MARIA QUITÉRIA DA SILVA PAIVA

ACÇÕES PRÉ E PÓS-JUNCIONAIS DA 5-HIDROXITRIPTAMINA A NÍVEL VASCULAR: INTERACÇÕES COM O MEDIADOR ADRENÉRGICO

PORTO 1989

D

Maria Quitéria da Silva Paiva

ACÇÕES PRÉ E PÓS-JUNCIONAIS DA 5-HIDROXITRIPTAMINA A NÍVEL VASCULAR: INTERACÇÕES COM O MEDIADOR ADRENÉRGICO

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

Porto - 1989

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

Aos Professores

José Ruiz de Almeida Garrett

Walter Friedrich Alfred Osswald

Serafim Correia Pinto Guimarães

A todos quantos trabalham no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto

A Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Á minha família

Aos meus amigos

O estudo das acções das aminas simpaticomiméticas a nível vascular constitui desde há muitos anos um dos problemas dominantes nas preocupações investigacionais do Laboratório de Farmacologia. Fiz delas também as minhas preocupações quando, em boa hora, entrei neste Laboratório.

As dúvidas que puderam existir, quanto a uma mudança de rumo, ao escolher o tema para esta dissertação, depressa se dissiparam. Na verdade à medida que se tem avançado no conhecimento dos mecanismos de actuação da 5-hidroxitriptamina mais evidentes se tornam as semelhanças e as ligações desta amina com o mediador adrenérgico.

Pareceu-nos pois uma feliz e oportuna escolha . Feliz, porque se situava no campo investigacional em que sempre trabalhamos, oportuna, pela sua actualidade e importância que estão bem patenteadas no enorme número de trabalhos recentemente publicados e nos frequentes encontros científicos que tem motivado.

Com a certeza de que com algo de novo se contribuiu ao apresentar este trabalho, mas com a humildade de reconhecer que mais e melhor poderia ter sido feito, sentimos como nossas as palavras de Santo Agostinho " *procuramos com o desejo de encontrar e encontramos com o desejo de procurar ainda* ".

É dever de justiça e gratidão assinalar que este trabalho não é apenas obra minha. Resulta da ajuda directa de alguns e indirecta de todos, que ao proporcionarem um ambiente de trabalho onde a tolerância, o respeito e a amizade são regra , facilitaram a minha tarefa.

Ao Senhor Professor Walter Osswald são devidas as primeira palavras de agradecimento pela orientação científica desta dissertação. A minha profunda admiração e reconhecimento pela forma como me responsabilizou, pela liberdade que me permitiu e pela crítica e incentivo com que sempre me acompanhou. Ainda o meu reconhecimento por ter proporcionado a minha entrada definitiva no Laboratório de Farmacologia e por todo o apoio e estímulo que ao longo dos anos me tem concedido.

Ao Senhor Professor José Garrett, para além do agradecimento pelo apoio concedido desde a primeira hora a este trabalho, quero manifestar a minha admiração e estima pelo Chefe, sob cuja direcção tive o privilégio de trabalhar. Pelo estímulo, pela disponibilidade, pela compreensão e amizade que sempre foram seu timbre, bem haja. Ainda o meu vivo reconhecimento por me ter aberto as portas deste Laboratório em circunstâncias difíceis e só ultrapassáveis pelo Homem que se empenha em servir e não em ser servido.

Ao Senhor Professor Serafim Guimarães o meu agradecimento pelas críticas e apoio a este trabalho. Pelo meu crescimento científico, como resultado de trabalho em estreita colaboração e sob a sua orientação em clima de amizade e de diálogo, o meu reconhecimento e gratidão. Ainda o meu mais vivo apreço pela confiança que em mim depositou e pelo entusiasmo que me transmitiu desde a primeira hora, ao convidar-me para que colaborasse na investigação com o Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina.

A solidariedade dos Professores Eduardo Rodrigues Pereira, Jorge Castro-Tavares , Isabel Azevedo, Patrício Soares-da-Silva e Helena Fernandes o meu reconhecimento.

Ao Professor Fernando Brandão, para além da solidariedade, agradeço os ensinamentos que me serviram neste trabalho.

Ao Professor Daniel Moura, sempre pronto na ajuda e na paciência para escutar, agradeço as críticas e incentivos de todos os momentos.

À Professora Margarida Caramona devo a amizade e o companheirismo nas horas de trabalho comum.

À Domingas Branco o meu reconhecimento pela amizade e pela sempre pronta disponibilidade na ajuda.

Aos Drs Domingos Araújo, José Guilherme Monteiro, António Albino Teixeira, Berta Quintas, António Sarmento, Jorge Polónia, Manuel Vaz da Silva e Pedro Nunes o meu reconhecimento pela solidariedade e pela palavra amiga.

À Manuela Moura agradeço o seu rigor e singular dedicação nas execuções técnicas. À Maria Luísa Vasques o meu agradecimento pela disponibilidade na execução dos originais dos desenhos incluidos neste trabalho. À Aida Santos o meu apreço pela disponibilidade no trabalho de secretaria e pela palavra amiga. À Eva Abrantes e Sr José Martins o meu agradecimento pela sempre pronta ajuda no trabalho de secretaria. Aos Srs Aldovino Sousa, Abílio Nunes e Mabilde Gomes agradeço o auxílio prestado na preparação de animais e de material para a realização das experiências.

A todos quantos trabalham no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Farmácia a minha expressão de estima e apreço pela forma como sempre me receberam.

Aos Drs Jorge Proença e Jorge Gonçalves agradeço a amizade e apoio de todas as horas. Ao Dr Jorge Gonçalves devo por inteiro a orientação gráfica e ainda o entusiasmo e os esforços a que não se poupou na execução gráfica deste trabalho. À Maria Fernanda Pereira agradeço o empenho posto na execução gráfica de parte deste trabalho.

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

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

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

Paiva MQ, Osswald W (1980) Inactivation of some vasoconstrictor agonists by saphenous vein strips of the dog *J Pharm Pharmacol* **32**: 227 - 228

Paiva MQ, Caramona MM, Osswald W (1984) Intra - e extraneuronal metabolism of 5-hydroxytryptamine in the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **325**: 62-68

Paiva MQ, Caramona MM, Osswald W (1988) The actions of 5-hydroxytryptamine receptor agonists and antagonists at pre- and postjuncional level on the canine saphenous vein. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **338**: 616-622

A contribuição pessoal consistiu na:

-colaboração no planeamento e estabelecimento do protocolo experimental;

-realização da maioria das experiências;

-colaboração na discussão dos resultados e na elaboração dos trabalhos mencionados.

Abreviaturas:

5-HT = 5-hidroxitriptamina;

5-HT-^{3}H = 5-hidroxitriptamina tritiada;

NA = noradrenalina;

NA-^{3}H = noradrenalina tritiada;

8-OH-DPAT = bromidrato de (+) - 8-hidroxi-dipropilaminotetralina;

U-0521 = 3,4-di-hidroxi-2-metilpropiofenona;

UK14304 = 5-bromo-6-(2-imidazolina-2-ilamino)-quinoxalina.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Descrição geral

2. Experiências para registo da actividade contráctil

2.1. Determinação de curvas concentração-resposta pelo método cumulativo.

2.1.1 Influência dos locais de perda na sensibilidade à 5-HT.

2.1.2 Efeito de fármacos antagonistas.

2.2. Inactivação da 5-HT em experiências de imersão em óleo.

2.3. Interacção da 5-HT com agonistas adrenérgicos.

3. Experiências de incubação com compostos marcados

3.1. Incubação com 5-HT-^{3}H; determinação dos metabólitos totais e da 5-HT-^{3}H acumulada nos tecidos.

3.2. Incubação com NA-^{3}H; influência da 5-HT na acumulação e metabolização da NA-^{3}H.

3.3. Determinação do espaço extracelular.

4. Experiências de incubação e perifusão para o estudo da libertação de aminas marcadas

4.1. Captação, distribuição e libertação de 5-HT-^{3}H

4.1.1. Determinação dos compartimentos de distribuição

4.1.2. Captação neuronial e libertação por estimulação electrica

4.2. Influência da 5-HT na libertação da NA-^{3}H por estimulação electrica

4.2.1. Influência da incubação com 5-HT

4.2.2. Influência da adição de 5-HT (e de 8-OH-DPAT) ao líquido de perifusão

5. Doseamento da radioactividade

6. Estatística

7. Fármacos usados.

III. RESULTADOS E COMENTÁRIOS

1. Captação, distribuição, inactivação e libertação da 5-HT

1.1. Influência dos locais de perda na sensibilidade à 5-HT

1.2. Inactivação da 5-HT pelo método de imersão em óleo

1.3. Acumulação e metabolização da 5-HT-^{3}H

1.4. Análise dos compartimentos de distribuição da 5-HT-^{3}H

1.5. Libertação por estimulação eléctrica da 5-HT-^{3}H acumulada nas terminações nervosas

1.6. Comentários

2. Efeito contráctil da 5-HT (estimulação de receptores pós-juncionais)

Comentários.

3. Interacção com a mediação adrenérgica

3.1. Interacção a nível da captação e metabolização de NA-^{3}H

3.2. Interacção a nível da libertação da NA-^{3}H por estimulação electrica das terminações nervosas (nível pré-juncional)

3.2.1. Efeito da incubação com 5-HT na libertação de NA-^{3}H

3.2.2. Efeito da adição de 5-HT ao líquido de perifusão na libertação de NA-^{3}H

3.2.3. Efeito da adição de 8-OH-DPAT ao líquido de perifusão na libertação de NA-^{3}H

3.2.4. Modificação por vários fármacos do efeito da 5-HT na libertação de NA-^{3}H.

3.3. Interacção a nível do efeito contráctil (nível pós-juncional)

3.4. Comentários

IV. DISCUSSÃO GERAL

V. RESUMO

VI. SUMMARY

VII. BIBLIOGRAFIA

"Serotonin was gotten out of blood because of its nuisance value in the search for the vasoactive angiotonin. It has proved to be a nuisance of quite a different sort.
... substances that are nuisances to one person give tenure to others... "

Irvine H. Page (1958)

I. INTRODUÇÃO

Mais de cem anos se passaram desde que se verificou que o sangue, após coagulação, possui capacidade vasoconstritora. A presença de "material" vasoconstritor não identificado (designado por uma variedade de nomes) era causa de perturbações frequentes nas experiências de perfusão com sangue desfibrinado embora já se conhecesse empiricamente que ele podia ser eliminado por passagem do sangue através dos pulmões, um fenómeno que agora se sabe ser devido à sua captação e destruição enzimática pelas células do endotélio dos vasos pulmonares.

Na década de 1930-40, interessado na identificação dos agentes humorais responsáveis pela hipertensão, I. Page viu-se confrontado com o "material" vasoconstritor que aparecia no soro. O plasma cuidadosamente preparado não tinha propriedades vasoconstritoras. Assim qualquer vasoconstritor isolado do sangue de hipertensos deveria ser sempre considerado suspeito porque não era seguro que não tivesse ocorrido alguma coagulação. Antes de prosseguir na pesquisa de substâncias responsáveis pela hipertensão era imperativo controlar o misterioso agente vasoconstritor resultante da coagulação (Page 1954). Rapport *et al* (1948) isolaram do soro a substância vasoconstritora sob a forma de complexo cristalino, a que deram o nome de serotonina. Pouco tempo depois Rapport (1949) mostrou que a metade activa do complexo (que tinha recebido o nome de

serotonina) era a 5-hidroxitriptamina.

De modo completamente independente, mas também na década 30-40, Erspamer e colaboradores encetaram um trabalho com o propósito de extrair e caracterizar a substância responsável pelas propriedades histoquímicas peculiares das células enterocromafins da mucosa gastrintestinal. As experiências conduziram à descoberta, primeiro na mucosa e depois noutros tecidos, de um factor de natureza básica com acção estimulante do intestino e que foi designado por enteramina. Esta substância foi mais tarde identificada por Erspamer e Asero (1952) como sendo idêntica à 5-hidroxitriptamina.

Com a descoberta da 5-hidroxitriptamina e a possibilidade da sua obtenção por síntese em 1951, abriu-se um vasto campo de pesquisa, no domínio das indolalquilaminas com um período de trabalho intenso em que se obteve uma imensa quantidade de dados experimentais cujo interesse ultrapassou rapidamente os limites da farmacologia. Factor importante no rápido desenvolvimento da investigação neste domínio foi a hipótese de a 5-HT poder exercer funções de mediação química a nível central, à semelhança do que se conhecia a nível periférico para a acetilcolina e noradrenalina. Esta hipótese surgiu com base em certos factos de que se destacam : a) a descoberta da presença de 5-HT no cérebro (Twarog e Page 1953); b) a verificação de que vários compostos , estruturalmente relacionados com a 5-HT e que bloqueavam o efeito desta amina a nível do músculo liso, eram capazes de influenciar a actividade mental; c) a capacidade que certos fármacos antipsicóticos tinham de reduzir a concentração da amina no tecido cerebral.

Assim o estudo das indolalquilaminas, especialmente do seu metabolismo conduziu à explicação de mecanismos de acção de fármacos, à clarificação da patogénese de alguns síndromes mórbidos e a achados importantes no campo terapêutico. A descoberta dos inibidores da monaminoxídase e da dopadescarboxílase e de fármacos que bloqueavam o armazenamento de aminas biogénicas no organismo estão entre os resultados mais impressionantes obtidos nos anos que se seguiram à descoberta da 5-HT.

A 5-HT aparece largamente distribuída em ambos os reinos animal e vegetal. No

reino animal está presente quer nos vertebrados quer nos invertebrados. Os locais mais importantes em que se encontra nos mamíferos são: as células enterocromafins da mucosa gastrintestinal (contém cerca de 90% do total da 5-HT do organismo), as plaquetas e o sistema nervoso central (onde é mediador em certos neurónios). A glândula pineal contém 5-HT que funciona como precursor da melatonina. Detectou-se ainda em outros tecidos, nomeadamente coração, rim, baço e tiroide (Erspamer 1966 a; Tyce 1985).

Identificaram-se neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos no sistema nervoso periférico do tracto gastrintestinal do Rato, Ratinho e Cobaia. Depois da identificação da 5-HT como neurotransmissor entérico verificou-se a sua presença noutros tecidos nervosos periféricos, tais como, as fibras nervosas das artérias cerebrais, os gânglios cervical-superior e nodoso e a medula suprarrenal (Gershon e Tamir 1985). São várias as publicações que referem a existência de nervos 5-hidroxitriptaminérgicos nos vasos cerebrais de várias espécies animais (Griffith *et al* 1982; Edvinsson *et al* 1983, 1984). Estes resultados são contudo postos em causa por alguns autores (Saito e Lee 1987; Yu e Lee 1989), os quais mostraram que as fibras nervosas que continham 5-HT eram fibras simpáticas que captavam 5-HT proveniente possivelmente do sangue circulante e ou de neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos centrais que a libertavam para os espaços intersticiais.

Como dado com grande interesse na atribuição de um papel fisiológico à 5-HT verifica-se que é sintetizada na maior parte dos tecidos em que está armazenada. Praticamente só as plaquetas não a sintetizam. A 5-HT contida nas plaquetas tem a sua origem nas células enterocromafins do tracto gastrintestinal. Liberta-se destas células para o plasma e a parte que não é destruída pelo fígado ou endotélio pulmonar é captada, normalmente por um processo activo (Stoltz 1985). O processo de captação e armazenamento nas plaquetas é idêntico àquele mediante o qual se processa a captação e armazenamento das catecolaminas e que opera ao nível dos nervos adrenérgicos. Não é, por isso, de admirar que os inibidores da captação neuronial das catecolaminas bloqueiem a captação da 5-HT e que esta seja captada pelos terminais adrenérgicos podendo deslocar o mediador existente nas vesículas e fixar-se nestas estruturas, de onde pode ser libertada por

estímulos adequados, comportando- se como falso mediador ou eventualmente como co-mediador.

De modo semelhante ao que se verifica com as catecolaminas, a reserpina impede a fixação da 5-HT aos seus depósitos tecidulares levando a uma diminuição marcada do conteúdo de 5-HT no organismo (Page 1958).

A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido essencial L-triptofano que, por uma hidroxilação origina o 5-hidroxitriptofano que é depois descarboxilado a 5-hidroxitriptamina. Assim a biogénese da 5-HT obedece a um esquema geral de formação muito semelhante ao de outras aminas no organismo. Normalmente não se utiliza mais do que 2% do triptofano fornecido pela dieta para a síntese diária de cerca de 10 mg de 5-HT. As enzimas que intervem na biossíntese da 5-HT (hidroxílase do triptofano, descarboxílase de ácidos aromáticos) são muito semelhantes ou até as mesmas (descarboxílase de ácidos aromáticos) que intervem na formação de catecolaminas. O factor limitante na síntese da 5-HT é a hidroxílase do triptofano, uma enzima que aparece somente nas células que sintetizam 5-HT (Hagen e Cohen 1966; Tyce 1985; Osswald 1986).

Também, à semelhança do que acontece com a síntese, o processo de metabolização apresenta analogias com o das catecolaminas. A maior via de inactivação da 5-HT é a desaminação oxidativa. A monaminoxídase A transforma a 5-HT num composto instável, o aldeído 5-hidroxindolacético. Este aldeído dá origem por acção da desidrogénase aldeídica ao ácido 5-hidroxindolacético ou por acção da redútase aldeídica ao 5-hidroxitriptofol. Em circunstâncias normais a oxidação a ácido 5-hidroxindolacético é a via predominante. Conhecem-se ainda outras vias metabólicas de menor importância, entre as quais a metilação do grupo hidroxilo (pela 5-hidroxindol-metiltransférase que tem como dador de metilo a S-adenosilmetionina), quer para a 5-HT quer para os seus metabólitos desaminados. Os metabólitos presentes na urina dão uma indicação da quantidade de 5-HT formada e degradada no organismo desde que se suprimam da dieta os alimentos ricos em 5-HT (Blaschko e Levine 1966; Tyce 1985; Osswald 1986).

É enorme a lista de trabalhos que nos dão conta dos diversos efeitos

farmacológicos, fisiológicos e patológicos da 5-HT estudados no decorrer dos anos (Page 1954, 1958; Erspamer 1966 b; Mantegazzini 1966; Douglas 1985; etc) mas é certamente a nível do sistema nervoso central, gastrintestinal e cardiovascular que ela tem maior expressão.

Está ainda mal avaliada a função fisiológica da 5-HT apesar de se conhecer bem a sua distribuição no organismo, o seu modo de formação e inactivação e muitas das suas acções farmacológicas, bem como o seu envolvimento em algumas situações patológicas. O tumor carcinoide ilustra bem as suas implicações em situações patológicas. Trata-se de um tumor das células enterocromafins em que a massa tumoral (e eventuais metástases) produz e liberta quantidades elevadas de 5-HT, bradicinina, substancia P, histamina e vários polipeptídeos. A determinação de 5-HT no sangue e dos seus metabólitos na urina pode ser de interesse para a detecção do tumor (Ahlman 1985).

Outra patologia de há muito conotada com a 5-HT é a enxaqueca. As primeiras indicações que apontaram para o envolvimento da 5-HT na patogénese da enxaqueca resultaram do conhecimento da eficácia do metisergide na profilaxia dos ataques e da observação de que alguns doentes excretavam quantidades aumentadas de ácido hidroxindolacético durante as crises. É mal conhecido o mecanismo fisiopatológico responsável pelo aparecimento da enxaqueca. Segundo alguns investigadores a enxaqueca seria precedida de uma redução de 5-HT no sangue - causada por uma rápida libertação das plaquetas e excreção na urina - segundo outros apareceria como resultado de uma actividade anormalmente aumentada dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos (originados no núcleo de rafe) que inervam os vasos sanguíneos cerebrais. Foram os achados farmacológicos que proporcionaram a maior evidência da implicação da 5-HT na patogénese da enxaqueca (Fozard 1985, 1987 b; Saxena 1987; Saxena e Ferrari 1989).

Outras importantes patologias parecem estar também relacionadas com a dinâmica da 5-HT a nível central: a ansiedade, as perturbações do sono e a depressão. Nestas duas últimas situações parece haver uma deficiência de 5-HT.

São vários os trabalhos que indiciam a intervenção da 5-HT na génese de doenças

cardiovasculares - doenças vasculares periféricas, fenómeno de Raynaud, espasmo coronário, espasmo vascular cerebral, hipertensão e eclampsia; contudo está ainda por esclarecer qual o seu papel na patogenia destas manifestações (Van Zwieten 1987).

Por estar fora do âmbito da nossa investigação e para evitar a extensão de matéria a incluir, não nos referiremos às acções farmacológicas da 5-HT em todos os territórios. Apenas consideraremos os aspectos gerais relacionados com o sistema cardiovascular, atribuindo particular realce às acções farmacológicas a nível vascular.

Desde há muito se sabe que a 5-HT exerce múltiplas e complexas acções a nível cardiovascular. As respostas vasculares à 5-HT no animal intacto são altamente variáveis. É sempre necessário indicar as condições experimentais em que são obtidas. As respostas diferem não só entre espécies, mas também entre animais da mesma espécie e mesmo em testes sucessivos no mesmo animal. Esta variabilidade, que é responsável pelo relato de resultados discrepantes, foi atribuída ao facto dos efeitos da 5-HT serem mediados reflexamente e ainda ao aparecimento de taquifilaxia (quando a 5-HT é administrada em intervalos curtos). Contudo, à luz de conhecimentos mais recentes, parece que esta variabilidade poderá também ser devida à existência de uma grande multiplicidade de receptores e de uma grande variedade de células (músculo, nervo e endotélio) onde a 5-HT actua para controlar o tono vascular.

Page e Mc Cubin (1953) usaram o termo "anfibárico" para descrever as acções desta amina. Usualmente ela é capaz de desencadear respostas pressoras e depressoras mas, em certos casos, apenas aparece um destes dois tipos de resposta. No decorrer do tempo tem sido referida por vários autores como "amina de efeito imprevisível" ou como podendo causar " quer constrição quer dilatação" ou como causadora de "heterogeneidade de respostas no músculo liso vascular" (Vanhoutte e Cohen 1983). As alterações no fluxo e na pressão sanguínea são o reflexo das mudanças de tono que a amina produz quer a nível pré quer pós-capilar; produz contracção da maior parte das artérias e veias, constrição das vénulas e dilatação das arteríolas. Na microcirculação é capaz de causar edema sendo em

algumas espécies mais potente que a histamina.

Os mecanismos pelos quais a 5-HT pode desencadear as suas respostas são múltiplos. A vasoconstrição pode resultar de : 1) activação de receptores específicos da 5-HT existentes nas células musculares lisas; 2) ampliação das respostas vasoconstritoras a outros mediadores neuro-humorais (noradrenalina, angiotensina II, prostaglandinas $F_{2\alpha}$, histamina) ; 3) activação de receptores alfa pós-juncionais; 4) efeito simpaticomimético indirecto, por deslocamento de noradrenalina armazenada nas vesículas dos terminais adrenérgicos; 5) activação de receptores da 5-HT nas plaquetas causando libertação da própria amina ou de outras substâncias vasoconstritoras (tromboxano A_2) . A vasodilatação pode resultar de: 1) inibição da transmissão adrenérgica, por actuação a nível de receptores pré-juncionais; 2) activação de receptores da 5-HT existentes nas células musculares lisas; 3) activação de receptores adrenérgicos ß 4) activação de receptores a nível do endotélio, causando a libertação do factor de relaxamento; 5) activação de nervos autónomos inibidores (causando provavelmente libertação de polipeptídeo intestinal vasoactivo; 6) aumento da produção de prostaciclina (Van Nueten e Vanhoutte 1984; Van Nueten *et al* 1985 a, b; Vanhoutte 1987).

Embora causando contracção na maior parte dos grandes vasos, existem contudo diferenças na sensibilidade entre os tecidos vasculares de diferentes espécies e, dentro da mesma espécie, entre os vasos de diferente origem anatómica (Van Nueten 1983). A 5-HT é mais potente que a noradrenalina nas artérias coronárias, cerebrais , umbilicais e pulmonares. A quantidade que se liberta por agregação plaquetária é suficiente para causar contracção do músculo vascular numa grande variedade de casos (Cohen e Vanhoutte 1985; De Clerck e Reneman 1985).

As respostas contrácteis podem ser moduladas por diversos factores. Em alguns casos a presença de endotélio atenua as contracções (Cohen e Vanhoutte 1985). A hipoxia e abaixamento da temperatura aumentam a resposta (Van Nueten *et al* 1985 b). Aumentos na sensibilidade surgem também no decorrer de alterações patológicas tais como

aterosclerose e hipertensão, embora se conheçam mal os mecanismos responsáveis por esse aumento (Webb e Vanhoutte 1985).

O efeito vasodilatador da 5-HT observa-se principalmente no organismo intacto mas pode ser demonstrado *in vitro* nos grandes vasos em condições experimentais adequadas. Manifesta-se sobretudo quando o tono é elevado. Tem-se observado relaxamento nas artérias coronárias, artérias cerebrais, veias safenas, circulação nasal canina, leito vascular perfundido de estômago de Cobaia. Em muitas circunstâncias é o bloqueio da contracção que permite desmascarar o relaxamento. Embora o relaxamento possa resultar da activação das células musculares parece que as respostas mais potentes se devem à activação das células endoteliais com a subsequente libertação do factor de relaxamento do endotélio (Van Nueten *et al* 1985 b).

A importante observação (que constitui um marco na história da caracterização de receptores da 5-HT) de que fármacos distintos antagonizavam as diferentes acções da 5-HT no íleo de Cobaia sugeriu a existência de 2 tipos de receptores para a 5-HT (Gaddum e Picarelli 1957): receptores M sensíveis à morfina e receptores D sensíveis à "dibenzilina" (fenoxibenzamina). Estes fármacos revelaram-se no entanto de pouca utilidade para a classificação de receptores por falta de especificidade. Aplicou-se posteriormente o termo de "receptor D" a receptores numa variedade de preparações do músculo liso onde a dietilamida do ácido lisérgico e análogos (incluindo o metisergide) antagonizavam especificamente as acções contrácteis da 5-HT. Subsequentemente encontrou-se no íleo de Cobaia mais tipos de receptores do que os então descritos por Gaddum e Picarelli. De modo idêntico, noutras preparações incluindo as vasculares, receptores que não pertenciam ao tipo D ou M mediavam efeitos da 5-HT.

Peroutka e Snyder (1979) mostraram que a dietilamida do ácido lisérgico possuia alta afinidade para dois "locais" distintos de ligação da 5-HT em tecidos cerebrais. A 5-HT tinha alta afinidade para um desses locais, que foi designado por 5-HT_1 enquanto que para o outro, que foi designado 5-HT_2 era a espiperona a mais afim.

Com a descoberta recente de uma variedade de fármacos relativamente selectivos tentou-se obter uma nomenclatura que integrasse a classificação de Gaddum e Picarelli com a de Peroutka e Snyder. A despeito de várias discrepâncias os dados sugerem a existência de 3 principais tipos de receptores. Os receptores D do íleo de Cobaia e da aorta de Coelho que tem características semelhantes aos locais de ligação 5-HT_2 são referidos como receptores 5-HT_2. Ao receptor M atribuiu-se a designação de 5-HT_3. Designou-se o outro grupo de receptores como receptores "tipo 5-HT_1". Enquanto que para os receptores 5-HT_2 e 5-HT_3 se conhecem antagonistas relativamente selectivos, para os receptores "tipo 5-HT_1" não há nenhum antagonista satisfatoriamente selectivo. Este grupo de receptores além de ser mal definido é um grupo heterogéneo. Distinguiram-se, no entretanto, vários subtipos de "locais" de ligação designados por 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} e 5-HT_{1D} com radioligandos relativamente selectivos. Há também já evidência da heterogeneidade de receptores do tipo 5-HT_3 e 5-HT_2.

Trabalhos publicados por Fozard (1984 a, 1987 a), Peroutka (1984, 1988), Bradley *et al* (1986), Göthert (1986), Göthert e Schlicker (1987) e Hartig (1989) dão-nos referências ácerca dos progressos obtidos nos últimos anos no campo da identificação e classificação de receptores da 5-HT.

E bem conhecido que os três diferentes tipos de receptores (5-HT_1, 5-HT_2 e 5-HT_3) estão envolvidos na regulação da actividade cardiovascular. Trabalhos recentes apontam ainda para o possível envolvimento de um novo tipo de receptores na mediação dos efeitos da 5-HT a este nível (Bom *et al* 1988; Molderings *et al* 1989).

Os receptores vasculares têm sido estudados quer no animal inteiro, quer em preparações isoladas, mas é sobretudo nestas últimas que a análise tem sido mais exaustiva. Embora em alguns vasos a contracção induzida pela 5-HT seja mediada por activação directa de receptores adrenérgicos alfa, na maior parte dos casos é mediada por receptores específicos, nomeadamente receptores 5-HT_2. Conhecem-se no entanto, algumas situações em que é mediada por receptores "tipo 5-HT_1". Este tipo de receptores

medeia também o relaxamento muscular induzido pela 5-HT por activação de receptores presentes quer nas células musculares quer nas endoteliais (em alguns casos o relaxamento é mediado por receptores adrenérgicos beta) e medeia ainda o efeito da 5-HT a nível pré-juncional que se traduz na diminuição do mediador induzida por despolarização dos nervos simpáticos (Göthert 1986). Não se conhece a existência de receptores 5-HT_3 nos vasos, mas sabe-se que estão presentes nas terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas do coração e que da sua estimulação pela 5-HT resulta um aumento da libertação dos mediadores (Richardson e Engel 1986).

O nosso interesse pelo estudo das acções da 5-HT a nível vascular surgiu na sequência de trabalho realizado com a finalidade de verificar se a técnica de imersão em óleo descrita por Kalsner e Nickerson (1986 a, b), correntemente usada no Laboratório de Farmacologia para estudo da inactivação do mediador adrenérgico seria adequada para o estudo da inactivação de diversos agonistas vasoconstritores (Paiva e Osswald 1980). De facto, foi possível mostrar quais os mecanismos responsáveis pela inactivação dos diversos agonistas e, nomeadamente para a 5-HT, verificar que a captação neuronial e a desaminação oxidativa desempenhavam um papel importante na inactivação desta amina pela veia safena de Cão.

Nessa altura, sugestionados pelas semelhanças existentes entre a 5-HT e o mediador adrenérgico - ambas aminas biogénicas, sintetizadas e inactivadas por processos relativamente semelhantes, captadas para os nervos por mecanismo idêntico, susceptíveis de ser libertadas para a corrente sanguínea (embora de origem diferente), desencadeando na maior parte dos casos contracção a nível vascular, ambas implicadas em situações patológicas de certa analogia (feocromocitoma e tumor carcinóide) - e também porque se conhecia bem o comportamento da veia safena de Cão em relação a este mediador decidimos usar esta estrutura para estudar tão extensamente quanto possível as acções da 5-HT.

Neste estudo encaramos fundamentalmente: a captação. a inactivação extra e intraneuroniais e a libertação dos nervos; a actuação a nível de receptores pré e pós-juncionais, com vista à sua caracterização; e ainda as possíveis interacções com o mediador adrenérgico.

Cremos que os nossos resultados poderão contribuir para o esclarecimento de alguns dos pontos considerados no trabalho que nos propusemos realizar.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Descrição geral

Usaram-se, na maior parte das experiências, veias safenas de Cão , retiradas de animais de raça indeterminada (8-20 Kg de peso), anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/Kg injectado intravenosamente na pata anterior). Removeram-se segmentos de ambas as veias safenas laterais proximalmente à junção dos ramos plantar e dorsal. Com os segmentos retirados prepararam-se tiras por corte helicoidal (Guimarães e Osswald 1969). Em algumas experiências (experiências de incubação) usaram-se segmentos da artéria mesentérica anterior dos quais se obtiveram tiras por corte longitudinal.

2. Experiências para registo da actividade contráctil

Suspenderam-se tiras de veia safena de cerca de 2 cm de comprimento em banho de órgãos isolados de 20 ml de capacidade contendo solução de Krebs-Henseleit (com a seguinte composição em mmol/l: NaCl, 118,6; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 2,52; KH_2PO_4, 1,18; $MgSO_4$ $7H_2O$, 1,23; $NaHCO_3$, 25,0; Glicose, 10,0; Acido ascórbico, 0,057; Etilenodiaminotetracetato de sódio 0,027.) a 37°C, oxigenada com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. Prendeu-se uma das extremidades da tira a uma haste de suporte e a outra a uma alavanca isotónica de inscrição frontal com ampliação de 5-6 vezes, suportando as preparações um peso de 1,5 a 2 g. Para o registo das respostas contrácteis usou-se o

quimógrafo com cilindro e papel coberto de negro de fumo. Deixaram-se estabilizar as preparações durante 60 a 90 minutos com mudanças de líquido nutritivo de 20 em 20 minutos.

2.1. Determinação de curvas de concentração-resposta pelo método cumulativo

Obtiveram-se curvas de concentração-resposta para os diferentes agonistas pelo método cumulativo, adicionando ao banho a quantidade necessária de agonista para obter concentrações multiplicadas por um factor 3 até ser atingida a resposta máxima. Determinaram-se em cada preparação duas ou três curvas, obtidas com um intervalo de 60 minutos entre o fim de cada uma das curvas e o início da seguinte, com 5 substituições da solução de Krebs-Henseleit durante esse período de tempo.

