e as enzimas inactivadoras (MAO e/ou COMT) localizam-se intracelularmente. Como as catecolaminas são moléculas marcadamente polares, a sua captação celular efectua-se principalmente através de mecanismos de transporte membranar. As catecolaminas são portanto inactivadas por sistemas de metabolização, que combinam um sistema de transporte membranar com subsequente metabolização intracelular (Trendelenburg 1986).

Estão descritos, para as catecolaminas, dois sistemas de transporte membranar distintos: o *uptake*₁, localizado fundamentalmente nas terminações nervosas noradrenérgicas, embora ocorra também em algumas estruturas não neuroniais, e o *uptake*₂, localizado em estruturas não neuroniais como o músculo liso vascular e não-vascular, e algumas glândulas exócrinas (Trendelenburg 1990).

Nos vasos sanguíneos, esses dois sistemas de transporte apresentam uma importância relativa distinta na inactivação de catecolaminas com diferentes origens. Para a noradrenalina libertada das terminações nervosas noradrenérgicas, o sistema de captação neuronal (*uptake*₁) funciona como o principal mecanismo de inactivação, e a captação extraneuronal (*uptake*₂) funciona como uma "segunda linha de defesa", removendo da biófase a noradrenalina que "escapou" ao *uptake*₁. Para as catecolaminas circulantes, a situação é diferente, pois o *uptake*₂ funciona como um mecanismo de inactivação bastante efectivo, especialmente nos vasos em que a inervação adrenérgica é assimétrica (localizada no bordo adventício-medial) (ver Graefe e Bönisch 1988; Trendelenburg 1988).

Na aorta de Coelho, verificou-se que a adrenalina-³H localizada extraneuronalmente se distribui em três compartimentos distintos: no espaço extracelular, num compartimento dependente de uma prévia captação através do

*uptake*₂, e ainda num compartimento que corresponde muito provavelmente à ligação da adrenalina-³H ao colagénio e elastina.

O *uptake*₂ é responsável por aproximadamente 45% da remoção extraneuronal da amina-³H neste órgão. O *uptake*₂ e a COMT (em condições de inibição da MAO) funcionam como um sistema de metabolização de adrenalina-³H bastante activo, o que está de acordo com a conhecida capacidade de captação e metabolização extraneuronal de catecolaminas deste órgão (Kalsner e Nickerson 1969; Levin 1974; Trendelenburg 1974; Kalsner 1975; Levin e Wilson 1983; Henseling 1984; Abrahamsen e Nedergaard 1985; Barone *et al.* 1987). Este sistema de metabolização funciona como um local de perda irreversível para a adrenalina-³H, contribuindo para a sua eliminação da biófase. No entanto, após inibição da COMT, este sistema passa a funcionar como um local de perda reversível para a adrenalina-³H, pois nestas condições a adrenalina-³H permaneceu intacta no tecido, podendo posteriormente retornar à biófase. O *uptake*₂ da adrenalina-³H é inibido por corticosteróides, por esteróides sexuais e pelo derivado O-metilado da adrenalina.

A ligação da adrenalina-³H ao colagénio e à elastina contribui também (com aproximadamente 30%) para a remoção extraneuronal desta amina na aorta de Coelho. A ligação da adrenalina-³H ao colagénio e à elastina não está associada à metabolização da amina-³H, e por isso funciona como um local de perda reversível. As catecolaminas ligadas a estas proteínas, funcionando como uma reserva de catecolaminas, podem influenciar a concentração das aminas na biófase e consequentemente as respostas fisiológicas do tecido (Gillespie 1976).

A adrenalina-³H presente no espaço extracelular da aorta de Coelho corresponde aproximadamente a 25% da adrenalina-³H distribuída extraneuronalmente. A inibição do *uptake*₂ produz um aumento na concentração de catecolaminas no espaço extracelular, o que demonstra claramente que, em condições fisiológicas, o *uptake*₂ é de facto capaz de influenciar a resposta fisiológica dos tecidos às catecolaminas.

A existência, nos vasos sanguíneos, de um sistema de transporte específico para as catecolaminas (*uptake*₂) que é inibido por esteróides (ver Trendelenburg 1988), reveste-se de um significado fisiológico interessante. De facto, sabe-se que algumas situações que activam o sistema nervoso simpático conduzem também a um aumento na concentração plasmática de corticosteróides (Haynes 1991). Nestas condições, pode ocorrer inibição do *uptake*₂ por esses esteróides (Salt 1972; Morton 1987), originando uma potenciação da resposta fisiológica às catecolaminas (Fritz e Levine 1951; Shenfield *et al.* 1975; Goldie 1980). Inversamente, situações que produzam uma redução na concentração plasmática de corticosteróides podem

induzir um aumento no $uptake_2$ das catecolaminas, com consequente diminuição da resposta fisiológica a esses transmissores (Morton 1987).

Em concordância com a noção previamente existente de que o fígado desempenha um importante papel na eliminação de catecolaminas circulantes (Hertting e LaBrosse 1962; Zimon *et al.* 1967; Lightman e Hems 1973; Steinberg *et al.* 1988), verificou-se, sobretudo com hepatócitos isolados *in vitro* e com fígado perfundido, que o fígado de Rato apresenta uma grande capacidade de remoção e de metabolização de catecolaminas. Os hepatócitos isolados captam muito eficazmente adrenalina- ^3H e noradrenalina- ^3H ; a remoção das duas aminas- ^3H é quantitativamente semelhante e corresponde maioritariamente a metabolização. A COMT e a MAO desempenham um papel fundamental na metabolização de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H , respectivamente. As catecolaminas não se acumulam nas células (a razão células:meio é de cerca de 1). A inibição da MAO e da COMT produz uma redução muito acentuada na formação de todos os metabólitos, mas mesmo nestas condições não há acumulação das aminas- ^3H nas células. As fatias de fígado removem e metabolizam uma menor quantidade de noradrenalina- ^3H . No entanto, o grau e o padrão de metabolização da noradrenalina- ^3H e os efeitos da inibição da MAO e da COMT são semelhantes aos verificados com os hepatócitos isolados; também neste modelo não se verifica acumulação de noradrenalina- ^3H no tecido, mesmo após inibição da MAO e da COMT. O fígado perfundido capta grandes quantidades de noradrenalina- ^3H do meio (25% da noradrenalina- ^3H infundida na veia porta é removida pelo órgão numa única passagem). A maioria da noradrenalina- ^3H captada é metabolizada, e o OMDA- ^3H e a NMN- ^3H são os metabólitos mais abundantes. A noradrenalina- ^3H acumula-se no fígado (a razão tecido:meio para a amina- ^3H é de 2,6) e apenas 1% da amina- ^3H removida é excretada para a bile. A inibição da MAO e da COMT produz uma redução muito acentuada na formação de todos os metabólitos, com a excepção do OMDA- ^3H , e não altera o conteúdo do fígado em amina- ^3H .

Demonstrou-se, neste estudo, que as catecolaminas são captadas pelo fígado através de um sistema de transporte distinto dos sistemas de transporte de catecolaminas clássicos, o $uptake_1$ e o $uptake_2$. Em hepatócitos isolados e em fatias de fígado, a metabolização de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H é parcialmente reduzida pela desipramina e pela corticosterona. Em fígado perfundido, porém, a corticosterona não produz qualquer efeito inibitório sobre a metabolização de noradrenalina- ^3H . Em hepatócitos isolados (com a MAO e a COMT inibidas) o conteúdo das células em catecolaminas- ^3H é reduzido parcialmente pela corticosterona e pela cianina 863, mas não pela desipramina nem pelo probenecide, mostra-se completamente dependente da presença de sódio no meio extracelular e

não é afectado pela despolarização da membrana celular. A bilirrubina produz um aumento no conteúdo das células em catecolaminas- ^3H .

A inexistência de acumulação de catecolaminas no fígado de Rato deve-se muito provavelmente à existência de uma extrusão bastante activa das aminas- ^3H das células hepáticas, extrusão essa que se deve efectuar pelo menos em parte através do transportador hepático da bilirrubina.

Os resultados obtidos com o MPP^+ , um composto que é transportado em diversas estruturas por sistemas de transporte utilizados pelas catecolaminas, reforçam as nossas conclusões, pois a captação hepática de MPP^+ também não ocorre nem através do uptake_1 nem através do uptake_2 . O MPP^+ - ^3H é eficientemente captado pelos hepatócitos isolados e por hepatócitos em cultura e a captação de MPP^+ - ^3H é inibida pela cianina 863, decínio 22, quinina, clonidina, quinidina, O-metilisoprenalina, corticosterona, taurocolato de sódio e tetraetilamónio e mostra-se completamente dependente da presença de sódio no meio extracelular.

A captação hepática das catecolaminas e do MPP^+ é sensível a uma série de substâncias pertencentes a diferentes classes (catiões, aniões e substâncias neutras). A existência, no fígado, de sistemas de captação com baixa especificidade em relação aos substratos (sistemas multiespecíficos ou inespecíficos) foi proposta por vários autores, com base na observação de competição mútua entre substâncias estruturalmente não relacionadas (Eaton e Klaassen 1978a; Mol *et al.* 1988; Zimmerli *et al.* 1989; Meijer *et al.* 1990; Steen *et al.* 1992). Um sistema de captação com uma reduzida especificidade seria muito certamente adequado e vantajoso à função de "desintoxicação" que este órgão desempenha, relativamente a compostos endógenos e exógenos existentes em circulação (Buscher *et al.* 1986). É portanto possível que a captação hepática de catecolaminas e de MPP^+ , que não ocorre através de nenhum dos sistemas de transporte específicos para as catecolaminas (uptake_1 ou uptake_2), se efectue através de um sistema de captação hepática de compostos orgânicos com uma baixa especificidade.

