MARIA ISABEL AMORIM DE AZEVEDO

CAPTAÇÃO EXTRANEURONAL DE CATECOLAMINAS

proposta de interpretação

PORTO • 1982

MARIA ISABEL AMORIM DE AZEVEDO

CAPTAÇÃO EXTRANEURONAL DE CATECOLAMINAS

proposta de interpretação

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

PORTO • 1982

CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

PROFESSORES EFECTIVOS

Doutor Manuel da Silva Pinto	Oftalmologia
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett	Farmacologia
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões	Química Fisiológica
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia	Anatomia Descritiva
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos	Semiótica Radiológica
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão	Anatomia Patológica
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida	Clínica Cirúrgica
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares	Genética
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald	Terap.Geral e Hidrologia
Doutor Manuel José Bragança Tender	Fisiologia
Doutor João da Silva Carvalho	Ginecologia
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima	Ortopedia e Traumatologia
Doutor António Fernandes da Fonseca	Psiquiatria
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra	Histologia e Embriologia
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia	Higiene e Med. Social
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira	Patologia Cirúrgica
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior	Propedêutica Cirúrgica
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga	Patologia Médica
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro	Clínica Médica
Doutor José Augusto Fleming Torrinha	Imunologia
Doutor Manuel Pinheiro Coelho Hargreaves	Propedêutica Médica e Semiótica Laboratorial

PROFESSORES JUBILADOS

Doutor Francisco Manuel da Fonseca e Castro
Doutor José Afonso Dias Guimarãis
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor António de Sousa Pereira
Doutor Álvaro António Pinheiro Rodrigues
Doutor Ernesto Borges Teixeira de Morais
Doutor Francisco Alberto da Costa Pereira Viana
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Emídio José Ribeiro
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor João Costa

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

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

Esta publicação foi subsidiada pelo Instituto Nacional de Investigação Científica.

O trabalho experimental apresentado foi também subsidiado, na sua maior parte, pelo Instituto Nacional de Investigação Científica, através do Projecto PMC2 do Laboratório de Farmacologia, depois substituído pelo Centro de Farmacologia e Biopatologia Química da Universidade do Porto, FmPl.

Recebemos também daquele Instituto um subsídio de investigação de 1972 a 1980, altura em que passamos a auferir o subsídio de exclusividade do Ministério da Educação e Universidades.

Nota - Os resultados apresentados nos capítulos Veia safena de Cão e Aorta de Coelho fazem parte das seguintes publicações:

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

Branco, D., Azevedo, I., Sarmento, A., Osswald, W.: The fate of isoprenaline in the isolated rabbit aorta. Radiochemical and morphologic observations. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 316: 120-125 (1981)

PREFACIO

A tese que apresentamos surgiu no decorrer do trabalho de investigação que realizámos no Laboratório de Farmacologia ao longo dos últimos sete ou oito anos, a partir duma das primeiras hipóteses de trabalho que nos foram propostas pelo nosso orientador, Prof. Walter Osswald.

Iniciado numa altura em que mal nos apercebíamos da importância relativa do tema, fomos aderindo cada vez mais ao mesmo, à medida que os resultados iam surgindo e a nossa posição de perspectiva melhorando. Ao apresentar a tese, sentimos o trabalho como verdadeiramente nosso, importante dentro das linhas de investigação fundamentais do Laboratório de Farmacologia, e oportuno. Por isso, e ainda pela maneira como nos acompanhou durante a realização deste trabalho, o Prof. Walter Osswald assume lugar de primeiro plano na esfera de influências positivas que nos trouxeram até este lugar.

Como dizíamos, um trabalho desta natureza fica a dever-se a um conjunto de influências positivas, activas e passivas, evidentes, discretas ou mesmo desconhecidas. Não nos parecendo necessário nem possível referi-las todas, gostaríamos de salientar algumas.

A atitude de disponibilidade, respeito e estímulo da nossa Família em relação a este trabalho, criou um espaço absolutamente indispensável à sua realização.