Fez-se a representação das curvas em um sistema de coordenadas cartesianas dispondo em ordenadas as respostas expressas em percentagem da resposta máxima e em abcissas o logaritmo das concentrações molares do agonista. Sempre que possível calculou-se em cada curva, por interpolação gráfica, a concentração necessária do agonista para obter 50% de resposta máxima (CE_{50}). Em alguns casos calculou-se também por interpolação gráfica a CE_{30} (concentração necessária do agonista para obter 30% da resposta máxima)

2.1.1. Influência dos locais de perda na sensibilidade à 5-HT

Para estudar o papel desempenhado pela captação neuronial e pela captação extraneuronial nas respostas à 5-HT, usaram-se como bloquedores desses locais de perda, a cocaína (12µmol/l) e a hidrocortisona (40µmol/l). Estes fármacos adicionaram-se ao banho 30 minutos antes da obtenção da 2ª curva e mantiveram-se no banho até ao fim da

experiência. Para inibir a actividade da monaminoxidase pré-incubaram-se as tiras durante 30 minutos com 1 mmol/l de pargilina e lavaram-se com solução nutritiva durante 30 minutos por 6 vezes.

Em algumas experiências usaram-se tiras desnervadas . A desnervação foi feita por pinçagem durante 5 minutos , com 2 pinças arteriais, após isolamento e exposição da veia safena lateral segundo o método descrito por Branco et al (1984). Este procedimento reduziu o conteúdo de noradrenalina para valores inferiores a 5% dos obtidos na veia controlo. Cinco dias após a cirurgia retirou-se o segmento de veia compreendido entre os dois locais de pinçagem. Usaram-se também tiras da veia safena contralateral com cirurgia simulada (tratadas de modo idêntico às desnervadas, mas com exclusão da pinçagem).

Realizaram-se experiências de controlo na ausência dos bloqueadores dos locais de perda para avaliar eventuais mudanças espontâneas da sensibilidade das preparações. Estas experiências mostraram não haver mudança significativa da CE_{50} durante o decurso das experiências.

A influência dos bloqueadores dos locais de perda na sensibilidade à 5-HT foi expressa pelo cociente entre as CE_{50} (CE_{50} na ausência do bloqueador / CE_{50} na presença do bloqueador).

2.1.2. Efeito de fármacos antagonistas

Obtiveram-se curvas concentração-resposta à 5-HT, 8-OH-DPAT e noradrenalina na ausência (1ª curva) e na presença de vários antagonistas que se adicionaram ao banho 30 minutos antes da obtenção da 2ª ou 3ª curvas e se mantiveram até final da experiência. Usaram-se como antagonistas : cetanserina (0,1 e 1 µmol/l), metiotepina (0,01 µmol/l), metisergide (0,1 e 1 µmol/l), (-) -pindolol (0,1 e 1 µmol/l), ioimbina (0,06 , 1 e 10 µmol/l) e prazosina (0,1 µmol/l) (isoladamente ou em combinação , ver resultados). Estas experiências foram realizadas, em preparações pré-tratadas com 1 mmol/l de pargilina (para inibir a monaminoxidase), na presença de cocaína (12 µmol/l), hidrocortisona (40 µmol/l) e propranolol (1 µmol/l ; para bloquear os receptores beta). Fizeram-se experiências

de controlo (na ausência de antagonistas) para avaliar as eventuais mudanças espontâneas na sensibilidade das preparações durante a experiência. Os resultados mostraram não haver mudança significativa a nível da CE_{50} da 1ª para a 2ª ou 3ª curvas. Sempre que possível avaliou-se a nível da CE_{50} o efeito produzido pelo antagonista no deslocamento para a direita das curvas concentração-resposta. Exprimiu-se o deslocamento em unidades logarítmicas ou em valores de cociente entre as CE_{50} (CE_{50} após tratamento com o antagonista / CE_{50} antes do tratamento).

2.2 Inactivação da 5-HT em experiências de imersão em óleo

Adicionou-se ao banho 1 µmol/l de 5-HT e quando a contracção atingiu uma fase estacionária (8 a 10 minutos de exposição) substituiu-se a solução de Krebs por óleo mineral oxigenado e aquecido a 37ºC e deixou-se a preparação relaxar até 50% da resposta, segundo a técnica descrita por Kalsner e Nickerson (1968 a, b) e Osswald et al (1971). Lavou-se depois a preparação 3 vezes com solução de Krebs-Henseleit.

Para estudar o efeito do bloqueio da captação neuronial e ou extraneuronial no tempo de relaxamento da preparação adicionou-se ao banho 30 minutos antes de nova adição de 5-HT, cocaína (12 µmol/l), hidrocortisona (40 µmol/l) ou ambos os fármacos, que se mantiveram até final da experiência. Para estudar o efeito da inibição da monaminoxidase incubaram-se as preparações com 0,7 µmol/l de iproniazida durante 30 minutos e lavaram-se 6 vezes nos 30 minutos seguintes. Realizaram-se experiências em tiras normais, em tiras desnervadas (ver método de obtenção em 2.1.1.) ou em tiras de animais pré-tratados com reserpina (1 e 0,5 mg/Kg intramuscular, 24 e 6 horas, respectivamente, antes do início da experiência).

Mediu-se o tempo em minutos (T_{50}) que a preparação levou a relaxar até 50% da resposta inicialmente obtida com 1 µmol/l de 5-HT na ausência ou na presença dos bloqueadores. Consideraram-se as mudanças causadas pelos bloqueadores no T_{50} como

uma expressão do papel representado pelo lugar de perda na inactivação da 5-HT e exprimiram-se estas mudanças pelo cociente entre os T_{50} (T_{50} após tratamento com o fármaco/ T_{50} antes do tratamento). Este cociente representa o valor do múltiplo do tempo controlo (MTC). A percentagem de inibição na capacidade de inactivação calculou-se a partir do valor médio do múltiplo do tempo controlo usando a fórmula (MTC - 1 / MTC) x 100 (Kalsner e Nickerson 1968 a; Osswald *et al* 1971). Experiências de controlo realizadas na ausência dos bloqueadores dos locais de perda mostraram não haver mudança significativa no T_{50} obtido após a segunda adição de 5-HT quando comparado com o T_{50} obtido após a primeira adição.

2.3. Interacção de 5-HT com agonistas adrenérgicos (a nível do efeito contráctil)

Adicionou-se ao banho noradrenalina, metoxamina, fenilefrina ou UK 14304 e registou-se a resposta contráctil. Escolheram-se concentrações dos agonistas que suscitavam respostas contrácteis de reduzida dimensão (2 a 10 mm de altura). Após lavagem da preparação por 3 vezes e passado um período de 20 minutos adicionou-se ao banho 5-HT (em concentração que originou também uma resposta de 2 a 10 mm de altura) e registou-se a resposta. Após lavagem da preparação, passado um periodo de 20 minutos , adicionou-se a 5-HT (em concentração idêntica) e 2 a 3 minutos depois os agonistas (noradrenalina, metoxamina, fenilefrina ou UK14304) nas concentrações usadas previamente e registaram-se as respostas. No fim de cada experiência obteve-se a resposta máxima à noradrenalina e exprimiram-se as respostas em % da resposta máxima.

Noutra série de experiências (tiras tratadas com 12 µmol/l de cocaína e 0,5 µmol/l de propranolol), obtiveram-se 2 curvas de concentração-resposta (pelo método cumulativo) para os diferentes agonistas: noradrenalina, metoxamina, fenilefrina e UK14304. Obteve-se a primeira curva na ausência de 5-HT e a segunda curva iniciou-se 3 minutos após a adição de 5-HT (2,5-10 nmol/l; contabilizaram-se as experiências em que a

contracção à 5-HT foi menor ou igual a 5% da resposta máxima à noradrenalina). Em algumas experiências 0,1 µmol/l de cetanserina, 0,01 µmol/l de metiotepina, 0,06 µmol/l de ioimbina ou 0,1 µmol/l de prazosina estiveram presentes no líquido nutritivo durante toda a experiência.

Experiências de controlo mostraram não haver variação da sensibilidade das preparações da primeira para a segunda curva, para os vários agonistas.

Como para as concentrações mais altas dos agonistas, as curvas de concentração-resposta obtidas na presença de 5-HT convergiam com as obtidas na ausência de 5-HT, os deslocamentos para a esquerda avaliaram-se a nível da CE_{30} (concentração que produz 30% da resposta máxima para o respectivo agonista). Exprimiu-se o deslocamento para a esquerda em unidades logarítmicas ou em valores de cociente entre as CE_{30} (CE_{30} na ausência de 5-HT/CE_{30} na presença de 5-HT).

3. Experiências de incubação com compostos marcados

Incubaram-se tiras de peso compreendido entre 40 e 60 mg com as aminas marcadas 5-HT-^{3}H ou NA-^{3}H em pequenos matrazes contendo 3ml de solução de Krebs-Henseleit a 37ºC, oxigenada com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. Durante a incubação agitaram-se permanentemente os matrazes. No fim da incubação lavaram-se rapidamente as tiras em solução fresca de Krebs-Henseleit, secaram-se em papel de filtro, pesaram-se e homogeneizaram-se em 3 ml de ácido clorídrico ou perclórico (0,01 mol/l). Adicionou-se aos líquidos de incubação ácido clorídrico ou perclórico de modo a obter uma concentração final de 0,01 mol/l. Conservaram-se os homogeneizados dos tecidos e os líquidos de incubação à temperatura de 4ºC. Depois de um período de contacto de 24 horas centrifugaram-se os homogeneizados durante 10 minutos a 8000 x g em centrífuga

refrigerada.

Em cada uma das experiências incubou-se nas mesmas condições uma amostra do líquido nutritivo sem qualquer tecido presente. Esta amostra serviu para correcção da contaminação (das diversas fracções de metabólitos pelas aminas ^{3}H) ou da degradação espontânea das aminas ^{3}H.

3.1. Incubação com 5-HT-^{3}H

Incubaram-se tiras de veia safena normal ou desnervada com 0,23 µmol/l de 5-HT - ^{3}H durante 30 minutos nas condições referidas atrás. Para estudar os efeitos da cocaína (12 µmol/l) , clorimipramina (24 µmol/l), hidrocortisona (40 µmol/l), fenoxibenzamina (30 µmol/l), amezínio (10 e 100 µmol/l), expuseram-se os tecidos aos referidos fármacos 30 minutos antes e durante o período de incubação .Para bloquear a monaminoxidase incubaram-se as preparações com 1 mmol/l de pargilina durante 30 minutos e lavaram-se 2 vezes com solução de Krebs-Henseleit por 5 minutos antes da adição de 5-HT-^{3}H. Nas experiências de controlo (na ausência de qualquer fármaco) incubaram-se as preparações com o líquido nutritivo durante 30 minutos antes da adição de 5-HT-^{3}H.

Para a determinação da 5-HT-^{3}H acumulada nos tecidos e dos metabólitos -^{3}H formados pelos tecidos separou-se a 5-HT dos seus metabólitos nos extractos dos tecidos e nos meios de incubação (acidificados com ácido clorídrico de modo a obter a concentração final de 0,01 mol/l) pelo método modificado de Feldstein e Wong (1965). A amostras de 2 ml adicionou-se 0,5 g de cloreto de sódio e 10 ml de éter sulfúrico (isento de peróxidos), agitou-se durante 5 minutos em tubos rolhados e centrifugou-se em centrífuga refrigerada a 150 xg por 5 minutos. Determinou-se em aliquotas da fase aquosa a 5-HT-^{3}H intacta e em aliquotas da fase etérea os metabólitos -^{3}H formados.

A radioactividade total foi determinada em aliquotas dos extractos dos tecidos e

dos líquidos de incubação. Estas determinações permitiram avaliar a recuperação da radioactividade no processo de separação da amina dos seus metabólitos. A recuperação foi de 87 ± 2% (média ± erro padrão; n = 15).

3.2 Incubação com NA-^{3}H; influência da 5-HT na metabolização e acumulação de NA-^{3}H.

Incubaram-se tiras de veia safena ou de artéria mesentérica (de animais normais ou tratados com 0,5 mg/Kg de reserpina injectada intravenosamente, 18 horas antes da remoção dos tecidos) com 0,1 µmol/l de NA - ^{3}H durante 30 minutos na ausência ou na presença de 5-HT em diferentes concentrações: 0,1, 1,0 e 10 µmol/l.

Para determinar a concentração de 5-HT capaz de inibir 50% (CI_{50}) a formação de metabólitos desaminados da noradrenalina, usaram-se tiras de veia safena de animal reserpinizado tratadas com 50 µmol/l de U-0521 (para inibir a catecol-O-metiltransferase) e 40 µmol/l de hidrocortisona. Estas substâncias foram adicionadas ao líquido de incubação 30 minutos antes do início da incubação com NA -^{3}H e mantidas durante a incubação. Fez-se a incubação na ausência de 5-HT e na presença de 5-HT nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 µmol/l. Representou-se num sistema de coordenadas cartesianas em ordenadas a percentagem de inibição da formação de metabólitos desaminados e em abcissas o logaritmo da concentracão molar de 5-HT e calculou-se por interpolação gráfica os valores de CI_{50}.

Para a determinação da NA-^{3}H acumulada nos tecidos e dos metabólitos ^{3}H formados, separou-se a NA-^{3}H dos seus metabólitos -^{3}H nos extractos dos tecidos e nos líquidos de incubação (acidificados com ácido perclórico de modo a obter a concentração final de 0,01 mol/l) por cromatografia em colunas de alumina e Dowex 50 W x 4

segundo o método descrito por Graefe et al (1973). Isolaram-se 5 fracções: noradrenalina (NA); 3-4-di-hidroxifenilglicol (DOPEG); ácido 3-4-di-hidroximandélico (DOMA); normetanefrina (NMN) e a fracção metilada e desaminada (OMDA) que representa a soma do 4-hidroxi-3-metil-fenilglicol (MOPEG) com o ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico (VMA) Determinou-se a radioactividade das diversas fracções obtidas por separação cromatográfica.

Para a determinação da radioactividade total usaram-se aliquotas dos extractos de tecidos e dos líquidos de incubação. A recuperação da radioactividade recolhida após os processos de cromatografia (soma da radioactividade encontrada nas 5 fracções) em relação à radioactividade total da amostra foi de 89 ± 4% (média ± erro padrão ; n=8).

3.3 Determinação do espaço extracelular

Incubaram-se tiras de veia safena durante 5 ou 30 minutos em 3 ml de Krebs-Henseleit contendo sorbitol ^{14}C. No fim da incubação introduziram-se rapidamente as tiras em Krebs-Henseleit, limparam-se, pesaram-se e solublizaram-se em solueno para determinação da radioactividade. Determinou-se também a radioactividade em aliquotas do liquido de incubação.

Corrigiram-se todos os valores de acumulação de amina ^{3}H intacta nos tecidos por subtracção do valor correspondente ao espaço extracelular, admitindo que a distribuição extracelular do sorbitol ^{14}C é semelhante à das aminas marcadas. O valor médio do volume do espaço extracelular determinado para as veias safenas foi 0,34 ± 0,12 ml/g (n=4) após 5 minutos de incubação e de 0,47 ± 0,15 ml/g (n=3) após 30 minutos de incubação.

Os valores do espaço extracelular usados para corrigir os valores de acumulação da amina ^{3}H intacta na artéria mesentérica foram de 0,33 ml/g, conforme referido em trabalho publicado por Garrett et al (1981).

4. Experiências de incubação e perifusão para o estudo da libertação de aminas marcadas

Incubaram-se tiras de veia safena de peso compreendido entre 70 a 90 mg com aminas marcadas 5-HT-^{3}H ou NA - ^{3}H em solução de Krebs -Henseleit, a 37ºC, oxigenada com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono e permanentemente agitada. Antes da incubação submeteram-se as tiras a um período de pré-incubação por tempo variável com diferentes fármacos, de acordo com o tipo de experiência. Após o período de incubação, suspenderam-se as tiras em banho especial de vidro, de 1 ml de capacidade,semelhante ao descrito por Farnebo e Malmfors (1971) e perifundiram-se, continuamente, em solução de Krebs-Henseleit a 37ºC, oxigenada, a uma velocidade de 0,8 mililitros por minuto.

O líquido de perifusão , recolhido em algumas experiências desde o início da perifusão, foi acidificado com $HClO_4$ de modo a obter uma concentração final de 0,01 mol/l.

No fim da perifusão pesaram-se e homogeneizaram-se as tiras em 5 ml de solução de $HClO_4$ 0,01 mol/l. Centrifugaram-se os homogeneizados durante 10 minutos a 8000 x g em centrífuga refrigerada.

4.1. Captação, distribuição e libertação de 5-HT-^{3}H

4.1.1. Determinação dos compartimentos de distribuição

Os tecidos foram pré-incubados com 1 mmol/l de pargilina (concentração que bloqueou quase totalmente a desaminação oxidativa da 5-HT) durante 30 minutos, lavados em Krebs-Henseleit por igual período de tempo, incubados durante 60 minutos com 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H e perifundidos durante 240 minutos de acordo com as condições atrás

descritas. Recolheu-se o líquido de perifusão em fracções de 1 minuto durante os primeiros 10 minutos, de 2,5 minutos até aos 30 minutos, de 5 minutos até aos 100 minutos e de 10 minutos até ao fim da experiência.

Realizaram-se algumas experiências na presença de 12 µmol/l de cocaína, 40 µmol/l de hidrocortisona ou de ambas as substâncias, que se adicionaram à solução de Krebs 30 minutos antes da incubação com 5-HT-^{3}H e se mantiveram até final da experiência.

Determinou-se a radioactividade total em aliquotas de todas as fracções recolhidas e do extracto do tecido.

Exprimiu-se o resultado obtido para as fracções do efluxo em pmoles/g/min e para o tecido em pmoles/g. Considerou-se que os valores obtidos na curva de efluxo representavam a soma de valores correspondentes a vários efluxos regidos por equações exponenciais simples. A função dessa curva pode ser expressa pela equação seguinte:

$$Y_t = A.e^{-K_1 t} + B.e^{-K_2 t} + _ + Z.e^{-K_n t}$$

Y_t indica a velocidade de efluxo total no tempo t (a velocidade é expressa em pmoles/g/min); A, B, .. Z são as velocidades iniciais de efluxo (isto é, velocidades no tempo zero) para cada um dos efluxos regidos por exponenciais simples. Para analisar as curvas de efluxo da 5-HT-^{3}H usou-se a técnica do "descasque" descrita por Henseling *et al* (1976 a), baseada no facto de que em representação semilogarítmica, os valores de uma equação exponencial simples representam uma linha recta. Durante a fase final do efluxo a curva mostrou um declínio rectilíneo, havendo assim razão para admitir, que nessa fase, a radioactividade do efluxo se originou apenas em um compartimento. Determinou-se a linha de regressão que melhor se adaptava aos pontos experimentais começando com os 3 ou 4 últimos valores da curva. Usaram-se sucessivamente os valores precedentes até se

atingir um valor que se desviava claramente da linha recta. Subtrairam-se aos valores experimentais, os valores da linha de regressão. Analisou-se a curva resultante do mesmo modo. Para cada linha de regressão obtiveram-se, a velocidade inicial de efluxo, o tempo de semivida ($t/2 = \ln 2/k$) e o tamanho do compartimento (S = velocidade inicial de efluxo / k). Caracterizaram-se deste modo 3 compartimentos (I, II, III).

A figura 1 mostra um exemplo de como se efectuou a análise compartimental.

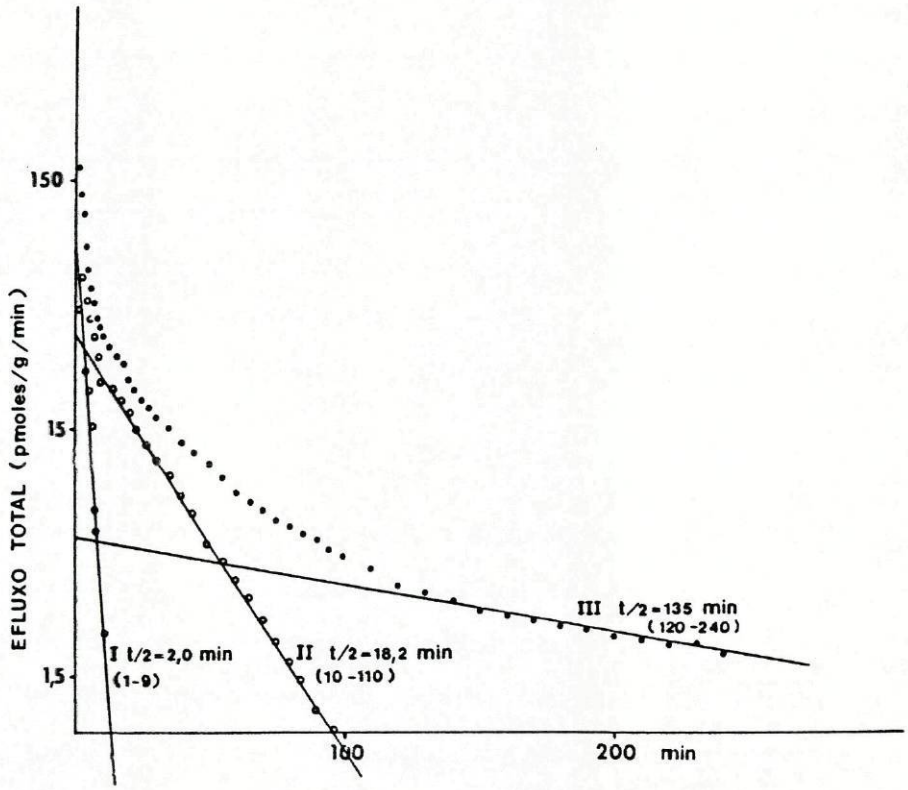


Figura 1. Exemplo da análise compartimental de uma curva de efluxo de uma experiência controlo. Veia safena incubada com 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H por 60 min e perifundida durante 240 min. Ordenada: velocidade média de efluxo (picomol/g/min; escala logarítmica). Abcissa: tempo (em min) desde o início da perifusão. Iniciou-se a análise pelo compartimento III. Depois do "descasque" determinou-se o compartimento II, ... (ver texto). Estão indicados os tempos de semi-vida (min) dos compartimentos (dentro de parêntesis os tempos entre os quais se determinaram as linhas de regressão).

Para esta análise usaram-se os valores da velocidade de efluxo, portanto a presença de uma "fracção fixa" (isto é de radioactividade que não contribuiu para o efluxo) não afectou a análise compartimental. Calculou-se a fracção fixa por diferença entre a radioactividade total presente no tecido no fim da perifusão e a radioactividade pertencente ao compartimento III (no fim de perifusão). A radioactividade atribuida ao compartimento III (nesse momento) foi determinada a partir da linha de regressão que representava esse compartimento. Da linha de regressão obteve-se não só o tamanho do compartimento mas também a quantidade de radioactividade perdida pelo compartimento III até ao fim da perifusão; a diferença entre estes dois valores corresponde à radioactividade que ficou no compartimento III no fim da experiência.

4.1.2. Captação neuronial e libertação por estimulação eléctrica

Depoisde pré-incubados com 1 mmol/l de pargilina por 30 minutos lavaram-se os tecidos em solução de Krebs-Henseleit por igual período de tempo, incubaram-se durante 60 minutos com 1,2 µmol de 5-HT-^{3}H e perifundiram-se durante 220 minutos nas condições atrás referidas. Em algumas experiências adicionou-se à solução de Krebs-Henseleit 12 µmol/l de cocaína 30 minutos antes da incubação com a amina marcada, fármaco que se manteve até final da experiência. As tiras montadas no banho especial de perifusão foram presas por cada uma das extremidades a eléctrodos de platina para estimulação de campo de acordo com a técnica descrita por Brandão (1977). Estimulou-se cada preparação durante 3 períodos (características dos estímulos : 2 ms, 10 Hz, 100 V) de 2,5 minutos iniciados aos 100 (S_1), 150 (S_2), e 200 (S_3) minutos de perifusão. Recolheu-se o líquido de perifusão em amostras de 5 minutos desde os 90 minutos de perifusão até final da experiência.

Mediu-se a radioactividade total em aliquotas das amostras recolhidas e em

aliquotas dos extractos dos tecidos.

Determinou-se a fracção de libertação (F.L) de acordo com o descrito por Luchelli Fortis e Langer (1975), isto. é,. calculou-se o cociente entre a quantidade de amina ^{3}H libertada por pulso e a quantidade calculada como estando presente no início de cada um dos períodos de estimulação.

4.2. Influência da 5-HT na libertação de NA-^{3}H por estimulação eléctrica

4.2.1. Influência da incubação com 5-HT na libertação de NA-^{3}H

Incubaram-se os tecidos (pré-tratados com 1 mmol/l de pargilina) com 0,2 µmol/l de NA-^{3}H ou com 0,2 µmol/l de NA-^{3}H + 1,2 µmol/l de 5-HT durante 60 minutos na presença de 40 µmol/l de hidrocortisona e 50 µmol/l de U-0521 (estes dois últimos fármacos mantiveram-se no líquido nutritivo até ao fim da experiência). Montaram-se as preparações em condições adequadas para estimulação de campo e penfundiram-se até aos 175 minutos. Estimulou-se cada preparação por 2 vezes (características dos estímulos: 2 ms; 10 Hz; 100 V) durante 2,5 minutos, com início aos 110 (S_1) e 150 (S_2) minutos após o início da perifusão. Recolheu-se o líquido de perifusão em amostras de 5 minutos desde os 100 minutos de perifusão até final da experiência.

Determinou-se a quantidade de NA-^{3}H presente no tecido após 110 minutos de perifusão (em cada preparação adicionou-se ao valor de ^{3}H obtido no tecido no fim da perifusão os valores de ^{3}H recolhidos no efluxo). Calcularam-se as fracções de libertação de ^{3}H por pulso originadas pelos dois períodos de estimulação (S_1 e S_2), quer para as preparações incubadas com NA-^{3}H quer para as incubadas com NA-^{3}H + 5-HT.

4.2.2. Influência da adição de 5-HT (e de 8-OH-DPAT) ao líquido de perifusão na libertação de NA-^{3}H por estimulação eléctrica

Os tecidos pré-tratados com 1 mmol/l de pargilina foram incubados com 0,2 µmol/l de NA-^{3}H durante 60 minutos na presença de 40 µmol/l de hidrocortisona e de 50 µmol/l de U0521, fármacos que se mantiveram no líquido nutritivo até final da experiência. Montaram-se as preparações em condições adequadas para estimulação de campo e perifundiram-se durante 175 minutos. Estimulou-se cada preparação 2 vezes (características dos estímulos: 2 ms, 10 Hz, 100 V) durante 2,5 minutos com início aos 110 (S_1) e 150 (S_2) minutos após o início da perifusão. Recolheu-se o líquido de perifusão em amostras de 5 minutos desde os 100 minutos de perifusão até final da experiência Adicionou-se ao líquido de perifusão, 10 minutos antes de S_2, 5-HT (0,01; 0,1 e 1 µmol/l) ou 8-OH-DPAT (1 e 10 µmol/l), fármacos que se mantiveram até final da experiência. Para avaliação das variações na libertação de ^{3}H de S_1 para S_2 realizaram-se algumas experiências na ausência de 5-HT ou de 8-OH-DPAT (controlo).

Para estudar a influência de vários fármacos (cocaína, ioimbina,cetanserina, metisergide, metiotepina, pindolol), no efeito da 5-HT (0,1µmol/l) , adicionaram-se estes fármacos ao líquido de perifusão 30 minutos antes do início de S_1 e mantiveram-se até ao fim da experiência. Realizaram-se algumas experiências na presença dos fármacos referidos sem qualquer adição de 5-HT entre S_1 e S_2 para avaliar as eventuais alterações na libertação de ^{3}H de S_1 para S_2 por influência dos próprios fármacos.

A libertação de ^{3}H que ocorreu durante cada período de estimulação foi expressa como fracção de libertação por estímulo. Para avaliar os efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT bem como a influência dos fármacos no efeito da 5-HT sobre a libertação de NA-^{3}H por estimulação eléctrica, calculou-se a razão entre as fracções de libertação: S_2/S_1 e compararam-se as razões obtidas nas diferentes circunstâncias.

5. Doseamento da radioactividade

Mediu-se a radioactividade das diversas amostras por cintilometria líquida em contador de cintilações (Tri-Carb Scintillation Spectrometer mod 3320, Packard, Warrenville, ILL, USA ou Liquid Scintillation Counter BF 500, Berthold, Wildbad, RFA), usando como líquido de cintilação: uma mistura de 330 ml de Triton X-100, 5,5 g de Permablend III e 1000 ml de tolueno ou uma mistura de 330 ml de Triton X-100, 5g de 2,5-difeniloxazol (PPO) e 0,5 g de p-bis (o-metilestiril) benzeno (bis MSB) e tolueno até perfazer 1000 ml

6. Estatística

Exprimiram-se os resultados em média aritmética ± erro padrão ou média geométrica com os intervalos de confiança a nível de 95%. A comparação das médias foi feita usando o teste t de Student para valores emparelhados ou independentes. Consideraram-se significativas as diferenças entre as médias sempre que $P< 0,05$.

7. Fármacos utilizados

Metilsulfato de amezínio (BASF,Ludwigshafen, RFA); bitartarato de (-) noradrenalina, sulfato de 5-hidroxitriptamina e creatinina, cloridrato de ioimbina, cloridrato de (-)fenilefrina, cloridrato de pargilina, fosfato de hidrocortisona (Sigma, St. Louis, MO, USA); hidrogenomaleato de metisergide e cloridrato de (-) pindolol (Sandoz, Basileia, Suíça); cloridrato de prazosina e UK 14304 (5-bromo-6-(2-imidazolina-2-ilamino)-quinoxalina) (Pfizer, Seixal, Portugal); cloridrato de cocaína (Uquipa, Lisboa, Portugal); fosfato de iproniazida (Aldrich-Europe Beerse, Bélgica) ; cortexona (Schwarz - Mann, NY, USA); maleato de metiotepina (Hoffmann - La Roche , Basileia, Suiça); cloridrato de

fenoxibenzamina (Smith Kline & French, Welwyn Garden City, Inglaterra); cloridrato de clorimipramina (Ciba-Geigy, Basileia, Suíça); tartarato de cetanserina (Janssen, Beerse, Bélgica) ; U-0521 (3,4-di-hidroxi-2-metilpropiofenona) (Upjohn, Kalamazoo, USA); pentobarbital sódico (Siegfred, Zofingen, Suiça); cloridrato de (±) metoxamina (Wellcome, Londres,Inglaterra) ; cloridrato de (±)-propranolol (ICI, Cheshire, Inglaterra) ; reserpina (K & K Lab. CA, USA); 8-OH-DPAT (bromidrato de (±)-8-hidroxi-dipropilaminotetralina) (Research, Biochemicals Inc, Natick, USA) ; sulfato de 5-hidroxitriptamina-^{3}H e creatinina (29,1 Ci/mmol), sorbitol -^{14}C (15 Ci/mmol) e cloridrato (-)-7-noradrenalina -^{3}H (18,8 - 23,1 Ci /mmol ; NEN Chemicals, Dreieich, RFA).

Todos os outros reagentes usados foram produtos *pro analysi*.

III. RESULTADOS E COMENTÁRIOS

1. Captação, distribuição e inactivação da 5-HT

1.1. Influência dos locais de perda na sensibilidade à 5-HT

A figura 2 representa uma das experiências em que se estudou a influência do bloqueio da captação neuronial na sensibilidade à 5-HT.

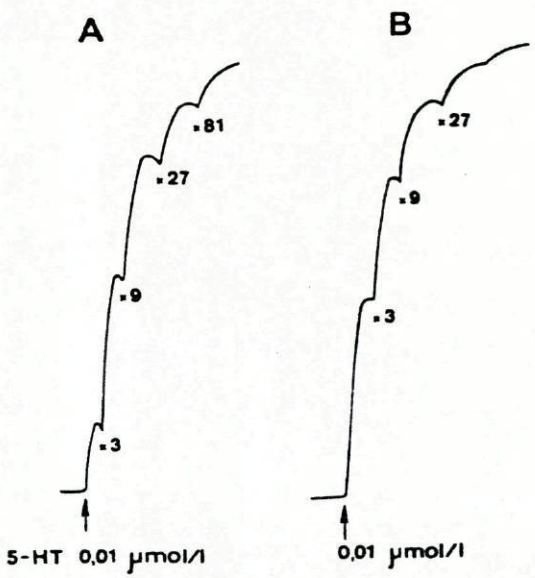


Figura 2. Curvas concentração-resposta à 5-HT numa tira de veia safena. Em **A** na ausência de cocaína (controlo). Em **B** na presença de 12 µmol/l de cocaína adicionada ao banho 30 min antes da obtenção da segunda curva.

Os resultados da tabela I mostram que os valores da CE_{50} determinados a partir das curvas de concentração-resposta foram 53 (30-107) nmol/l (n=8) e 65 (51-82) nmol/l (n=7); respectivamente para tiras normais e para tiras tratadas com pargilina.

Tabela I. Efeito da cocaína (12 µmol/l) e hidrocortisona (40 µmol/l) nas contracções de tiras de veia safena causadas pela 5-HT em tiras normais ou pré-tratadas com pargilina (1mmol/l). Calcularam-se as CE_{50} e os factores de potenciação expressos pelo aumento na sensibilidade, i. e. razão CE_{50} (antes) / CE_{50} (após tratamento com cocaína ou hidrocortisona ou ambos os fármacos). Os números representam as médias geométricas e os limites de confiança a nível de 95%; n - número de experiências.