Em conclusão, este estudo confirmou, por um lado, a importância relativa do uptake_2 na remoção de catecolaminas pelos vasos sanguíneos, demonstrando de forma directa um aumento da quantidade de amina no espaço extracelular como consequência do bloqueio do referido sistema de captação. Por outro lado, demonstrou que o fígado possui o sistema de metabolização de catecolaminas mais eficiente de todos os órgãos caracterizados até agora, e que as características desse sistema de captação permitem diferenciá-lo dos sistemas de captação extraneuronais conhecidos, uptake_1 e uptake_2 . Isto é, a remoção e metabolização de catecolaminas circulantes é muito provavelmente feita em grande parte pelo

fígado, dados a eficiência do sistema de captação dos hepatócitos, a riqueza dos mesmos em MAO e COMT, e o peso relativamente importante deste órgão, através de um sistema de captação que este estudo caracterizou parcialmente pela primeira vez, e que apresenta características compatíveis com um sistema de captação de compostos orgânicos com baixa especificidade.

RESUMO

O objectivo do presente trabalho foi caracterizar os sistemas de metabolização extraneuronal de catecolaminas, em estruturas que desempenham um papel importante na inactivação destes transmissores, nomeadamente um vaso sanguíneo (a artéria aorta) e o fígado.

Incubou-se tiras de aorta de Coelho com 50 nmol/l de adrenalina-(-)- ^3H durante 15 minutos. Realizou-se experiências em que o uptake_1 e a monoaminoxidase (MAO) foram inibidos, experiências em que o uptake_1 , a MAO e a catecol-O-metiltransferase (COMT) foram inibidos (em que se determinou a adrenalina- ^3H presente no tecido e os metabólitos- ^3H formados, presentes no tecido e no líquido de incubação) e ainda experiências em que o uptake_1 , a MAO e a COMT foram inibidos (em que se determinou a distribuição compartimental da adrenalina- ^3H no tecido por análise do efluxo da mesma para o líquido de incubação).

Com a COMT inibida, os inibidores do uptake_2 produziram uma redução no conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H que não excedeu os 50%. Com a COMT funcionante, os inibidores do uptake_2 diminuíram marcadamente a O-metilação de adrenalina- ^3H e simultaneamente aumentaram o conteúdo do tecido em adrenalina- ^3H . Os mineralocorticóides (corticosterona e DOCA) reduziram o conteúdo em adrenalina- ^3H do tecido (com a COMT inibida) e a formação de metanefrina- ^3H (com a COMT funcionante) tão eficazmente como os esteróides sexuais (17 β -estradiol, progesterona e testosterona); a hidrocortisona não produziu qualquer efeito (até aos 120 $\mu\text{mol/l}$). A análise compartimental das curvas de efluxo de adrenalina- ^3H mostrou que esta se distribuiu em três compartimentos extraneuronais, os compartimentos I, II e III, com tempos de semi-vida de 0,4, 4 e 15 minutos, respectivamente. A corticosterona (120 $\mu\text{mol/l}$) reduziu o conteúdo em adrenalina- ^3H do compartimento III e simultaneamente aumentou o conteúdo em amina- ^3H do compartimento I (espaço extracelular).

Conclui-se que, na aorta de Coelho: (1) o conteúdo extraneuronal do tecido em adrenalina- ^3H é apenas parcialmente dependente do uptake_2 , e que, pelo contrário, a O-metilação de adrenalina- ^3H é totalmente dependente de uma prévia captação da amina através do uptake_2 ; (2) a distribuição extraneuronal de adrenalina- ^3H independente do uptake_2 corresponde muito provavelmente à ligação a proteínas estruturais do espaço extracelular (colagénio e elastina); e (3) a inibição

do $uptake_2$ origina um aumento da concentração de adrenalina- ^3H no espaço extracelular, o que significa que, em condições fisiológicas, o $uptake_2$ cria um gradiente de concentração da amina- ^3H na biófase e, conseqüentemente, influencia a resposta fisiológica do tecido às catecolaminas.

Incubou-se hepatócitos isolados de Rato com 50 nmol/l de adrenalina-(-)- ^3H ou com 50 nmol/l ou 200 nmol/l de noradrenalina-(-)- ^3H , e fatias de fígado com 200 nmol/l de noradrenalina-(-)- ^3H , durante 15 minutos, determinando-se o conteúdo das células (ou tecido) em amina- ^3H e a quantidade de metabólitos- ^3H formados, presentes nas células (ou tecido) e no líquido de incubação.

Os hepatócitos captaram muito eficazmente as catecolaminas- ^3H . A captação das duas aminas- ^3H pelos hepatócitos foi quantitativamente semelhante, e correspondeu principalmente a metabolização. A COMT e a MAO desempenharam um papel fundamental na metabolização de adrenalina- ^3H e de noradrenalina- ^3H , respectivamente (para a adrenalina- ^3H , o OMDA- ^3H e a MN- ^3H foram os metabólitos mais abundantes; para a noradrenalina- ^3H , os metabólitos mais abundantes foram o OMDA- ^3H e o DOMA- ^3H). As actividades da MAO (k_{MAO}) e da COMT (k_{COMT}) para a noradrenalina- ^3H foram $2,27 \pm 0,14$ e $0,7 \pm 0,15$ minuto $^{-1}$, respectivamente. As duas catecolaminas- ^3H não se acumularam nas células (a razão células:meio para as aminas- ^3H foi cerca de 1). A inibição da MAO e da COMT originou uma redução muito marcada na formação de todos os metabólitos da noradrenalina- ^3H , mas mesmo nestas condições não se verificou acumulação da amina- ^3H nas células. A captação de noradrenalina- ^3H pelas fatias de fígado foi quantitativamente inferior à captação observada com as células isoladas. No entanto, a percentagem de metabolização e o padrão de metabolização da amina- ^3H , bem como o efeito da inibição da MAO e da COMT foram semelhantes ao verificado com as células isoladas. Do mesmo modo, também não houve acumulação de noradrenalina- ^3H nas fatias de fígado, mesmo após inibição da MAO e da COMT.

Perfundiu-se fígado de Rato com 2 nmol/l de noradrenalina-(-)- ^3H durante 60 minutos, determinando-se o conteúdo do tecido em amina- ^3H e a quantidade de metabólitos- ^3H formados, presentes no tecido ou no efluente venoso, e ainda a noradrenalina- ^3H e metabólitos- ^3H presentes na bile.

Verificou-se que o fígado perfundido captou muito eficientemente a amina- ^3H (numa única passagem pelo fígado, este órgão removeu 25% da noradrenalina- ^3H infundida na veia porta). A noradrenalina- ^3H captada foi maioritariamente metabolizada, e os metabólitos OMDA- ^3H e NMN- ^3H foram os mais abundantes. A razão tecido:meio para a noradrenalina- ^3H no fígado foi de 2,6, e apenas 1% da amina- ^3H captada pelo órgão foi excretada para a bile. A inibição da MAO e da

COMT originou uma redução na formação de todos os metabólitos- ^3H , com a exceção do OMDA- ^3H , e não produziu alteração no conteúdo do fígado em noradrenalina- ^3H .

Experiências realizadas no sentido de caracterizar a captação hepática de catecolaminas mostraram que:

- 1) em hepatócitos isolados e em fatias de fígado, a desipramina (1 ou 10 $\mu\text{mol/l}$) e a corticosterona (40 ou 120 $\mu\text{mol/l}$) produziram efeitos semelhantes, que consistiram numa redução parcial da metabolização (metabólitos OMDA- ^3H e MN- ^3H ou NMN- ^3H) de adrenalina- ^3H ou de noradrenalina- ^3H e numa não alteração no conteúdo das células (ou tecido) em aminas- ^3H . A ausência de sódio no meio de incubação praticamente aboliu o conteúdo e a metabolização de noradrenalina- ^3H nos hepatócitos isolados. Em condições de ausência de sódio no meio de incubação, a corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) não apresentou qualquer efeito inibitório.
- 2) em hepatócitos isolados com a MAO e a COMT inibidas, o conteúdo das células em noradrenalina- ^3H não foi reduzido pela desipramina (1 $\mu\text{mol/l}$), corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$), cianina 863 (10 $\mu\text{mol/l}$) ou probenecide (100 $\mu\text{mol/l}$); o conteúdo das células em adrenalina- ^3H não foi afectado pela desipramina nem pelo probenecide, mas foi parcialmente reduzido pela corticosterona e pela cianina 863. A bilirrubina (200 $\mu\text{mol/l}$) induziu um aumento (de 50%) no conteúdo das células em aminas- ^3H . A ausência de sódio no meio de incubação praticamente aboliu o conteúdo em aminas- ^3H , e a despolarização da membrana celular (com 50 mmol/l de KCl) não afectou o conteúdo dos hepatócitos em aminas- ^3H .
- 3) em fígado perfundido, a corticosterona (40 $\mu\text{mol/l}$) não produziu alteração no conteúdo e metabolização da noradrenalina- ^3H .