Encontrámos no Laboratório de Farmacologia um ambiente

excelente em múltiplos aspectos: qualidade das pessoas, relações humanas, condições de trabalho. O nosso desenvolvimento como pessoa e investigador está intimamente ligado àquelas condições, pelo que nos sentimos profundamente gratos e dedicados a todos quantos lá trabalham, e muito particularmente aos criadores e principais animadores daquela realidade material e espiritual, os Profs. José Garrett e Walter Osswald.

A vertente morfológica da metodologia que escolhemos colocou-nos na necessidade de recorrer frequentemente aos Laboratórios de Anatomia Patológica e Histologia da nossa Faculdade. Em ambos encontrámos sempre acolhimento generoso e óptima colaboração. Por ter sido gratuita, ficaremos sensibilizados para sempre em relação à colaboração de todos os que lá nos ajudaram, em particular aos Profs. Daniel Serrão e António Coimbra. As autorradiografias que apresentamos foram preparadas com a preciosa ajuda técnica da Srª D. Alice Guimarães, no Laboratório de Histologia.

Como primeiros e indiscutíveis beneficiários deste trabalho, pelo prazer que nos causou realizá-lo, aqui testemunhamos a nossa profunda gratidão em relação a todas as influências que o tornaram possível, incluindo o acaso que as colocou no nosso caminho.

INDICE

INTRODUÇÃO

REMOÇÃO, ACUMULAÇÃO E METABOLIZAÇÃO DE CATECOLAMINAS POR VARIOS TECIDOS

a) MATERIAL E METODOS

b) RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Veia safena de Cão (Isoprenalina)
2. Aorta de Coelho (Isoprenalina)
3. Artérias umbilicais humanas (Isoprenalina, Adrenalina, Noradrenalina)
4. Coração de Rato (Isoprenalina)
5. Canal torácico de Cão (Isoprenalina)
6. Pele de Rato/Cicatrização (Isoprenalina)

Apêndice: efeito da cortexona sobre a morfologia da membrana dos fibroblastos e macrófagos

ALTERAÇÕES DA ULTRASTRUTURA NUCLEAR INDUZIDAS PELA ISOPRENALINA EM CELULAS MUSCULARES, FIBROBLASTOS E FIBROCITOS DA AORTA DE RATOS JOVENS

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

RESUMO

SUMMARY

BIBLIOGRAFIA

INTRODUÇÃO

Quando se oferecem doses altas de catecolaminas a tecidos vivos, estes acumulam aquelas substâncias em maior ou menor quantidade. As primeiras referências a este fenómeno foram feitas por Burn (1932), Raab (1943), Nickerson et al (1950), Raab e Gigee (1955). No entanto, o fenómeno parecia não se verificar para doses pequenas (von Euler, 1956).

A possibilidade de se dispôr de catecolaminas marcadas com trítio, com alta actividade específica, veio permitir o estudo da manipulação das catecolaminas pelos tecidos, em concentrações não muito diferentes das fisiológicas. Assim, em 1959, Axelrod et al verificaram que após uma injecção intravenosa de adrenalina-^{3}H a ratinhos, a substância desaparecia em duas fases: nos primeiros 5 minutos desaparecia a maior parte, dando origem fundamentalmente a metabolitos O-metilados; o restante (30%) desaparecia dum modo muito mais lento.

No que diz respeito à identificação das estruturas responsáveis pela acumulação das catecolaminas, desde o início (Burn, 1932) e até 1965 as atenções concentraram-se sobre os nervos adrenérgicos. Ficou bem demonstrada a existência dum sistema de transporte de catecolaminas para dentro dos terminais nervosos adrenérgicos (chamado siste-

ma de captação neuronal), bem como um grande número de características desse sistema (revisão de Paton, 1976).