	Tiras normais (n-8)	Tiras pré-tratadas com pargilina (n-7)
CE_{50} (nmol/l)	53 (30 - 107)	65 (51 - 82)
Factores de potenciação		
cocaína	2,2 * (1,5 - 3,2)	1,7 * (1,2 - 2,5)
hidrocortisona	1,1 (0,9 - 1,3)	1,1 (0,8 - 1,5)
cocaína + hidrocortisona	2,7 **(2,1 - 3,4)	2,1 * (1,9 - 2,3)

* Significativamente diferente da unidade $P < 0,01$.
** Significativamente diferente da unidade $P < 0.001$
A potenciação devida à cocaína + hidrocortisona não foi significativamente diferente da causada apenas pela cocaína.

A cocaína aumentou a sensibilidade à 5-HT 2,2 vezes em tiras normais e 1,7 vezes em tiras tratadas com pargilina. A hidrocortisona não aumentou significativamente a sensibilidade, quer em tiras normais quer tratadas com pargilina. Quando se associou a hidrocortisona à cocaína verificou-se que a associação dos dois fármacos aumentou a sensibilidade 2,7 e 2,1 vezes, respectivamente, em tiras normais e em tiras tratadas com

pargilina, mas estes aumentos não foram significativamente diferentes dos obtidos quando se usou apenas cocaína. Comparando os valores da CE_{50} nas tiras normais e nas tiras tratadas com pargilina, verificou-se que a inibição da monaminoxídase não afectou a sensibilidade das preparações.

1.2. Inactivação da 5-HT pelo método de imersão em óleo

A figura 3 representa um exemplo de uma das experiências em que se estudou a inactivação da 5-HT pelo método de imersão em óleo.

Em tiras normais o tempo necessário para obter 50% do relaxamento em óleo (T_{50}) após contracção causada por 1µmol/l de 5-HT foi de 6,2 min. Nas tiras de animais sujeitos a intervenção cirúrgica simulada não houve alteração significativa do T_{50} (7,5 min) nem diferença no factor de prolongamento pela cocaína (quando comparado com o factor de prolongamento obtido em tiras normais) (tabela 2).

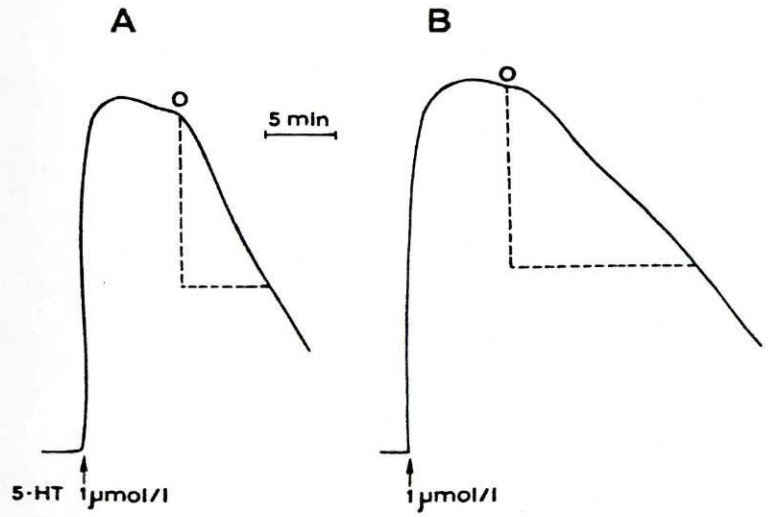


Figura 3. Contracções causadas pela 5-HT numa tira de veia safena. Em **A** na ausência de cocaína (controlo). Em **B** na presença de cocaína (12 µmol/), adicionada ao banho 30 min antes da segunda adição de 5-HT. O tracejado horizontal representa o tempo correspondente a 50% de relaxamento em óleo mineral (T_{50}).

A cocaína aumentou o T_{50} 2,6 vezes em tiras normais, 2,3 vezes em tiras de animais sujeitos a intervenção cirúrgica simulada e 2,3 vezes em tiras de animais pré-tratados com reserpina; contudo, em tiras desnervadas o efeito da cocaína foi sigificativamente reduzido (o aumento no T_{50} foi de apenas 1,6 vezes). O aumento do T_{50} causado pela hidrocortisona foi relativamente pequeno (1,4 vezes). Com a associação de cocaína e hidrocortisona o T_{50} aumentou 4,9 vezes (ver resultados tabela 2).

Tabela 2. Efeito da cocaína (12 µmol/l) e hidrocortisona (40 µmol/l) no tempo de relaxamento 50% (T_{50}) em óleo, de tiras de veia safena expostas a 1 µmol/l de 5-HT. Os números representam as médias geométricas e os limites de confiança a nível de 95%. n - número de experiências.

		Factor de prolongamento causado por		
Veia Safena	T 50 em óleo (min)	cocaína	hidrocortisona	cocaína + hidrocortisona
Normal (n-7)	6,2 (4,6 - 8,3)	2,6 [a] (1,8 - 3,9)	1,4 (1,1 - 1,8)	4,9 [c] (4,1 - 5,7)
De cirurgia simulada (n-5)	7,5 (5,1 - 11,1)	2,3 (1,7 - 3,1)		
Cinco dias após desnervação (n-5)	7,9 (4,4 - 14,2)	1,6 [b] (1,3 - 2,0)		
Pretratamento com reserpina	6,8 (5,0 - 9,3)	2,3 (1,5 - 3,6)		

Há diferença significativa entre : a e b ($p < 0,05$) e entre a e c ($p < 0,01$).

Numa série de experiências realizadas em tempo anterior verificou-se que o factor de prolongamento do T_{50} pelo inibidor da monaminoxidase, iproniazida, foi de 4,6 ±0,7 (n=6); e que esse factor aumentou para 9,4±1,6 (n=6) quando se adicionou cocaína.

1.3. Acumulação e metabolização da 5-HT-^{3}H

Durante os 30 minutos de incubação com 0,23µmol/l de 5-HT-^{3}H as tiras de veia safena não sujeitas a qualquer tratamento removeram uma quantidade apreciável de amina - 836±46 pmoles/g/30 min (n=5) contribuindo cerca de metade da amina removida para a formação de metabólitos - 390±31 pmoles/g/30 min (n=5). A restante amina- 447±27 pmoles/g/30 min (n=5) acumulou-se no tecido sob a forma de amina intacta. Como pode ver-se pela tabela 3 a supressão da captação neuronial (por bloqueio da captação pela cocaína ou clorimipramina ou por desnervação) causou uma redução significativa na acumulação (31 a 36%), mas não afectou de modo significativo a formação de metabólitos. A hidrocortisona (que inibe a captação extraneuronial) reduziu 40% a acumulação e 35% a metabolização. A inibição simultânea das captações neuronial e extraneuronial pela combinação de cocaína com hidrocortisona ou por fenoxibenzamina reduziu a acumulação 57% e 63% respectivamente e reduziu a metabolização 52% e 73% respectivamente.

A inibição da monaminoxidase pela pargilina reduziu de modo importante a metabolização (89%) e aumentou 53% a acumulação de 5-HT-^{3}H no tecido. Com a monaminoxidase inibida a adição de cocaína reduziu nas tiras normais em 44% e nas tiras desnervadas em 56% a quantidade de 5-HT-^{3}H acumulada nos tecidos.

A concentração mais baixa (10 µmol/l) de amezinio reduziu 32% a acumulação de 5-HT-^{3}H nos tecidos e 74% a metabolização ; a concentração mais alta (100µmol/l) reduziu 38% a acumulação de 5-HT-^{3}H e aboliu praticamente a formação de metabólitos (ver resultados, tabela 3).

Tabela 3. Acumulação e metabolização de 5-HT-^{3}H (0,23 µmol/l), em tiras de veia safena durante um período de 30 minutos de incubação. Os resultados estão expressos em picomoles/ g /30min e representam média ± erro padrão; n - número de experiências. Remoção - 5-HT-^{3}H acumulada nos tecidos + metabólitos totais.

Tratamento	n	5-HT-^{3}H acumulada	Metabólitos-3H totais	Remoção
Nenhum (controlo)	5	447 ± 27	390 ± 31	836 ± 46
Cocaína (12µmol/l)	4	307 ± 31 **	320 ± 21	627 ± 50 *
Clorimipramina (24µmol/l)	2	285 ± 5 **	280 ± 101	665 ± 89 *
Desnervação (5 dias antes)	2	261 ± 91 *	305 ± 86	566 ± 117 *
Hidrocortisona (40µmol/l)	3	268 ± 20 **	255 ± 10 *	524 ± 21 **
Hidrocortisona + cocaína	3	191 ± 29 ***	186 ± 15 **	377 ± 33 ***
Fenoxibenzamina (30µmol/l)	2	164 ± 11 **	106 ± 9 **	270 ± 13 ***
Pargilina (1mmol/l)	3	682 ± 110 *	44 ± 4 ***	725 ± 106
Pargilina + cocaína	3	381 ± 75 (a)	34 ± 16 **	415 ± 93 ** (a)
Pargilina + desnervação	2	298 ± 18 * (a)	30 ± 14 **	328 ± 23 ** (a)
Amezínio (10µmol/l)	3	306 ± 25 **	103 ± 21 ***	418 ± 41 ***
Amezínio (100µmol/l)	2	275 ± 13*	32 ± 11 ***	307 ± 8 ***

Os asteriscos indicam haver diferença significativa em relação aos valores de controlo (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$). (a) Indica haver diferença significativa em relação ao valor correspondente ao tratamento apenas com pargilina ($P<0,05$).

1.4. Análise dos compartimentos de distribuição da 5-HT-^{3}H

Efectuou-se a análise dos compartimentos de distribuição da 5-HT em tiras tratadas com pargilina (1mmol/l), nesta situação a quantidade de metabólitos presentes quer nos líquidos recolhidos do efluxo quer na veia safena, no fim da perifusão, oscilou entre 4 e 10% da radioactividade total, o que nos levou a considerar os valores de radioactividade total como equivalentes a valores de 5-HT-^{3}H.

A análise compartimental das curvas de efluxo de tiras de veia safena incubadas com 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H indicou que a amina se distribuiu em 4 compartimentos , um dos quais constitui a fracção fixa. Nas preparações controlo (apenas tratadas com pargilina) os valores de tamanho dos compartimentos e respectivo tempo de semi-vida foram: para o compartimento I 314±45 pmoles/g e 2,3 (1,8-3,1) min (n=5), para o compartimento II 1069±94 pmoles/g e 16,3 (12,9 - 20,6) min (n=5), para o compartimento III 1183±119 pmoles/g e 129,8 (95,7 -176,2) min (n=5). O valor da fracção fixa foi 1571± 204 pmoles/g (n=5). O valor da actividade total (soma dos valores de todos os compartimentos) foi 4089±228 pmoles/g (n=5).

Verificou-se a influência da cocaína (bloqueador de captação neuronial), da hidrocortisona (bloqueador da captação extraneuronial) ou de ambos os fármacos no tamanho e tempo de semi-vida dos compartimentos. A cocaína reduziu: a fracção fixa 86%, o tempo de semi-vida do compartimento III para cerca de metade e a actividade total 29% . A hidrocortisona reduziu o tamanho do compartimento II 27%. A cocaína + hidrocortisona reduziram: a actividade total 38%, a fracção fixa 88%, o tamanho do compartimento III 35% e o seu tempo de semi-vida para cerca de metade. O tamanho do compartimento I aumentou 141 %. (ver resultados, tabela 4).

Tabela 4. Análise compartimental das curvas de efluxo obtidas em tiras de veia safena pré-tratadas com 1 mmol/l de pargilina expostas a 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H, durante 1 hora e perifundidas com solução de Krebs durante 240 minutos.

	Controlo n = 5	Cocaína (12µmol/l) n = 5	Hidrocortisona 40µmol/l) n = 4	Cocaína + Hidrocortisona n = 4
Actividade total	4089±228	2917±124 ***	4825±804	2516±34***
Fracção fixa	1571±204	219±42***	2529±602	186±71***
Compartimento III				
Tamanho	1183±119	857±153	1124±134	766±93 *
Tempo de semi-vida	129,8 (95,7-176,2)	65,7** (49,2 - 87,7)	112,5 (76,7-165)	60,5** (41,9-87,5)
Compartimento II				
Tamanho	1069±94	1329 ± 205	780±69 *	808±108
Tempo de semi-vida	16,3 (12,9-20,6)	12,6 (9,3 - 17,1)	18,7 (13,8-25,4)	17,3 (14,7-20,4)
Compartimento I				
Tamanho	314±45	494±97	392±75	756±102**
Tempo de semi-vida	2,3 (1,8-3,1)	2,3 (1,7 - 3,1)	2,9 (1,2-6,8)	4,3 (3,0-6,2)

A actividade total representa a soma do ^{3}H do efluxo total com o ^{3}H presente no tecido no fim da experiência. A fracção fixa e o tamanho de cada compartimento estão expressas em pmoles/g; o tempo de semi-vida em minutos. Os resultados representam médias ± erro padrão excepto nos tempos de semi-vida em que estão representadas médias geométricas com os limites de confiança a nível de 95%; n- número de experiências. Os asteriscos representam os valores significativamente diferentes do controlo (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

1.5. Libertação por estimulação electrica da 5-HT-^{3}H acumulada pelas terminações adrenérgicas

Estimularam-se preparações da veia safena, previamente incubadas com 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H, após um período de lavagem (perifusão) de 100 minutos. Nesta fase de lavagem o efluxo espontâneo do ^{3}H era relativamente estável. Sujeitaram-se as preparações a três períodos de estimulação aos 100, 150 e 200 minutos de perifusão. A estimulação eléctrica produziu um aumento marcado de efluxo de ^{3}H. O aumento de efluxo foi máximo durante a estimulação, decaindo progressivamente e atingindo os valores de efluxo espontâneo 15 minutos após o início da estimulação. As fracções de libertação foram identicas para os 3 períodos de estimulação (ver resultados, tabela 5). A estimulação eléctrica das tiras tratadas com cocaína não causou apreciável aumento de efluxo de ^{3}H aos 150 e 200 minutos e apenas uma pequena libertação no primeiro período de estimulação.

Tabela 5. Fracções de libertação de ^{3}H após estimulação eléctrica de tiras pré-incubadas com 1 mmol/l de pargilina e incubadas em Krebs (controlo) ou Krebs + 12 µmol/l de cocaína, com 1,2 µmol/l de 5-HT-^{3}H; perifusão durante 220 minutos com solução de Krebs sem (controlo) ou com cocaína (12µmol/l). Os resultados representam média ± erro padrão; n- número de experiências.

	Fracção de libertação (x 10^{-5}) (a)		
	100 min	150 min	200 min
Controlo	1,05± 0,12 n=4	1,04 ± 0,02 n=4	1,02 ± 0,19 n=2
Cocaína (12µmol/l)	0,38 ± 0,14 * n=3	0,07 ± 0,01 * n=3	0,00 ± 0,00 * n=2

(a) Fracção da radioactividade total do tecido libertada por cada estímulo eléctrico depois de um período de perifusão de 100, 150 ou 200 minutos. Características de estimulação : 100V; 2 ms; 10 Hz; 2,5 min. * Todos os valores obtidos na presença de cocaína são significativamente diferentes dos controlos (P <0,02).

1.6. Comentários

Para estudar os aspectos que se relacionam com a captação, distribuição e inactivação da 5-HT usaram-se 4 métodos diferentes. Realizaram-se ensaios com a 5-hidroxitriptamina (não marcada) para estudo: 1) da sensibilidade e 2) da inactivação por imersão em óleo e ainda ensaios de incubação com a amina marcada (5-HT-^{3}H) para determinação: 3) da acumulação da amina e metabólitos formados pelos tecidos e 4) dos compartimentos de distribuição.

Com os estudos de sensibilidade pretendeu-se averiguar qual o papel desempenhado pelas estruturas neuroniais e extraneuroniais na modificação da concentração da amina na biofase (junto dos receptores onde actua a 5-HT, responsáveis pela contracção das preparações). Usando a cocaína como bloquedor de captação neuronial mostrou-se que a sensibilidade dos tecidos aumentou de modo significativo (2,2 vezes) enquanto que não houve modificação com o bloqueador de captação extraneuronial (hidrocortisona). Estes resultados são de certo modo semelhantes aos obtidos na mesma preparação com a noradrenalina e adrenalina (Guimarães 1975 ; Guimarães e Paiva 1977). Estes autores mostraram que a inibição da captação neuronial (pela cocaína) potenciava as respostas a ambas as catecolaminas, contudo a potenciação foi mais importante para a noradrenalina (7,5 vezes) do que para a adrenalina (2,8 vezes). Os valores obtidos com a 5-HT são da mesma ordem de grandeza dos obtidos com a adrenalina (2,2 *vs* 2,8 vezes). Em relação ao bloqueio da captação extraneuronial os referidos autores usaram como bloqueador a cortexona, não tendo conseguido demonstrar claramente se houve aumento de sensibilidade, dado que o efeito espasmolítico exibido pela cortexona dificultava a avaliação (Guimarães e Paiva 1977). Igual crítica pode aplicar-se relativamente à hidrocortisona, uma vez que mostrou possuir também efeito espasmolítico. Por tal facto, embora os resultados

obtidos não permitam atribuir importância aos mecanismos extraneuroniais na remoção da amina de biofase, não são contudo determinantes para a exclusão do papel destes mecanismos.

O bloqueio da monaminoxidase pela pargilina não afectou a sensibilidade das preparações à 5-HT. De igual modo Furchgott (1955), Kalsner e Nickerson (1968 b) e Osswald *et al* (1971) mostraram que a inibição da monaminoxidase não afectou ou afectava de modo pouco significativo a sensibilidade de várias preparações (aorta de Coelho, veia safena de Cão) à noradrenalina, adrenalina e fenilefrina. Sabendo que a enzima responsável pela metabolização da 5-HT é a monaminoxidase seria de esperar uma modificação importante na sensibilidade das preparações por bloqueio da sua actividade. Pelos resultados obtidos poder-se-ía ser levado a concluir que a desaminação oxidativa representa um papel de pouca importância na terminação de acçãoda 5-HT. Com efeito foi assinalado por vários autores (Kalsner e Nickerson 1968 b; Osswald *et al* 1971) que a alteração da sensibilidade como consequência do bloqueio de um mecanismo de inactivação poderá ser um índice pouco fiável para a apreciação da terminação de acção de vários agonistas. A explicação proposta para o facto do bloqueio da monaminoxidase não aumentar a sensibilidade, parece ser a de que este mecanismo de inactivação, embora de grande capacidade, tem uma baixa avidez e por isso não gera gradientes de concentração capazes de influenciar o número de moléculas activas a nível da biofase (Guimarães *et al* 1971), isto é, o grau de potenciação dependerá além de outros factores, das constantes cinéticas que caracterizam os locais de perda (Trendelenburg 1980; Paiva e Guimarães 1984).

A técnica de imersão em óleo descrita por Kalsner e Nickerson (1968 a, b) tem sido um método largamente utilizado para o estudo da inactivação de várias aminas simpaticomiméticas. Foi adaptada para o estudo da inactivação de vários agentes

vasoconstritores de entre os quais a 5-HT (Paiva e Osswald 1980). Com esta técnica parte-se de pelo menos dois pressupostos: 1) que o tempo de relaxamento em óleo, calculado para 50% do relaxamento após contracção produzida pela 5-HT, possa ser considerado como medida directa da actividade dos mecanismos intrínsecos de inactivação da 5-HT 2) que a mudança na velocidade de relaxamento observada após o bloqueio de cada via de inactivaçao seja a medida da participaçao desse mecanismo (Brandão 1979).

Com a captação neuronial bloqueada o tempo de inactivação (tempo de relaxamento 50%) aumentou 2,6 vezes o que corresponde a considerar que o bloqueio da capacidade inactivadora - (2,6-1) / 2,6 x 100 - foi de cerca de 62%. O bloqueio da captação extraneuronial aumentou o tempo de inactivação 1,4 vezes o que corresponde a cerca de 30% de bloqueio da capacidade inactivadora; o bloqueio conjunto da captação neuronial e extraneuronial resultou em efeito aproximadamente aditivo, sendo o bloqueio da capacidade inactivadora cerca de 80%. O bloqueio da monaminoxídase, contrariamente ao que se observou nas experiências de sensibilidade, mostrou que esta enzima desempenha um papel importante na terminação da acção da 5-HT. O prolongamento do tempo de inactivação foi relativamente elevado (4,6 vezes) o que corresponde à diminuição da capacidade de inactivação de 78%. Nesta situação (monaminoxídase inibida) com a adição de cocaína o tempo de relaxamento passou a ser 9,4 vezes maior, o que significa que ocorreu uma inibição da capacidade de inactivação de aproximadamente 89%. A sobreposição dos efeitos do bloqueio da captação neuronial e da inibição da monaminoxídase (cocaína sozinha reduziu 78%; ambos os fármacos reduziram 89%) deve-se ao facto de que a cocaína ao bloquear a captação neuronial bloqueia parte dos mecanismos de inactivação afectados pelo inibidor da monaminoxídase, dada a localização intraneuronial predominante da monaminoxidase A, responsável pela desaminação da 5-HT (Caramona 1983). Os resultados põem em evidência a importância relativamente maior da inibição da monaminoxídase em relação à captação neuronial o que pode ser explicado pela existência da monaminoxídase extraneuronial que contribui para a inactivação da 5-HT.

Em tiras desnervadas o aumento do tempo de relaxamento produzido pela cocaína foi significativamente menor do que o produzido em tiras normais (1,6 vs 2,6) o que contribui para reforçar a ideia da importância do papel da captação neuronial como mecanismo de inactivação.

Em animais reserpinizados a cocaína prolongou o tempo de inactivação de modo semelhante ao que se obteve em tiras normais. Nesta situação embora estivesse impedida a captação vesicular da 5-HT, a cocaína ao bloquear o acesso ao compartimento neuronial impediria a exposição da 5-HT ao efeito da monaminoxídase intraneuronial, o que permite considerar que não só as vesículas mas também o próprio axoplasma funciona como local de perda importante.

Os resultados encontrados para a 5-HT com este método foram idênticos aos obtidos para as catecolaminas: para a noradrenalina a cocaína prolongou o tempo de relaxamento de modo mais importante do que a cortexona (Guimarães e Paiva 1977), para a noradrenalina e adrenalina a inibição de monaminoxídase produziu um aumento maior no tempo de relaxamento do que a inibição de captação neuronial (Osswald *et al* 1971). Com a técnica de imersão em óleo foi possivel mostrar que algumas das vias de inactivação conhecidas para a terminação da acção das catecolaminas (captação neuronial e extraneunorial e monaminoxídase) desempenham também um papel activo na remoção da 5-HT da biofase.

As experiências de incubação com compostos marcados proporcionam um método directo de avaliação da quantidade de metabólitos formados e da quantidade de amina intacta acumulada no tecido em dado momento. O uso de bloqueadores de captação e de inibidores enzimáticos tem permitido obter informações àcerca dos mecanismos envolvidos (e do papel desempenhado pelas várias estruturas teciduais) na remoção desses compostos a partir do líquido de incubação.

Usou-se na incubação 0,23 µmol/l de 5-HT-^{3}H, uma concentração que corresponde a pelo menos cerca de 5 vezes o valor da concentração de amina existente no plasma na forma livre (aceitando que os valores de 5-HT livre no plasma oscilam entre 3 e 20 ng/ml; Vanhoutte e Houston 1986). Ao fim de 30 minutos de incubação determinou-se a quantidade de metabólitos existentes no tecido e no líquido de incubação e ainda a amina intacta acumulada no tecido. Embora uma quantidade apreciável de amina tenha sido removida, na situação controlo 836±46 picomoles/g/30 min, este valor é cerca de 3 vezes menor do que o obtido por Paiva e Guimarães (1978) para a incubação com noradrenalina -^{3}H e adrenalina -^{3}H em ensaios realizados em condições idênticas e com as mesmas concentrações das aminas marcadas. A remoção foi de 2453 ± 240 e 2281 ± 220 picomoles/g/30 min para a noradrenalina e adrenalina respectivamente. Se se analisar as 2 componentes que constituem o valor da remoção (remoção = amina intacta acumulada no tecido + metabólitos totais) pode verificar-se que a acumulação foi menor para a 5-HT (447±27 picomoles/g/30 min) que para a adrenalina (673±51 picomoles/g/30 min) ou para a noradrenalina (1485±130 picomoles/g/30 min) e que também a quantidade de metabólitos totais foi consideravelmente mais baixa para a 5-HT (390±31 picomoles/g/30 min) do que para a noradrenalina (968±69 picomoles/g/30 min) ou para a adrenalina (1608±127 picomoles/g/30 min).

Mesmo tendo em conta que no caso das catecolaminas duas enzimas importantes intervêm no seu metabolismo, a catecol-O-metiltransférase e a monaminoxídase e que no caso da 5-HT apenas intervem a monaminoxídase e considerando os metabólitos resultantes da desaminação oxidativa, verificou-se que a quantidade dos referidos metabólitos é maior para a noradrenalina (823±68 picomoles/g/30 min) e para a adrenalina (1109±112 picomoles/g/30 min) do que para a 5-HT (390±31 picomoles/g/30 min).

Pelo facto da 5-HT ser um mau substracto da monaminoxídase B e possuindo a veia safena os dois tipos de monaminoxídase A e B (Caramona 1982) poderia sugerir-se

que a monaminoxídase B fosse responsável pelo acréscimo dos metabólitos desaminados obtidos para as catecolaminas. Tal hipótese não parece poder admitir-se face aos resultados apresentados por Caramona (1985) e Caramona *et al* (1985) que mostram que no tecido intacto da veia safena só a monaminoxídase A está envolvida na desaminação oxidativa da noradrenalina.

A menor acumulação e menor formação de metabólitos poderá no entanto ser atribuída a um mais difícil acesso da 5-HT aos locais de armazenamento e de metabolização.

Para a maior acumulação de adrenalina e noradrenalina intactas no tecido parece contribuir o compartimento intraneuronial uma vez que a presença de cocaína alterou de modo mais importante a acumulação de adrenalina e noradrenalina do que a da 5-HT-^{3}H. A cocaína reduziu a acumulação de modo significativo para todas as aminas mas a redução foi cerca de 90% para ambas as catecolaminas (Paiva e Guimarães 1978) e de 31% para a 5-HT-^{3}H. Confirmou-se o papel do compartimento neuronial na acumulação da 5-HT com o uso da clorimipramina (24 µmol/l; descrita como bloqueador específico de captação de 5-HT em sinaptosomas, com efeito idêntico à cocaína; Squires 1974) que reduziu 36% a acumulação de 5-HT-^{3}H e com os ensaios efectuados em tiras desnervadas onde se observou uma redução de 42% na acumulação relativamente às tiras controlo.

A hidrocortisona (bloqueador da captação extraneuronial) reduziu cerca de 40% a acumulação. Os resultados obtidos permitem concluir que cerca de um terço da acumulação de 5-HT-^{3}H ocorreu nas terminações nervosas e que dos restantes dois terços acumulados extraneuronialmente parte se acumulou via mecanismo sensível aos corticosteroides.

A supressão da captação neuronial não reduziu de modo significativo a formação de metabólitos (embora os valores sejam mais baixos que no controlo), mas a hidrocortisona reduziu essa formação em cerca de 35% o que indica que as estruturas extraneuroniais desempenham papel importante na remoção da 5-HT-^{3}H, funcionando

não só como local de acumulação mas também como local de metabolização. O facto da supressão da captação neuronial não reduzir a formação de metabólitos poderá ser explicado pelo mecanismo compensador, exibido pelas estruturas extraneuroniais, como resultado de uma maior oferta da amina a essas estruturas; idêntica situação foi descrita para as catecolaminas (Osswald *et al* 1971; Guimarães *et al* 1971; Brandão e Guimarães 1972; Levin 1974; Paiva e Guimarães 1978). Contudo, o bloqueio simultâneo da captação neuronial e extraneuronial (pela associação de cocaína e hidrocortisona ou por fenoxibenzamina) resultou em uma redução muito maior da metabolização do que a obtida apenas por bloqueio da captação extraneuronial, nomeadamente de 52% (cocaína + hidrocortisona) e 73% (fenoxibenzamina) (em vez de 35%). Estes resultados são a favor da evidência de que a 5-HT é também metabolizada em quantidade apreciável nas estruturas neuroniais.

Como já foi referido a maior via de inactivação da 5-HT é a desaminação oxidativa pela monaminoxidase, enzima presente quer intra quer extraneuronialmente (Caramona 1983); assim, como era de esperar a pargilina (inibidor da monaminoxidase) aboliu praticamente a formação de metabólitos. Concomitantemente a acumulação de 5-HT-^{3}H no tecido aumentou significativamente, o que representa uma boa evidência para a noção de que a actividade da monaminoxidase é um factor limitante da acumulação de amina. Neste caso o aumento na acumulação parece ocorrer de modo mais importante intraneuronialmente, porque a cocaína reduziu a acumulação em maior grau nas tiras tratadas com pargilina do que nas tiras controlo e para valores que não diferem dos observados somente com a cocaína.

Sabendo que a veia safena de Cão contém monaminoxidase A e B e sendo a pargilina inibidor de ambos os tipos (Neff e Yang 1974) não é possível por este processo definir quais os tipos de enzima envolvidos na metabolização da 5-HT.

O uso de amezínio, descrito como um inibidor da monaminoxidase tipo A, (Steppeler e Starke 1980; Araújo *et al* 1983) que reduziu (na concentração mais alta)

praticamente a formação de metabólitos indica que, nesta preparação, a 5-HT é um substracto específico da monaminoxídase A, o que está de acordo com o descrito para homogeneizados de tecidos (Traut 1979). Ao contrário da pargilina, o amezínio não aumentou a acumulação da 5-HT-^{3}H, porque além de ser um bom substracto da captação neuronial exerce um efeito semelhante à cocaína (Araújo *et al* 1983); o amezinio exerceu efeitos semelhantes à pargilina+cocaína ou desnervação+ pargilina.

A análise dos compartimentos de distribuição da 5-HT mostrou que a 5-HT se distribuiu em 4 compartimentos, um dos quais constitui a fracção fixa, isto é, um compartimento que não contribuiu para o efluxo de radioactivade observada durante o período de 240 minutos de perifusão. A fracção fixa representa 38% da actividade total (isto é, da quantidade de 5-HT-^{3}H recolhido no efluxo + a quantidade de 5-HT-^{3}H presente no tecido no fim de experiência; este valor corresponde à quantidade de amina presente no tecido no início da perifusão), o compartimento III representa 28,9%, o compartimento II representa 26% e o compartimento I 7,6%.

Os tempos de semi-vida dos compartimentos sugerem que o compartimento I ($t_{1/2}$=2,3 min) representa o espaço extracelular, o compartimento II ($t_{1/2}$=16,3 min) estruturas extraneuroniais e o compartimento III ($t_{1/2}$=129,8 min) estruturas neuroniais. De facto, estes tempos de semi-vida não diferem de modo apreciável dos referidos para compartimentos idênticos determinados em ensaios com noradrenalina realizados no coração e aorta de Coelho (Lindmar e Löffelholz 1974; Henseling *et al* 1976 a, b).

A hidrocortisona reduziu o tamanho do compartimento II; o que reforça a noção de se tratar de um compartimento extraneuronial. A cocaína reduziu de modo importante (cerca de 90%) o tamanho da fracção fixa, o que é sugestivo de que esta fracção firmemente ligada se encontra provavelmente armazenada nas vesículas das terminações nervosas, o que está de acordo com o encontrado por Henseling *et al* (1976 a), que mostrou que a reserpina reduziu de modo apreciável a fracção fixa.

Embora os valores do tamanho do compartimento III obtidos na presença de cocaína sejam inferiores aos valores obtidos na situação controlo, esta diferença não foi significativa, o que poderá colocar algumas dúvidas sobre a identificação deste compartimento como neuronial. Para explicação deste facto poder-se-à admitir que a concentração de cocaína (12 µmol/l) não tenha sido suficiente para o bloqueio da captação neuronial (a concentração usada por Henseling *et al* (1976 b) foi cerca de 2,5 vezes maior) ou ainda que parte da 5-HT possa ter entrado por um processo passivo, não bloqueável pela cocaína.

A presença de hidrocortisona conjuntamente com a cocaína diminuiu de modo significativo o tamanho do compartimento III, o que poderá ser sugestivo de que também estruturas extraneuroniais contribuam para os valores de efluxo que determinaram este compartimento .

Sendo o tempo de semi-vida um dos parâmetros que caracteriza determinado compartimento não seria de esperar que a cocaína reduzisse o tempo de semi-vida (contrariamente a uma esperada redução no tamanho do compartimento). Contudo, os resultados obtidos mostraram uma redução significativa no tempo de semi-vida que pode ser explicada se se admitir que a cocaína cortou um mecanismo de recaptação que contribuia para um tempo de semi-vida aumentado nas situações de controlo. Também a fracção fixa, que foi maior na ausência de cocaína, poderá contribuir para o aumento da concentração de amina livre no axoplasma com consequente aumento no tempo de semi-vida do compartimento III.

Depoisde ter sido mostrado que a 5-HT é captada por estruturas extraneuroniais e neuroniais da veia safena de Cão pretendeu-se verificar se a 5-HT-^{3}H acumulada nas terminações nervosas era subsequentemente libertada por estimulação eléctrica dos nervos

simpáticos como acontece com a noradrenalina-^{3}H ou adrenalina-^{3}H (Guimarães *et al* 1978; Brandão *et al* 1980). Com esse fim estimularam-se as preparações (com a monaminoxidase inibida, incubadas prèviamente com 5-HT-^{3}H e montadas para perifusão) numa altura em que o efluxo espontâneo era relativamente estável e baixo. Verificou-se que em cada um dos 3 períodos de estimulação consecutivos se libertou uma quantidade apreciável de 5-HT-^{3}H e não houve diferença significativa entre os efeitos das 3 estimulações. Nas tiras expostas à cocaína a estimulação eléctrica causou apenas um pequeno aumento na libertação de ^{3}H no 1º período, não havendo no 2º e 3º períodos de estimulação praticamente libertação de ^{3}H. Estas experiências mostraram que: 1) a 5-HT-^{3}H acumulada nas tiras de veia safena é susceptível de ser libertada; 2) que a amina ^{3}H provém dos terminais adrenérgicos, uma vez que a incubação prévia com cocaína bloqueou essa libertação.