Realizou-se, ainda, experiências de incubação de hepatócitos em cultura ou de hepatócitos isolados de Rato com 100 nmol/l de 1-metil-4-fenilpiridínio- ^3H (MPP^+ - ^3H) durante 2 ou 15 minutos, determinando-se o conteúdo das células em MPP^+ - ^3H . O MPP^+ é um composto que possui numerosas semelhanças bioquímicas com as catecolaminas, e que apresenta algumas vantagens, em relação às próprias catecolaminas, para o estudo dos sistemas de transporte das mesmas. Essas experiências mostraram que:

- 1) o MPP^+ - ^3H foi muito eficientemente captado pelos hepatócitos isolados e pelos hepatócitos em cultura, acumulando-se nas células. Hepatócitos em cultura e hepatócitos isolados em suspensão correspondentes a 1 mg de proteínas celulares removeram o MPP^+ - ^3H de 16,1 e 5,0 μl de meio de incubação por minuto, e simultaneamente 11,3 e 4,8% do MPP^+ - ^3H intracelular saíu das células por minuto, respectivamente. O K_m e o $V_{\max}$ do sistema de transporte de MPP^+ - ^3H ,

calculados em células em cultura, foram de 12,6 $\mu\text{mol/l}$ e 40,1 pmol/(mg de proteína.minuto), respectivamente;

2) a captação de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ foi sensível à cianina 863, decínio 22, quinina, clonidina, quinidina, O-metilisoprenalina, corticosterona, taurocolato de sódio e tetraetilamónio e mostrou-se completamente dependente do sódio extracelular.

Conclui-se que: (1) o fígado de Rato remove e metaboliza catecolaminas muito eficientemente. Os hepatócitos isolados, particularmente, foram muito eficazes, possuindo um dos sistemas de metabolização de catecolaminas mais activos descritos; (2) apesar da captação e da metabolização hepática de catecolaminas serem muito eficientes, os hepatócitos isolados e as fatias de fígado não acumulam as aminas- ^3H , mesmo após inibição da MAO e da COMT. Essa aparente incapacidade dos hepatócitos em acumularem catecolaminas deve-se muito provavelmente à existência de uma extrusão bastante activa das aminas das células através, pelo menos em parte, do transportador da bilirrubina; (3) a captação hepática de catecolaminas ocorre sobretudo através de um sistema de transporte que não corresponde nem ao *uptake*₁, nem ao *uptake*₂, nem aos sistemas de transporte renal de catiões ou de aniões orgânicos; (4) a captação hepática de $\text{MPP}^+ - ^3\text{H}$ ocorre através de um sistema de transporte que não corresponde nem ao *uptake*₁, nem ao *uptake*₂, nem ao sistema de transporte renal de catiões orgânicos, e que possui características em comum com os sistemas de captação hepática de catiões orgânicos do tipo I e do tipo II.

A captação hepática de catecolaminas e de MPP^+ parece pois efectuar-se por um novo tipo de transportador membranal de catecolaminas sensível a derivados da cianina e à corticosterona, dependente da presença de sódio no meio extracelular e que aceita como substratos pequenos catiões orgânicos.

SUMMARY

The present study aimed at characterizing the extraneuronal metabolizing systems of catecholamines, in tissues that play an important role in the inactivation of catecholamines, namely a blood vessel (the aorta) and the liver.

Rabbit aortic strips were incubated with 50 nmol/l ^3H -(-)-adrenaline during 15 min. In a series of experiments, monoaminoxidase (MAO) and uptake₁ were inhibited, or MAO, uptake₁ and catechol-O-methyl transferase (COMT) were inhibited, and ^3H -adrenaline present in the tissue as well as the ^3H -metabolites formed (present in the tissue and in the incubation medium) were measured. In another series of experiments, MAO, uptake₁ and COMT were inhibited, and the compartmental distribution of ^3H -adrenaline in the tissue was determined by analysis of the efflux of ^3H -amine into the medium.

When COMT was inhibited, inhibitors of uptake₂ produced a maximal reduction of ^3H -adrenaline content in the tissue that did not exceed 50%. When COMT was functional, inhibitors of uptake₂ markedly reduced the O-methylation of ^3H -adrenaline and concomitantly increased the tissue content of ^3H -adrenaline. Mineralocorticoids (corticosterone and DOCA) reduced ^3H -adrenaline content in the tissue (when COMT was inhibited) and ^3H -metanephrine formation (when COMT was functional) as effectively as did sexual steroids (17 β -oestradiol, progesterone and testosterone); hydrocortisone had no effect (for concentrations up to 120 $\mu\text{mol/l}$). Compartmental analysis of the efflux curves of ^3H -adrenaline showed that the amine had distributed into three extraneuronal compartments (compartments I, II and III), with half times of 0.4, 4 and 15 min, respectively. Corticosterone (120 $\mu\text{mol/l}$) decreased the amount of ^3H -adrenaline present in compartment III and simultaneously increased the amount of ^3H -amine present in compartment I (extracellular space).

We conclude that, in the rabbit aorta: (1) the extraneuronal content of ^3H -adrenaline in the tissue can be only partially ascribed to uptake₂ whereas the O-methylation of ^3H -adrenaline is totally dependent on a previous uptake of the ^3H -amine through uptake₂; (2) binding of ^3H -adrenaline to structural proteins (collagen and elastin) is very probably responsible for the extraneuronal distribution of ^3H -adrenaline independent of uptake₂; (3) inhibition of uptake₂ increases the amount of ^3H -adrenaline in the extracellular space, i.e., uptake₂ generates a concentration gradient for ^3H -adrenaline in the biophase and,

consequently, is able to influence the physiological response of the tissue to catecholamines.

Isolated rat hepatocytes were incubated with 50 nmol/l or 200 nmol/l ^3H -(-)-noradrenaline or 50 nmol/l ^3H -(-)-adrenaline, and rat liver slices were incubated with 200 nmol/l ^3H -(-)-noradrenaline, for 15 min. Cells (or tissue) content of ^3H -amines as well as the ^3H -metabolites formed (present in cells (or tissue) and in the incubation medium) were measured.

Isolated hepatocytes removed ^3H -catecholamines from the incubation medium very efficiently. The removal of both amines was quantitatively similar, and mainly due to metabolism. For ^3H -adrenaline, O-methylation predominated (^3H -OMDA and ^3H -MN were the predominant metabolites); for ^3H -noradrenaline, deamination predominated (^3H -OMDA and ^3H -DOMA were the predominant metabolites). The following activities of MAO and COMT were determined for ^3H -noradrenaline: $k_{\text{MAO}} 2.27 \pm 0.14$ and $k_{\text{COMT}} 0.70 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$. There was no accumulation of ^3H -catecholamines in the cells, as the cell:medium ratio was about unity. Inhibition of MAO and COMT strongly reduced the formation of all ^3H -metabolites, but surprisingly there was no accumulation of ^3H -catecholamines in the cells. The removal of ^3H -noradrenaline by liver slices was smaller than the removal by isolated cells. However, the degree of metabolism and the pattern of metabolism of ^3H -noradrenaline, as well as the effect of MAO and COMT inhibition were similar to those of isolated cells. Likewise, there was no accumulation of ^3H -noradrenaline in the tissue, even after inhibition of MAO and COMT.

Rat livers were perfused with 2 nmol/l ^3H -(-)-noradrenaline for 90 min; the tissue content of the ^3H -amine, the ^3H -metabolites formed (present in the tissue and in the venous effluent), as well as the ^3H -amine and ^3H -metabolites present in the bile were determined.

The perfused liver removed ^3H -noradrenaline very efficiently (25% of the ^3H -amine infused in the portal vein was removed by the liver during a single passage through that organ). The removed ^3H -noradrenaline was mainly metabolized, ^3H -OMDA and ^3H -NMN being the predominant metabolites. ^3H -noradrenaline accumulated in the liver, as the tissue:medium ratio for ^3H -noradrenaline was 2.6, and only about 1% of the removed ^3H -amine was excreted into bile. Inhibition of MAO and COMT produced a decrease in the formation of all ^3H -metabolites (with the exception of ^3H -OMDA) and did not change the tissue content of ^3H -noradrenaline.

Experiments were performed to characterize the hepatic uptake of catecholamines. These experiments showed that:

1) in isolated hepatocytes and liver slices incubated with ^3H -noradrenaline or ^3H -adrenaline, desipramine (1 or 10 $\mu\text{mol/l}$) and corticosterone (40 or 120 $\mu\text{mol/l}$) produced similar effects, slightly decreasing the formation of ^3H -OMDA and ^3H -NMN or ^3H -MN, and having no effect on ^3H -amine content of the cells (or tissue). Incubation of isolated hepatocytes in a sodium-free medium practically abolished the ^3H -noradrenaline content and metabolism in the cells. Under sodium-free conditions, corticosterone (40 $\mu\text{mol/l}$) did not affect the content and metabolism of ^3H -noradrenaline.

2) in isolated hepatocytes in which MAO and COMT were inhibited, desipramine (1 $\mu\text{mol/l}$), corticosterone (40 $\mu\text{mol/l}$), cyanine 863 (10 $\mu\text{mol/l}$) or probenecid (100 $\mu\text{mol/l}$) did not affect the cell content of ^3H -noradrenaline; the cell content of ^3H -adrenaline was not affected by desipramine or probenecid, but was partially reduced by corticosterone or cyanine 863. Bilirubin (200 $\mu\text{mol/l}$) increased (by 50%) the amount of ^3H -noradrenaline or ^3H -adrenaline in the cells. When isolated hepatocytes were incubated in a sodium-free medium there was a near abolition of the ^3H -adrenaline or ^3H -noradrenaline content of the cells. Depolarization of the cell membrane (with 50 mmol/l KCl in the medium) did not affect cell content of ^3H -amines.