Em 1965 Iversen, e Burgen e Iversen, identificaram, através da determinação das constantes cinéticas para a acumulação de noradrenalina intacta pelo tecido, da afinidade de várias aminas para esse sistema, das cinéticas de efluxo, e pelo uso de inibidores específicos, um segundo sistema de captação, que mais tarde se verificou, por estudos de histoquímica, ser extraneuronal (Eisenfeld et al 1967a e b, Malmfors, 1967, Farnebo, 1968, Ehinger e Sporrong, 1968, Farnebo e Malmfors, 1969, etc.).

Uma vez definida a existência duma captação extraneuronal de catecolaminas, muitos autores têm dedicado os seus esforços a aprofundar o conhecimento de tal fenómeno, na perspectiva de se vir a compreender o seu significado fisiológico.

Não tem sido um objectivo fácil de alcançar. Aliás, a captação extraneuronal de catecolaminas tem-se revelado um fenómeno extremamente complexo.

Sistema de captação extraneuronal de catecolaminas é uma designação que se refere, obviamente, ao mecanismo de transporte activo das referidas aminas através da membrana celular (Graefe, 1976). Na prática, quando se põe um organismo ou um órgão isolado em contacto com uma catecolamina, concomitante ou subsequentemente ao transporte extraneuronal passam-se muitos outros fenómenos, nomeadamente a captação neuronal, a acumulação e/ou metaboliza-

ção intra- e extraneuronal, a fixação a estruturas intra e extracelulares, etc.. Torna-se por isso necessário recorrer ao uso de artifícios que permitam excluir algumas daquelas variáveis, tal como o uso de fármacos bloqueadores da captação neuronal, de inibidores enzimáticos, etc.. Muitas vezes tais fármacos não são absolutamente específicos, pois interferem com os processos que se pretende avaliar, dificultando assim a interpretação dos mesmos.

Acontece ainda que, dum modo geral, e quer se usem métodos bioquímicos, farmacológicos ou estudos de cinética, os resultados obtidos dizem respeito a um complexo estrutural (organismo inteiro ou órgão isolado), ficando nós, portanto, perante uma resultante dos múltiplos processos que funcionam simultaneamente em tal complexo.

As tentativas de identificação das estruturas responsáveis pela captação extraneuronal das catecolaminas, com as técnicas de histofluorescência disponíveis na época, não foram muito esclarecedoras por duas razões: a técnica exigia o uso de concentrações bastante altas de noradrenalina, medindo-se a acumulação da mesma no tecido; e o uso de tais concentrações, com tempos de contacto relativamente longos, levava ao aparecimento de fluorescência num sem número de estruturas, ou seja, dum modo que não parecia muito específico.

Assim, mesmo minuciosos estudos comparativos sobre a captação extraneuronal de noradrenalina, como por exemplo o de Burnstock et al (1972) sobre uma série de órgãos de

várias espécies animais, ou estudos praticamente exaustivos sobre a captação extraneuronal de isoprenalina ou noradrenalina por um determinado órgão, como os do grupo de Trendelenburg sobre o coração de Rato (Bönisch e Trendelenburg, 1974, Bönisch et al 1974, Uhlig et al 1974, 1976, Bönisch, 1978, Bönisch et al 1978, Fiebig e Trendelenburg, 1978 a e b, Bönisch et al 1979), não permitiram avançar grandes hipóteses sobre o significado da captação extraneuronal (Trendelenburg, 1980).

No entanto ficou bem demonstrado (por estes últimos autores e outros) que a captação e metabolização extraneuronais de catecolaminas ocorrem mesmo para concentrações muito baixas das mesmas, o que mantém francamente em aberto a possibilidade dum papel fisiológico para aqueles fenómenos.