Se se compararem os resultados destas experiências com os obtidos por Brandão *et al* (1980) (estes autores usaram protocolo idêntico e uma concentração não muito diferente de amina marcada) verifica-se que também os valores das fracções de libertação se mantém praticamente constantes em duas estimulações consecutivas e que esses valores são da mesma ordem de grandeza dos obtidos para a 5-HT-^{3}H. Tais factos mostram que a 5-HT-^{3}H captada pelas terminações nervosas é incorporada nas vesículas de onde é libertada por estimulação eléctrica por um processo idêntico ao das catecolaminas comportando-se assim como co-mediador.

Verbeuren *et al* (1983), com experiências destinadas a verificar em vasos isolados de Cão (veia safena e artérias cerebrais) se a 5-HT era susceptível de se acumular e de ser libertada por estimulação eléctrica (por aplicação de estímulos que se sabia produzirem libertação de noradrenalina) mostraram que os vasos captavam 5-HT-^{3}H de modo dependente da concentração usada e que a acumulação era marcadamente reduzida pela

desnervação com 6-hidroxidopamina ou pelo tratamento prévio com cocaína. Mostraram ainda que a estimulação eléctrica aumentava a libertação de ^{3}H de modo dependente da frequência de estímulos e que o aumento na libertação de ^{3}H era inibido pela tetrodotoxina e desaparecia dos tecidos desnervados ou pré-tratados com cocaína.

As conclusões apresentadas por estes autores, embora usando protocolo experimental diferente, foram essencialmente as mesmas que atrás se referiram: a 5-HT-^{3}H é captada pelos vasos, acumulada nos nervos adrenérgicos e daí é libertada como "falso" mediador juntamente com a noradrenalina.

2. Efeito contráctil da 5-hidroxitriptamina (estimulação de receptores pós-juncionais)

Para estudar o efeito contráctil dos diversos agonistas (5-HT, 8-OH-DPAT e noradrenalina) nas diferentes situações , as experiências foram realizadas (em preparações pré-tratadas com pargilina) na presença de cocaína, hidrocortisona e propranolol (ver métodos).

A 5-HT causou contracções nas tiras de veia safena e a amplitude das contracções dependeu das concentrações usadas. A resposta máxima para a 5-HT foi 75,5±2,1% (n=14) da resposta máxima à noradrenalina . Para comparar o efeito da 5-HT com o efeito de um agonista 5-HT_1 usou-se o 8-OH-DPAT, verificando-se que o 8-OH-DPAT causou também contracções cuja amplitude dependia das concentrações usadas.

A figura 4 representa uma das experiências em que se obtiveram na mesma tira de veia safena uma curva concentração-resposta à 5-HT e outra ao 8-OH-DPAT.

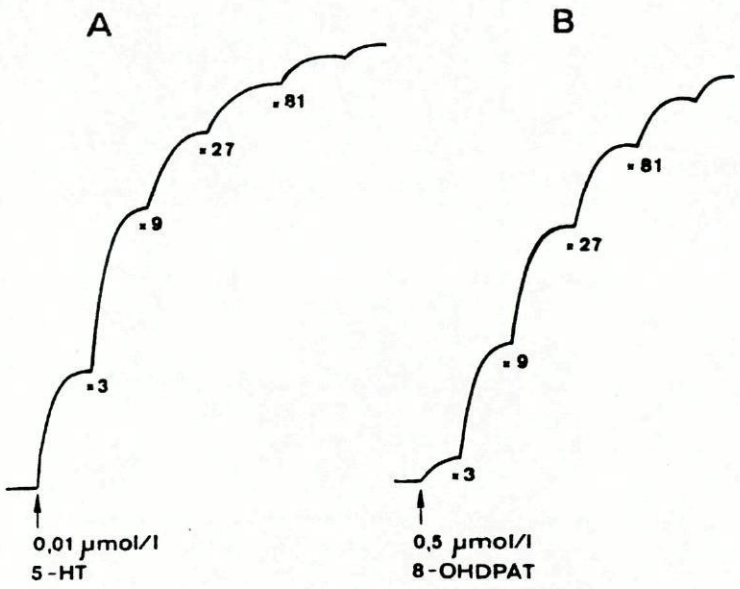


Figura 4. Curvas concentração-resposta em uma tira de veia safena à 5-HT (**A**) e ao 8-OH-DPAT (**B**).

As curvas concentração-resposta para estes agonistas foram paralelas, mas o 8-OH-DPAT foi aproximadamente 100 vezes menos potente que a 5-HT (diferença de 2,06±0,08 unidades logarítmicas; n=6). Os valores da CE_{50} foram de 40,7 (21,9-75,1) nmol/l (n=6) e de 4,2 (2,42-7,14) µmol (n=6) respectivamente para a 5-HT e para o 8-OH-DPAT (ver figura 5).

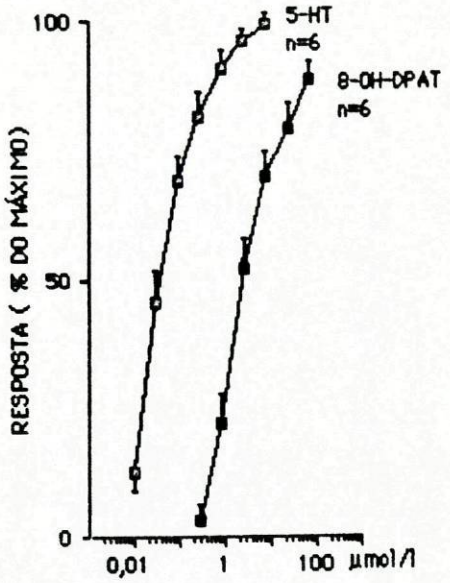


Figura 5. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à 5-HT e ao 8-OH-DPAT. Valores expressos em % da resposta máxima à 5-HT (média ± erro padrão); n- número de experiências.

A metiotepina (0,01 µmol/l) e a ioimbina (1 e 10 µmol/l) deslocaram as curvas concentração-resposta para a direita de modo paralelo, quer para a 5-HT quer para o 8-OH-DPAT (figura 6 A e B). Ao nível da CE_{50}, o deslocamento para a direita produzido pela metiotepina foi de 5,4 vezes (0,73±0,06 unidades logarítmicas; n=6) no caso da 5-HT e de 11,7 vezes (1,07±0,06 unidades logarítmicas; n=6) no caso do 8-OH-DPAT. Os deslocamentos para a direita nas curvas da 5-HT e do 8-OH-DPAT causadas por 1 µmol/l de ioimbina foram de 3,3 vezes (0,52±0,05 unidades logarítmicas; n=6) e de 3,5 vezes (0,54±0,04 unidades logarítmicas; n=6) respectivamente; para 10 µmol/l de ioimbina os respectivos deslocamentos foram de 11,5 vezes (1,06±0,08 unidades logarítmicas; n=6) e de 9,3 vezes (0,97±0,05 unidades logarítmicas; n=6).

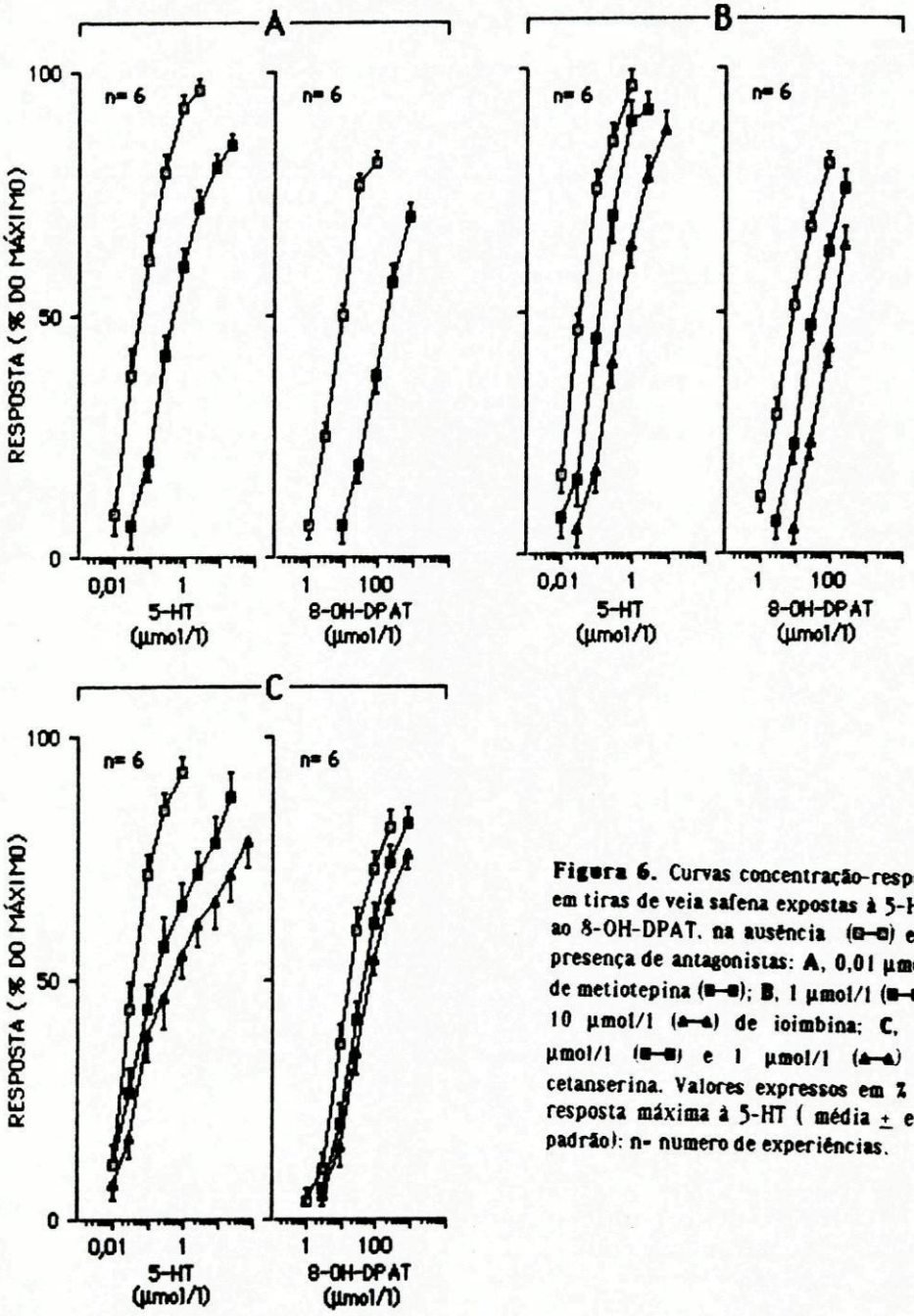


Figura 6. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à 5-HT e ao 8-OH-DPAT, na ausência (■—■) e na presença de antagonistas: **A**, 0,01 µmol/l de metiotepina (■—■); **B**, 1 µmol/l (■—■) e 10 µmol/l (▲—▲) de ioimbina; **C**, 0,1 µmol/l (■—■) e 1 µmol/l (▲—▲) de cetanserina. Valores expressos em % da resposta máxima à 5-HT (média ± erro padrão); n= numero de experiências.

A cetanserina (0,1 e 1 µmol/l) antagonizou as contracções produzidas pela 5-HT de modo não paralelo, deprimindo as respostas mais acentuadamente para as concentrações mais altas ; a redução nas respostas ao 8-OH-DPAT foi relativamente menor como pode ver-se pela figura 6 C. A nível da CE_{50} os deslocamentos para a direita causados por 0,1 µmol/l de cetanserina foram de 3,2 vezes (0,51±0,06 unidades logarítmicas; n=6) e de 2,1 vezes (0,32±0,05 unidades logarítmicas; n=6) para a 5-HT e para o 8-OH-DPAT, respectivamente; os deslocamentos causados por 1 µmol/l de cetanserina foram de 8,3 vezes (0,92±0,07 unidades logarítmicas; n=6) e de 3,3 vezes (0,52±0,04 unidades logarítmicas; n=6) respectivamente para a 5-HT e para o 8-OH-DPAT.

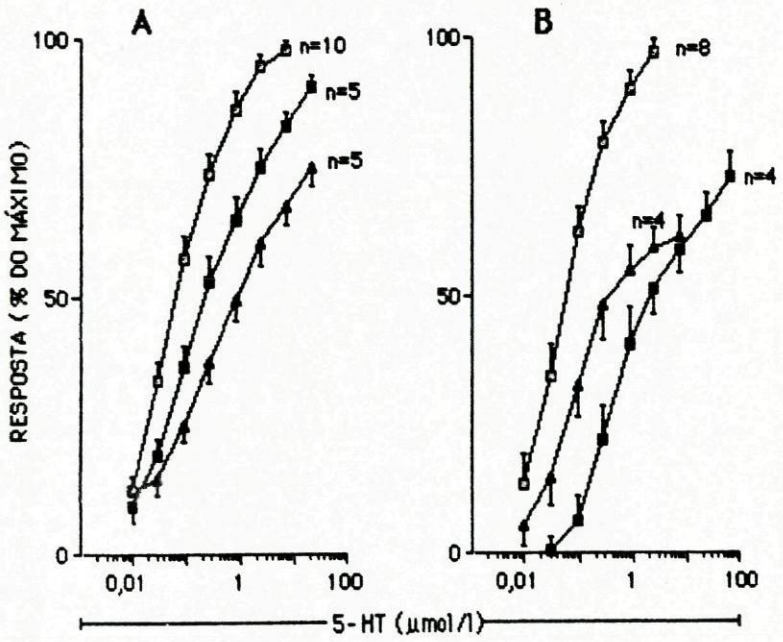


Figura 7. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à 5-HT. Em **A**, na ausência de antagonistas (□—□) ou na presença de 0,1 µmol/l (■—■) e 1 µmol/l (▲—▲) de metisergide. Em **B**, na ausência de antagonistas (□—□) ou na presença de 1 µmol/l de cetanserina (▲—▲) ou de 1 µmol/l de cetanserina + 0,01 µmol/l de metiotepina (■—■). Valores expressos em % da resposta máxima à 5-HT (média ± erro padrão); n- número de experiências.

O metisergide (0,1 e 1 µmol/l) também deslocou para a direita de modo não paralelo as respostas à 5-HT (figura 7A).

Os efeitos de 1 µmol/l de cetanserina e 0,01 µmol/l de metiotepina parecem ser aditivos, uma vez que o deslocamento da curva concentração-resposta da 5-HT, para a direita causado pela combinação de ambos os fármacos a nível da CE_{50} foi maior que o causado por qualquer dos fármacos individualmente (figura 7B); o deslocamento produzido pela cetanserina (1 µmol/l) foi de 7,1 vezes (0,85±0,09 unidades logarítmicas; n=4) enquanto que o causado pela cetanserina (1µmol/l) mais metiotepina (0,01 µmol/l) foi de 37,2 vezes (1,57±0,10 unidades logarítmicas; n=4).

O (-)-pindolol não exibiu efeito antagonista em concentrações de 0,1 e 1 µmol/l (figura 8 A e B)

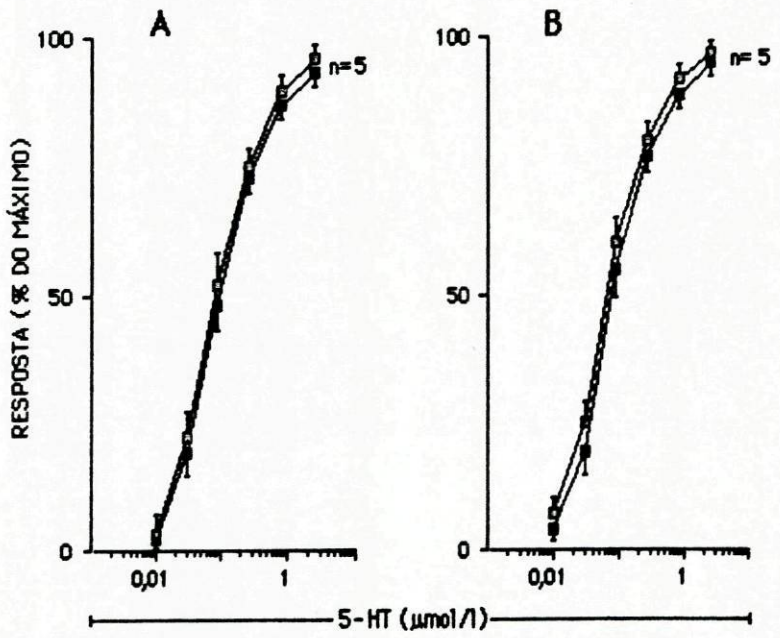


Figura 8. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à 5-HT. Na ausência de (-) pindolol (□—□) ou na presença de (-) pindolol (■—■): em **A** 0,1 µmol/l e em **B** 1µmol/l. Valores expressos em % da resposta máxima à 5-HT (média ± erro padrão); n- número de experiências.

O bloqueio dos adrenoceptores alfa$_1$ e alfa$_2$ pela associação de prazosina (0,1 µmol/) e ioimbina (0,06 µmol/l) produziu um deslocamento para a direita que, embora pequeno, foi significativo (análise dos resultados feita com valores emparelhados; resultados comparados na mesma tira na ausência e na presença dos bloqueadores).

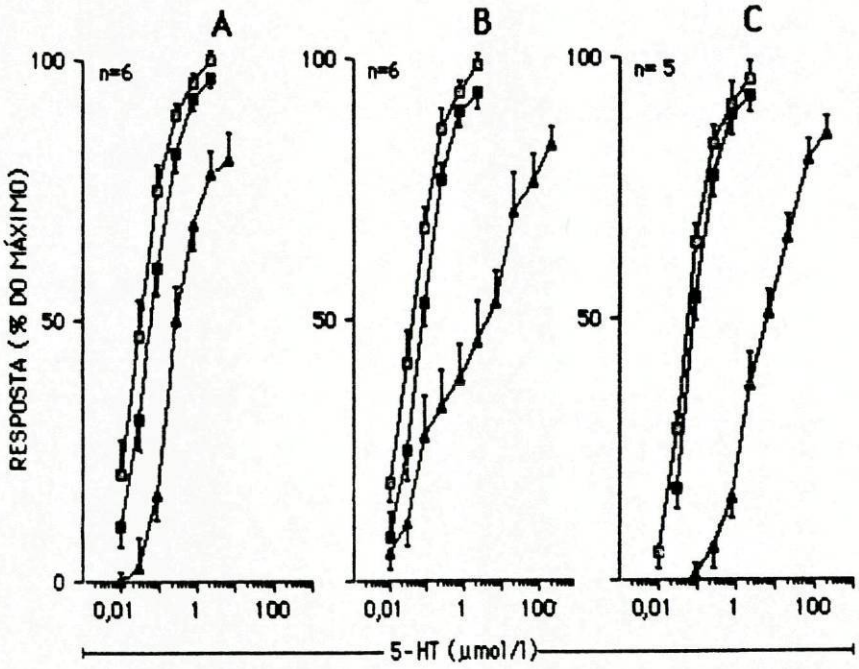


Figura 9. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à 5-HT, na ausência (□—□) ou na presença de antagonistas: 0,1µmol/l de prazosina + 0,06 µmol/l de ioimbina (■—■) em **A**, **B** e **C**; ou prazosina e ioimbina (nas mesmas concentrações) + 0,01 µmol/l de metiotepina, em **A**, ou + 1 µmol/l de cetanserina em **B**, ou + 0,01 µmol/l de metiotepina + 1 µmol/l de cetanserina em **C** (▲—▲). Valores expressos em % da resposta máxima à 5-HT (média ± erro padrão); n- número de experiências.

A metiotepina (0,01 µmol/l), adicionada após a associação de prazosina (0,1 µmol/l) e ioimbina (0,06 µmol/l), causou ainda um deslocamento para a direita idêntico ao já assinalado: 5,8 vezes (0,76±0,06 unidades logarítmicas; n=6) quando avaliado a nível da CE_{50} mas deprimiu o efeito máximo (figura 9A). A cetanserina (1 µmol/l) depois do bloqueio dos receptores adrenérgicos, também deslocou para a direita a curva concentração-resposta à 5-HT, mostrando a curva uma inflexão menos acentuada a nível das concentrações médias (figura 9B). A combinação de metiotepina e cetanserina depois do bloqueio adrenérgico, originou um deslocamento da curva concentração-resposta para a direita de modo paralelo, e da mesma ordem de grandeza do deslocamento produzido pelos mesmos fármacos na ausência de bloqueio adrenérgico (comparar figura 7 B com figura 9C).

Quer a metiotepina (0,01 µmol/l),quer a cetanserina (1 µmol/l), deslocaram as curvas concentração-resposta da noradrenalina para a direita; a metiotepina e a cetanserina nas doses usadas produziram efeitos idênticos (figura 10B e C). A metiotepina causou um deslocamento de 4,8 vezes (0,68 ± 0,07 unidades logarítmicas; n=6) e a cetanserina de 5,4 vezes (0,73±0,09 unidades logarítmicas; n=6) enquanto que o deslocamento para a direita da curva concentração-resposta da noradrenalina produzido pela associação de prazosina (0,1 µmol/l) e ioimbina (0,06 µmol/l) foi de 104,7 vezes (2,02±0,07 unidades logarítmicas n=5) (figura 10A).

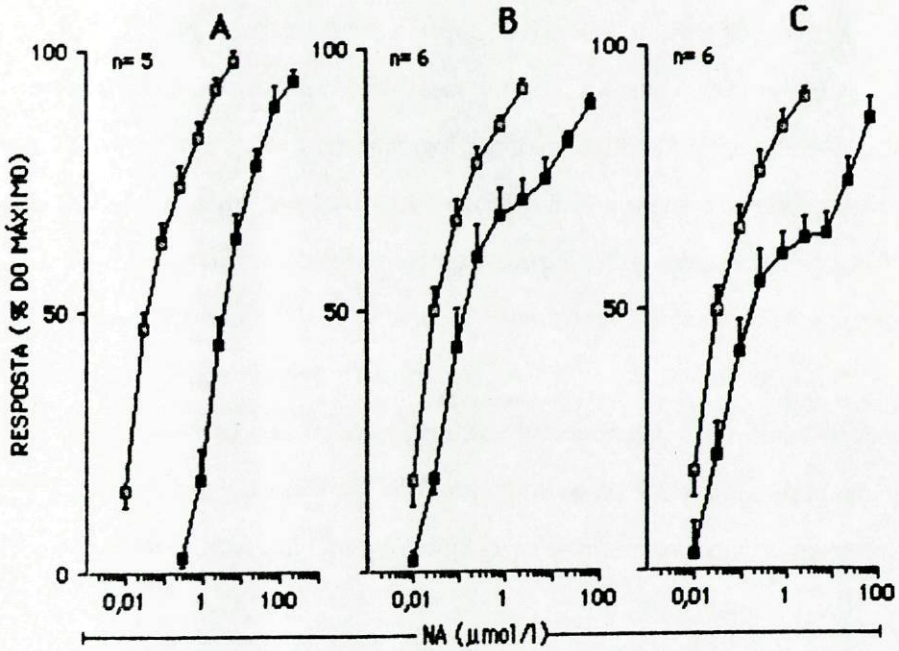


Figura 10. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à noradrenalina, na ausência (□—□) ou na presença de antagonistas: em **A** 0,1µmol/l de prazosina + 0,06 µmol/l de ioimbina, em **B** 0,01 µmol/l de metiotepina e em **C** 1 µmol/l de cetanserina (■—■). Valores expressos em % da resposta máxima à noradrenalina (média ± erro padrão); n- número de experiências.

Comentários

O objectivo destas experiências foi determinar qual o tipo ou tipos de receptores envolvidos no efeito contráctil da 5-HT em tiras de veia safena de Cão. Nestes tecidos a 5-HT causou contracções dependentes da concentração e a resposta máxima que produziu foi cerca de 75% da resposta máxima obtida para a noradrenalina; no entanto, os valores da CE_{50} foram idênticos para ambos os agonistas (comparar fig 5 com fig 10). Usou-se o 8-OH-DPAT descrito como um agonista 5-HT_{1A}, mas que possui também alguma afinidade para os receptores 5-HT_{1D}

(Middleniss e Fozard 1983; Hamon *et al* 1984; Engel *et al* 1986; Heuring e Peroutka 1987; Waeber *et al* 1988) e comparou-se o efeito de vários bloqueadores em relação a este agonista com o efeito obtido em relação à 5-HT (descrita como agonista misto). O 8-OH-DPAT causou contracções dependentes da concentração, sendo cerca de 100 vezes menos potente que a 5-HT.

A metiotepina e a ioimbina deslocaram paralelamente para a direita as curvas concentração-resposta ao 8-OH-DPAT e à 5-HT. O deslocamento causado pela metiotepina foi significativamente maior para o 8-OH-DPAT do que para a 5-HT (11,7 *vs* 5,4 vezes). A ioimbina em ambas as concentrações (1 e 10 µmol/l) causou deslocamento aproximadamente idêntico para a 5-HT e para o 8-OH-DPAT. A cetanserina deslocou as curvas de ambos os agonistas para a direita de modo não paralelo, contudo o deslocamento avaliado a nível da $CE_{50'}$ foi significativamente maior para a 5-HT que para o 8-OH-DPAT.

Sendo a metiotepina um bloquedor 5-HT_1 (também com afinidade para os receptores5-HT_2), a cetanserina um bloqueador específico dos receptores 5-HT_2 e o 8-OH-DPAT um agonista 5-HT_1 e dado que, a metiotepina e a cetanserina bloquearam de modo diferente os efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT conclui-se que na veia safena as contracções produzidas pela 5-HT são mediadas por mais que um tipo de receptores, nomeadamente receptores do "tipo" 5-HT_1 e receptores 5-HT_2. Também os resultados encontrados com a ioimbina são a favor do envolvimento de receptores do tipo 5-HT_1 nas respostas à 5-HT (o que é compatível com os resultados apresentados por Tuncer *et al* 1985).

A noção de que mais que um tipo de receptores está envolvido nas respostas à 5-HT é reforçada pelo facto de que a combinação de cetanserina e metiotepina causou a nível da CE_{50} um deslocamento para a direita que foi maior que o observado com cada um dos fármacos usado isoladamente. Parece ser de admitir a existência de um receptor pós-juncional activado pela 5-HT idêntico a um subtipo descrito recentemente por Heuring e Peroutka (1987), o receptor 5-HT_{1D}. Embora estes autores tenham descrito um "local" de ligação nas membranas do núcleo caudado bovino e

não um receptor, existem duas razões para sugerir que os receptores pós-juncionais 5-HT_1 são idênticos àquele "local": a primeira é a de que o 8-OH-DPAT activa claramente um receptor 5-HT no músculo vascular, sendo cerca de 100 vezes menos potente do que a 5-HT (Peroutka *et al* 1986, admitem a existência de receptores $5\text{-}HT_{1A}$ que medeiam as contracções da 5-HT na artéria basilar de Cão mas mostraram que o 8-OH-DPAT era cerca de 3 vezes mais potente que a 5-HT); além disso o (-) pindolol (considerado com alta afinidade para os locais de ligação $5\text{-}HT_{1A}$ e $5\text{-}HT_{1B}$) não antagonizou o efeito da 5-HT, o que será difícil de explicar se o receptor for do tipo 1A ou 1B; a segunda é a de que a ioimbina é antagonista do 8-OH-DPAT (e da 5-HT). Estas características aplicam-se ao novo subtipo de "local" de ligação como foi proposto por Heuring e Peroutka (1987).

O bloqueio dos receptores alfa$_1$ e alfa $_2$ com prazosina (0,1µmol/l) e ioimbina (0,06 µmol/l) causou deslocamento para a direita das curvas concentração-resposta da 5-HT; o deslocamento embora pequeno foi significativo. Este facto é a favor do envolvimento dos receptores alfa nas contracções causadas pela 5-HT. Parece poder excluir-se um efeito indirecto da 5-HT (efeito contráctil produzido pela noradrenalina libertada das terminações nervosas; Pluchino 1972), uma vez que as experiências se realizaram na presença de cocaína. Por outro lado, o facto de a cetanserina e a metiotepina terem efeito antagonista em relação à noradrenalina permite pôr a hipótese de uma certa participação adrenérgica na resposta à 5-HT.

Os resultados obtidos, nesta preparação vascular, confirmam dados obtidos por outros autores quanto ao antagonismo exercido: pelo metisergide (Apperley *et al* 1980) pela cetanserina (Van Nueten *et al* 1981; Tuncer *et al* 1985) e pela ioimbina (Tuncer *et al* 1985).

A tentativa de classificação dos receptores envolvidos na acção pós-juncional da 5-HT é ainda assunto de discussão. Sabe-se no entanto que há diferenças relativamente aos receptores activados conforme o tipo de vasos. Assim a mediação das contracções induzidas pela 5-HT na aorta de Coelho, na aorta, veia jugular e artéria caudal de Rato tem

sido atribuída a receptores 5-HT_2 (Cohen *et al* 1981; Bradley *et al* 1983; Feniuk *et al* 1983; Maayani *et al* 1984).

Na veia safena de Cão parece que a 5-HT activa diferentes tipos de receptores pós-juncionais, nomeadamente 5-HT_{1D} e 5-HT_2 e possivelmente receptores adrenérgicos alfa. É possível especular sobre a contribuição de cada um desses tipos para o efeito contráctil. A contribuição pode diferir de acordo com a concentração do agonista, a activação dos receptores 5-HT_2 predominará nas altas concentrações. Esta mesma hipótese foi sugerida por Docherty e Hyland (1986) quando discutem os resultados obtidos em experiências com a veia safena humana.

3. Interacção da 5-HT com mecanismos adrenérgicos

Estudou-se a interferência da 5-HT com o mediador adrenérgico (noradrenalina) ao nível: da captação e metabolização, da libertação por estimulação nervosa (efeito pré-juncional) e do efeito contráctil (efeito pós-juncional)

3.1. Interacção a nível da captação e metabolização da NA-^{3}H

Avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de 5-HT (0,1, 1,0 e 10,0 µmol/l) na metabolização e acumulação de 0,1 µmol/l de NA-^{3}H em tiras de veia safena e de artéria mesentérica de animais normais ou previamente tratados com reserpina . A concentração mais baixa de 5-HT não alterou nenhum dos parâmetros em consideração. As concentrações mais altas alteraram quer a quantidade de metabólitos ^{3}H formados quer a acumulação de NA-^{3}H no tecido. Em tiras de veia safena de animais normais 1,0 e 10,0 µmol/l de 5-HT reduziram a formação de metabólitos totais 24 e 28% respectivamente. A concentração mais alta de 5-HT reduziu 44% a acumulação de NA-^{3}H no tecido . A presença de 10,0 µmol/l de 5-HT aumentou 70% a formação de DOPEG (ver tabela 6).

Tabela 6. Acumulação e metabolização de NA-^{3}H (0,1µmol/l) durante um período de 30 minutos de incubação de tiras de veia safena e de artéria mesentérica na ausência (controlo) e na presença de 5-HT. 1 e 10 µmol/l. Os resultados estão expressos em picomoles/g/30min (média ± erro padrão); n- número de experiências.

	Veia Safena (n-3)			**Artéria mesentérica** (n-3)		
Fracções	Controlo	+ 1 µmol/l de 5-HT	+ 10 µmol/l de 5-HT	Controlo	+ 1 µmol/l de 5-HT	+ 10 µmol/l de 5-HT
OMDA	197 ± 73	123 ± 19 *	112 ± 15 *	253 ± 8	270 ± 7	247 ± 14
NMN	177 ± 47	144 ± 23	134 ± 20	182 ± 17	180 ± 15	187 ± 5
DOPEG	16 ± 2	17 ± 1	27 ± 6 *	131 ± 18	182 ± 31 *	189 ± 33 *
DOMA	42 ± 10	37 ± 6	32 ± 8	139 ± 22	177 ± 35	156 ± 31
metabólitos totais	423 ± 57	321 ± 48*	304 ± 41 *	704 ± 57	838 ± 72	777 ± 86
NA-^{3}H acumulada no tecido	453 ± 50	399 ± 44	253 ± 40 *	1021 ± 97	1039 ± 115	737 ± 104 *

* Valores significativamente diferentes do controlo (valores emparelhados) $P < 0,05$.

Nas tiras de artéria mesentérica 10,0 µmol/l de 5-HT reduziram 28% a acumulação de NA-^{3}H no tecido. 1,0 e 10,0 µmol/l de 5-HT aumentaram a formação de DOPEG de 39 e 44% respectivamente (ver tabela 6).

Nas veias safenas de animais reserpinizados 10,0µmol/l de 5-HT reduziram 15% a formação de DOPEG e 23% a formação de DOMA. A redução de acumulação de NA-^{3}H pelos tecidos foi 48%. (ver tabela 7).

Nas artérias mesentéricas de animais reserpinizados 10,0 µmol/l de 5-HT reduziram 33% a formação de DOPEG e 31% a formação de DOMA (tabela 7).