3) in the perfused liver, corticosterone (40 $\mu\text{mol/l}$) did not change the content and metabolism of ^3H -noradrenaline.

Some additional experiments were performed. Rat cultured hepatocytes or isolated hepatocytes were incubated with 100 nmol/l ^3H -1-methyl-4-phenylpyridinium (^3H -MPP $^+$) for 2 or 15 min, and the cell content of ^3H -MPP $^+$ was determined. MPP $^+$ has several biochemical similarities with catecholamines, and possesses some advantages, in relation to catecholamines, for the study of transport mechanisms of these transmitters. These experiments showed that:

1) ^3H -MPP $^+$ was very efficiently taken up by cultured hepatocytes and by isolated hepatocytes, being accumulated in cells. An amount of cultured hepatocytes and isolated hepatocytes which corresponded to 1 mg cell protein cleared 16.1 and 5.0 μl of incubation medium of ^3H -MPP $^+$ per min, and simultaneously 11.3 and 4.8% of intracellular ^3H -MPP $^+$ left the cells per min, respectively. K_m and V_{max} of the uptake system of ^3H -MPP $^+$, calculated in cultured hepatocytes, were 12.6 $\mu\text{mol/l}$ and 40.1 pmol/(mg protein.min), respectively;

2) ^3H -MPP $^+$ uptake into hepatocytes was sensitive to cyanine 863, decynium 22, quinine, clonidine, quinidine, O-methylisoprenaline, corticosterone, sodium taurocholate and tetraethylammonium, and was completely dependent on the presence of sodium in the incubation medium.

We conclude that: (1) rat liver removes and metabolizes catecholamines very efficiently. Isolated hepatocytes, particularly, were very efficient, possessing one of the most active metabolizing systems for catecholamines so far described; (2) despite the very efficient removal and metabolism of catecholamines, isolated hepatocytes and liver slices do not accumulate these amines. The inability of the liver to accumulate catecholamines, even after inhibition of MAO and COMT, is probably due to a very efficient removal of catecholamines from the cells, through, at least partially, the bilirubin transporter; (3) the hepatic uptake of catecholamines occurs mainly through a transport system which is distinct from uptake₁, from uptake₂, and from the renal transport systems for organic cations or anions; (4) the hepatic uptake of MPP⁺ occurs through a system which is distinct from uptake₁, from uptake₂, and from the renal transport system of organic cations.

The hepatic uptake of catecholamines and MPP⁺ seems to be accomplished by a new type of membranar transporter of catecholamines sensitive to cyanine derivatives and to corticosterone, sodium-dependent, and which accepts small organic cations as substrates.

BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsen J, Nedergaard OA (1985) Accumulation of ^3H -adrenaline by rabbit aorta. *Blood Vessels* 22:32-46
- Acevedo C, Masana MI, Tchercansky D, Rubio MC (1990) Accumulation of ^3H -($\pm$)-noradrenaline by isolated rat liver cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342:40-44
- Anning EN, O'Donnell SR, Wanstall JC (1980) K^+ -depolarization: an alternative method of inhibiting extraneuronal uptake on isolated tissue preparations? *Arch Int Pharmacodyn Ther* 243:209-216
- Anwer MS, Kroker R, Hegner D (1976) Cholic acid uptake into isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 357:1477-1486
- Araújo D, Martel F, Viana F, Osswald W (1994) Diosmin inhibits extraneuronal metabolism of adrenaline and does not change the fate of transmitter noradrenaline in human varicose veins. *J Auton Pharmacol* 14:13
- Avakian OV, Gillespie JS (1968) Uptake of noradrenaline by adrenergic nerves, smooth muscle and connective tissue in isolated perfused arteries and its correlation with the vasoconstrictor response. *Br J Pharmacol Chemother* 32:168-184
- Axelrod J (1959) Metabolism of epinephrine and other sympathomimetic amines. *Physiol Rev* 39:751-776
- Axelrod J (1966) Methylation reactions in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. *Pharmacol Rev* 18:95-113
- Axelrod J, Tomchick R (1958) Enzymatic O-methylation of norepinephrine and other catechols. *J Biol Chem* 233:702-705
- Axelrod J, Albers RW, Clemente CD (1959) Distribution of catechol-O-methyl transferase in the nervous system and other tissues. *J Neurochem* 5:68-72
- Azevedo I, Osswald W (1976) Uptake, distribution and metabolism of isoprenaline in the dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 295:141-147

- Azevedo I, Bönisch H, Osswald W, Trendelenburg U (1983) Autoradiographic study of rat hearts perfused with ^3H -isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 322:1-5
- Babin-Ebell J, Russ H, Gliese M, Schömig E (1991) Inhibition of the renal transport system for organic cations by steroids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:R92
- Barnhart JL, Combes B (1975) Characteristics common to choleretic increments of bile induced by theophylline, glucagon and SQ-20009 in the dog. *Proc Soc Exp Biol Med* 150:591-596
- Barone S, Panek D, Bennet L, Stitzel RE, Head RJ (1987) The influence of oestrogen and oestrogen metabolites on the sensitivity of the isolated rabbit aorta to catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335:513-520
- Berry MN, Friend DS (1969) High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43:506-520
- Bierring F, Kobayasi T (1963) Electron microscopy of the normal rabbit aorta. *Acta Pathol Microbiol Scand* 57:154-168
- Bissel DM (1976) Study of hepatocyte function in cell culture. Em: *Progress in Liver Diseases* (vol. 5). Popper H, Schaffner F (eds). Grune and Stratton, New York, pp. 69-82
- Bissel DM, Hammaker LE, Meyer UA (1973) Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. *J Cell Biol* 59:722-734
- Bissell DM, Levine GA, Bissell MJ (1978) Glucose metabolism by adult hepatocytes in primary culture and by cell lines from rat liver. *Am J Physiol* 234:C122-C130
- Blaschko H (1952) Amine oxidase and amine metabolism. *Pharmacol Rev* 4:415-453
- Bloom A, Scaf AHJ, Meijer DKF (1982) Hepatic drug transport in the rat. A comparison between isolated hepatocytes, the isolated perfused liver and the liver in vivo. *Biochem Pharmacol* 31:1553-1565

- Bogdanski DF, Brodie BB (1966) Role of sodium and potassium ions in storage of norepinephrine by synaptic nerve endings. *Life Sci* 5:1563-1569
- Bogdanski DF, Brodie BB (1969) The effects of inorganic ions on the storage and uptake of ^3H -norepinephrine by rat heart slices. *J Pharmacol Exp Ther* 165:181-189
- Bönisch H, Uhlig W, Trendelenburg U (1974) Analysis of the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 283:223-244
- Bönisch H, Friedrich U, Fritsch H, Harder R (1984) Transport of noradrenaline across the cell membrane of isolated neuronal cells with special reference to PC-12 cells. In: *Neuronal and Extraneuronal Events in Autonomic Pharmacology*. Fleming WW, Graefe K-H, Langer SZ, Weiner N (eds). Raven Press, New York, pp. 63-74
- Bönisch H, Bryan LJ, Henseling M, O'Donnell SR, Stockman P, Trendelenburg U (1985) The effect of various ions on uptake₂ of catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328:407-416
- Bonney RJ (1974) Adult liver parenchymal cells in primary culture: characteristics and cell recognition standards. *In Vitro* 10:130-142
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Branco D, Osswald W (1980) The fate of isoprenaline after inhibition of O-methylation and of extraneuronal uptake. *Eur J Pharmacol* 67:247-253
- Branco D, Azevedo I, Sarmiento A, Osswald W (1981) The fate of isoprenaline in the isolated rabbit aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:120-125
- Branco D, Caramona M, Martel F, Ferreira de Almeida JA, Osswald W (1992a) Predominance of oxidative deamination in the metabolism of exogenous noradrenaline by the normal and chemically denervated human uterine artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346:286-293

- Branco D, Caramona M, Araújo D, Osswald W (1992b) The role of monoamine oxidase in the metabolism of exogenous noradrenaline by the human saphenous vein. *Fundam Clin Pharmacol* 6:145-152
- Brandão F, Paiva MQ, Guimarães S (1980) The role of neuronal and extraneuronal systems in the metabolism of adrenaline and noradrenaline released from nerve terminals by electrical stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311:1-7
- Breese GR, Traylor TD (1970) Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 174:413-420
- Brine F, Cornish EJ, Miller RC (1979) Effect of uptake inhibitors on responses of sheep coronary arteries to catecholamines and sympathetic nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 67:553-561
- Broadley KJ, Paton DM (1990) Comparison of the uptake and O-methylation of isoprenaline by cardiac and respiratory tissues of guinea-pigs. *Pharmacol Res* 22:573-585
- Bryan LJ, O'Donnell SR (1984) Some factors affecting the extraneuronal accumulation of adrenaline in guinea-pig trachealis smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326:268-272
- Bryan-Lluka LJ, O'Donnell SR (1992) Dopamine and adrenaline, but not isoprenaline are substrates for uptake and metabolism in isolated perfused lungs of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346:20-26
- Bryan-Lluka LJ, Vuocolo HE (1992) Evidence from guinea-pig trachealis that uptake₂ of isoprenaline is enhanced by hyperpolarization of the smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346:399-404
- Bryan-Lluka LJ, Westwood NN, O'Donnell SR (1992) Vascular uptake of catecholamines in perfused lungs of the rat occurs by the same process as uptake₁ in noradrenergic neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:319-326
- Burgen ASV, Iversen LL (1965) The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. *Br J Pharmacol* 25:34-49