Em revisão apresentada no Handbook of Physiology (1980), Bevan et al não conseguem adiantar sobre este tema mais do que "Extraneuronal uptake is usually thought of as a process whereby transmitter is removed from the region of the alpha-adrenergic receptors, i.e., a mechanism of inactivation". Esta conclusão, apresentada por vários autores desde há bastante tempo (Kalsner, 1969 a e b, Kalsner e Nickerson, 1969 a e b, Kaumann, 1970, 1972, Trendelenburg et al, 1971, Almgren e Jonason, 1973, 1974, Graefe e Trendelenburg, 1974, Guimarães et al, 1975, Bausher e Sears, 1976, Bell e Grabisch, 1976, Trendelenburg e Henseling, 1976, Belfrage et al 1977, Guimarães e Paiva,

1977, Johnson e de la Lande, 1978, Kalsner, 1978), baseia-se na potenciação da resposta de órgãos efectores à noradrenalina pelo bloqueio da captação extraneuronal.

Novas maneiras de abordar o problema pareciam, portanto, necessárias.

Encorajados pelos resultados de Coimbra et al (1974) que, com técnicas de autorradiografia, conseguiram mostrar a distribuição de noradrenalina-^{3}H em tiras de veia safena lateral de Cão, após incubação com a referida amina, decidimos empreender um estudo sobre a captação extraneuronal de catecolaminas por vários tecidos, recorrendo simultaneamente a técnicas de doseamento da amina acumulada nos tecidos bem como dos metabolitos produzidos, e a técnicas de morfologia e autorradiografia de luz e ultrastrutural. Com a integração dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias esperávamos encontrar uma noção que nos aproximasse da resposta à interrogação que mais nos fascina neste problema: o que significa, na economia geral do organismo, a captação extraneuronal das catecolaminas ?

REMOÇÃO, ACUMULAÇÃO E METABOLIZAÇÃO DE CATECOLAMINAS POR VÁRIOS TECIDOS

a) MATERIAL E METODOS

Iniciámos a nossa investigação com vasos sanguíneos (veia safena lateral de Cão, aorta torácica de Coelho, artérias umbilicais humanas, coração de Rato), dado o papel relevante atribuído aos vasos sanguíneos na remoção de catecolaminas circulantes (Gillespie e Muir, 1970, Osswald e Branco, 1973, Bönisch et al, 1974).

Os resultados entretanto obtidos levaram-nos a incluir, por motivos que exporemos, neste estudo, um vaso linfático (canal torácico de Cão) e um tecido em cicatrização (pele de Rato).

Colheita dos tecidos

As veias safenas e os canais torácicos de Cão foram obtidos de cães de raça indeterminada (8-12 kg de peso), anestesiados com pentobarbital sódico (30 mg/kg, i.v., injectado na pata anterior). Removeram-se segmentos de ambas as veias safenas laterais, proximalmente à junção dos ramos plantar e dorsal. Os canais torácicos foram abordados através de incisão efectuada no 4º espaço intercostal esquerdo. Laqueava-se o topo proximal e dissecava-se todo o

canal até à cisterna de Pecquet.

As aortas de Coelho foram obtidas de animais adultos com 2,0-2,5 kg de peso, mortos por sangria depois de concussão da nuca.

As artérias umbilicais humanas obtinham-se de cordões umbilicais colhidos imediatamente a seguir ao nascimento.

Os corações e retalhos de pele de Rato retiravam-se imediatamente após a decapitação do animal.

Após a colheita, sempre para solução de Krebs-Henseleit oxigenada e arrefecida a 4°C, os vasos eram limpos, abertos longitudinalmente e cortados em segmentos de peso aproximadamente constante; os retalhos de pele eram cortados em forma de fatia.

Oferta da catecolamina ao tecido

As tiras dos vasos sanguíneos, do canal torácico ou os retalhos de pele eram incubados em solução de Krebs-Henseleit (composição em mmol/l: Na^+144, K^+ 4,7, Ca^{2+} 2,6, Mg^{2+} 1,2, Cl^- 130,3, $H_2PO_4^-$ 1, HCO_3^- 25, glicose 11,1, EDTA sódico 0,04, ácido ascórbico 0,11),3 ml, à temperatura de 37°C, oxigenada com uma mistura de 95%O_2 e 5%CO_2 e sob agitação constante. Após um período de repouso (15 a 45 min) os tecidos eram transferidos para novo líquido nutritivo contendo a catecolamina tritiada (isoprenalina-^3H, ou, em alguns casos, noradrenalina-^3H ou adrenalina-^3H), sempre numa concentração de 2 micromol/l.