Tabela 7. Acumulação e metabolização de NA-^{3}H (0,1 µmol/l) durante um período de30 minutos de incubação de tiras de veia safena e artéria mesentérica de animal reserpinizado na ausência (controlo) e na presença de 5-HT (10 µmol/l). Os resultados estão expressos em picomoles /g/30min (média ± erro padrão); n- número de experiências

	Veia safena (n-3)		**Artéria mesentérica** (n-3)	
	Controlo	+ 10 µmol/l de 5-HT	Controlo	+ 10 µmol/l de 5-HT
OMDA	185 ± 27	157 ± 16	321 ± 38	294 ± 8
NMN	192 ± 31	183 ± 24	233 ± 47	254 ± 12
DOPEG	288 ± 13	245 ± 8 *	940 ± 71	631 ± 26 *
DOMA	99 ± 4	76 ± 7 *	347 ± 30	239 ± 12 *
metabólitos totais	764 ± 85	660 ± 47	1840 ± 186	1418 ± 50
NA-^{3}H acumulada no tecido	116 ± 15	60 ± 9 *	94 ± 9	90 ± 8

* Valores significativamente diferentes do controlo (valores emparelhados) $P < 0,05$.

Em tiras de veia safena de animal reserpinizado (com a catecol-O-metiltransférase eacaptação extraneuronial inibidas) os valores da CI_{50} (concentração de 5-HT que inibiu 50% a formação de DOPEG ou de DOPEG+DOMA) calculados por interpolação gráfica foram de 40,1±11,0 µmol/l (n=3) e de 25,7± 5,3 µmol/l (n=3) para a formação de DOPEG e de DOPEG+DOMA respectivamente.

3.2. Interacção a nível da libertação de NA-^{3}H por estimulação eléctrica das terminações nervosas

3.2.1. Efeito da incubação com 5-HT na libertação de NA-^{3}H

A presença de 5-HT (1,2 µmol/l) no líquido de incubação com NA -^{3}H (0,2 µmol/l) reduziu significativamente a quantidade de NA-^{3}H acumulada no tecido, de 2,47±0,24 nmoles/g para 1,72±0,20 nmoles/g (ver figura 11A). Como pode ver-se na figura 11B a presença de 5-HT reduziu a fracção de libertação de noradrenalina ^{3}H.

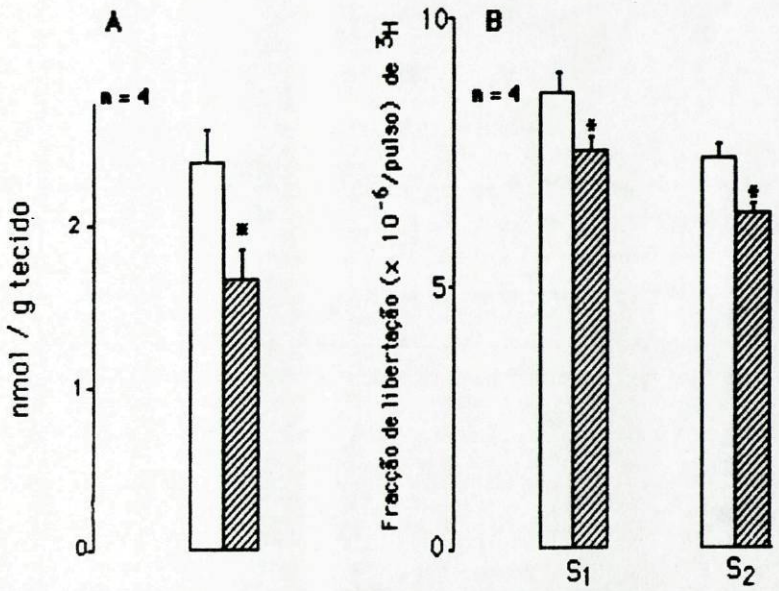


Figura 11. Em **A** : valores de ^{3}H em tiras de veia safena incubadas durante 60 min com NA-^{3}H (0,2µmol/l) na ausência (colunas abertas) ou na presença de 5-HT (1,2 µmol/l) (colunas tracejadas) determinados após 110 min de perifusão. Em **B**: fracção de libertação de ^{3}H por estímulo (2,5 min; 2 ms; 10 Hz; 100 V). S1 e S2 períodos de estimulação iniciados respectivamente aos 110 e 150 min de perifusão de tiras de veia safena incubadas durante 60 min com 0,2 µmol/l de NA-^{3}H (colunas abertas) e com 0,2 µmol/l de NA-^{3}H + 1,2 µmol/l de 5-HT (colunas tracejadas). Em ambos **A** e **B** a monaminoxídase, a catecol-O-metiltransférase e a captação extraneuronial estavam inibidas. Estão representadas as médias ± erro padrão; n= 4 para cada par de colunas.

* Os resultados são significativamente diferentes dos obtidos na ausência de 5-HT ($P < 0,05$).

Essa redução embora pequena (cerca de 13% para ambas as fracções de libertação S_1 e S_2) foi significativa.

3.2.2. Efeito da adição de 5-HT ao líquido de perifusão na libertação de NA-^{3}H

A figura 12 mostra que a 5-HT reduziu de modo dependente da concentração a fracção de libertação da NA-^{3}H. As razões (S_2/S_1) das fracções de libertação (S_1 fracção de libertação antes da adição de 5-HT; S_2 fracção de libertação depois da adição de 5-HT) foram de: 0,65±0,03 (n=3), 0,45±0,03 (n=5) e 0,41±0,04 (n=3) para as concentrações de 0,01, 0,1 , 1,0 µmol/l de 5-HT, respectivamente. Estas razões foram significativamente diferentes da razão obtida nas tiras controlo (na ausência de 5-HT) que foi de 0,81±0,03 (n=5).

A 5-HT nas concentrações mais baixas (0,01 e 0,1 µmol/l) não alterou o efluxo basal de ^{3}H, mas na concentração mais alta (1 µmol/l) aumentou esse efluxo em cerca de 10%.

3.2.3. Efeito da adição de 8-OH-DPAT ao líquido de perifusão na libertação de NA-^{3}H

O 8-OH-DPAT nas concentrações de 1 e 10 µmol/l não alterou a libertação de NA-^{3}H causada por estimulação eléctrica. (figura 12). O 8-OH-DPAT na concentração de 10 µmol/l aumentou moderadamente o efluxo basal de ^{3}H (cerca de 18%).

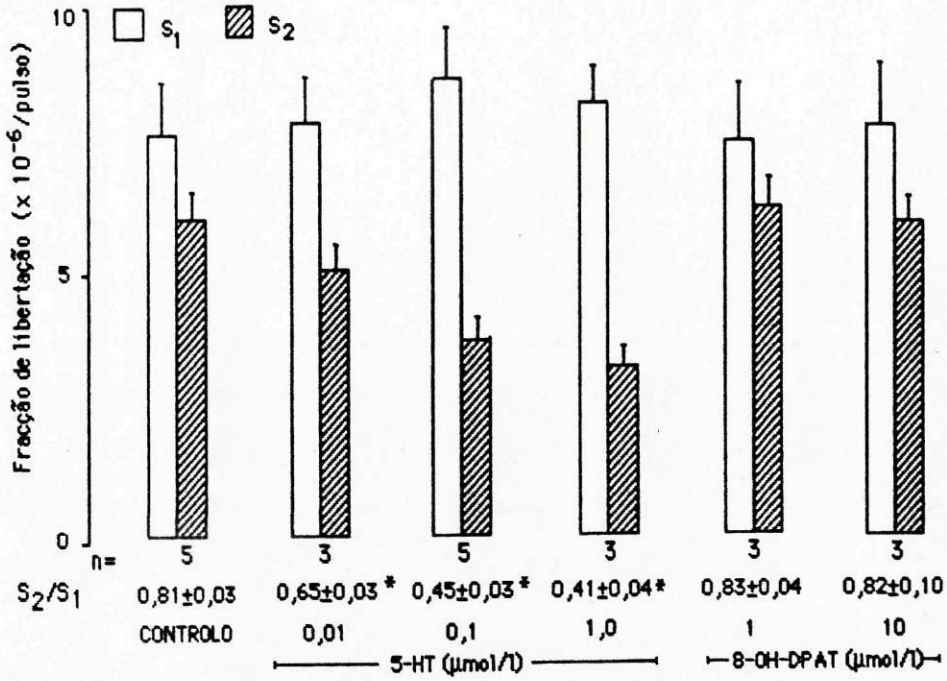


Figura 12 . Fracção de libertação de ^{3}H por estímulo em tiras de veia safena incubadas previamente com NA-^{3}H (0,2 µmol/l) durante 60 min, com a monaminoxídase, a catecol-O-metiltransférase e a captação extraneuronial inibidas. Efectuou-se a estimulação electrica (2 ms; 10 Hz; 100V) aos 110 (S1) e 150 (S2) min de perifusão durante periodos de 2,5 min. A 5-HT ou o 8-OH-DPAT estiveram presentes no liquido de perifusão a partir dos 140 min até ao fim da experiência. Estão representadas as médias ± erro padrão; n- numero de experiências.

* Valores significativamente diferentes do controlo ($P < 0,01$).

3.2.4. Modificação por vários fármacos do efeito da 5-HT na libertação de NA-^{3}H

Escolheu-se, para estudar a eventual influência de vários fármacos no efeito inibidor da 5-HT sobre a libertação de NA-^{3}H, a concentração de 0,1 µmol/l de 5-HT,

concentração que inibia claramente a libertação de NA-^{3}H (figura 12)

Em experiências controlo mostrou-se que os fármacos em estudo (cocaína e antagonistas da 5-HT) não alteraram de modo significativo a razão S_2/S_1. De facto as razões S_2/S_1 obtidas na presença de cocaína (12 µmol/l), ioimbina (1 µmol/l), cetanserina (1 µmol/l), metisergide (1 µmol/l), metiotepina (0,01 e 0,1 µmol/l) e pindolol (1 µmol/l) distribuiram-se entre 0,78±0,03 e 0,89±0,07 (n=3; para cada concentração de fármaco). Estes valores não foram significativamente diferentes do valor de S_2/S_1 (0,81±0,03; n=5) encontrado nas experiências sem qualquer fármaco. Com estes resultados é possível comparar as razões S_2/S_1 obtidas na presença de um antagonista e 5-HT com as razões obtidas na ausência do antagonista (e presença de 5-HT).

Como pode ver-se pela figura 13, o metisergide (1 µmol/l) e a metiotepina (0,1 e 0,01 µmol/l) antagonizaram de modo significativo o efeito inibidor da 5-HT. O metisergide aumentou a razão S_2/S_1 para 0,71±0,03 (n=4) (a razão S_2/S_1 na ausência de metisergide foi de 0,45±0,03; n=5). Os valores S_2/S_1 na presença de 0,01 e 0,1 µmol/l de metiotepina aumentaram (de modo dependente da concentração) para 0,65±0,04 (n=4) e 0,78±0,05 (n=5), respectivamente (a razão S_2/S_1 na ausência de metiotepina foi de 0,45±0,03; n=5).

Os outros fármacos usados (cocaína, ioimbina, cetanserina e pindolol) não modificaram de modo significativo a razão S_2/S_1. Como pode ver-se também na figura 13 , quer a ioimbina (1 µmol/l) quer a metiotepina (0,1µmol/l) aumentaram de modo significativo a libertação produzida pela estimulação eléctrica. As fracções de libertação correspondentes a S_1 passaram de $(8,6\pm0,9)\times10^{-6}$; n=5 (na ausência de fármacos) para $(16,8\pm1,2)\times10^{-6}$; n=3 (na presença de 1 µmol/l de ioimbina) e para $(12,0\pm1,1)\times10^{-6}$; n=5 (na presença de 0,1 µmol/l de metiotepina); contudo, a metiotepina (mas não a ioimbina) antagonizou o efeito inibidor da 5-HT.

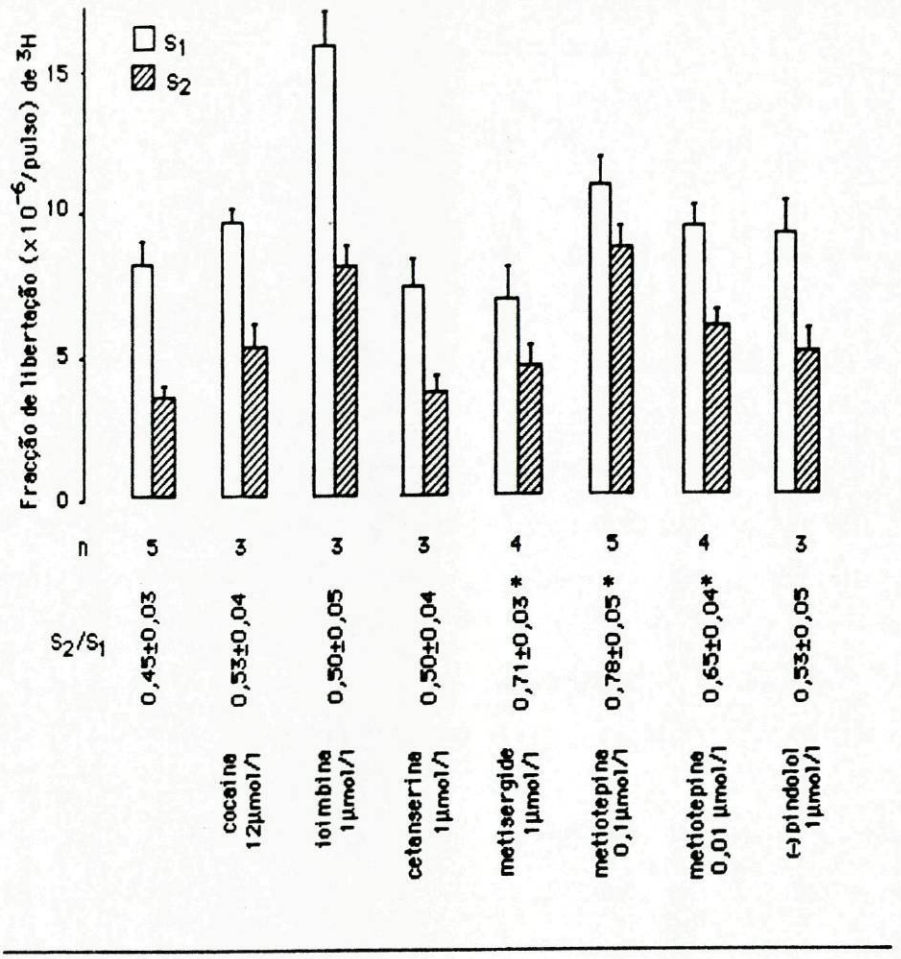


Figura 13. Fracção de libertação de ^{3}H por estímulo em tiras de veia safena incubadas previamente com NA-^{3}H durante 60 min. com monaminoxídase, catecol-O-metiltransférase e captação extraneuronial inibidas. Efectuou-se a estimulação electrica (2 ms; 10 Hz; 100V) aos 110 (S_1) e 150 (S_2) min de perifusão durante periodos de 2,5 min. A 5-HT (0,1 µmol/l) esteve presente no líquido de perifusão a partir dos 140 min até ao fim da experiência. Por baixo das colunas estão indicados os fármacos (e as respectivas concentrações) que se adicionaram ao líquido nutritivo a partir dos 80 min de perifusão e se mantiveram até final da experiência. Estão representadas as médias ± erro padrão; n- número de experiências.

* Valores significativamente diferentes do valor S2/S1 indicado debaixo do primeiro par de colunas (5-HT apenas).

3.3. Interacção da 5-HT com a noradrenalina (e outros agonistas adrenérgicos) a nível do efeito contráctil

Como pode ver-se na figura 14 uma baixa concentração de 5-HT aumentou a resposta contráctil à noradrenalina.

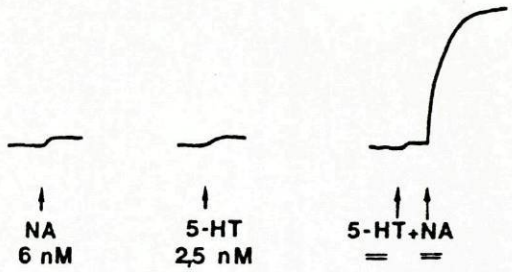


Figura 14. Respostas contrácteis de veia safena produzidas por 6 nmol/l de noradrenalina (NA) e 2,5 nmol/l de 5-hidroxitriptamina (5-HT) adicionadas ao banho separadamente ou em combinação (5-HT + NA).

Realizaram-se outras experiências em que se usaram além de noradrenalina, a fenilefrina e a metoxamina (como agonistas específicos alfa$_1$) e o UK14304 (como agonista específico alfa$_2$). A figura 15 mostra que o efeito dos diferentes agonistas e o efeito 5-HT não atingiram 5% da resposta máxima à noradrenalina, no entanto quando se adicionaram os agonistas adrenérgicos à 5-HT as respostas obtidas estavam claramente aumentadas atingindo valores compreendidos entre 15 e 29% da resposta máxima à noradrenalina. Se se comparar as respostas obtidas quando a 5-HT actuou em combinação com qualquer dos agonistas com as respostas obtidas por cálculo (isto é, quando se adiciona o valor da

percentagem da resposta obtida para a 5-HT com o valor da percentagem da resposta obtida para cada um dos agonistas, adicionados separadamente) verifica-se que são significativamente diferentes.

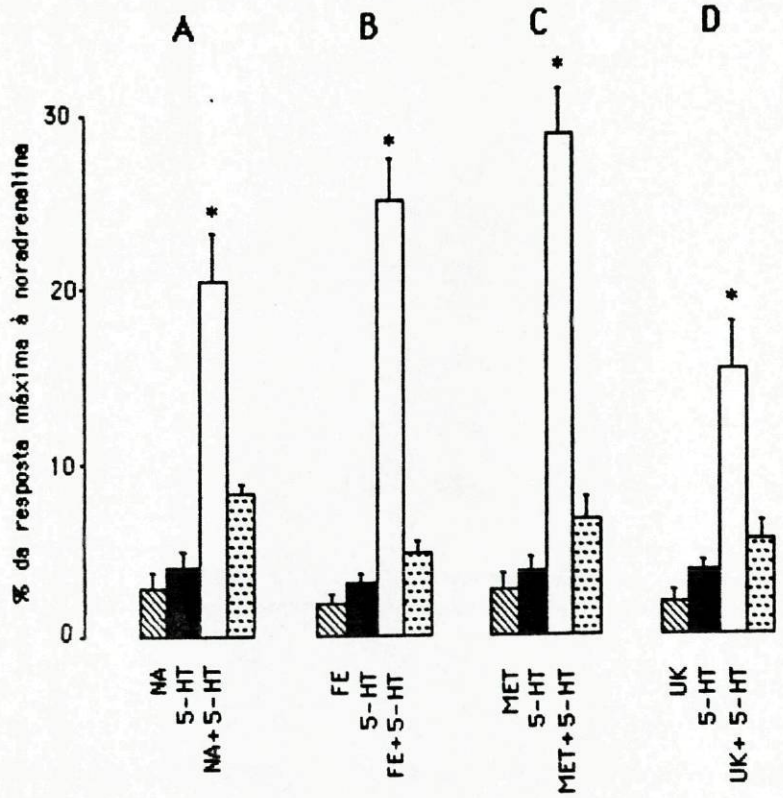


Figura 15. Efeito dos diferentes agonistas adrenérgicos (colunas tracejadas) e da 5-HT (colunas a cheio) ou da combinação dos diferentes agonistas adrenérgicos com a 5-HT (colunas abertas). As colunas ponteadas de cada grupo foram obtidas por cálculo adicionando os efeitos individuais dos agonistas adrenérgicos e da 5-HT.

NA- noradrenalina (7 nmol/l); FE- fenilefrina (100 nmol/l); MET - metoxamina (330 nmol/l); UK - UK14304 (1,8 nmol/l); 5-HT (2,5 a 10 nmol/l). Valores expressos em % da resposta máxima à NA (média ± erro padrão); n - 5 para cada grupo.

* O efeito dos agonistas + 5-HT (colunas abertas) é significativamente diferente do previsto por calculo (colunas ponteadas).

Para verificar se o efeito amplificador se exercia para concentrações mais altas dos agonistas adrenérgicos obtiveram-se curvas de concentração-resposta pelo método cumulativo para os diversos agonistas na ausência e na presença de baixas concentrações de 5-HT (ver figura 16).

Como as curvas de concentração-resposta na presença de 5-HT convergiam com as obtidas na sua ausência para as concentrações mais altas dos agonistas, avaliaram-se os deslocamentos das curvas para a esquerda produzidos pela 5-HT a nível das CE_{30} (concentrações que produziram 30% da resposta máxima). A este nível os deslocamentos para a esquerda foram análogos em todas as situações (ver resultados, tabela 8).

Tabela 8 Desvios para a esquerda produzidos pela 5-HT nas curvas concentração-resposta para os diferentes agonistas. Avaliaram-se os resultados a nível da CE_{30} (representam média ± erro padrão em unidades logarítmicas); n- número de experiências.
Os valores dentro dos parentesis representam os cocientes entre os valores médios das CE_{30} (CE_{30} na ausência de 5-HT / CE_{30} na presença de 5-HT).

Fenilefrina	n - 6	0,291 ± 0,030	(1,95)
Metoxamina	n - 6	0,266 ± 0,039	(1,85)
Noradrenalina	n - 8	0,244 ± 0,029	(1,67)
UK 14304	n - 6	0,209 ± 0,043 *	(1,62)

* Estes valores foram obtidos ao nível da CE_{30} em relação à resposta máxima ao UK 14304 que corresponde a 70% da resposta máxima para a noradrenalina.

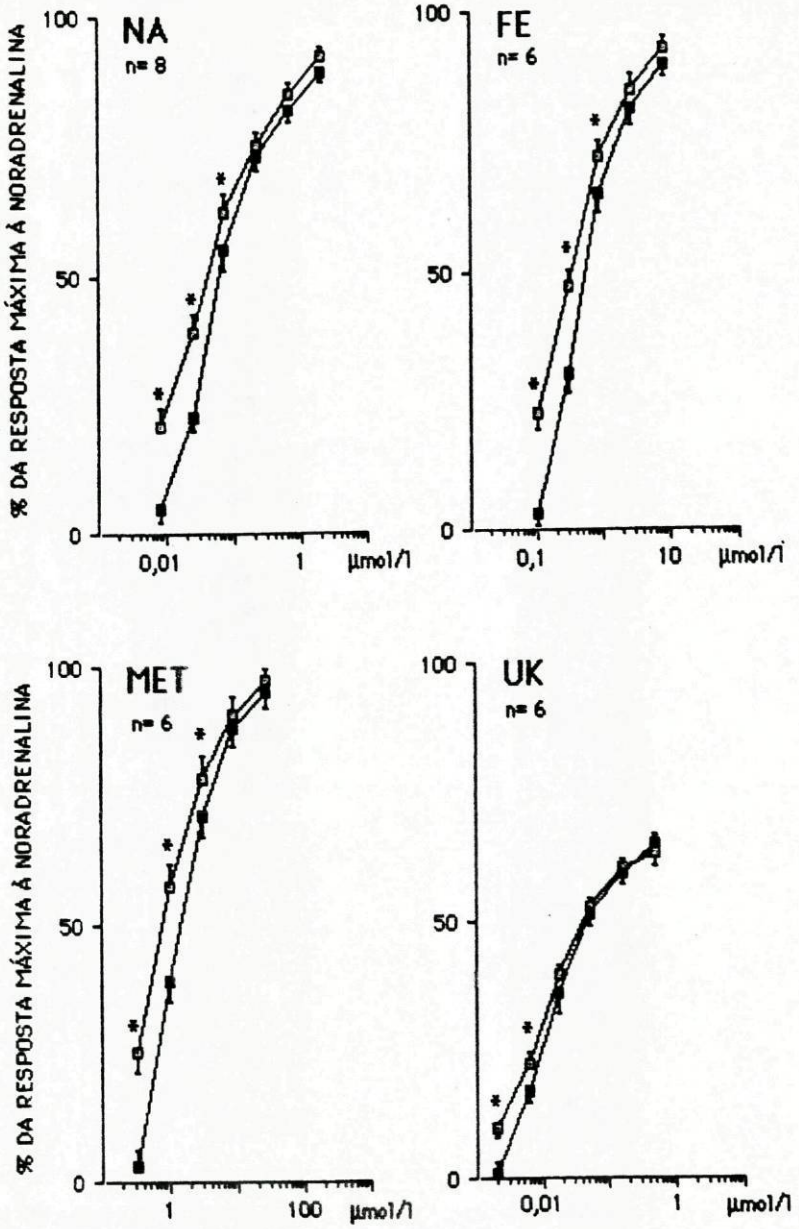


Figura 16. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à NA, fenilefrina (FE), metoxamina (MET) e UK14304 (UK). Na ausência de 5-HT (■—■) e na presença de 5-HT (□—□). Valores expressos em % da resposta máxima à noradrenalina (média ± erro padrão); n- número de experiências.

* As respostas obtidas na presença de 5-HT foram significativamente diferentes das obtidas na ausência de 5-HT ($P < 0,05$).

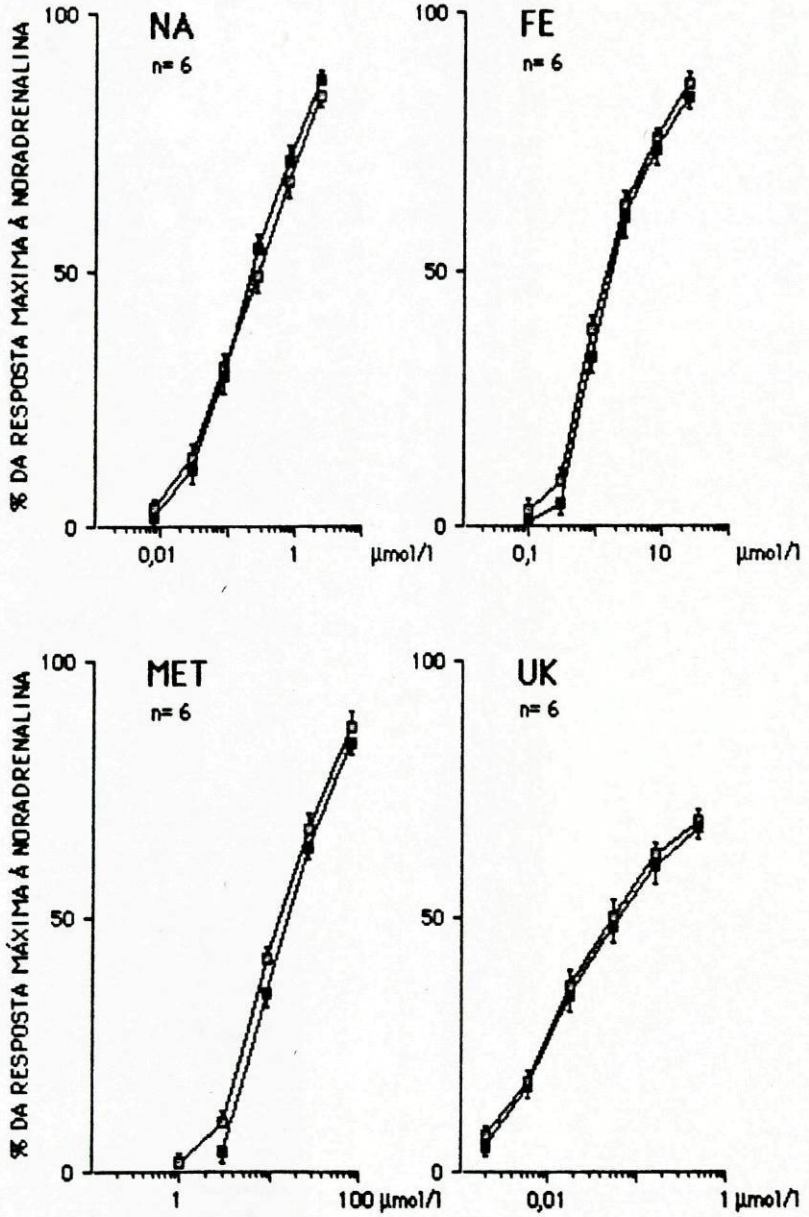


Figura 17. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à noradrenalina (NA), fenilefrina (FE), metoxamina (MET) e UK14304 (UK) obtidas na presença de 0,1 µmol/l de cetanserina. Na ausência de 5-HT (■—■) e na presença de 5-HT (□—□). Valores expressos em % da resposta máxima à noradrenalina (média ± erro padrão); n= número de experiências.

Para saber se o efeito amplificador da 5-HT era mediado por receptores 5-hidroxitriptaminérgicos ou eventualmente receptores adrenérgicos, obtiveram-se de igual modo curvas concentração-resposta, mas na presença de vários bloquedores: cetanserina, metiotepina, ioimbina e prazosina.

A cetanserina (0,1µmol/l) e a metiotepina (0,01µmol/l) inibiram os deslocamentos para a esquerda produzidos pela 5-HT (figura 17) e o efeito inibidor foi dependente do grau de bloqueio das respostas contrácteis à 5-HT.

A prazosina (0,1µmol/l) e a ioimbina (0,06µmol/l) não antagonizaram o efeito amplificador da 5-HT relativamente à noradrenalina (figura 18).

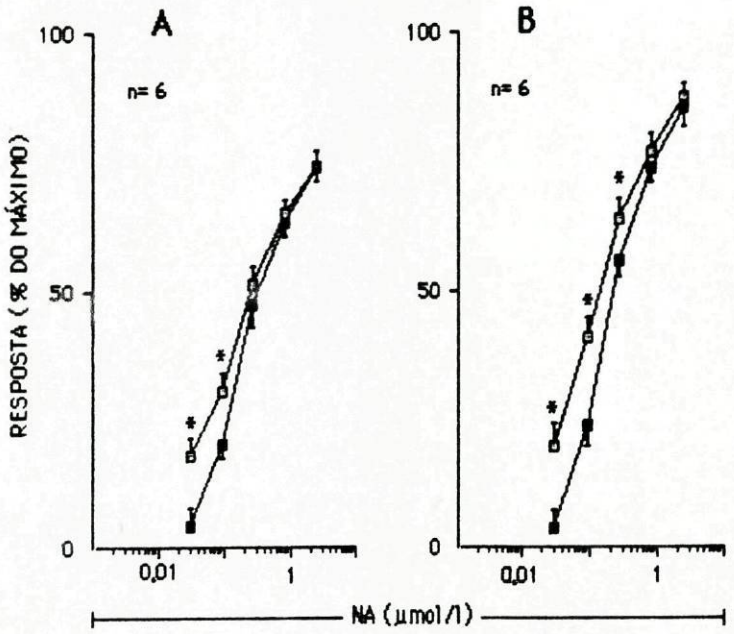


Figura 18. Curvas concentração-resposta em tiras de veia safena expostas à noradrenalina obtidas: em **A** na presença de 0,1 µmol/l de prazosina e em **B** na presença de 0,06µmol/l de ioimbima. Na ausência de 5-HT (■—■); na presença de 5-HT (□—□). Valores expressos em % da resposta máxima à noradrenalina (média ± erro padrão); n- número de experiências.

* As respostas obtidas na presença de 5-HT foram significativamente diferentes das obtidas na ausência de 5-HT ($P < 0,05$).

3.4. Comentários

Entre os múltiplos efeitos da 5-hidroxitriptamina sobre o território vascular tem sido objecto de particular interesse o estudo da interferência desta amina com os mecanismos adrenérgicos.

A interferência com a noradrenalina pode processar-se pelo menos a três níveis: a nível da sua captação e metabolização, a nível da sua libertação pelas terminações nervosas adrenérgicas e a nível do seu efeito contráctil (activação de receptores pós-juncionais).

Ao estudar o primeiro aspecto desta interferência pretendeu-se analisar a eventual influência da 5-HT na acumulação e metabolismo da NA-^{3}H em experiências de incubação com dois tecidos vasculares diferentes: a veia safena e a artéria mesentérica de Cão.

Concentrações baixas de 5-HT (0,1 µmol/l) não alteraram a acumulação de NA-^{3}H nos tecidos nem a formação de metabólitos. Contudo, concentrações mais altas (10 a 100 vezes) reduziram a formação de metabólitos totais na veia safena e a acumulação de NA-^{3}H (na concentração 100 vezes superior) em ambos os tecidos. Esta redução na formação de metabólitos totais ou na acumulação de NA-^{3}H pode explicar-se pela competição da 5-HT com a NA-^{3}H no acesso aos locais de acumulação e de inactivação desta catecolamina. Um tanto inesperadamente verificou-se que a fracção desaminada (DOPEG) era significativamente aumentada pelas concentrações mais altas da 5-HT, o que levou a admitir que a 5-HT pudesse interferir nas terminações nervosas a nível vesicular impedindo a entrada de NA-^{3}H ou promovendo a sua saída das vesículas e, assim, proporcionando uma maior oferta de NA-^{3}H à monaminoxidase presente no axoplasma. As experiências realizadas em tiras de vasos de animais reserpinizados (nestas preparações há perda da capacidade

de acumulação vesicular) mostraram que a 5-HT (10 µmol/l) não aumentou a formação de DOPEG. Pelo contrário, verificou-se uma redução de ambos os metabólitos desaminados: o DOPEG e o DOMA. Como a actividade da monaminoxídase intraneuronial é muito alta (Cassis *et al* 1986) não é provável que o aumento da oferta de substracto a esta enzima conduza à saturação da sua capacidade desaminativa. É, pois, de admitir que o factor limitante da formação de metabólitos desaminados seja a saturação do sistema de transporte (devido à concentração relativamente alta de 5-HT).