- Burger HJ, Gebhardt R, Mayer C, Mecke D (1989) Different capacities for amino acid transport in periportal and perivenous hepatocytes isolated by digitonin/collagenase perfusion. *Hepatology* 9:22-28
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4546-4550
- Buscher HP, Fricker G, Gerok W, Kramer W, Kurz G, Müller M, Schneider S (1986) Membrane transport of amphiphilic compounds by hepatocytes. Em: *Receptor-mediated Uptake in the Liver*. Greten H, Windler E, Beisiegel U (eds). Springer Verlag, Heidelberg, pp. 189-199
- Carlsson A, Waldeck B (1963) On the role of liver catechol-O-methyl transferase in the metabolism of circulating catecholamines. *Acta Pharmacol Toxicol* 20:47-55
- Chapman GS, Jones AL, Meyer UA, Bissell DM (1973) Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. II. Ultrastructural studies. *J Cell Biol* 59:735-747
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constants (k_i) and the concentration which causes 50% inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr (1984) Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 120:574-578
- Clarke DE, Jones CJ, Linley PA (1969) Histochemical fluorescent studies on noradrenaline accumulation by uptake₂ in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 39:1-9
- Colburn RW, Goodwin FK, Murphy DL, Bunney WE, Davis JM (1968) Quantitative studies of norepinephrine uptake by synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 17:957-964
- Cornish EJ, Goldie RG (1980) Metabolism of [³H]-($\pm$)-isoprenaline by isolated atria and coronary arteries of the kitten. *Br J Pharmacol* 68:499-504

- Daniels AJ, Reinhard JF Jr (1988) Energy-driven uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium into chromaffin granules via the catecholamine transporter. *J Biol Chem* 263:5034-5036
- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Beichert CM, Kopin IJ (1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1:249-254
- De la Lande IS, Parker DAS, Proctor C, Marino V (1987) Cocaine inhibits extraneuronal O-methylation of exogenous noradrenaline in nasal and oral tissues of the rabbit. *Life Sci* 41:2463-2468
- De la Lande IS, Marino V, Kennedy JA, Parker DAS (1990) Further evidence that the extraneuronal uptake of noradrenaline in rabbit dental pulp is similar to uptake₁. *Eur J Pharmacol* 183:1147-1148
- De la Lande IS, Marino V, Lavranos T, Kennedy JA, Parker DAS, Seamark RF (1991) Distribution of extraneuronal uptake₁ in reproductive tissues: studies on cells in culture. *J Neural Transm (Suppl.)* 34:37-42
- De Lean A, Munson PJ, Rodbard D (1978) Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 235:E97-E102
- Di Monte D, Ekstrom G, Shinka T, Smith MT, Trevor AJ, Castagnoli Jr N (1987) Role of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion formation and accumulation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity to isolated hepatocytes. *Chem Biol Interact* 62:105-116
- Dyck WP, Janowitz HD (1971) Effect of glucagon on hepatic bile secretion in man. *Gastroenterology* 60:400-404
- Eaton DL, Klaassen CD (1978a) Carrier-mediated transport of ouabain in isolated hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 205:480-488
- Eaton DL, Klaassen CD (1978b) Carrier-mediated transport of the organic cation procaine amide ethobromide by isolated rat liver parenchymal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 206:595-606

- Eckert E, Henseling H, Trendelenburg U (1976) The effect of inhibitors of extraneuronal uptake on the distribution of ^3H -($\pm$)-noradrenaline in nerve-free rabbit aortic strips. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 293:115-127
- Ferreira-de-Almeida JA, Martel F, Azevedo I, Osswald W (1994) Metabolism of [^3H]Noradrenaline by umbilical arteries and placental bed tissue obtained from normotensive and preeclamptic human pregnancies. *J Matern Fetal Invest* (in press)
- Feverly J, Blanckaert N (1991) Bilirubin metabolism. Em: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* (vol. 1). McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J (eds). Oxford University Press, Oxford, pp. 107-115
- Fiebig ER, Trendelenburg U (1978) The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of ^3H -(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303:21-35
- Fischer E, Barth A, Klinger W, Gregus Z, Varga F (1980) Choleretic potencies of some bile acids and their effect on biliary excretion of eosine in the rat. *Acta Biol Med Ger* 39:711-715
- Fitz JG, Scharschmidt BF (1987) Regulation of transmembrane electrical potential gradient in rat hepatocytes in situ. *Am J Physiol* 252:G56-G64
- Follmann W, Petzinger E, Kinne RK (1990) Alterations of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 258:C700-C712
- Forte TM (1984) Primary hepatocytes in monolayer culture: a model for studies on lipoprotein metabolism. *Ann Rev Physiol* 46:403-415
- Foster PS, Goldie RG, Paterson JW (1983) Effect of steroids on β -adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br J Pharmacol* 78:441-445
- Fritz I, Levine R (1951) Action of adrenal corticoid steroids and norepinephrine on vascular responses of stress in adrenalectomized rats. *Am J Physiol* 165:456-465
- Fry JR, Bridges JW (1976) The metabolism of xenobiotics in cell suspensions and cell cultures. Em: *Progress in Drug Metabolism* (vol. 2). Bridges JW, Chasseaud LF (eds). John Wiley, New York, pp. 71-117

- Fuller RW, Hemrick SK (1978) Enhanced selectivity of pargyline as an inhibitor of type B monoamine oxidase in harmaline-treated rats. *Life Sci* 22:1083-1086
- Galivan J (1979) The effect of age in culture on the uptake and metabolism of methotrexate by primary cultures of hepatocytes. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 24:571-582
- Ganapathy V, Ganapathy ME, Nair CN, Mahesh VB, Leibach FH (1988) Evidence for an organic cation-proton antiport system in brush-border membranes isolated from the human term placenta. *J Biol Chem* 263:4561-4568
- Garceau D, Yamaguchi N (1982) Pharmacological evidence for the existence of a neuronal amine uptake mechanism in the dog liver in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 60:755-762
- Garrett J, Branco D (1977) Uptake and metabolism of noradrenaline by the mesenteric arteries of the dog. *Blood Vessels* 14:43-54
- Gebhardt R, Mecke D (1979) The role of growth hormone, dexamethasone and triiodothyronine in the regulation of glutamine synthetase in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 100:519-525
- Gebhardt R, Belleman P, Mecke D (1978) Metabolic and enzymatic characteristics of adult rat liver parenchymal cells in non-proliferating primary monolayer cultures. *Exp Cell Res* 112:431-441
- Gillespie JS (1976) Extraneuronal uptake of catecholamines in smooth muscle and connective tissue. Em: *The Mechanism of Neuronal and Extraneuronal Transport of Catecholamines*. Paton DM (ed). Raven Press, New York, pp. 325-354
- Gillespie JS, Towart R (1973) Uptake kinetics and ion requirements for extraneuronal uptake of noradrenaline by arterial smooth muscle and collagen. *Br J Pharmacol* 47:556-567
- Goldie RG (1980) Effect of cortisol-induced inhibition of extra-neuronal uptake of (-)-isoprenaline in cat and guinea-pig atria. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 7:325-328
- Gorkin VZ (1966) Monoamine oxidases. *Pharmacol Rev* 18:115-120

- Graefe K-H, Bönisch H (1988) The transport of amines across the axonal membranes of noradrenergic and dopaminergic neurones. Em: *Catecholamines I* (Handb Exp Pharmacol, vol. 90). Trendelenburg U, Weiner N (eds). Springer, Berlin, pp. 193-245
- Graefe K-H, Trendelenburg U (1974) The effect of hydrocortisone on the sensitivity of the isolated cat nictitating membrane to catecholamines. Relationship to extraneuronal uptake and metabolism. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 286:1-48
- Graefe K-H, Stefano FJE, Langer SZ (1973) Preferential metabolism of (-)-³H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens. *Biochem Pharmacol* 22:1147-1160
- Greim H (1980) Isolated cell systems as a tool in toxicological research. *Arch Toxicol* 44:209-210
- Grohmann M (1987) The activity of the neuronal and extraneuronal catecholamine-metabolizing enzymes of the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:139-147
- Grohmann M, Trendelenburg U (1985) The handling of five catecholamines by the extraneuronal O-methylating system of the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329:264-270
- Guimarães S, Paiva MQ (1977) The role played by the extraneuronal system in the disposition of noradrenaline and adrenaline in vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 296:279-287
- 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 to isoprenaline caused by inhibition of catechol-O-methyl transferase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 286:401-412
- Guimarães S, Paiva MQ, Moura D, Proença J (1985) The saturability of a site of loss and the degree of supersensitivity to agonists which are substrates of this site of loss. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329:30-35