A incubação com a amina era interrompida aos 8 ou 30

minutos.

No fim da incubação o tecido era submetido a uma lavagem rápida em solução fresca de Krebs-Henseleit, seguida duma secagem ligeira em papel de filtro.

Pesava-se o tecido, retirava-se uma pequena amostra para estudo morfológico e pesava-se novamente o restante tecido que se guardava em tubo contendo 3 ml de ácido perclórico 0,4N, a 4°C.

Os líquidos de incubação eram recolhidos em tubos a que se adicionava ácido perclórico de modo a obter uma concentração final deste de 0,4N. Também estes tubos se mantinham a uma temperatura de 4°C.

No caso das veias safenas de Cão, foram também colhidas pequenas amostras de tecido para estudo morfológico (autorradiográfico) após os 2 primeiros minutos de incubação com a isoprenalina-^{3}H.

Os corações de Rato foram perfundidos, segundo Langendorff, com solução de Tyrode modificada (composição em mmol/l: Na^{+} 149,2, K^{+} 2,7, Ca^{2+} 1,275, Mg^{2+} 2,1, Cl^{-} 145,3, $H_2PO_4^{-}$ 0,4, HCO^{-} 11,9, glicose 5,0, ácido ascórbico, 0,284, EDTA sódico 0,04) e isoprenalina-^{3}H, na concentração de 0,95 micromol/l (em alguns casos também com uma concentração 10 vezes menor) durante 5, 20, 30 ou 60 minutos. Fizeram-se também experiências em que, após a perfusão com isoprenalina durante 30 minutos, se lavava o tecido perfundindo-o com solução de Tyrode sem amina durante 30 minutos.

Estas experiências, integradas num protocolo comum ela-

borado com o Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg (da direcção do Prof. U.Trendelenburg) foram executadas pelo Dr. H.Bönisch, daquele Instituto, durante um breve estágio realizado por aquele investigador no nosso Laboratório. Destinaram-se apenas a obtenção de material para estudo morfológico. Na realidade este modelo tinha sido já exaustivamente estudado do ponto de vista de análise cinética por aqueles autores, pelo que nos dispensamos de apresentar pormenores, quer da metodologia, quer dos resultados obtidos por doseamento radioquímico (ver Bönisch e Trendelenburg, 1974, Bönisch et al, 1974).

Os fragmentos para estudo morfológico foram colhidos na porção antero-superior do septo interventricular, imediatamente no fim da experiência em questão.

Uso de substâncias conhecidas como inibidores da captação extraneuronal ou da metabolização das catecolaminas

Para além das incubações realizadas em situação de controle, isto é, só na presença da amina tritiada, foram também feitas incubações e perfusões após pré-tratamento e na presença de:

- Cortexona (desoxicorticosterona) - descrita como inibidor específico da captação extraneuronal, foi usada numa concentração de 60 micromol/l.
- Corticosterona - usada como inibidor da captação extraneuronal nos corações de Rato, apenas para que o protocolo destas experiências fosse rigorosamente igual ao das expe-

riências anteriormente realizadas por Bönisch e Trendelenburg. A concentração foi de 10 micromol/l.

- U0521 (3,4-di-hidroxi-2-metilpropiofenona) - descrito como inibidor da catecol-O-metiltransférase, foi usado numa concentração de 100 micromol/l.
- Cocaína - inibidor clássico da captação neuronal da noradrenalina, mas não desprovida de efeitos extraneuronais (Gillis, 1976); foi usada numa concentração de 12 e16 micromol/l.
- Cortexona + U0521 (nas concentrações acima referidas)
- Cortexona + U0521 + Cocaína (nas concentrações acima referidas).
- Clorgilina - classificada como inibidor específico da monoaminoxídase tipo A, foi usada numa concentração de 10 micromol/l.
- Deprenil - classificado como inibidor específico da monoaminoxídase tipo B, foi usado numa concentração de 100 micromol/l.