Para saber se a redução da formação de metabólitos desaminados era dependente da concentração de 5-HT realizaram-se alguns ensaios em que se usaram preparações de veia safena com a catecol-O-metiltransférase e a captação extraneuronial inibidas. Determinaram-se nestas circunstâncias quais as concentrações de 5-HT (CI_{50}) capazes de reduzir a 50% a formação de DOPEG e a formação de ambos metabólitos desaminados (DOPEG+DOMA). Os valores de CI_{50} foram 40 µmol/l e 26 µmol/l em relação à formação de DOPEG e de DOMA+DOPEG respectivamente. Estes valores traduzem mais provavelmente um índice da capacidade de bloqueio do transporte da NA-^{3}H para o axoplasma do que um índice de capacidade metabolizante da enzima. São valores bastante inferiores aos referidos por Caramona (1982) que obteve valores de Km da monaminoxídase para a 5-HT à volta de 700 µmol/l em veia safena e artéria mesentérica de Cão. A corroborar a hipótese posta estão os resultados referidos por Langeloh *et al* (1987) que referem um valor de Km (determinado como a concentração de 5-HT que inibia 50% da captação neuronial de NA-^{3}H) de 44,3 µmol/l obtido em preparações de canal deferente de Rato, valor semelhante ao encontrado no estudo da capacidade metabolizante da veia safena.

O segundo aspecto da interferência da 5-HT que se relaciona com a libertação de NA-^{3}H pelas terminações nervosas adrenérgicas foi abordado de 3 modos diferentes.

Numa primeira série de ensaios mostrou-se que a presença de 5-HT simultaneamente com a NA-^{3}H no líquido de incubação reduziu a quantidade de NA-^{3}H acumulada no tecido e a fracção de libertação de NA-^{3}H produzida por estimulação eléctrica.

A redução da acumulação (provavelmente neuronial, dado que a avaliação foi feita depois de um período de lavagem relativamente longo) não é de surpreender uma vez que a 5-HT (em concentração cerca de 6 vezes superior à de NA-^{3}H) deverá competir com a NA-^{3}H no transporte para dentro do nervo ou nos processos de acumulação vesicular, quer interferindo na entrada para as vesículas, quer promovendo a libertação de NA-^{3}H das vesículas.

A redução da fracção de libertação poderá ser devida à libertação de 5-HT simultaneamente com a NA-^{3}H a partir das terminações nervosas por estimulação eléctrica. Mostrou-se em experiências anteriores que a 5-HT era captada por estruturas neuroniais e libertada das varicosidades por estimulação eléctrica. Pode admitir-se que a 5-HT libertada conjuntamente com a NA-^{3}H seja capaz de activar receptores pré-juncionais responsáveis pela inibição da libertação de NA-^{3}H. Resultados semelhantes foram obtidos por Cohen (1987) na artéria tibial de Cão e por Meehan e Story (1989) na artéria da orelha de Coelho. propondo estes autores que a 5-HT libertada conjuntamente com a NA-^{3}H activaria receptores pré-juncionais do "tipo" 5-HT_1.

Numa segunda série de ensaios pretendeu-se verificar a influência da 5-HT, adicionada ao líquido de perifusão (isto é, administrada exogenamente), na libertação de NA-^{3}H por estimulação eléctrica, de tiras previamente carregadas com esta amina. Verificou-se que a 5-HT inibia de modo dependente da concentração a libertação de NA-^{3}H, o que confirma os resultados obtidos por Mc Grath (1977); Feniuk *et al* (1979); Watts *et al* (1981) e Engel *et al* (1983).

Numa terceira série de ensaios tentou-se definir o tipo de receptores envolvidos na inibição da libertação da noradrenalina. Para este propósito usaram-se diferentes antagonistas da 5-HT com vários graus de selectividade e estudou-se a sua influência na

libertação de noradrenalina. Enquanto que Mc Grath (1977) e Fentuk *et al* (1979) mostraram que o metisergide era inactivo ou pouco potente em antagonizar o efeito inibidor da 5-HT, nas nossas experiências o referido fármaco antagonizou de modo claro os efeitos pré-juncionais da 5-HT. Das outras substâncias usadas só a metiotepina partilhou o efeito do metisergide mostrando um antagonismo claro; assim a cetanserina, o pindolol e a ioimbina não modificaram o efeito da 5-HT. O 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) não afectou a libertação de NA-^3H por estimulação eléctrica, mesmo quando usado em concentraçoes 10 a 1000 vezes superiores às concentrações activas de 5-HT.

O facto da cetanserina (um bloqueador específico 5-HT_2) não exercer qualquer bloqueio, leva a excluir o envolvimento dos receptores 5-HT_2 no efeito da 5-HT. Os resultados são a favor do envolvimento dos receptores 5-HT_1, porém, uma vez que o 8-OH-DPAT não teve qualquer efeito, é de admitir a exclusão da participação de receptores 5-HT_{1A}, o que está de acordo com os dados encontrados por Charlton *et al* (1986) no rim de Rato e de Göthert *et al* (1986a, b) na veia cava de Rato e na veia safena humana.

Molderings *et al* (1987) propuseram o subtipo 1B para a veia cava de Rato , mas o facto do (-)-pindolol que tem alta afinidade para os "locais" de ligação 5-HT_{1B} (Engel *et al* 1986) não antagonizar o efeito da 5-HT pode ser tomada como evidência de que o receptor pré-juncional da veia safena de Cão não pertence ao tipo 1B; de resto, até ao momento presente, apenas se conhece a existência do subtipo 1B em tecidos de Rato e Ratinho.

Confrontando os resultados obtidos por Waeber *et al* (1988), que caracterizam um "local" de ligação do tipo 5-HT_{1D} nas membranas de diversas espécies de animais em diversas áreas cerebrais, com os resultados obtidos por Pazos *et al* (1984) que caracterizam um" local" de ligação do tipo 5-HT_{1C} no plexo coroideu do cérebro de Porco, e uma vez que nas nossas experiências o metisergide revelou efeito antagonista mas a ioimbina não, poderia especular-se sobre a possibilidade do envolvimento de um receptor não do tipo 5-HT_{1D} (como acontece a nível pós-juncional) mas do tipo 5-HT_{1C}. Tal não parece ser o caso, uma vez que a 5-carboxamidatriptamina (agonista de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, mas não de receptores 5-HT_{1C}; Peroutka 1988) se

revelou ser ainda mais activa que a 5-HT na inibição da libertação de noradrenalina -^{3}H como foi demonstrado nesta preparação por Engel *et al* (1983).

De qualquer modo, os nossos resultados reforçam a noção de que os receptores pré-juncionais parecem ser relativamente homogéneos nos diferentes órgãos e espécies estudados, na medida em que se pode considerar que pertence ao tipo 5-HT$_1$ (Göthert 1987).

No último aspecto estudou-se a interferência da 5-HT no efeito contráctil da noradrenalina.

Trabalhos de alguns autores mostraram que a 5-HT em baixas concentrações aumentava a amplitude das respostas contrácteis à noradrenalina e a outros agentes contracturantes em várias artérias (De la Lande *et al* 1966; Van Nueten *et al* 1981, 1982; Seabrook e Nolan 1983; Su e Uruno 1984; Stupecky *et al* 1986). Em relação a preparações venosas tanto quanto se conhece existe apenas uma referência a este efeito potenciador (Felix *et al* 1986).

Sendo as veias safenas tecidos muito sensíveis à acção da 5-HT e dotados de receptores alfa$_1$ e alfa$_2$, (De Mey e Vanhoutte 1980; Langer e Shepperson 1981; Guimarães *et al* 1983) decidiu-se verificar se o efeito amplificador da 5-HT se manifestava neste tecido em relação à noradrenalina (um agonista alfa$_1$ e alfa$_2$) e em relação a agonistas específicos alfa$_1$ (fenilefrina e metoxamina) e alfa$_2$ (UK 14304).

Os resultados mostraram que a 5-HT em concentração relativamente baixa aumentou as respostas contrácteis desencadeadas por concentrações relativamente baixas de noradrenalina, metoxamina fenilefrina e UK 14304. Usando concentrações dos vários agonistas que produziram contracções de amplitude semelhante verificou-se que o grau de amplificação era aproximadamente idêntico, o que nos permite concluir que este efeito se exerce quer para contracções mediadas por receptores alfa$_1$ quer alfa$_2$.

Para se saber se o efeito amplificador se exercia para qualquer concentração do

agonista adrenérgico realizaram-se experiências em que se obtiveram curvas concentração-resposta pelo método cumulativo. Os resultados mostraram que as curvas na presença de 5-HT convergiam com as obtidas na ausência desta amina para valores que se situavam entre os 50 - 70 % da contracção máxima.

De acordo com o proposto por Draskóczy e Trendelenburg (1968) e Asano e Hidaka (1980) e dado que não houve deslocamento paralelo para a esquerda das curvas concentração-resposta esta interacção embora aditiva não pode designar-se por potenciação. Stupecky *et al* (1986) designaram este tipo de interacção como "sinergismo limiar".

Pode induzir-se um deslocamento para a esquerda de uma curva concentração-resposta de um agonista por um segundo agonista se este bloqueia a captação, metabolismo ou outra via de eliminação do primeiro agonista. Tal não é o caso, porque as experiências se realizaram em preparações pré-tratadas com pargilina e na presença de cocaína, bloqueando-se assim as principais vias de inactivação, e ainda porque alguns dos agonistas usados, metoxamina e UK 14304 não são susceptíveis de degradação enzimática. Assim, o mecanismo subjacente a este "sinergismo limiar" parece operar a nível da activação dos receptores ou mesmo para além deste nível.

Para elucidar acerca do papel dos receptores 5-hidroxitriptaminérgicos ou adrenérgicos no efeito amplificador repetiram-se as experiências obtendo curvas concentração-resposta na presença de bloqueadores dos receptores da 5-HT; cetanserina (para bloquear receptores 5-HT_2) e metiotepina (para bloquear receptores 5-HT_1 e 5-HT_2) e de bloqueadores adrenérgicos : ioimbina (para bloquear receptores alfa$_2$) e prazosina (para bloquear receptores alfa$_1$). A cetanserina e a metiotepina antagonizaram o efeito amplificador da 5-HT em relação a todos os agonistas o que revela que os receptores 5-HT_1 e 5-HT_2 estão envolvidos neste efeito.

Nem a prazosina nem a ioimbina bloquearam o efeito amplificador em relação à noradrenalina, o que sugere que o efeito amplificador da 5-HT não é mediado pela activação alfa$_1$ ou alfa$_2$.

IV. DISCUSSÃO GERAL

Sendo a 5-HT uma amina biogénica dotada de grande actividade biológica e com efeitos potencialmente nefastos não é de surpreender que existam vários mecanismos capazes de impedirem a sua presença no organismo na forma activa. Sabe-se que os mecanismos mais importantes responsáveis pela remoção da 5-HT livre no sangue circulante são a degradação enzimática pela monaminoxídase, particularmente no fígado (Drapanas e McDonald 1963; Thomas e Vane 1967) e a rápida remoção pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos, principalmente do circuito pulmonar, com subsequente desaminação pela monaminoxídase (Thomas e Vane 1967; Junod 1972; Bakle e Vane 1974; Gillis e Pitt 1982; Catravas e Gillis 1983). A captação pelas plaquetas onde a 5-HT se acumula numa forma funcionalmente inactiva (Born e Gilson 1959; Tranzer *et al* 1966; Pletscher 1968) representa também um processo relativamente rápido de remoção da amina que escapa à degradação pelo fígado ou à captação pelos vasos pulmonares. A ligação às proteínas constitui ainda um mecanismo fisiológico de inactivação funcional da 5-HT (Gershon e Tamir 1985).

Thomas e Vane (1967) mostraram que por uma simples passagem através da circulação pulmonar é removida cerca de 90% da 5-HT administrada em infusão venosa. Além dos vasos pulmonares outros vasos contribuem de modo importante para a remoção da amina. 50% da 5-HT injectada intrarterialmente em *bólus* desaparecem numa única passagem através da pata perfundida de Cão anestesiado (Pitt *et al* 1982).

Com métodos histoquímicos de fluorescência ou por autoradiografia e em

alguns casos por comparação das características de remoção da amina nos circuitos vasculares com as características de remoção por células endoteliais em cultura mostrou-se serem as células endoteliais as responsáveis pela remoção rápida e metabolização da 5-HT a partir dos circuitos vasculares (Strum e Junod 1972; Shepro *et al* 1975). Além das células endoteliais outras estruturas são capazes de captar e armazenar a 5-HT, embora de modo mais lento (Axelrod e Inscoe 1963). Assim é possível que a 5-HT que escapa à desaminação oxidativa pelas células endoteliais seja captada e acumulada noutras estruturas extraneuroniais (nomeadamente nas células musculares dos vasos) ou nas terminações nervosas, podendo esta acumulação ser significativa em situações patológicas em que há lesão do endotélio. A confirmar este facto o trabalho de Cohen *et al* (1987) mostra, *in vivo*, usando o Cão como animal de experiência, que após lesão do endotélio a 5-HT (resultante da agregação plaquetária) se acumula nas terminações nervosas das artérias coronárias, alterando a função dos nervos adrenérgicos.

Nas experiências que realizamos na veia safena de Cão com o propósito de estudar os mecanismos responsáveis pela remoção e inactivação da 5-HT mostramos também que esta amina é captada pelas terminações nervosas adrenérgicas incorporando-se parcialmente nas vesículas donde pode ser libertada por estímulos capazes de promoverem exocitose. Mostramos ainda que além das terminações nervosas a 5-HT é captada por estruturas extraneuroniais donde difunde para o exterior desde que o gradiente seja favorável. Depois de captada por qualquer das estruturas (neuronial ou extraneuronial) pode ser metabolizada por desaminação oxidativa pela monaminoxídase A. Não tivemos qualquer evidência da existência de mecanismos de captação ou metabolismo que pudessem ser considerados específicos para esta amina. Assim a captação neuronial é sensível à cocaína (como se pode mostrar pelos efeitos idênticos que se obtiveram com cocaína ou por desnervação). Os efeitos da clorimipramina foram semelhantes aos da cocaína; a clorimipramina é descrita como um bloqueador específico do processo de captação da 5-HT no s sinaptosomas (Squires 1974). A hidrocortisona inibiu

apenas parcialmente a captação extraneuronial o que parece poder significar a existência de dois componentes desta captação, sendo um deles resistente ao bloqueio pelos corticosteróides. Isto é precisamente o que acontece nesta preparação com as catecolaminas (Azevedo e Osswald 1976; Paiva e Guimarães 1978).

Os dados cinéticos relativamente à captação extraneuronial obtidos em experiências de incubação em condições que excluiam a captação neuronial e o metabolismo não diferem substancialmente dos referidos para as catecolaminas em várias preparações de músculo vascular ou não vascular (Trendelenburg 1980). A captação total apresentou duas componentes: uma componente não saturável e uma componente saturável com um Km de 391 µmol/l e uma Vmax de 45 nmol/g/min (Paiva *et al* 1984). Os valores de Km na veia safena revelaram-se relativamente mais elevados do que os referidos por outros autores para a captação extraneuronial da 5-HT no coração perfundido de Rato (Grohmann e Trendelenburg 1984; Bryan *et al* 1989). Tal variação pode ser atribuída às diferenças de tecido ou de espécie ou ainda pode ser interpretada como sendo devida à tendência que existe para que os valores de Km sejam maiores quando obtidos em experiências de incubação do que quando obtidos em experiências de perfusão (Grohmann e Trendelenburg 1984).

A análise compartimental revelou que a 5-HT se distribui em 4 compartimentos, um dos quais constitui a fracção fixa. Pela análise dos tempos de semi-vida dos compartimentos que contribuem para o efluxo de radioactividade observado durante o período de perifusão e ainda pela análise das alterações do tamanho dos compartimentos pelos bloqueadores da captação neuronial e extraneuronial é de admitir que esses compartimentos representem o espaço extracelular (compartimento I), estruturas extraneuroniais (compartimento II) e terminações nervosas e possivelmente também estruturas extraneuroniais (compartimento III). O facto de a cocaína reduzir consideravelmente (cerca de 90%) o valor da fracção fixa indica a natureza neuronial deste compartimento e uma vez que a 5-HT se encontra fixamente ligada é de admitir que esteja

armazenada nas vesículas das terminações nervosas.

Outro ponto que merece ser discutido é o que diz respeito à importância relativa das captações neuronial e extraneuronial na inactivação da 5-HT.

Nas experiências de incubação com a amina marcada (com 0,23 µmol/l durante 30 minutos) a exclusão da captação neuronial quer pelo uso de fármacos (cocaína ou clorimipramina) ou por desnervação reduziu de cerca de um terço a acumulação da amina; a hidrocortisona reduziu a acumulação de cerca de 40%. Destes resultados podemos concluir que cerca de um terço da acumulação da 5-HT ocorre nas terminações nervosas e que dos restantes dois terços extraneuroniais aproximadamente metade se acumula por um mecanismo de captação sensível aos corticosteróides e a outra metade por mecanismo resistente aos corticosteróides. Deve no entanto ter-se presente na análise destes resultados que a exclusão de um mecanismo de captação poderá favorecer os restantes mecanismos, o que pode concorrer para a sobrevalorização do papel que se atribui a determinado compartimento.

Se confrontarmos estes resultados com os obtidos na análise compartimental ressaltam algumas diferenças no que respeita à importância relativa dos compartimentos. Na análise compartimental mostramos que a fracção fixa (neuronial) correspondia a 38%, o compartimento III (neuronial e possivelmente também extraneuronial) a 26%, o compartimento II (extraneuronial) a 29% da quantidade total de 5-HT-^{3}H presente no tecido ao fim de 1 hora de incubação. De facto nestas circunstâncias o compartimento neuronial tem um papel relativamente mais importante que o extraneuronial. Estas discrepâncias têm justificação e podem ser atribuídas ao facto de que nas experiências para análise compartimental a oferta da amina marcada foi cerca de 5 vezes maior, processou-se durante um tempo mais longo e em tecidos com a monaminoxídase inibida. A inibição da monaminoxídase parece ter a sua relevância, pois nas experiências de incubação durante 30 minutos (com 0,23 µmol/l), em que esta enzima estava inibida, a acumulação neuronial era relativamente maior (como pode verificar-se se compararmos o efeito da

cocaína, em tiras não tratadas pela pargilina e em tiras tratadas) (ver tabela 3).

Os resultados das experiências de imersão em óleo mostram que o prolongamento do tempo de relaxamento em óleo (T_{50}) causado pela cocaína corresponde a um bloqueio da capacidade de inactivação de cerca de 60% e que a hidrocortisona apenas aumenta ligeiramente esse tempo. As discrepâncias com os resultados obtidos nas experiências de incubação (com a amina marcada, durante 30 min) são contudo mais aparentes que reais, porque nas condições das experiências de imersão em óleo, quando a captação neuronial está diminuída pode ocorrer difusão do agonista (5-HT) a partir da estruturas extraneuroniais para a biofase, o que determina um atraso no relaxamento (Trendelenburg 1974). Ainda a acrescentar o facto de as concentrações usadas nas experiências de incubação em óleo terem sido cerca de 5 vezes as usadas nas experiências de incubação com a amina marcada. O papel desempenhado pela captação extraneuronial torna-se contudo evidente quando a hidrocortisona é adicionada à cocaína; neste caso observa-se um aumento significativo do tempo de relaxamento. Mais uma vez a situação é muito semelhante ao que se observa com as catecolaminas. Ainda e de acordo com o obtido nas experiências de imersão em óleo, a cocaína, mas não a hidrocortisona, causa aumento de sensibilidade à 5-HT; também nesta preparação, a cocaína, mas não a hidrocortisona, potencia as respostas contrácteis à noradrenalina e adrenalina (Guimarães e Paiva 1977).

Outro ponto a considerar diz respeito à inactivação metabólica da 5-HT. É bem conhecido que a via mais importante na metabolização da 5-HT é a desaminação oxidativa pela monaminoxídase. De facto mostramos nas experiências de incubação com 5-HT-^{3}H que a pargilina (inibidor da monaminoxídase A e B) reduziu de modo muito significativo a formação de metabólitos, ao mesmo tempo que aumentou a acumulação de amina intacta no tecido; este resultado representa, como já dissemos, uma boa evidência para a ideia de que a monaminoxídase é o factor limitante da acumulação da 5-HT no tecido. Mais uma vez podemos notar a existência de semelhanças com o metabolismo das

catecolaminas, embora no caso das catecolaminas intervenham 2 enzimas no seu metabolismo, ambas são factor limitante na acumulação; a monaminoxídase nas estruturas neuroniais e a catecol-O-metiltransférase nas estruturas extraneuroniais .

Na metabolização da 5-HT pela veia safena de Cão (uma estrutura com 2 tipos de monaminoxídase - A e B; Caramona 1982) parece estar envolvida apenas a monaminoxídase do tipo A uma vez que o amezínio (um inibidor específico da monaminoxídase tipo A; Steppler e Starke 1980; Araújo *et al* 1983) suprimiu praticamente a formação de metabólitos, o que está de acordo com o que se conhece para a 5-HT; esta amina é substracto específico da monaminoxídase tipo A (Traut 1979). Sabendo-se que a monaminoxídase A existe quer intra quer extraneuronialmente (Caramona 1983) e uma vez que se demonstrou que a 5-HT é captada por ambas as estruturas (neuronial e extraneuronial) é lógico averiguar como contribui a monaminoxídase de cada um dos compartimentos para o metabolismo total. A exclusão de captação neuronial não reduz de modo significativo a quantidade de metabólitos formados, mas o bloqueio de captação extraneuronial (pela hidrocortisona) reduz a acumulação e a metabolização de modo paralelo (cerca de um terço). Tal facto poderá indicar que a maior parte do metabolismo ocorre extraneuronialmente. Contudo, do bloqueio de ambas as captações neuronial e extraneuronial resulta uma redução do metabolismo mais marcada do que apenas do bloqueio da captação extraneuronial. Parece portanto poder admitir-se que existem 3 locais de perda (neuronial, extraneuronial, sensível aos corticosteróides e extraneuronial não sensível aos corticosteróides) responsáveis pela metabolização da 5-HT e que possuem monaminoxídase do tipo A.

De referir que as conclusões que obtivemos quanto à contribuição da captação neuronial e extraneuronial e desaminação oxidativa da 5-HT foram confirmadas recentemente por Bryan *et al* (1989). Estes autores mostram que os mecanismos responsáveis pela dissipação da 5-HT da circulação coronária do coração isolado de Rato são os mesmos das catecolaminas tendo a captação extraneuronial um papel mais

importante que a neuronial. Conclusões idênticas foram propostas por outros autores noutras estruturas vasculares. Na artéria da orelha de Coelho Buchan *et al* (1974) em ensaios com noradrenalina e 5-HT mostram que a acumulação de ambas as aminas se processa de modo semelhante; é dependente da concentração usada e é reduzida pelo estradiol, fenoxibenzamina e normetanefrina, sugerindo que as estruturas extraneuroniais desempenham papel importante na acumulação da 5-HT. Na aorta de Coelho, Kalsner (1975) em experiências de relaxamento em Krebs mostra que a 5-HT é captada extraneuronialmente e libertada por um processo idêntico ao das catecolaminas. Por outro lado algumas divergências foram apontadas por outros autores. Os trabalhos de Fukuda *et al* (1986 a, b) mostram que a 5-HT se acumula intra e extraneuronialmente nas artérias mesentéricas e artéria caudal de Rato, mas na aorta de Rato a amina acumula-se apenas extraneuronialmente, sendo este mecanismo de captação diferente do que ocorre com a noradrenalina. Também Iwasawa *et al* (1974) referem que a captação da 5-HT nos pulmões perfundidos de Coelho se processa por mecanismo diferente do da captação da noradrenalina.

Outro aspecto que não podemos deixar de referir diz respeito ao papel do endotélio na inactivação da 5-HT. Como seria de esperar, quer pela sua localização quer pela sua extensão o endotélio tem um papel importante na remoção da 5-HT (e de outros agentes) circulante, como provam trabalhos de vários autores, realizados em circuitos vasculares intactos, a que aludimos no início desta discussão.

As condições experimentais em que realizamos os nossos ensaios - tiras cortadas em helicoidal, provavelmente com a maior parte do endotélio destruído e em que a oferta da amina ao tecido se processa quer pela íntima quer pela adventícia - não permitem julgar do papel do endotélio na captação ou metabolização da 5-HT. No entanto em trabalho relativamente recente Verbeuren *et al* (1985) mostram em experiências de perfusão de segmentos de veia safena de Cão que os tecidos com endotélio intacto acumulavam menos de metade da quantidade de NA-^{3}H e

5-HT-^{3}H do que os tecidos com endotélio destruido. Estes autores mostraram ainda, com o uso de inibidores enzimáticos, que a monaminoxidase e a catecol-O-metiltransférase (apenas considerada para a noradrenalina) endoteliais interferiam com a remoção e a acumulação das aminas pelos tecidos. Bryan *et al* (1989) não encontram evidência de que a captação e o metabolismo pelas células do endotélio vascular coronário de Rato contribuam de modo significativo para a dissipação da 5-HT.

Para além do estudo dos mecanismos responsáveis pela inactivação da 5-HT foi também objectivo deste trabalho caracterizar na mesma estrutura vascular o tipo de receptores envolvidos nos efeitos pré e pós-juncionais da 5-HT. Embora se tenham obtido progressos evidentes nos últimos dez anos no conhecimento da farmacologia da 5-HT não se ultrapassaram ainda as dificuldades existentes na caracterização e nomenclatura dos receptores da 5-HT. Tais dificuldades advém não só do facto de não existirem fármacos suficientemente selectivos (o caso mais significativo refere-se aos antagonistas dos receptores 5-HT_1) como também da extrapolação que tem sido feita a partir dos estudos de fixação de radioligandos sem se ter em conta qualquer correlação funcional. Recentemente foram propostos alguns critérios que visam contribuir para o estabelecimento de um maior consenso na caracterização e classificação dos receptores (Bradley *et al* 1986; Saxena *et al* 1986; Fozard 1987 a; Göthert e Schlicker 1987; Peroutka 1988).

A veia safena de Cão tem sido usada repetidamente como modelo para estudo de receptores a nível pós-juncional (Humphrey 1978; Curro *et al* 1978; Apperley *et al* 1980; Van Nueten *et al* 1981; Tuncer *et al* 1985; Feniuk *et al* 1985; Humphrey *et al* 1988) e constitui um paradigma da evolução que tem ocorrido na caracterização de receptores.

Mostramos na veia safena que a 5-HT causava contracções dependentes da concentração para valores compreendidos aproximadamente entre 0,003 e 10 µmol/l. Uma vez que a 5-HT está descrita como um agonista misto era lógico admitir que o efeito contráctil pudesse resultar da activação de mais que um tipo de receptores.

Para caracterizar os receptores envolvidos nesse efeito usaram-se vários antagonistas: a cetanserina (antagonista selectivo 5-HT_2), a ioimbina (antagonista 5-HT_1 e $alfa_2$), a prazosina (antagonista $alfa_1$), (-)pindolol (antagonista 5-HT_{1A} 5-HT_{1B}) e ainda um agonista selectivo 5-HT_1, o 8-OH-DPAT (descrito como agonista 5-HT_{1A} mas que possui alguma afinidade para os receptores 5-HT_{1D}). O 8-OH-DPAT causou contracções dependentes da concentração para valores compreendidos aproximadamente entre 0,3 e 300 µmol/l, sendo cerca de 100 vezes menos potente que a 5-HT.

Como já referimos a análise do comportamento dos antagonistas, face ao efeito contráctil da 5-HT e do 8-OH-DPAT, sugere que a 5-HT actue em mais do que um tipo de receptores, nomeadamente receptores do "tipo" 5-HT_1 e 5-HT_2.

Na caracterização do receptor "tipo" 5-HT_1 e dentro dos subtipos de receptores descritos: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, pareceu-nos, de acordo com critério que não está isento de críticas poder admitir tratar-se de um receptor do "tipo" 5-HT_{1D}, idêntico ao local de ligação 5-HT_{1D} descrito por Heuring e Peroutka (1987).

Podemos especular qual seja a contribuição de cada um dos referidos tipos de receptores para a contracção: parece que os receptores 5-HT_2 são estimulados para as concentrações mais altas da 5-HT (o mesmo admitem Docherty e Hyland 1986) uma vez que o bloqueio pela cetanserina é mais importante para as altas concentrações da amina. Um facto que não pode deixar de se ter presente é de que as concentrações de cetanserina que bloqueiam o efeito da 5-HT nesta estrutura são relativamente altas (0,1 e 1 µmol/l) quando comparadas com as descritas para outras estruturas (aorta de Coelho, aorta e artéria caudal de Rato) em que actua como antagonista competitivo com valores de pA_2 entre 8,4 e 9,1 (Van Nueten *et al* 1981; Humphrey *et al* 1982; Bradley *et al* 1983). Tal facto pode sugerir que a cetanserina em concentrações mais elevadas actue por um bloqueio não específico dos receptores 5-HT.

Embora as nossas conclusões quanto à presença de receptores 5-HT_2 estejam de acordo com as de Van Nueten *et al* (1981) e Tuncer *et al* (1985) diferem contudo das de outros autores que admitem haver na mediação das respostas à 5-HT, na veia safena de Cão, apenas um tipo de receptores (Apperley *et al* 1980; Feniuk *et al* 1985; Humphrey *et al* 1988). Para estes autores este tipo de receptores designado por receptores "tipo" 5-HT_1 é diferente do tipo de receptores encontrado em outras estruturas vasculares, nomeadamente aorta de Coelho e artéria femoral de Cão onde foram caracterizados receptores 5-HT_2. No entanto Feniuk *et al* (1985) especulam sobre o mecanismo pelo qual a cetanserina reduz a resposta máxima à 5-HT admitindo que em altas concentrações a 5-HT possa estimular receptores 5-HT_2 existentes em pequeno número e que as diferenças encontradas entre os vários autores poderão ser o reflexo das variações desse pequeno número.

Contrariamente ao que acontece para os receptores 5-HT_2, todos os autores são unânimes em admitir a existência de receptores do "tipo" 5-HT_1 na veia safena de Cão.

Sabe-se ainda que estes receptores medeiam também contracções noutras estruturas vasculares, nomeadamente artéria basilar de Coelho, Cão e Homem e veia safena humana.

São bastante escassos os estudos que nos dão conta da identificação do subtipo de receptores do "tipo" 5-HT_1. Feniuk *et al* (1985) sugerem a presença de receptores tipo 5-HT_{1B} na veia safena de Cão, mas prudentemente preferem descrevê-lo apenas como receptor do "tipo" 5-HT_1. Peroutka *et al* (1986) descrevem que as contracções da 5-HT na artéria basilar canina são mediadas em parte por receptores "tipo" 5-HT_{1A}. Outros autores têm apontado as diferenças de comportamento (face a agonistas 5-HT_1; alguns de síntese relativamente recente) entre os receptores 5-HT_1 descritos em diferentes estruturas vasculares confirmando a noção de heterogeneidade dos receptores "tipo" 5-HT_1 (Humphrey *et al* 1988; Connor *et al* 1987; Summer *et al* 1987). Saxena e Ferrari (1989) referem o envolvimento funcional de 4 subtipos de receptores do "tipo" 5-HT_1 na mediação das respostas à 5-HT: 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} e ainda 2 subtipos

(designados arbitrariamente) 5-HT_{1X} e 5-HT_{1Y}. O subtipo 5-HT_{1X} estaria presente na veia safena de Cão mediando o efeito contráctil da 5-HT (e ainda a inibição da transmissão adrenérgica na mesma estrutura).

Quanto à possível presença de receptores 5-HT_3 na mediação das respostas contrácteis à 5-HT, os resultados obtidos por Apperley *et al* (1980) (estes autores referem a inexistência de receptores M), Brittain *et al* (1987) e Humphrey *et al* (1988) permitem-nos excluir que estes receptores estejam presentes na veia safena.

Outro ponto a considerar refere-se à mediação das respostas contrácteis por receptores adrenérgicos. É conhecido que nem todos os efeitos contrácteis da 5-HT no músculo liso são necessariamente mediados por activação de receptores específicos. É por vezes difícil distinguir entre os efeitos mediados por receptores específicos e os mediados por receptores adrenérgicos alfa, uma vez que, muitos dos fármacos que bloqueiam efeitos da 5-HT podem actuar a nível dos receptores adrenérgicos (Apperley *et al* 1976; Curro *et al* 1978; Van Nueten *et al* 1981).

Um dos exemplos mais significativos é a artéria de orelha de Coelho. Nesta preparação a 5-HT e a noradrenalina actuam num receptor alfa comum admitindo-se que este tecido possui uma população pequena (ou inexistente) de receptores específicos da 5-HT (Apperley *et al* 1976; Purdy *et al* 1981; Black *et al* 1981). Em experiências conduzidas para caracterizar o efeito da 5-HT a nível dos receptores alfa da orelha de Coelho, Purdy *et al* (1987) mostraram haver activação dos receptores alfa depois do bloqueio da população de receptores 5-HT_2. Estes autores admitem que a 5-HT possa ser um agonista dos receptores alfa em todos os vasos e que a estimulação ou não de receptores alfa depende das densidades relativas dos receptores 5-HT_2 e alfa de cada um dos vasos.