- Guzelian PS, Bissell DM, Meyer UA (1977) Drug metabolism in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Gastroenterology* 72:1232-1239
- Hallman H, Olson L, Jonsson G (1984) Neurotoxicity of the meperidine analogue *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur J Pharmacol* 97:133-136
- Hartmann H, Beckh K (1991) Nerve supply and nervous control of liver function. Em: *Oxford Textbook of Clinical Hepatology* (vol. 1). McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J (eds). Oxford University Press, Oxford, pp. 95-96
- Haynes RC Jr (1991) Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. Em: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds). Pergamon Press, New York, pp. 1431-1462
- Hays WL (1988) Statistics. Holt, Rinehart and Winston Inc., Orlando, Florida, EUA
- Head RJ, de la Lande IS, Irvine RJ, Johnson SM (1980) Uptake and O-methylation of isoprenaline in the rabbit ear artery. *Blood Vessels* 17:229-245
- Hedner J, Almgren O, Jonason J, Lundberg D (1981) Neuronal and extraneuronal uptake of ^3H -noradrenaline in rat portal vein in vitro. *Acta Physiol Scand* 111:171-177
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC (1984) Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224:1451-1453
- Heikkila RE, Nicklas WJ, Duvoisin RC (1985) Dopaminergic neurotoxicity after stereotaxic administration of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP^+) to rats. *Neurosci Lett* 59:135-140
- Henseling M (1980) Distribution and metabolic fate of ^3H -noradrenaline in rabbit aorta and their influence on muscle contraction. Em: *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Bevan JA, Godfraind T, Maxwell RA, Vanhoutte PM (eds). Raven Press, New York, pp. 160-170
- Henseling M (1983a) Accumulation of ^3H -(-)-noradrenaline in the rabbit aorta not related to uptake₁ and uptake₂, but sensitive to 3,4-dihydroxy-2-

- methylpropiofenone (U-0521) and oxytetracycline. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 323:121-127
- Henseling M (1983b) Kinetic constantes for uptake and metabolism of ^3H -(-)-noradrenaline in rabbit aorta. Possible falsification of the constants by diffusion barriers within the vessel wall. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 323:12-23
- Henseling M (1984) Stereoselectivity of extraneuronal uptake of catecholamines in rabbit aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 328:219-220
- Henseling M, Eckert E, Trendelenburg U (1976) The distribution of ^3H -($\pm$)-noradrenaline in rabbit aortic strips after inhibition of the noradrenaline-metabolizing enzymes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 292:205-217
- Henseling M, Rechtsteiner D, Trendelenburg U (1978) The influence of monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase on the distribution of ^3H -($\pm$)-noradrenaline in rabbit aortic strips. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 302:181-194
- Hertting G, LaBrosse EH (1962) Biliary and urinary excretion of metabolites of 7- ^3H -epinephrine in the rat. J Biol Chem 237:2291-2295
- Hertting G, Axelrod J, Whitby LG (1961) Effects of drugs on the uptake and metabolism of ^3H -norepinephrine. J Pharmacol Exp Ther 134:146-153
- Horn AS, Coyle JT, Snyder SH (1971) Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain: structure-activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons. Mol Pharmacol 333:266-270
- Howard RB, Pesch LA (1968) Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. J Biol Chem 243:3105-3109
- Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA (1967) The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. J Cell Biol 35:675-684
- Hughes RD, Millburn P, Williams RT (1973) Biliary excretion of some diquatary ammonium cations in the rat, guinea pig and rabbit. Biochem J 136:979-984

- Hwang SW, Schanker LS (1973) Hepatic uptake and biliary excretion of N-acetyl procainamide ethobromide in the rat. *Am J Physiol* 225:1437-1443
- Iga T, Klaassen CD (1982) Uptake of bile acids by isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 31:211-216
- Iga T, Eaton DL, Klaassen CD (1979) Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 236:C9-C14
- Iversen LL (1965) The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catechol amine uptake process. *Br J Pharmacol* 25:18-33
- Iversen LL, Kravitz EA (1966) Sodium dependence of transmitter uptake at adrenergic nerve terminals. *Mol Pharmacol* 2:360-362
- Iversen LL, Salt PJ (1970) Inhibition of catecholamine uptake₂ by steroids in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 40:528-530
- Iversen LL, Salt PJ, Wilson HA (1972) Inhibition of catecholamine uptake in the isolated heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 46:647-657
- Javitch JA, Snyder SH (1984) Uptake of MPP⁺ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 106:455-456
- Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite *N*-methyl-4-phenylpyridinium by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2173-2177
- Jeejeebhoy KN, Phillips MJ (1976) Isolated mammalian hepatocytes in culture. *Gastroenterology* 71:1086-1096
- Johnson MEM, Das NM, Butcher FR, Fain JN (1972) The regulation of gluconeogenesis in isolated liver cells by glucagon, insulin, dibutyl cyclic adenosine monophosphate, and fatty acids. *J Biol Chem* 247:3229-3235
- Joseph SK, Bradford NM, McGivan JD (1978) Characteristics of the transport of alanine, serine and glutamine across the plasma membrane of isolated rat liver cells. *Biochem J* 176:827-836

- Junge U, Nagamori S, Brunner G, Söling HD (1976) Enzyme activities in liver cell culture. Em: *Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies*. Tager JM, Söling HD, Williamson JR (eds). North Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 201-206
- Kalsner S (1969) Steroid potentiation of responses to sympathomimetic amines in aortic strips. *Br J Pharmacol* 36:582-593
- Kalsner S (1975) Role of extraneuronal mechanisms in the termination of contractile responses to amines in vascular tissue. *Br J Pharmacol* 53:267-277
- Kalsner S (1976) The lack of effect of oxytetracycline on responses to sympathetic nerve stimulation and catecholamines in vascular tissue. *Br J Pharmacol* 58:261-266
- Kalsner S, Nickerson M (1969) Disposition of norepinephrine and epinephrine in vascular tissue, determined by the technique of oil immersion. *J Pharmacol Exp Ther* 165:152-165
- Kass GE, Wright JM, Nicotera P, Orrenius S (1988) The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: role of intracellular calcium. *Arch Biochem Biophys* 260:789-797
- Kaumann AJ (1972) Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 273:134-153
- Kennedy JA, de la Lande IS (1986) Effect of progesterone on the metabolism of noradrenaline in the rabbit uterine endometrium and myometrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333:368-376
- Kennedy JA, de la Lande IS (1987) Characteristics of cocaine-sensitive accumulation and O-methylation of noradrenaline by rabbit endometrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:148-154
- Kennedy JA, de la Lande IS (1988) Catecholamine inactivation in uterine tissues: changes in pregnancy in the rat. *Clin Exp Physiol Pharmacol* 15:675-680
- Kinsella JL, Holohan PD, Pessah NI, Ross CR (1979) Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 209:443-450

- Klaassen CD, Stacey NH (1982) Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. Em: *Toxicology of the Liver*. Plaa G, Hewitt WR (eds). Raven Press, New York, pp. 147-179
- Klaassen CD, Watkins JB III (1984) Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol Rev* 36:1-67
- Koe BK (1976) Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 199:649-661
- Kopin IJ (1972) Metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. Em: *Catecholamines* (Handb Exp Pharmacol, vol. 33). Blaschko H, Muscholl E (eds). Springer, Berlin, pp. 270-282
- Kopin IJ (1985) Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 37:333-364
- Kopin IJ (1992) Mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced destruction of dopaminergic neurons. Em: *Selective Neurotoxicity* (Handb Exp Pharmacol, vol. 102). Herken H, Hucho F (eds). Springer, Berlin, pp. 333-356
- Kukongviriyapan V, Stacey NH (1989) Comparison of uptake kinetics in freshly isolated suspensions and short-term primary cultures of rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 140:491-497
- Kukongviriyapan V, Stacey NH (1990) Kinetics of taurocholate efflux from freshly isolated suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* 11:750-756
- Langston JW, Ballard P, Tetrad JW, Irwin I (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980
- Lazaruk KDA, Wright SH (1990) MPP⁺ is transported by the TEA⁺-H⁺ exchanger of renal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 258:F597-F605
- LeCam A, Freychet P (1977) Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L systems in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 252:148-156

- Lefkowitz RJ, Hoffman BB, Taylor P (1991) Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic systems. Em: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds). Pergamon Press, New York, pp. 84-121
- Levin JA (1974) The uptake and metabolism of ^3H -l and ^3H -dl-norepinephrine by intact rabbit aorta and by isolated adventitia and media. *J Pharmacol Exp Ther* 190:210-226
- Levin JA, Wilson SE (1977) The effect of monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase inhibitors on the accumulation and metabolism of [^3H]norepinephrine by the adventitia and media of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 203:598-609
- Levin JA, Wilson SE (1983) Effect of inhibitors of neuronal and extraneuronal uptake on the accumulation and metabolism of ^3H -l-norepinephrine in rabbit aorta. *Blood Vessels* 20:234-244
- Lightman SL, Hems DA (1973) Metabolism of adrenaline in the isolated perfused liver of the rat. *Biochem Pharmacol* 22:2419-2423
- Lindmar R, Löffelholz K (1974) Neuronal and extraneuronal uptake and efflux of catecholamines in the isolated rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 284:63-92
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Ludwig J, Grohmann M, Trendelenburg U (1986) Inhibition by K^+ of uptake₂ of ^3H -($\pm$)-isoprenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 334:393-396
- Lund A (1951) Elimination of adrenaline and noradrenaline from the organism. *Acta Pharmacol Toxicol* 7:297-308
- Marino V, de la Lande IS, Newlyn M, Parker DAS (1993) Evidence for uptake₂-mediated O-methylation of noradrenaline in the human amnion FL cell-line. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 247:371-378