Na veia safena, um pouco à semelhança do que acontece com os receptores 5-HT_2, não há unanimidade nas conclusões apresentadas por diversos autores em relação à activação dos receptores adrenérgicos alfa pela 5-HT. Humphrey (1978) mostra que a 5-HT em baixas concentrações actua sobre receptores específicos mas em

altas concentrações actua nos adrenoceptores alfa por mecanismo indirecto (por deslocação da noradrenalina dos depósitos neuroniais). Excluindo tratar-se de um efeito indirecto, Curro *et al* (1978) admitem que a 5-HT contrai a veia safena de Cão estimulando receptores que não são típicos da 5-HT. Apperley *et al* (1980), Feniuk *et al* (1985), Tuncer *et al* (1985) consideram não haver mediação por receptores alfa no efeito contráctil da 5-HT. Os resultados que obtivemos sugerem o envolvimento de receptores adrenérgicos, embora com um papel pouco importante, pois que o grau de bloqueio das respostas à 5-HT pela prazosina ou pela ioimbina é relativamente pequeno quando comparado com o bloqueio que estes antagonistas (em igual concentração) produzem face à noradrenalina.

Outro ponto diz respeito à caracterização de receptores pré-juncionais da 5-HT que envolve problemas idênticos aos referidos para os receptores pós-juncionais.

Para além do bem conhecido efeito indirecto (Innes 1962; Thoa *et al* 1969; Pluchino 1972; Fozard e Mwaluko 1976; Mc Grath 1977; Humphrey 1978) não mediado por receptores, que envolve a captação da 5-HT pelas terminações nervosas com a libertação de noradrenalina sabe-se ainda que a 5-HT pode exercer outro efeito a nível pré-juncional interferindo com a libertação do mediador adrenérgico (inibindo ou estimulando a libertação induzida por despolarização dos nervos simpáticos) por um mecanismo de características diferentes das conhecidas para o efeito indirecto. Enquanto que o efeito indirecto ocorre para altas concentrações de 5-HT e por um mecanismo sensível à cocaína e independente do cálcio, o segundo efeito ocorre para baixas concentrações da amina, não é bloqueado pela cocaína e é dependente do cálcio (Humphrey *et al* 1983). Este último efeito foi inicialmente observado na veia safena de Cão por Mc Grath (1977), Mc Grath e Shepherd (1978), Feniuk *et al* (1979) tendo estes autores mostrado que baixas concentrações da 5-HT reduziam a amplitude das contracções resultantes da estimulação eléctrica do referido tecido. Ao mesmo tempo Mc Grath (1977) mostrou que a 5-HT inibia a libertação de trítio induzida por estimulação

eléctrica na veia safena pré-incubada com noradrenalina tritiada. Os resultados destes autores apontam para o envolvimento de um receptor pré-juncional específico da 5-HT neste efeito inibidor. Também, no mesmo tecido, Watts *et al* (1981) mostram que a 5-HT inibe de modo dependente da concentração a libertação do trítio induzida por estimulação eléctrica e admitem que o receptor pré-juncional envolvido neste efeito não é do tipo D (ou na nomenclatura recente do tipo 5-HT_2) e que é, do ponto de vista farmacológico, idêntico ao receptor pós-juncional da mesma preparação. Van Nueten *et al* (1981) corroboram a noção do não envolvimento do receptor 5-HT_2 com o uso da cetanserina. Posteriormente Engel *et al* (1983) ensaiando uma variedade de agonistas dos receptores 5-HT mostraram a existência de uma boa correlação entre as afinidades dos agonistas para os "locais" de ligação 5-HT_1 nas membranas de cortex de Rato e as suas potências em inibir a libertação de trítio devida à estimulação eléctrica de tiras de veia safena de Cão.

O efeito inibidor pré-juncional não foi observado apenas na veia safena, ocorrendo também noutros tecidos periféricos com inervação simpática: artéria basilar de Coelho (Bevan *et al* 1975), artéria tibial de Cão (Mc Grath 1977; Cohen 1987), canal deferente de Rato (Kapur e Mottran 1979), aurícula de Cobaia (Adler Graschinsky 1983), artérias mesentéricas de Rato (Su e Uruno 1984), artérias coronárias de Cão (Cohen 1985), rim perfundido de Rato (Charlton *et al* 1986), veia cava de Rato (Göthert *et al* 1986 b), veia safena humana (Göthert *et al* 1986 a), folículo ovárico bovino (Kannisto *et al* 1987), artéria da orelha de Coelho (Meehan e Story 1989), artéria coronária de Porco (Molderings *et al* 1989). Além da sua demonstração em preparações isoladas verificou-se ocorrer também *in vivo*, em animal anestesiado, através do estudo das respostas cardíacas ou vasculares após estimulação nervosa (Martinez e Lokhandwala 1980; Feniuk *et al* 1981 a; Humphrey *et al* 1983).

Na caracterização dos receptores pré-juncionais da veia safena de Cão, os resultados que obtivemos não estão de acordo, em alguns pontos, com os de outros autores que usaram o mesmo tecido vascular. A 5-HT inibiu de modo dependente da

concentração a libertação de NA-^{3}H induzida por estimulação electrica confirmando, como já referimos, os dados obtidos por outros autores. Contudo, enquanto que alguns autores mostraram que o metisergide era inactivo ou pouco activo a antagonizar o efeito inibidor da 5-HT (ou se comportava como a 5-HT inibindo a libertação de NA-^{3}H; Watts *et al* 1981) este fármaco, nas nossas experiências, exerceu um antagonismo claro em relação aos efeitos pré-juncionais da 5-HT. Dos outros antagonistas usados apenas a metiotepina exibiu efeito idêntico ao metisergide, inibindo o efeito da 5-HT de modo dependente da concentração. Assim a cetanserina, o pindolol e a ioimbina não modificaram o efeito da 5-HT.

Uma vez que a cetanserina não exerceu qualquer bloqueio parece poder excluir-se o envolvimento dos receptores 5-HT_2, o que aliás está de acordo com o verificado por vários autores não só para a veia safena de Cão como também para a generalidade das estruturas onde o efeito inibidor da 5-HT foi revelado.

O facto da metiotepina e do metisergide (antagonistas 5-HT_1 mas também 5-HT_2) antagonizarem o efeito inibidor da 5-HT conjugado com o facto da cetanserina não bloquear esse efeito levou, como já referimos, a considerar o envolvimento de receptores "tipo" 5-HT_1 o que está de acordo com as conclusões de vários autores para outras estruturas usando os mesmos parâmetros de avaliação (Charlton *et al* 1986, Kannisto *et al* 1987). Deste modo os resultados que obtivemos estão em concordância com alguns dos critérios propostos por Bradley *et al* (1986) para a caracterização dos receptores "tipo" 5-HT_1 (susceptibilidade ao antagonismo pela metiotepina e ou metisergide e resistência ao antagonismo pela cetanserina). Ainda satisfazendo outro critério proposto por estes autores para a caracterização dos receptores 5-HT_1, o efeito inibidor da 5-HT deve ser mimetizado pela 5-carboxamidatriptamina em concentrações menores ou iguais às da 5-HT. Feniuk *et al* (1981 b), Engel *et al* (1983) mostraram que a 5-carboxamidatriptamina era mais activa que a 5-HT, na veia safena de Cão, corroborando assim a ideia dos receptores pré-juncionais serem do "tipo" 5-HT_1. O mesmo foi

verificado noutras preparações para a 5-carboxamidatriptamina (Charlton *et al* 1986; Göthert *et al* 1986 a, b; Kannisto *et al* 1987).

Nos ensaios que realizamos o 8-OH-DPAT não afectou a libertação da NA-^{3}H mesmo quando usado em concentrações 10 a 1000 vezes superiores às concentrações activas da 5-HT e tal facto está de acordo com o obtido por vários autores para outros tecidos como já referimos. No entanto sabe-se que na veia safena humana o 8-OH-DPAT inibiu a libertação de NA-^{3}H (Göthert *et al* 1986 a).

Os resultados obtidos com o 8-OH-DPAT (e ainda com a ioimbina) permitem especular sobre a noção de identidade dos receptores pré e pós juncionais da veia safena de Cão proposta por Watts *et al* (1981), Humphrey *et al* (1988), Humphrey et Feniuk (1989, em publicação). Os nossos resultados não apoiam a noção de identidade desses receptores porque : a) a nível pós-juncional o 8-OH-DPAT contrai as preparações da veia safena tal como a 5-HT (as curvas concentração-resposta para os dois agonistas são aproximadamente paralelas), sendo cerca de 100 vezes menos activo que a 5-HT; b) a nível pré-juncional o 8-OH-DPAT não exibiu qualquer efeito mesmo em concentrações 1000 vezes superiores às concentrações activas da 5-HT; c) a ioimbina foi eficaz a nível pós-juncional antagonizando o efeito contráctil da 5-HT mas a nível pré-juncional não exerceu qualquer antagonismo.

Ainda dentro de outro critério proposto por Bradley *et al* (1986) para a caracterização dos receptores 5-HT_1, os efeitos inibidores da 5-HT não devem ser bloqueados por antagonistas dos receptores 5-HT_3. São escassas as informações sobre este ponto na veia safena. Feniuk *et al* (1979) mostraram que a morfina (antagonista não selectivo dos receptores M, mais tarde conotados com receptores 5-HT_3) não antagonizou o efeito inibidor da 5-HT (efeito avaliado em termos de redução da amplitude da contracção à estimulação eléctrica). Mais recentemente Humphrey *et al* (1988) ainda que por um processo indirecto, usando um agonista selectivo dos receptores "tipo" 5-HT_1 (GR43175; 3-(2-dimetilamino) etil-N-metil-1H-indol-5-metanosulfonamida) confirmam a não

existência de receptores 5-HT_3 nesta estrutura. A dar consistência a este facto estão os resultados obtidos noutra estruturas com inervação simpática (Charlton *et al* 1986; Kannisto *et al* 1987) que mostram que o efeito inibidor pré-juncional da 5-HT não é antagonizado pela metoclopramida (antagonista 5-HT_3) ou pelo MDL72222 (3-il-3,5-diclorobenzoato de 1αH, 3α, 5αH -tropano) um bloqueador específico e altamente potente (Fozard 1984 b).

Pode também excluir-se o envolvimento dos receptores adrenérgicos alfa nesse efeito inibidor uma vez que a ioimbina não exerceu qualquer antagonismo, o que está de acordo com resultados obtidos no mesmo tecido por outros autores que usaram diferentes bloqueadores adrenérgicos alfa (Mc Grath 1977; Watts *et al* 1981).

De modo diferente do que acontece a nível pós-juncional, em que propusemos que estariam envolvidos nas respostas contrácteis da 5-HT receptores "tipo" 5-HT_{1D}, não foi possível a nível pré-juncional caracterizar o receptor 5-HT_1 dentro dos subtipos conhecidos. Tal facto está de acordo com o recentemente proposto por Humphrey e Feniuk (1989, em publicação) e por Saxena e Ferrari (1989) que atribuem a estes receptores a designação 5-HT_{1X}.

Embora não tenha sido possível uma caracterização definitiva dos receptores envolvidos nos efeitos pré- e pós-juncionais da 5-HT na veia safena de Cão, os resultados que obtivemos contribuiram para reforçar a noção de heterogeneidade dos receptores do "tipo" 5-HT_1. Também o uso de agonistas selectivos do tipo 5-HT_1 de síntese recente tem reforçado a noção desta heterogeneidade, mas será certamente a síntese de outros compostos (sobretudo de antagonistas selectivos 5-HT_1) que à semelhança do que acontece para os receptores 5-HT_2 e 5-HT_3 permitirá avançar na caracterização e classificação dos diversos subtipos de receptores.

Parece ser contudo o estudo da estrutura molecular dos receptores, actualmemte em fase de rápido crescimento, que poderá contribuir para a identificação definitiva dos

diversos subtipos de receptores (Peroutka 1988; Hartig 1989).

Um último ponto a considerar diz respeito à interferência da 5-HT com os mecanismos adrenérgicos. A particular importância que assume o sistema nervoso adrenérgico no controle da actividade cardiovascular constitui por si só motivo suficiente para justificar o interesse de tal estudo. Como já referimos, a interferência pode processar-se em diversos níveis.

A nível pré-juncional a 5-HT pode interferir de diversas formas. Em baixas concentrações, como foi demonstrado, inibe a libertação de noradrenalina por um mecanismo dependente da activação de receptores específicos. O efeito da 5-HT é idêntico ao da noradrenalina no sentido de que ambas as aminas são capazes de inibir a libertação do mediador adrenérgico embora por activacão de receptores diferentes ("tipo" 5-HT_1 no caso da 5-HT; receptores $alfa_2$ no caso da noradrenalina - Dalemans *et al* 1976; Guimarães *et al* 1978). Em altas concentrações a 5-HT é captada pelo nervo promovendo a libertação de noradrenalina (por um mecanismo de troca) podendo esta catecolamina actuar a nível pós-juncional (é o efeito indirecto da 5-HT). Por outro lado a 5-HT que entra nos nervos e se acumula nas vesículas pode ser posteriormente libertada e interferir na mediação adrenérgica.

A nível pós-juncional pode interferir de duas maneiras. Em alguns tecidos a 5-HT exerce o seu efeito contráctil, ou de relaxamento, activando receptores adrenérgicos. Além deste efeito a 5-HT poderá interferir com as respostas contrácteis da noradrenalina quer diminuindo quer aumentando essas respostas. Pouco se conhece àcerca do efeito inibidor da 5-HT na resposta pós-juncional. Rapoport e Bevan (1982, 1983) referem-no como um efeito de longa duração resultante da dessensibilização dos receptores adrenérgicos alfa produzida pela 5-HT. Pelo contrário, como já referimos, são bem conhecidos os efeitos relativos ao aumento da resposta contráctil à noradrenalina exógena (ou à noradrenalina libertada pelas terminações nervosas) em diferentes preparações

arteriais isoladas, nomeadamente na artéria femoral, artéria da orelha e aorta de Coelho, artérias caudal e mesentérica de Rato, artérias cerebrais de Cobaia e artérias periféricas (digital e temporal) humanas. Este efeito foi também verificado *in vivo* (Meyers *et al* 1985; Medgett 1987).

Na veia safena de Cão demonstramos também que a 5-HT aumenta a resposta contráctil da noradrenalina exógena. Esta interacção praticamente desconhecida nas estruturas venosas, revelou-se mesmo em condições em que a 5-HT não produzia qualquer resposta contráctil, o que está de acordo com resultados obtidos por outros autores (De la Lande *et al* 1966). Este efeito foi extensivo a agonistas específicos alfa$_1$ e alfa$_2$. O facto da cetanserina e da metiotepina antagonizarem o efeito amplificador da 5-HT revela que neste tecido os receptores envolvidos no efeito amplificador são os mesmos que medeiam as respostas contrácteis da 5-HT; de um modo geral o grau de antagonismo era tanto maior quanto mais bloqueada estava a resposta contráctil à 5-HT.

Van Nueten *et al* (1981, 1982), Su e Uruno (1984) e Meehan *et al* (1986) mostram também que a cetanserina bloqueia o efeito amplificador da 5-HT em estruturas onde os efeitos contrácteis são mediados por receptores 5-HT$_2$.

Nem a prazosina nem a ioimbina bloquearam o efeito amplificador (em relação à noradrenalina) o que está de acordo com os resultados de Meehan *et al* (1986) que referem que a prazosina não bloqueia esse efeito na artéria de orelha de Coelho. Pelo contrário Van Nueten *et al* (1981) mostram na artéria femoral de Coelho que não só o bloqueio dos receptores 5-hidroxitriptaminérgicos mas também o bloqueio dos receptores adrenérgicos anula o efeito amplificador. Tais discrepâncias refletem provavelmente as características dos diferentes tecidos possivelmente relacionadas com a população de receptores adrenérgicos que é activada pela 5-HT.

Pouco se conhece sobre o mecanismo subjacente ao efeito amplificador. De referir que na veia safena havia interferência mútua no efeito amplificador no sentido de que também a noradrenalina aumentava as respostas contrácteis à 5-HT embora de forma

menos importante o que foi também descrito por outros autores noutras estruturas (De la Lande *et al* 1966; Van Nueten *et al* 1982). Este efeito amplificador não é específico para os agonistas adrenérgicos, foi também verificado para outros agentes contrácteis (prostaglandinas, tromboxano, histamina) . Não é de admitir, por razões que já apontamos, que o aumento da resposta contráctil seja consequência da interferência da 5-HT nos mecanismos de inactivação da noradrenalina. É possível que o mecanismo subjacente ao efeito amplificador opere a nível dos receptores ou para além do nível de activação dos receptores.

Estudos recentes têm sugerido que o efeito amplificador possa envolver um aumento da entrada de cálcio nas células do músculo liso vascular, desencadeado pela 5-HT. Van Nueten *et al* (1985) referem que a cinarizina (bloqueador da entrada de cálcio) reduz o efeito amplificador da 5-HT face às respostas contrácteis da prostaglandina $F_{2\alpha}$ na artéria basilar de Cão. Félix *et al* (1986) mostram o desaparecimento do efeito amplificador relativamente à noradrenalina e adrenalina pela remoção do cálcio do líquido de perfusão na veia da orelha de Porco. Meehan *et al* (1988) referem na artéria de orelha de Coelho que o efeito amplificador envolve um aumento selectivo da componente da resposta à noradrenalina que é dependente do cálcio extracelular e admitem que a 5-HT actue reforçando a entrada de cálcio (nas células musculares) promovida pela noradrenalina. Contudo os estudos que envolvem o uso de bloqueadores da entrada de cálcio ou o abaixamento da concentração de cálcio no líquido extracelular não estão isentos de crítica na medida que concomitantemente com o antagonismo do efeito amplificador também as próprias respostas à noradrenalina podem ser afectadas . É de admitir que na veia safena à semelhança do encontrado para outras estruturas a mobilizacão de cálcio pela 5-HT seja responsável pelo efeito amplificador, uma vez que neste tecido também a contracção produzida pela noradrenalina está na dependência da mobilização do cálcio dos depósitos intracelulares e da entrada de cálcio do meio extracelular (Collis e Shepherd 1979).

Outra possível interferência da 5-HT pode ter lugar a nível da acumulação e metabolização do mediador adrenérgico. Pelo facto da captação e metabolização se processarem por mecanismos idênticos aos da noradrenalina é de esperar que a 5-HT possa interferir de algum modo a este nível. A 5-HT em baixas concentrações (0,1 µmol/l) não exerce qualquer efeito, como já referimos. Em concentrações mais altas reduz a formação de metabólitos totais e a acumulação de NA-^{3}H, aumentando significativamente a fracção de metabólitos desaminados. Este aumento deve-se possivelmente à interferência da 5-HT a nível vesicular uma vez que em preparações reserpinizadas deixou de se evidenciar; pelo contrário verificou-se, à semelhança do que se passava com os outros metabólitos, uma redução da sua formação. A redução da acumulação da noradrenalina deve-se ao facto do sistema (ou sistemas) de transporte comum para ambas as aminas apresentar um certo grau de saturação. A redução na formação de metabólitos desaminados é devida não ao facto de ser atingida a saturação do sistema enzimático mas à limitação imposta pelo sistema de transporte.

São muito escassas as informações sobre este tipo de interferência noutras estruturas. Contudo os nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Jester e Horst (1972) que, no coração perfundido de Rato, mostram que a 5-HT interfere no sistema de transporte neuronial, reduz a acumulação de NA-^{3}H nos nervos e (com a captação neuronial bloqueada) inibe o metabolismo extraneuronial da NA-^{3}H reduzindo quer a formação de metabólitos desaminados quer a de normetanefrina.

Embora a concentração plasmática da 5-HT livre seja muito baixa em condições normais (ou praticamente inexistente) e possa aumentar para níveis apreciáveis durante a agregação plaquetária poderá especular-se se se atingem ou não concentrações susceptíveis de interferir na acumulação e metabolismo da noradrenalina. No entanto, os resultados que apresentamos e os obtidos por outros autores, apontam para que a interferência possa ter significado importante quer a nível pré-juncional (na inibição da libertação do

mediador adrenérgico) quer a nível pós-juncional (na amplificação do efeito contráctil) em situações patológicas.

Em conclusão, os resultados obtidos na veia safena de Cão permitem afirmar que a 5-HT se comporta de modo muito semelhante às catecolaminas biogénicas : é captada pelas terminações nervosas por um mecanismo sensível à cocaína e parcialmente incorporada nas vesículas donde é libertada por estimulação eléctrica, comportando-se como um co-mediador ; é captada por estruturas extraneuroniais por um mecanismo sensível e por outro não sensível aos corticosteróides. Depois de captada poderá ser acumulada ou metabolizada em qualquer das estruturas (neuronial ou extraneuronial) pela monaminoxidase A.

Verificamos também que da activação dos receptores pela 5-HT resulta a nível pré-juncional inibição da libertação do mediador adrenérgico e a nível pós-juncional contracção do músculo liso vascular. Os receptores pré-juncionais pertencem ao "tipo" 5-HT_1, mas não foi possível classificá-los dentro de algum dos subtipos conhecidos (1A, 1B, 1C ou 1D); a nível pós-juncional a 5-HT actua sobre receptores 5-HT_2 e "tipo" 5-HT_1, podendo este último ser relacionado com o "local" de ligação 5-HT_{1D}.

Mostramos ainda que a 5-HT interfere com o mediador adrenérgico a diversos níveis. Em baixas concentrações interfere : a nível pré-juncional inibindo a libertação de noradrenalina a partir das terminações nervosas e a nível pós-juncional aumentando as respostas contrácteis à noradrenalina, através da activação de receptores 5-HT_2 e "tipo" 5-HT_1. Em concentrações mais elevadas interfere reduzindo a acumulação e metabolização da noradrenalina.

Para finalizar, queremos referir que embora se conheça mal o seu papel fisiológico, provavelmente muito importante dada a sua variada distribuição no organismo, está a tornar-se cada vez mais evidente (além do já conhecido envolvimento no sindrome carcinóide e na enxaqueca) que a 5-HT exerce um papel de relevo em certas manifestações fisiopatológicas.

A nível vascular tem sido discutido o seu papel patogénico nas perturbações vaso-espásticas, em doenças vasculares periféricas com fundo aterosclerótico. Assim, pela agregação plaquetária, facilitada nos locais onde há lesão do endotélio, liberta-se 5-HT (e outros vasoconstritores) que induz posterior agregação plaquetária e vasoconstricção local, quer por efeito directo, quer por interferência amplificando os efeitos de outros vasoconstritores (noradrenalina, prostaglandinas, tromboxano, etc). Este efeito vasoconstritor pode limitar o fluxo, já comprometido por obstruções ateroscleróticas permanentes, podendo ser responsável pela angina de peito e enfarte do miocárdio; e pode desempenhar ainda um papel importante em doenças cérebro-vasculares e no fenómeno de Raynaud.

Assim, por todas estas razões, a 5-HT continua a ser "um autacóide em busca de função" (Douglas 1985) embora cada vez melhor se divise o palco da sua actuação no organismo e se vá conhecendo o diálogo que mantem com outros autores do complexo espectáculo oferecido pela regulação cardiovascular, na saúde e na doença.

V. RESUMO

Neste trabalho analisaram-se três aspectos diferentes da actividade da 5-HT num tecido com inervação adrenérgica, a veia safena de Cão. Foi nosso objectivo estudar: 1) a captação e metabolização da 5-HT; 2) a actuação sobre receptores pré e pós-juncionais com vista à sua caracterização e 3) as interferências desta amina com o mediador adrenérgico.

Relativamente à captação e metabolização da 5-HT avaliou-se, com o auxílio de vários métodos, o papel desempenhado pelas diferentes estruturas teciduais na remoção da amina a partir do meio exterior.

Em estudos de sensibilidade (avaliada através das respostas contrácteis) verificou-se que a cocaína (bloqueador da captação neuronial) causava supersensibilidade à 5-HT mas a hidrocortisona (bloqueador da captação extraneuronial) não.

Usando a técnica de imersão em óleo verificou-se que a pargilina (inibidor da monaminoxidase) e a cocaína aumentavam o tempo (T_{50}) de inactivação da 5-HT. A hidrocortisona apenas exerceu um efeito quando usada após cocaína.

Em experiências de incubação com a amina marcada (0,23 µmol/l de 5HT-^{3}H) durante 30 minutos verificou-se que se acumulava no tecido cerca de metade da quantidade removida enquanto a outra metade aparecia na forma de metabólitos. A cocaína, a clorimipramina (bloqueadores da captação neuronial) ou a desnervação reduziram a acumulação, mas não a metabolização; a hidrocortisona reduziu a acumulação e a metabolização. A hidrocortisona + cocaína ou a fenoxibenzamina

(bloqueador da captação neuronial e extraneuronial) reduziram de modo mais importante a acumulação e a metabolização (quando comparadas com a hidrocortisona ou a cocaína isoladas). A pargilina aumentou a acumulação e aboliu praticamente a formação de metabólitos.

Depois de incubação com a amina marcada e após lavagem prolongada, a 5-HT-^{3}H captada pelas terminações nervosas era libertada por estimulação eléctrica. A exposição à cocaína, antes da incubação com a amina marcada, impediu a captação neuronial e consequentemente a libertação de 5-HT-^{3}H por estimulação eléctrica.

A análise compartimental efectuada a partir das curvas de efluxo obtidas em tiras pré-tratadas com pargilina e carregadas com 5-HT-^{3}H mostrou qua a amina se distribuiu por 4 compartimentos , constituindo um deles a fracção fixa. Esta última (e provavelmente o compartimento III) é de natureza neuronial; os compartimentos II e I parecem ser respectivamente de natureza extraneuronial e extracelular.

Deste modo, relativamente ao destino da 5-HT, pode concluir-se que é captada pelas terminações adrenérgicas por um mecanismo sensível à cocaína e parcialmente incorporada nas vesículas, donde é libertada por estimulação eléctrica, comportando-se como um co-mediador; é também captada por estruturas extraneuroniais por um mecanismo sensível aos corticosteróides e por outro resistente a estes fármacos. Depois de captada pode acumular-se ou ser metabolizada pela monaminoxídase A.

No que se refere à actuação sobre receptores pré e pós-juncionais verificou-se que a 5-HT a nível pré-juncional inibe de modo dependente da concentração a libertação da noradrenalina-^{3}H por estimulação eléctrica e a nível pós-juncional desencadeia contracções de amplitude proporcional à concentração.

A nível pré-juncional o 8-OH-DPAT, um agonista selectivo 5-HT_{1A}, não inibiu a libertação de noradrenalina -^{3}H. A metiotepina e o metisergide (bloqueadores 5-HT_1 e também 5-HT_2) antagonizaram o efeito inibidor da 5-HT. A ioimbina (bloqueador $alfa_2$), o pindolol (bloqueador com afinidade para os "locais" de ligação 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}) ou a

cetanserina (bloqueador 5-HT_2) não antagonizaram o efeito inibidor da 5-HT.

A nível pós-juncional, além da 5-HT, o 8-OH-DPAT causou contracções de amplitude dependente da concentração. A metiotepina e a ioimbina deslocaram para a direita de modo paralelo as curvas de concentração-resposta ao 8-OH-DPAT. As contracções causadas pela 5-HT foram antagonizadas pela metiotepina e ioimbina (deslocamento das curvas para a direita de modo paralelo) bem como pela cetanserina e metisergide (com depressão na parte superior da curva). O (-)pindolol não antagonizou os efeitos da 5-HT. O antagonismo resultante do bloqueio dos receptores alfa (pela prazosina e ioimbina em baixas concentrações) foi pouco importante.

Pode concluir-se que na veia safena de Cão a 5-HT activa receptores : pré-juncionais pertencentes ao "tipo" 5-HT_1, sem que tenha sido possível classificá-los dentro de qualquer dos subtipos conhecidos (1A, 1B, 1C ou 1D); e pós-juncionais 5-HT_2 e do "tipo"5-HT_1 (provavelmente do subtipo 1D).

Analisou-se ainda a interferência com o mediador adrenérgico em três níveis. Além do nível pré-juncional em que mostramos que a 5-HT diminuia a libertação de NA-^3H a partir das terminações adrenérgicas verificou-se que interferia a nível pós-juncional amplificando a resposta contráctil à noradrenalina (e a outros agonistas adrenérgicos; fenilefrina, metoxamina e UK14304). O aumento nas respostas contrácteis foi mais marcado para as concentrações mais baixas dos agonistas. A cetanserina e a metiotepina antagonizaram o efeito amplificador sugerindo que os receptores envolvidos neste efeito são os mesmos que medeiam as respostas contrácteis.

Verificou-se ainda que a 5-HT interferia com a captação e metabolização do mediador adrenérgico. Em ensaios de incubação com a noradrenalina -^3H, a 5-HT em baixas concentrações (0,1 µmol/) não exercia qualquer efeito, mas para concentrações mais altas (1 e 10 µmol/l) competia com a noradrenalina diminuindo a acumulação e a formação de metabólitos desaminados.

Por último especula-se sobre o papel da 5-HT na etiopatogenia de doenças vasculares periféricas.

Especialmente em áreas localizadas onde, por haver lesão do endotélio, está facilitada a agregação plaquetária, a 5-HT é libertada das plaquetas em concentrações suficientes para causar espasmo vascular, com consequente baixa de fluxo sanguíneo, que assume particular importância a nível dos vasos coronários, cerebrais e digitais.

VI.SUMMARY

Three different aspects of the action of 5-HT were studied in a tissue possessing adrenergic innervation, the saphenous vein of the dog: 1) uptake and metabolism of 5-HT; 2) the effect of 5-HT at pre and postjunctional level and further characterization of the receptors involved and, 3) the interference of 5-HT with the adrenergic transmitter.

In what concerns uptake and metabolism of 5-HT several methods were used to determine the role played by the different tissue structures on the removal of the amine from the external medium.

In sensitivity experiments cocaine (a neuronal uptake blocker) caused supersensitivity to 5-HT but hydrocortisone (an extraneuronal uptake blocker) had no effect.

Using the oil immersion technique, pargyline (a monoamine oxidase inhibitor) and cocaine enhanced the half-time for relaxation (T_{50}); hydrocortisone was effective only in the presence of cocaine.

After exposure of the vein to 0.23 µmol/l ^{3}H-5-HT for 30 min about one half of the 5-HT removed was accumulated in the tissue, the other half appearing under the form of metabolites. Cocaine, chlorimipramine or denervation reduced the accumulation, but not the metabolism, of 5-HT; hydrocortisone reduced both accumulation and metabolism. Hydrocortisone plus cocaine or phenoxybenzamine (an inhibitor of neuronal and extraneuronal uptake) caused a greater reduction of

accumulation and metabolism than hydrocortisone or cocaine alone. Pargyline caused an increase in accumulation and virtually abolished metabolism. After incubation with ^{3}H-5-HT and washout ^{3}H-5-HT, taken up into adrenergic nerve terminals, was released by electrical stimulation ; no appreciable reduction in fractional release occurred during repeated stimulations. Exposure to cocaine prior to incubation with ^{3}H-5-HT prevented the neuronal uptake of 5-HT.

Compartmental analysis, done with the the help of washout curves of strips pretreated with pargyline and loaded with ^{3}H-5-HT, showed that ^{3}H-5-HT distributed into three compartments plus a bound fraction. The latter (and probably compartment III) is of neuronal nature; compartments II and I appear to be of extraneuronal and extracellular nature, respectively.

Thus, in what concerns the termination of action of 5-HT it is concluded that 5-HT behaves in a way which is very similar to that of biogenic catecholamines : it is taken up into adrenergic nerve terminals by a cocaine-sensitive mechanism and partially incorporated into vesicles, from where it may be released by electrical stimulation, thus behaving as a co-transmitter ; it is also subject to uptake into extraneuronal cells, through corticosteroid-sensitive and corticosteroid-resistant mechanisms. After uptake of any kind, metabolism by monoamine oxidase of type A may occur.

Concerning the pre and postjunctional effects we have shown that 5-HT at prejunctional level inhibited in a concentration-dependent way the release of ^{3}H-noradrenaline by electrical stimulation and at postjunctional level caused concentration-dependent contractions.

At prejunctional level, the selective 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT did not cause any inhibition of the release of ^{3}H-noradrenaline. The inhibitory effect of 5-HT was antagonized by metitepine and methysergide (5-HT_1 and 5-HT_2 blockers) but not by yohimbine (an $alfa_2$ blocker), (-)-pindolol (a blocker with affinity to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} binding sites) or ketanserin (a 5-HT_2 blocker).

At postjunctional level 8-OH-DPAT, like 5-HT, caused concentration-dependent contractions of the saphenous smooth muscle. A parallel shift of the concentration-response curve for 8-OH-DPAT to the right was caused by metitepine and yohimbine.

The contractions caused by 5-HT were antagonized by metitepine and yohimbine (parallel displacement of the curves to the right), as well as by ketanserin and methysergide (with a depression of the upper part of the curve). (-)-Pindolol was devoid of antagonistic action. Blockade of alfa-adrenoceptors (due to prazosin plus a low concentration of yohimbine) resulted in a weak antagonistic effect.

We conclude that the saphenous vein of the dog is endowed with prejunctional receptors of the 5-HT_1 type which can not be classified as belonging to any known subtype (1A, 1B, 1C or 1D) and that at postjunctional level 5-HT_1 (possibly of the 1D subtype) and 5-HT_2 receptors are present.

The last point to consider is the interference of 5-HT with the adrenergic transmitter.

At prejunctional level 5-HT inhibited the release of ^{3}H- noradrenaline evoked by electrical stimulation. At postjunctional level 5-HT amplified the contractile responses to noradrenaline (and to other adrenergic agonists: phenylephrine, methoxamine and UK 14,304).

5-HT caused leftwards displacement of the concentration-response curves to all the agonists. The concentration-response curves in the presence of 5-HT converge in the higher concentration range with those obtained in the absence of 5-HT. Ketanserin and metitepine inhibited the leftward shifts produced by 5-HT. These results suggest that the amplifying effect is dependent on the activation of 5-HT_1 and 5-HT_2 receptors.