- Mayer RA, Kindt MV, Heikkila RE (1986) Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenyl-ethylamine transport. *J Neurochem* 47:1073-1079
- McKinney TD, Hosford MA (1992) Organic cation transport by rat hepatocyte basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 263:G939-G946
- Meijer DKF (1971) The cardiac glycoside sensitive step in the hepatic transport of the bisquaternary ammonium compound hexafluorenum. *Eur J Pharmacol* 15:245-251
- Meijer DKF, Bos ES, Van der Laan KJ (1970) Hepatic transport of mono- and bisquaternary ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* 11:371-377
- Meijer DKF, Mol WEM, Müller M, Kurz G (1990) Carrier-mediated transport in the hepatic distribution and elimination of drugs, with special reference to the category of organic cations. *J Pharmacokinet Biopharm* 18:35-70
- Melamed E, Rosenthal J, Cohen O, Globus M, Uzzan A (1985) Dopamine but not norepinephrine or serotonin uptake inhibitors protect mice against neurotoxicity of MPTP. *Eur J Pharmacol* 116:179-181
- Mireylees SE, Foster RW (1973) 3-methoxyisoprenaline: a potent selective uptake₂ inhibitor. *J Pharm Pharmacol* 25:833-835
- Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH (1988) Transport of guanidine in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 255:G85-G92
- Mol WEM, Meijer DKF (1990) Hepatic transport mechanisms for bivalent organic cations. Subcellular distribution and hepato-biliary concentration gradients of some steroidal muscle relaxants. *Biochem Pharmacol* 39:383-390
- Mol WEM, Müller M, Kurz G, Meijer DKF (1986) Characterization of the hepatic uptake system for organic cations with a photolabel of procainamidethobromide. *J Hepatol* 3:S44
- Mol WEM, Fokkema GN, Weert B, Meijer DKF (1988) Mechanisms for the hepatic uptake of organic cations: studies with the muscle relaxant vecuronium in isolated rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 244:268-275

- Morton AJ (1987) A role for corticosterone in the in vivo regulation of the extraneuronal uptake of [^{3} H]-isoprenaline into rat atria. *Br J Pharmacol* 91:347-353
- Moseley RH, Morrisette J, Johnson TR (1990) Transport of N'-methylnicotinamide by organic cation-proton exchange in rat liver membrane vesicles. *Am J Physiol* 259:G973-G982
- Motulsky HJ, Ransnas LA (1987) Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB J* 1:365-374
- Mytilineou C, Cohen G (1984) 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine destroys dopamine neurons in explants of rat embryo mesencephalon. *Science* 225:529-531
- Mytilineou C, Cohen G, Heikkilä RE (1985) 1-Methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) is toxic to mesencephalic dopamine neurons in culture. *Neurosci Lett* 57:19-24
- Nahrwold DL (1971) Secretion by the common duct in response to secretin. *Surg Forum* 22:386-387
- Nicol CJM, Rae RM (1972) Inhibition of accumulation of adrenaline and noradrenaline in arterial smooth muscle by steroids. *Br J Pharmacol* 44:361P
- Nobin A, Falck B, Ingemansson S, Järhult J, Rosengren E (1977) Organization and function of the sympathetic innervation of the human liver. *Acta Physiol Scand* (Suppl.) 452:103-106
- O'Donnell SR, Reid JJ (1984) Kinetic constants of isoprenaline and corticosterone for extraneuronal uptake in different cell types from various tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 325:54-61
- O'Donnell SR, Saar N (1973) A histochemical study of extraneuronal accumulation of noradrenaline in the guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 49:367-378
- O'Maille ERL, Richards TG (1977) Possible explanations for the differences in secretory characteristics between conjugated and free bile acid. *J Physiol* (London) 265:855-866
- Orrenius S (1978) In vitro systems in the study of drug metabolism and toxicity. Em: *Industrial and Environmental Xenobiotics. In Vitro versus In vivo*

- Biotransformation and Toxicity*. Fouts JR, Gut I (eds). Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 45-46
- Osswald W (1980) Introductory Remarks: Disposition of norepinephrine in the blood vessel wall. Em: *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Bevan JA, Godfraind T, Maxwell R, Vanhoutte PM (eds). Raven Press, New York, pp. 147-148
- Osswald W (1990) Oxidative deamination of noradrenaline in human blood vessels. *J Neural Transm (Suppl.)* 32:395-404
- Osswald W, Branco D (1973) The effects of drugs and denervation on removal and accumulation of noradrenaline in the perfused hind-limb of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 277:175-190
- Paiva MQ, Guimarães S (1978) A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303:221-228
- Parker DAS, de la Lande IS, Proctor C, Marino V, Lam NX, Parker I (1987) Cocaine-sensitive O-methylation of noradrenaline in dental pulp of the rabbit: comparison with rabbit ear artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335:29-39
- Parsons B, Rainbow TC (1984) High-affinity binding sites for [³H]MPTP may correspond to monoamine oxidase. *Eur J Pharmacol* 102:375-377
- Paton DM (1980) Factors influencing the magnitude and duration of responses to endogenous and exogenous noradrenaline in rabbit pulmonary artery and portal vein. *J Auton Pharmacol* 1:67-71
- Pelton EW, Kimelberg HK, Shipherd SV, Bourke RS (1981) Dopamine and norepinephrine uptake and metabolism by astroglial cells in culture. *Life Sci* 28:1655-1663
- Pileblad E, Carlsson A (1985) Catecholamine-uptake inhibitors prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain. *Neuropharmacology* 24:689-692
- Phillips MJ, Oda M, Edwards VD, Greenberg GR, Jeejeebhoy KN (1974) Ultrastructural and functional studies of cultured hepatocytes. *Lab Invest* 31:533-542

- Powis (1973a) The accumulation and metabolism of (-)-noradrenaline by cells in culture. *Br J Pharmacol* 47:568-575
- Powis G (1973b) Binding of catecholamines to connective tissue and the effect upon the responses of blood vessels to noradrenaline and to nerve stimulation. *J Physiol (London)* 234:145-162
- Reinhard JF Jr, Diliberto EJ Jr, Viveros OH, Daniels AJ (1987) Subcellular compartmentalization of 1-methyl-4-phenylpyridinium with catecholamines in adrenal medullary chromaffin vesicles may explain the lack of toxicity to adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8160-8164
- Rennick BR (1981) Renal tubule transport of organic cations. *Am J Physiol* 240:F83-F89
- Rennick BR, Kandel A, Peters L (1956) Inhibition of the renal tubular excretion of tetraethylammonium and N'-methylnicotinamide by basic cyanine dyes. *J Pharmacol Exp Ther* 118:204-219
- Russ H, Gliese M, Sonna J, Schomig E (1992) The extraneuronal transport mechanism for noradrenaline (uptake₂) avidly transports 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346:158-165
- Russ H, Sonna J, Keppler K, Baunach S, Schömig E (1993) Cyanine-related compounds: a novel class of potent inhibitors of extraneuronal noradrenaline transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348:458-465
- Salt PJ (1972) Inhibition of noradrenaline uptake in the isolated heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur J Pharmacol* 20:329-340
- Sayre LM (1989) Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Lett* 48:121-149
- Schanker LS (1968) Secretion of organic compounds in bile. Em: *Handbook of Physiology. Alimentary Canal. Bile; Digestion; Ruminal Physiology* (vol. 5). Am Physiol Soc, Washington DC, pp. 2433-2449
- Schanker LS (1972) Transport of drugs. Em: *Metabolic Pathways. Metabolic Transport* (vol. 4). Hokin LE (ed). Academic Press, London, pp. 543-579

- Schanker LS, Solomon HM (1963) Active transport of quaternary ammonium compounds into bile. *Am J Physiol* 204:829-832
- Schömig E, Schönfeld C-L (1990) Extraneuronal noradrenaline transport (uptake₂) in a human cell line (Caki-1 cells). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341:404-410
- Schömig E, Körber M, Bönisch H (1988) Kinetic evidence for a common binding site for substrates and inhibitors of the neuronal noradrenaline carrier. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337:626-632
- Schömig E, Babin-Ebbell J, Russ H, Trendelenburg U (1992) The force driving the extraneuronal transport mechanism for catecholamines (uptake₂). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 345:437-443
- Schömig E, Babin-Ebell J, Russ H (1993) 1,1'-Diethyl-2,2'-cyanine (decynium22) potently inhibits the renal transport of organic cations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347:379-383
- Schwarz R, Burr R, Schwenk M, Pfaff E, Greim H (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells. *Eur J Biochem* 55:617-623
- Schwegler JS, Schömig E, Heuner A, Silbernagl S (1990) Development of high-capacity, low-affinity L-arginine transport in a proximal tubular cell line during differentiation. In: *Amino Acids: chemistry, biology and medicine*. Lubec G, Rosenthal GA (eds). ESCOM, Rotterdam, pp. 1017-1028
- Schwenk M, Wiedman T, Remmer H (1981) Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:340-344
- Segel IH (1975) *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. John Wiley, New York
- Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13:29-83
- Shenfield GM, Hodson ME, Clarke SW, Paterson JW (1975) Interaction of corticosteroids and catecholamines in the treatment of asthma. *Thorax* 30:430-435

- Singh Y, Swanson E, Sokoloski E, Kutty RK, Krishna G (1988) MPTP and MPTP analogs induced cell death in cultured rat hepatocytes involving the formation of pyridinium metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 96:347-359
- Soares-da-Silva P, Caramona MM (1984) Dopamine, noradrenaline and adrenaline levels in some peripheral tissues: effects of 6-hydroxydopamine. *Blood Vessels* 21:145P
- Sokol, PP, Holohan PD, Ross CR (1987) The neurotoxins 1-methyl-4-phenylpyridinium and 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine are substrates for the organic cation transporter in renal brush border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 242:152-157
- Solomon HM, Schanker IS (1963) Hepatic transport of organic cations: active uptake of a quaternary ammonium compound, procainamide ethobromide, by rat liver slices. *Biochem Pharmacol* 12:621-626
- Solyom A, Lauter CJ, Trams EG (1972) Plasma membranes from isolated liver cells. *Biochem Biophys Acta* 274:631-637
- Somogyi A (1987) New insights into the renal secretion of drugs. *Trends Pharmacol Sci* 8:354-357
- Staudt K, Russ H, Gliese M, Schömig E (1993) The extraneuronal noradrenaline carrier (uptake₂) exists in the human central nervous system (CNS). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347:R118
- Steen H, Oosting R, Meijer DKF (1991) Mechanisms for the uptake of cationic drugs by the liver: a study with tributylmethylammonium (TBuMA). *J Pharmacol Exp Ther* 258:537-543
- Steen H, Merema M, Meijer DKF (1992) A multispecific uptake system for taurocholate, cardiac glycosides and cationic drugs in the liver. *Biochem Pharmacol* 15:2323-2331
- Steinberg P, Acevedo C, Masana MI, Rubio MC (1988) Uptake and metabolism of ³H-(±)-noradrenaline in the isolated perfused rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337:392-396