We also verified that 5-HT interferes with the uptake and metabolism of noradrenaline. In incubation experiments with ^{3}H-NA, 5-HT in low concentrations (0.1µmol/l) did not exert any effect, but higher concentrations (1 and 10µmol/l) competed

with noradrenaline, reducing the accumulation of the amine in the tissue and the deaminated metabolite formation.

Finally, we speculate about pathogenetic role played by 5-HT in peripheral vascular diseases. Damage of endothelium, in localized areas, may lead to accelerated platelet aggregation that causes release of 5-HT in concentrations high enough to produce vasospasm. This spasm assumes particular importance in coronary, cerebral and digital vascular beds.

VII. BIBLIOGRAFIA

Adler-Graschinsky E (1983) Dual presynaptic effects of 5-hydroxytryptamine on peripheral noradrenergic synapses. *J Autom Pharmacol* **3**: 303-315

Ahlman H (1985) Serotonin and carcinoid syndrome. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and the Cardiovascular System.* Raven Press, New York, pp 199-212

Apperley E, Feniuk W, Humphrey PPA, Levy GP (1980) Evidence for two types of excitatory receptor for 5-hydroxytryptamine in dog isolated vasculature. *Br J Pharmacol* **68** : 215-224

Apperley E, Humphrey PPA, Levy GP (1976) Receptors for 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in the rabbit isolated ear artery and aorta. *Br J Pharmacol* **58**: 211-221

Araújo D, Caramona MM, Osswald W (1983) On the mechanism of action of amezinium methylsulfate on dog saphenous vein. *Eur J Pharmacol* **90** : 203-214

Asano M, Hidaka H (1980) Potentiation of the contractile response to acetylcholine in aortic strips by low concentrations of vascular contractile agonists. *Br J Pharmacol* **69** : 639-646

Axelrod J, Inscoe JK (1963) The uptake and binding of circulating serotonin and the effect of drugs. *J Pharmacol Exp Ther* **141** : 161-165

Azevedo I, Osswald W (1976) Uptake, distribution and metabolism of isoprenaline in the dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **295** : 141-147

Bakle YS, Vane JR (1974) Pharmacokinetic function of the pulmonary circulation. *Physiol Rev* **54** : 1007-1045

Bevan JA, Duckles SP, Lee TJ-F (1975) Histamine potentiation of nerve and drug induced responses of a rabbit cerebral artery. *Circ Res* **36**: 647-653

Black JL, French RJ, Mylecharane EJ (1981) Receptor mechanisms for 5-hydroxytryptamine in rabbit arteries. *Br J Pharmacol* **74**: 619-626

Blaschko H, Levine WG (1966) Metabolism of indolealkylamines. In: Eichler O, Farah A (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology,* vol **19**, 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg pp 212 - **244**

Born AH, Duncker DJ, Saxena PR, Verdouw PD (1988) 5-Hydroxytryptamine-induced tachycardia in the pig: possible involvement of a new type of 5-hydroxytryptamine receptor. *Br J Pharmacol* **93**: 663-671

Born GVR, Gilson RR (1959) Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. *J Physiol* (Lond) **146**: 472 - 491

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PPA, Middlemiss DN, Mylecharane E J, Richardson BP, Saxena PR (1986) Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* **25**: 563-576

Bradley PB, Humphrey PPA, Williams RH (1983) Are vascular "D" and "5-HT_2" receptors for 5-hydroxytryptamine the same? *Br J Pharmacol* **79**: 295 P

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

Brandão F (1977) Inactivation of norepinephrine in isolated vein. *J Pharmacol Exp Ther* **203**: 23-29

Brandão F (1979) Inactivação do mediador simpático numa estrutura vascular. Dissertação de doutoramento. Faculdade de Medicina do Porto

Brandão F, Guimarães S (1972) The termination of action of exogenous noradrenaline in the isolated cat spleen tissue. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **275**: 119-123

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

Brittain RT, Butler A, Coates IH, Fortune DH, Hagan R, Hill JM, Humber DC, Humphrey PPA, Ireland SJ, Jack D, Jordan CC, Oxford A, Straughan DW, Tiers MB (1987) GR 38032 F, a novel selective 5-HT_3 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **90**: 87P

Bryan LJ, O'Donnell SR, Williams AM (1989) Dissipation mechanisms for 5-hydroxytryptamine in the coronary circulation of the isolated perfused heart of the rat. *Br J Pharmacol* **97**: 329-338

Buchan P, Lewis AJ, Sugrue MF (1974) A comparison of the accumulation of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine into arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol* **52**: 132P - 133P

Caramona MM (1982) Monoamine oxidase of types A and B in the saphenous vein and mesenteric artery of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **319**: 121-124

Caramona MM (1983) Localization of monoamine oxidase of type A and B in blood vessels with different innervation patterns. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **324**: 185-189

Caramona MM (1985) A monoaminoxidase em estruturas vasculares. Dissertação de doutoramento. Faculdade de Farmácia de Coimbra

Caramona MM, Araújo D, Brandão F (1985) Influence of MAO A and MAO B on the inactivation of noradrenaline in the saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **328**: 401-406

Cassis L, Ludwig J, Grohmann M, Trendelenburg U (1986) The effect of partial inibition of monoamine oxidase on the steady-state rate of deamination of ^{3}H-catecholamines in two metabolizing systems. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **333**: 253-261

Catravas J D, Gillis CN (1980) Pulmonary clearance of [^{14}C]-5-hydroxytryptamine and [^{3}H] -norepinephrine in vivo: effects of pretreatment with imipramine or cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **213**: 120-127

Catravas JD, Gillis CN (1983) Single-passe removal of [^{14}C]-5-hydroxytryptamine and [^{3}H]-norepinephrine by rabbit lung in vivo: kinetics and sites of removal. *J Pharmacol Exp Ther* **224**: 28 -33

Charlton KG, Bond RA, Clarke DE (1986) An inhibitory prejunctional 5-HT_1- like receptor in the isolated perfused rat kidney. Apparent distinction from 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1C} subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **332**: 8-15

Cohen ML, Fuller RW, Wiley KS (1981) Evidence for 5-HT_2 receptors mediating contractions in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **218**: 421-425

Cohen RA (1985) Serotonergic prejunctional inhibition of canine coronary adrenergic nerves. *J Pharmacol Exp Ther* **235**: 76-80

Cohen RA (1987) Inhibition of adrenergic neurotransmission in canine tibial artery after exposure to 5-hydroxytryptamine in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **242**: 493-499

Cohen RA, Vanhoutte PM (1985) Platelets, serotonin and endotelial cells. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and Cardiovascular System.* Raven Press, New York, pp 105-112

Cohen RA, Zitnay KM, Weisbrod RM (1987) Accumulation of 5- hydroxytryptamine leads to dysfunction of adrenergic nerves in canine coronary artery following intimal damage en vivo. *Circ Res* **61**: 829-833

Collis MG, Shepherd JT (1979) Isoproterenol-induced relaxation of venous smooth muscle contracted by agents which mobilize different calcium pools. *J Pharmacol Exp Ther* **209**: 359-365

Connor HE, Feniuk W, Humphrey PPA (1987) Characterisation of 5-HT receptors mediating contraction in dog and primate isolated basilar artery. *Br J Pharmacol* **92**: 757P

Curro FA, Greenberg S, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM (1978) Interaction between alpha adrenergic and serotonergic activation of canine saphenous veins. *J Pharmacol Exp Ther* **207**: 936-949

Dalemans P, Janssens W, Verbeuren T, Vanhoutte PM (1976) Effects of naturally occuring catecholamines on adrenergic neuro-effector interaction in isolated cutaneous veins. *Arch Int Pharmacodyn* **220**: 333-334

De Clerk F, Reneman RS (1985) Platelet-derived serotonin and abnormal tissue perfusion. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and Cardiovascular System* Raven Press New York, pp 155-164

De la Lande IS, Cannell VA, Waterson JG (1966) The interaction of serotonin and noradrenaline on the perfused artery. *Br J Pharmacol* **106**: 539-546

De Mey JC, Vanhoutte PM (1980) Differences of pharmacological properties of posjunctional alpha-adrenergic receptors among arteries and veins. *Arch Int Pharmacodyn* **244**: 328-329

Docherty TJ, Hyland L (1986) An examination of 5-hydroxytryptamine receptors in human saphenous vein. *Br J Pharmacol* **89** : 77-81

Douglas WW (1985) Histamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) and their antagonists. In Goodman and Gilman's (eds) *The pharmacological basis of the therapeutics* 7th edition, Macmillan, New York, pp 605-638

Drapanas T, Mc Donald JC (1963) The direct removal of portal blood serotonin by the liver. *Surg Gynecol Obstet* **116**: 481 -485

Draskóczy PR, Trendelenburg U (1968) The uptake of l- and d-norepinephrine by the isolated perfused rabbit heart in relation to the stereospecificity of the sensitizing action of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **159** : 66-73

Edvinsson L, Birath E, Uddman R, Lee TJ-F, Duverger D, Mackenzie ET, Scatton B (1984) Indoleaminergic mechanisms in brain vessels: location, concentration, uptake and in vitro responses of 5-hydroxytryptamine. *Acta Physiol Scand* **121** : 291-299

Edvinsson L, Degueruce A, Duverger D, Mackenzie ET, Scatton B (1983) Central serotonergic nerves project to the pial vessels of the brain. *Nature* **306**: 55-57

Engel G , Göthert M, Hoyer D, Schlicker E, Hillenbrand K (1986) Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5-HT_{1B} binding sites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **332**: 1-7

Engel G, Göthert M, Müller-Schweinitzer E, Schlicker E, Sistonen L, Stadler PA(1983) Evidence for common pharmacological properties of [^{3}H] 5- hydroxytryptamine binding sites, presynaptic 5-hydroxytryptamine autoreceptors in CNS and inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine receptors on sympathetic nerves. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **324**: 116-124

Erspamer V (1966 a) Occurrence of indolealkylamines in nature. In: Eichler O. Farah A (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology,* vol **19**, 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 132-166

Erspamer V (1966 b) Peripheral physiological and pharmacologial actions of indolealkylamines. In: Eichler O, Farah, A (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology,* vol **19**, 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 245-359

Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* **169**: 800-801

Farnebo LO, Malmfors T (1971) ^{3}H-noradrenaline release and mechanical response in the field stimulated mouse vas deferens. *Acta Physiol Scand* suppl. **371**: 1-18

Feldstein A, Wong KK (1965) Analysis of 5-HTP-C^{14} and its metabolites *Analyt Biochem* **11**: 467-472

Felix W, Muller V, Ochsenkuhn A, Schneider E (1986) Interactions between adrenaline and serotonin on isolated perfused porcine ear veins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **332**: R82

Feniuk W, Humphrey PPA, Perren MJ, Watts AD (1985) A comparison of 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in rabbit aorta and dog saphenous vein: evidence for different receptor types obtained by use of selective agonists and antagonists. *Br J Pharmacol* **86**: 697-704

Feniuk W, Humphrey PPA, Watts A (1979) Presynaptic inhibitory action of 5-hydroxytryptamine in dog isolated saphenous vein. *Br J Pharmacol* **67**: 247-254

Feniuk W, Humphrey PPA, Watts AD (1981 a) Modification of the vasomotor actions of methysergide in the femoral arterial bed of the anaesthetized dog by changes in the sympathetic nerve activity. *J Auton Pharmacol* **1** : 127-132

Feniuk W, Humphrey PPA, Watts AD (1981 b) Further characterization of pre and post-junctional receptors for 5-hydroxytryptamine in isolated vasculature. *Br J Pharmacol* **73**: 191P-192P

Feniuk W, Humphrey PPA, Watts AD (1983) Further evidence for the heterogeneity of vascular receptors for 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* **79**: 296 P

Fozard JR (1984 a) Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology* **23** : 1473 - 1486

Fozard JR (1984 b) MDL 72222 : a potent and highly selective antagonist at neuronal 5-hydroxytryptamine receptors. *Naunyn - Schmiedebergs Arch Pharmacol* **326**: 36-44

Fozard JR (1985) 5-Hydroxytryptamine in the pathophysiology of migraine. In: J A Bevan et al (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Elsevier, Amesterdam, pp 321 - 328

Fozard JR (1987 a) 5-HT: The enigma variations. *Trends Pharmacol Sci* **8** : 501-506

Fozard J R (1987 b) The pharmacological basis of migraine treatment. In: Blau JN (ed) *Migraine:Therapeutic, Conceptual and Research Aspects*. Elsevier, Amsterdam, pp 165 -184

Fozard JR, Mwaluko GMP (1976) Mechanisms of the indirect sympathomimetic effect of 5-hydroxytryptamine on the isolated heart of the rabit. *Br J Pharmacol* **57** : 115-125

Fukuda S, Su C, Lee TJ-F (1986 a) Extraneuronal serotonin accumulation in peripheral arteries of the rat. *Experientia* **42** : 1244-1245

Fukuda S, Su C, Lee TJ-F (1986 b) Mechanisms of extraneuronal serotonin uptake in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **239**: 264-269

Furchgott RF, Weinstein P, Huebl H, Bozargmehri P, Mensendiek R (1955) Effect of inhibition of monoamine oxidase on response of rabbit aortic strips to sympathomimetic amines. *Fed Proc* **14** : 341-34

Gaddum JH, Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptors. *Br J Pharmacol* **12**. 323 - 328

Garrett J, Castro-Tavares J, Branco D (1981) Uptake and metabolism of noradrenaline by blood vessels of perinephritic hypertensive dogs. *Blood Vessels* **18**: 100-109

Gershon MD, Tamir H (1985) Peripheral sources of serotonin and serotonin-binding proteins. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and Cardiovascular System* Raven Press, New York, pp 15-26

Gillis CN, Pitt BR (1982) The fate of circulating amines within the pulmonary circulation. *Ann Rev Physiol* **44**: 269-281

Göthert M (1986) Serotonin receptors in the circulating system. In: Van Zwieten PA, Schönbaum E (eds) *Progress in pharmacology* Vol 6/2. Gustav Fischer, Stuttgart, New York pp 155-172

Göthert M (1987) Inhibitory actions of serotonin (5-HT), on peripheral and central neurones. In: Rand MJ, Raper C (eds) Pharmacology - *Proceedings of the* Xth *International Congress of Pharmacology* (IUPHAR). *Excerpta Medica*, Amsterdam - New York - Oxford, pp 289-293

Göthert M, Kollecker P, Rohm N, Zerkowski H-R (1986 a) Inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors on the sympathetic nerves of the human saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **332**: 317-323

Göthert M, Schlicker E (1987) Classification of serotonin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* **10** (suppl 3): 53-57

Göthert M, Schlicker E, Kollecker P (1986 b) Receptor-mediated effects of serotonin and 5-methoxytryptamine on noradrenaline release in the rat vena cava and in the heart of the pithed rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **332**: 124-130

Graefe KH, Stefano F, Langer SZ (1973) Preferential metabolism of ^{3}H (-)norepinephrine through the deaminated glycol in the vas deferens. *Biochem Pharmacol* **22**: 1147-1160

Griffith SG, Lincoln J, Burnstock G (1982) Serotonin as a neurotransmitter in cerebral arteries. *Brain Res* **247**: 388-392

Grohmann M, Trendelenburg U (1984) The substrate specificity of uptake$_2$ in the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **328**: 164-173

Guimarães S (1975) Further study of the adrenoceptors of the saphenous vein of the dog: influence of the factors which interfere with the concentrations of agonists at the receptor level. *Eur J Pharmacol* **34**: 9-19

Guimarães S, Brandão F, Paiva MQ (1978) A study of the adrenoceptor-mediated feedback mechanisms by using adrenaline as a false transmitter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **305**: 185-188

Guimarães S, Osswald W (1969) Adrenergic receptors in the vein of the dog. *Eur J Pharmacol* **5**: 133-140

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

Guimarães S, Paiva MQ (1977) The role played by extraneuronal system in the disposition of noradrenaline and adrenaline in vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **296**: 279-287

Guimarães S, Paiva MQ, Polónia JJ (1983) Alpha$_1$- and alpha$_2$ - adrenoceptors of the dog saphenous vein and their relation to the sympathetic nerve terminals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (suppl): 155

Hagen PB, Cohen LH, (1966) Biosynthesis of indolealkylamines. Physiological release and transport of 5-hydroxytryptamine. In: Eichler O, Farah A (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol **19**, 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 182-211

Hamon M, Bourgoin S, Gozlan H, Hall MD, Goetz C, Artaud F, Horn AS (1984) Biochemical evidence for the 5-HT agonist properties of PAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin) in the rat brain. *Eur J Pharmacol* **100**: 263-276

Hartig PR (1989) Molecular biology 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 64-69

Henseling M, Eckert E, Trendelenburg U (1976 a) The distribution of ^{3}H - (±)noradrenaline in rabbit aorta strips after inhibition of the noradrenaline-metabolizing enzymes. *Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **292** : 205-217

Henseling M , Eckert E, Trendelenburg U (1976 b) The effect of cocaine on the, distribution of labelled noradrenaline in rabbit aortic strips and on efflux of radioactivity from the strips. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **292**: 231-241

Heuring RE, Peroutka SJ (1987) Characterization of a novel ^{3}H-5-hydroxytryptamine binding site subtype in bovine brain membranes. *J Neurosc* **7** : 894-903

Humphrey PPA (1978) The effects of α-adrenoceptor antagonists on contractile responses to 5-hydroxytryptamine in dog saphenous vein. *Br J Pharmacol* **63**: 671-675

Humphrey PPA, Feniuk W (1989) The sub-classification of functional 5-HT_1 like receptors. (em publicação)

Humphrey PPA, Feniuk W, Perren MJ, Connon HE, Oxford AW, Costes IH, Butina D (1988) GR 43175, a selective agonist for the 5-HT_1 - like receptor in dog isolated saphenous vein. *Br J Pharmacol* **94** : 1123-1132

Humphrey PPA, Feniuk W, Watts AD (1982) Ketanserin a novel antihypertensive drug? *J Pharm Pharmacol* **34** : 541

Humphrey PPA, Feniuk W, Watts AD (1983) Prejunctional effects of 5-hydroxytryptamine on noradrenergic nerves in the cardiovascular system. *Fed Proc* **42**: 218-222

Innes IR (1962) An action of 5-hydroxytryptamine on adrenaline receptors. *Br J Pharmacol* **19** : 427-441

Iwasawa Y, Gillis CN (1974) Pharmacological analysis of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine removal from the pulmonary circulation: Differentiation of uptake sites for each amine. *J Pharmacol Exp Ther* **188** : 386-393

Jester J, Worst WD (1972) Influence of serotonin on adrenergic mechanisms . *Biochem Pharmacol* **21** : 333-338

Junod AF (1972) Uptake, metabolism and efflux of ^{14}C-5-hydroxytryptamine in isolated perfused rat lungs. *J Pharmacol Exp Ther* **183** 341 - 355

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, Nickerson M (1986 a) Disposition of phenylephrine in vascular tissue, determined by oil immersion technique. *J Pharmacol Exp Ther* **163**: 1-10

Kalsner S, Nickerson M (1986 b) A method for the study of mechanisms of drug disposition in smooth muscle. *Canad J Physiol Pharmacol* **46**: 719-730

Kannisto P, Owman Ch, Schmidt G, Sjöberg N-O (1987) Characterization of presynaptic 5-HT receptors on adrenergic nerves supplying the bovine ovarian follicle. *Br J Pharmacol* **92**: 487-497

Kapur H, Mottram DR (1979) A pre-synaptic inhibitory effect of 5-hydroxytryptamine on the electrically induced twitch response of the rat vas deferens. *Biochem Pharmacol* **21**: 333-338

Langeloh A, Bönisch H, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the ^{3}H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake$_1$. Multifactorial induction of outward transport. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* **336**: 602-610

Langer SZ, Shepperson NB (1981) Antagonism of alpha-adrenoceptor mediated contractions of the isolated saphenous vein of the dog by diltiazem and verapamil. *Br J Pharmacol* **74**: 942P - 943P

Levin JA (1974) The uptake and metabolism of ^{3}H-L and ^{3}H-DL - norepinephrine by intact rabbit aorta and by isolated adventitia and media. *J Pharmacol Exp Ther* **190** : 210-226

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

Luchelli-Fortis MA, Langer SZ (1975) Selective inhibition by hydrocortisone of ^{3}H-normetanephrine formation during ^{3}H-transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **287**: 261-275

Maayani S, Wilkinson S, Stollak J (1984) 5-Hydroxytryptamine receptor in rabbit aorta: characterization by butyrophenone analogs. *J Pharmacol Exp Ther* **229**: 346-350

Mantegazzini P (1966) Pharmacological actions of indolealkylamines and percursor aminoacids on the central nervous system. In: Eichler O, Farah A (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology,* vol **19**, 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 424 - 470

Martinez AA, Lokhandwala MF (1980) Evidence for a presynaptic inhibitory action of 5-hydroxytryptamine on sympathetic neurotransmission to the myocardium. *Eur J Pharmacol* **63**: 303-311

McGrath (1977) 5-Hydroxytryptamine and neurotransmitter release in canine blood vessels. Inhibition by low and augmentation by high concentrations. *Circ Res* **41**: 428-435

McGrath MA, Shepherd JT (1978) Histamine and 5-hydroxytryptamine - inhibition of transmitter release mediated by H_2 - and 5-hydroxytryptamine receptors. *Fed Proc* **37**: 195-198

Meehan AG, Medgett IC, Story DF (1988) Involvement of Ca^{2+} mobilization in the amplifying effect of serotonin on response of rabbit isolated ear artery to exogenous noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **337**: 500-503

Meehan AG, Rand MJ, Medgett IC (1986) Effects serotonin on sympathetic noradrenergic transmission in rabbit isolated ear artery. *J Cardiovasc Pharmacol* **8**: 1144 -1153

Meehan AG, Story DF (1989) Interaction of the prejunctional inhibitory action of 5-hydroxytryptamine on noradrenergic transmission with neuronal amine uptake in rabbit isolated ear artery. *J Pharmacol Exp Ther* **248**: 342-347

Medgett IC (1987) Effect of neuronal uptake blockade on the amplifying effect of serotonin on sympathetic vasoconstriction in rat autoperfused hind limb. *J Cardiovasc Pharmacol* **10** (suppl 3): S65-68

Meyers H, Mecca TE, Clinton Webb R (1985) Direct and sensitizing effects of serotonin agonists and antagonists on vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* **7** (suppl 7) S44-48

Middlemiss DN, Fozard JR (1983) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT_1 recognition site. *Eur J Pharmacol* **90**: 151-153

Molderings GJ, Fink K , Schlicker E, Göthert M (1987) Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT_{1B} receptors of the rat vena cava. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **336**: 245-250

Molderings GJ, Göthert M, Fink K, Roth E, Schlicker E (1989) Inhibition of noradrenaline release in the pig coronary artery via a novel serotonin receptor. *Eur J Pharmacol* **164**: 213-222

Neff NH, Yang HYT (1974) Another look at the monoamine oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs. *Life Sci* **14**: 2061-2074

Osswald W (1986) 5-Hidroxitriptamina e seus antagonistas. Em: Garrett J, Osswald W (eds) *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Porto Editora, Porto, pgs 485-490

Osswald W, Guimarães S, Coimbra A (1971) The termination of action of catecholamines in the isolated venous tissue of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **269**: 15-31

Page IH (1954) Serotonin (5-Hydroxytryptamine). *Physiol Rev* **34**: 563-588

Page IH (1958) Serotonin (5-Hydroxytryptamine); The Last Four Years. *Physiol Rev* **38**: 277-335

Page IH, McCubbin JW (1953) Variable arterial pressure response to serotonin in laboratory animals and man. *Circ Res* **1**: 354-362

Paiva MQ, Caramona MM, Osswald W (1984) Intra and extraneuronal metabolism of 5-hydroxytryptamine in the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **325**: 62-68

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

Paiva MQ, Guimarães S (1984) The kinetic characteristics of the extraneuronal O-methylating system of the dog saphenous vein and the supersensivity to catecholamines caused by its inhibition. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **327**: 48-55

Paiva MQ, Osswald W (1980) Inactivation of some vasoconstrictritor agonists by saphenous vein strips of the dog. *J Pharm Pharmacol* **32**: 227-228

Pazos A, Hoyer D, Palacios JM (1984) The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus : characterization of a new type of serotonin recognition site. *Eur J Pharmacol* **106**: 539-546

Peroutka SJ (1984) Vascular serotonin receptors. *Bioch Pharmacol* **33**: 2349 - 2353

Peroutka SJ (1988) 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes: molecular, biochemical and physiological characterization. *Trends Neurosci* **11**: 496 - 500

Peroutka SJ, Huang S, Allen GS (1986) Canine basilar artery contractions mediated by 5-hydroxytryptamine $_{1A}$ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **237**: 901-906

Peroutka SJ , Snyder SH (1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [^{3}H]5-hydroxytryptamine, [^{3}H]lysergic acid diethylamide and [^{3}H]spiroperidol. *Molec Pharmacol* **16**: 687 - 699

Pitt BR, Hammond GL, Gillis CN (1982) Comparison of pulmonary and extrapulmonary extraction of biogenic amines. *J Appl Physiol* **52**: 1545-1551

Pletscher A (1968) Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Br J Pharmacol* **32**: 1-16

Pluchino S (1972) Direct and indirect effects of 5-HT and tyramine on cat smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **272**: 189-224

Purdy RE, Hurlbut DE, Rains LA (1981) Receptors for 5-hydroxytryptamine in rabbit isolated ear artery and aorta. *Blood Vessels* **18**: 16-27

Purdy RE, Murray DL (1987) Serotonin-induced vasoconstriction and contractile sinergism with norepinephrine : role of alpha-adrenoceptors. In: Mylecharane EJ, Humphrey PP, Angus JA, De la Lande (eds). *Proceedings of an IUPHAR satellite meeting on serotonin*: Heron Island, Australia

Rapoport RM, Bevan JA (1982) Incresead contractility induced in rabbit ear artery by prior exposure to serotonin masks concomitant desensitization to norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* **222**: 338-343

Rapoport RM, Bevan JA (1983) Effects of contraction on the subsequent responsiveness and maximum contractility of the rabbit ear artery and saphenous vein in vitro. *Blood Vessels* **20** : 44-55

Rapport MM (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin). V Presence of creatinine in the complex. A proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem* **180** : 961-969

Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor (serotonin). IV Isolation and characterization. *J Biol Chem* **176** : 1243-1251

Richardson BP, Engel G (1986) The pharmacology and function of 5-HT_3 receptors. *Trends Neurosci* **9** : 424 -428

Saito A, Lee TJ-F (1987) Serotonin as an alternative transmitter in sympathetic nerves of large cerebral arteries of the rabbit . *Circ Res* **60** : 220-228

Saxena PR (1987) Arteriovenous anastomoses and veins in migraine research. In: Blau JN (ed) *Migraine : Therapeutic, Conceptual and Research Aspects*. Elsevier, Amsterdam, pp 581-596

Saxena PR, Ferrari MD (1989) 5-HT_1-like receptor agonists and the pathophysiology of migraine. *Trends Pharmacol Sci* **10** : 200-204

Saxena PR, Richardson BP, Mylecharane EJ, Middlemiss DN, Humphrey PPA, Fozard JR, Feniuk W, Engel G , Bradley PB (1986) Functional receptors for 5-hydroxytryptamine (5-HT). *Trends Pharmacol Sci* **7** : (7), Centre-fold

Seabrook JM, Nolan PL (1983) The vascular interaction of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* **89** : 131-135

Shepro D, Batbouta JC, Robblee LS, Carson MP e Belamarich FA (1975) Serotonin transport by cultured bovine aortic endothelium. *Circ Res* **36**: 799-806

Squires RF (1974) Effects of noradrenaline pump blockers on its uptake by synaptosomes from several brain regions; additional evidence for dopamine terminals in the frontal cortex. *J Pharm Pharmacol* **26**: 364-367

Steppeler A, Starke K (1980) Selective inhibition by amezinium of intraneuronal monoamine oxidase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **314**: 13-16

Stoltz J F (1985). Uptake and storage of serotonin by platelets. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and the Cardiovascular System*. Raven Press, New York, pp 37-42

Stupecky GL, Murray DL, Purdy RE (1986) Vasoconstrictor threshold synergism and potentiation in the rabbit isolated thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* **238**: 802-808

Strum JM, Junod AF (1972) Radioautographic demonstration of 5-hydroxytryptamine ^{3}H uptake by pulmonary endothelial cells. *J Cell Biol* **54**: 456-467

Su C, Uruno T (1984) Excitatory and inhibitory effects of 5-hydroxytryptamine in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **106**: 283-290

Summer MJ, Humphrey PPA, Feniuk W (1987) Characterisation of the 5-HT_1 like receptor mediating relaxation of porcine vena cava. *Br J Pharmacol* **92**: 574P

Thoa NB, Eccleston D, Axelrod J (1969) The accumulation of C^{14}-serotonin in the guinea-pig vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* **169**: 68-73

Thomas DP, Vane JR (1967) 5-Hydroxytryptamine in the circulation of the dog. *Nature* (Lond) **216**: 687-781

Tranzer JP, Da Prada M, Pletcher A (1966) Ultra-stuctural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature* (Lond) **212**: 1574 - 1575

Traut M (1979) Inhibition of noradrenaline uptake and monoamine oxidase by amezinium metilsulfat (LU 1631). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **308**: R12

Trendelenburg U (1974) The relaxation of rabbit aortic strips after a preceding exposure to sympathomimetic amines. *Naunyn-Schimiedeberg's Arch Pharmacol* **281**: 13 -46

Trendelenburg U (1980) A kinetic analysis of the extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **87**: 33-113

Tuncer M, Dogan N, Ilhan M, Kayaalp SO (1985) Serotonin-induced contraction of canine saphenous vein: mediation by 5-HT_1 receptors. *Arch Int Pharmacodyn* **274**: 305-312

Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**: 175-161

Tyce GM (1985) Biochemistry of serotonin In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and Cardiovascular System.* Raven Press, New York, pp 15-26

Vanhoutte, PM (1987) Cardiovascular effects of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* **10** (suppl 3) S8 - S11

Vanhoutte PM, Cohen RA (1983) The elusory role of serotonin in vascular function and disease. *Biochem Pharmacol* **32**: 3671-3674

Vanhoutte PM, Houston DS (1986) Serotonin, platelets and vascular function. In: Magro A, Osswald W, Reis D, Vanhoutte PM (eds) *Central and peripheral mechanism of cardiovascular regulation.* Plenum Press, New York and London, pp 135 -161

Van Nueten JM (1983) 5-Hydroxytryptamine and precapillary vessels. *Fed Proc* **42**: 223-227

Van Nueten JM, Janssen PAJ, De Rider W, Vanhoutte PM (1982) Interaction between 5-hydroxytryptamine and other vasoconstrictor substances in the isolated femoral artery of the rabbit: effect of ketanserin (R41468). *Eur J Pharmacol* **77**: 281-287

Van Nueten JM, Janssen PAJ, Van Beek J, Xhonneux R, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM (1981) Vascular effects of ketanserin (R41468), a novel antagonist of 5-HT_2 serotonergicreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* **218**: 217- 230

Van Nueten JM, Janssens WJ, Vanhoutte PM (1985 a) Serotonin and vascular reactivity. *Pharmc Res Com* **17**: 585 - 608

Van Nueten JM, Janssens WJ, Vanhoutte (1985 b) Serotonin and vascular smooth muscle. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and the Cardiovascular System.* Raven Press, New York, pp. 95-103

Van Nueten JM, Vanhoutte PM (1984) Serotonin and vascular function. *Clin Anaesthesiol* **2**: 363-382

Van Zwieten PA (1987) Pathophysiological relevance of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* **10** (suppl 3): S19 -S25

Verbeuren TJ, Jordaens FH, Herman AG (1983) Accumulation and release of [^{3}H]-5-hydroxytryptamine in saphenous veins and cerebral arteries of the dog. *J Pharmacol Exp Ther* **226**: 579-588

Verbeuren TJ, Jordaens FH, Herman AG (1985) Possible mechanisms by which the endothelium inhibits the accumulation of vasoactive amines in the isolated perfused dog saphenous vein. *Arch Int Pharmacodyn* **278**: 175

Yu J-G, Lee T J-F (1989) 5-Hydroxytryptamine-containing fibers in cerebral arteries of the cat, rat and guinea-pig. *Blood Vessels* **26**: 33-43

Waeber C, Schoeffter P, Palacios JM, Hoyer D (1988) Molecular pharmacology of 5-HT_{1D} recognition sites: radioligand binding studies in human, pig and calf brain membranes. *Naunyn - Schmiedberg's Arch Pharmacol* **337**: 595-601

Watts AD, Feniuk W, Humphrey PPA (1981) A pre-junctional action of 5-hydroxytryptamine and methysergide on noradrenergic nerves in dog isolated saphenous vein. *J Pharm Pharmacol* **33**: 515-520

Webb RC, Vanhoutte PM (1985) Responsiveness of the hypertensive blood vessel wall to serotonergic stimuli. In: Vanhoutte PM (ed) *Serotonin and the Cardiovascular System*. Raven Press, New York, pp 113 - 121

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....19

II. MATERIAL E MÉTODOS.....30

III. RESULTADOS E COMENTÁRIOS.....47

IV. DISCUSSÃO GERAL.....97

V. RESUMO.....119

VI. SUMMARY.....123

VII. BIBLIOGRAFIA.....127