- Sundström E, Jonsson G (1985) Pharmacological interference with the neurotoxic action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. *Eur J Pharmacol* 110:293-299
- Sweet WD, Levin JA (1983) Two mechanisms of ^3H -catecholamine accumulation in rabbit aorta media differentiated by sensitivity to temperature and corticosterone. *Blood Vessels* 20:265-282
- Thurman RG, Kauffman FC (1980) Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol Rev* 31:229-251
- Trendelenburg U (1974) The relaxation of rabbit aortic strips after a preceding exposure to sympathomimetic amines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 281:13-46
- Trendelenburg (1986) The metabolizing systems involved in the inactivation of catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332:201-207
- Trendelenburg U (1987) The membrane potential of vascular smooth muscle appears to modulate uptake₂ of ^3H -isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:33-36
- Trendelenburg U (1988) The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Em: *Catecholamines I* (Handb Exp Pharmacol, vol. 90). Trendelenburg U, Weiner N (eds). Springer, Berlin, pp. 279-319
- Trendelenburg U (1990) The interaction of transport mechanisms and intracellular enzymes in metabolizing systems. *J Neural Transm (Suppl.)* 32:3-18
- 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
- Van den Bosch L, De Smedt H, R. Borghgraef R (1989) Characteristics of Na^+ -dependent hexose transport in OK, an established renal epithelial cell line. *Biochim Biophys Acta* 979:91-98
- Vane JR (1969) The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br J Pharmacol* 35:209-242
- Vendasalu A (1960) Studies on adrenaline and noradrenaline in human plasma. *Acta Physiol Scand (Suppl.)* 49:39-41

- Verity MA, Su C, Bevan JA (1972) Transmural and subcellular localization of monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase in rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 21:193-201
- Wanson J-C, Drochmans P, Mosselmans R, Ronveaux M-F (1977) Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. Ultrastructural characteristics of intercellular contacts and cell membrane differentiations. *J Cell Biol* 74:858-877
- Wanson J-C, Bernaert D, May C (1979) Morphology and functional properties of isolated and cultured hepatocytes. Em: *Progress in Liver Diseases* (vol. 6). Popper H, Schaffner F (eds). Grune and Stratton, New York, pp. 1-22
- Weibel ER (1973) Stereological techniques for electron microscopic morphometry. Em: *Principles and Techniques of Electron Microscopy* (vol. 3). Hayat MA (ed). Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp. 237-296
- Wiebel F, Singh J (1980) Monooxygenase and UDP-glucuronyl-transferase activities in established cell cultures. *Arch Toxicol* 44:85-97
- Wilkinson L (1989) SYSTAT: the system for statistics. SYSTAT Inc., Evanston, Ill., EUA
- Williams P, Hudgins P (1973) Actions of hydrocortisone, desoxycorticosterone acetate and progesterone on ^{14}C -norepinephrine uptake and metabolism by rabbit aorta. *Pharmacology* 9:262-269
- Wolkoff AW, Samuelson AC, Johansen KL, Nakata R, Withers DM, Sosiak A (1987) Influence of Cl^- on organic anion transport in short-term cultured rat hepatocytes and isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 79:1259-1268
- Wu EY, Smith MT, Bellomo G, Di Monte D (1990) Relationships between the mitochondrial transmembrane potential, ATP concentration, and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 282:358-362
- Zaterka S, Grossman MI (1966) The effect of gastrin and histamine on secretion of bile. *Gastroenterology* 50:500-505
- Zimmerli B, Valantinas J, Meier PJ (1989) Multispecificity of Na^+ -dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 250:301-308

- Zimon RP, Tyce GM, Flock EV, Sheps SG, Owen CA Jr (1967) Effect of monoamine oxidase inhibition on biliary excretion of metabolites of norepinephrine by isolated rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 157:89-95
- Zürcher G, Keller HH, Bruderer H, Borgulya J, Da Prada M (1988) Caratteristiche neurochimiche di una nuova classe di inibitori della COMT attivi per via orale: livelli plasmatici de DOPA e 3-OMD nel ratto trattato con DOPA e benserazide. Em: *Morbo di Parkinson e Demenze: metodologie diagnostiche*. Agnoli A, Battistin L (eds). D. Guanella SRL, Roma, pp. 15-29
- Zürcher G, Colzi A, Da Prada M (1990) Ro 40-7592: inhibition of COMT in rat brain and extracerebral tissues. *J Neural Transm (Suppl.)* 32:375-380

AGRADECIMENTOS

As primeiras palavras de agradecimento são devidas à Professora Isabel Azevedo, minha orientadora. A minha profunda admiração e reconhecimento pela forma como me orientou ao longo de todo o trabalho, pelo entusiasmo e interesse que sempre demonstrou, pela liberdade que me concedeu e pelas críticas, sempre pertinentes, que apresentou no momento certo. Gostaria ainda de expressar o meu profundo agradecimento pelo apoio e incentivos concedidos ao longo destes anos.

Ao Professor Walter Osswald, o meu reconhecimento pelo estímulo, disponibilidade, compreensão e apoio que demonstrou desde o primeiro momento, e também pelos ensinamentos científicos e humanos que sempre recordarei. Ainda o meu agradecimento por ter proporcionado a minha entrada no Instituto.

Ao Professor Serafim Guimarães o meu agradecimento pelas críticas e apoio a este trabalho, e pela constante disponibilidade demonstrada. Tenho a agradecer-lhe ainda o inestimável ambiente científico e humano que tem proporcionado no Instituto.

Ao Professor Daniel Moura o meu profundo agradecimento pelo entusiasmo e disponibilidade que sempre manifestou, e o meu reconhecimento pelas críticas valiosas e pelas palavras amigas.

Ao Professor Patrício Soares da Silva agradeço o ter permitido o meu contacto inicial com este Instituto, e ainda todo o apoio prestado.

Aos Professores Eduardo Rodrigues Pereira e Fernando Brandão agradeço todo o apoio concedido.

À Doutora Maria Quitéria Paiva agradeço o ensinamento de técnicas de trabalho laboratorial, e as sugestões e críticas valiosas que sempre me concedeu.

À D. Domingas Branco agradeço o ensinamento de técnicas de trabalho laboratorial, e o apoio e amizade demonstrados.

Aos Professores António Albino Teixeira, António Sarmento, Jorge Polónia e José António Ferreira de Almeida, e aos Drs. Alberto Mota, Alexandra Matias, Domingos Araújo, José Pedro Nunes, Manuel Pestana, Manuel Vaz da Silva, Maria Augusta Coelho, Nuno Borges, Perpétua Pinto do Ó, Rosa Begonha, Sofia Magina e Tiago Guimarães agradeço o bom ambiente no Instituto que sempre proporcionaram, e a amizade demonstrada.

Gostaria de salientar o meu agradecimento aos Drs. Nuno Borges e Perpétua Pinto do Ó, pelo convívio enriquecedor que sempre proporcionaram, e

pela amizade e disponibilidade que sempre demonstraram. Ao Dr. Nuno Borges, agradeço ainda os muitos ensinamentos na área da informática.

À D. Manuela Moura, à D. Prazeres Cleto e à Dra. Paula Serrão agradeço o rigor e dedicação nas execuções técnicas.

À D. Luísa Vasquez agradeço a disponibilidade na execução dos originais dos desenhos incluídos neste trabalho.

À D. Aida Camarinha, à D. Fernanda Melo Adrião e ao Sr. José Martins agradeço o trabalho competente de secretaria.

Aos Srs. Aldovino Sousa e Abílio Nunes agradeço o auxílio prestado na preparação dos animais de experiência.

À D. Mabilde Gomes, D. Deolinda Ramos e D. Conceição Martins agradeço o desempenho correcto das suas funções.

Ao Professor José Morais e às Dras. Rosário Lobato e Manuela Maya agradeço todo o apoio e disponibilidade nos ensinamentos da técnica de preparação de hepatócitos isolados.

Ao Professor Edgar Schömig e ao Doutor Hermann Russ gostaria de agradecer os ensinamentos da técnica de cultura de células, e todo o apoio e amizade demonstrados.

Um agradecimento especial é devido à Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, pela Bolsa de Doutoramento que me permitiu realizar este trabalho, bem como pelos subsídios para a realização de um estágio no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia de Lisboa e no Departamento de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Würzburg, e ainda para a participação no 7th International Catecholamine Symposium, em Amsterdão. Gostaria de sublinhar a forma simpática e eficiente como a Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica sempre respondeu a todas as necessidades levantadas durante este período.

Por último, gostaria de agradecer aos meus pais, aos meus irmãos e ao José Joaquim o terem tornado possível este trabalho. A eles dedico esta dissertação.