Preparação dos tecidos e líquidos de incubação para doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H (ISO) e do seu metabolito O-metilisoprenalina-^{3}H (OMI)

Os tecidos eram homogenizados em 5 ml de ácido perclórico 0,4N, com EDTA (1,0 mg/ml) e metabissulfito de sódio (1,25 mg/ml). Depois de estabilizar durante um mínimo de 2 h, o extracto era centrifugado durante 10 min a 8000 g numa centrífuga refrigerada.

As amostras obtidas dos tecidos bem como às dos líquidos de incubação adicionou-se tampão Tris até se obter um pH de 8,2.

A separação da ISO e OMI foi feita por cromatografia em colunas de alumina e Dowex.

Passou-se o extracto do tecido ou a amostra do líquido de incubação pelas colunas de alumina e Dowex. A ISO, adsorvida na coluna de alumina, foi eluída com ácido clorídrico 0,2N. A OMI, adsorvida na coluna de Dowex, foi eluída com ácido clorídrico 6N: etanol (em volumes iguais). Depois de adicionar uma mistura de cintilação (Triton X100, 330 ml; Permablend III, 5,5 g; e tolueno até perfazer 1000 ml) as amostras foram lidas num espectrofotómetro de cintilação líquida Packard TriCarb, mod. 3320 ou Betaszint BF 5001A.

Os valores obtidos para a OMI foram corrigidos tendo em linha de conta uma pequena porção de ISO que aparecia naquela fracção, sempre calculada a partir da cromatografia duma solução padrão.

Os resultados foram expressos em equivalentes de radioactividade de ISO (em picomol/g de tecido).

Os valores relativos à acumulação de ISO foram subtraídos da quantidade de ISO presente no espaço inerte (parte do espaço extracelular, definido pelo espaço do sorbitol) e calculada a partir da concentração de ISO no meio de incubação.

A recuperação do processo cromatográfico foi avaliada

comparando a soma da radioactividade das várias fracções com a radioactividade total da amostra correspondente.

Preparação dos tecidos e líquidos de incubação para doseamento radioquímico da noradrenalina-^{3}H (NA) ou adrenalina-^{3}H (A) e respectivos metabolitos

A preparação inicial dos tecidos e líquidos de incubação fez-se tal como acabamos de descrever para a determinação da ISO. A separação entre a NA ou a A e os respectivos metabolitos foi feita por cromatografia em colunas de alumina e Dowex, de acordo com a técnica descrita por Graefe et al (1973) e apresentada pormenorizadamente por Brandão(1979).

Obtinha-se assim a separação de 5 fracções: I - MOPEG (4-hidroxi, 3-metoxifenilglicol)+VMA (ácido 4-hidroxi,3-metoximandélico), II - NMN ou MN (normetanefrina ou metanefrina), III - DOPEG (3,4-di-hidroxifenilglicol), IV - noradrenalina ou adrenalina e V - DOMA (ácido 3,4-di-hidroximandélico).

A radioactividade foi determinada no espectrofotómetro de cintilação líquida, após se ter adicionado às amostras a mesma mistura de cintilação referida para a ISO.

Os resultados obtidos para a radioactividade foram expressos em equivalentes de radioactividade de NA ou A (em picomol/g de tecido).

Os valores relativos à acumulação de amina intacta nos

tecidos foram subtraídos da quantidade de amina presente no espaço do sorbitol, e calculada a partir da concentração de amina no meio de incubação.

A recuperação do processo cromatográfico foi verificada para todas as amostras de cada experiência, pela relação: soma de ^{3}H das 5 fracções/^{3}H total por amostra.

Os valores obtidos para cada um dos metabolitos foram corrigidos a partir duma pequena quantidade de amina intacta que aparecia nas respectivas fracções e conhecida através da cromatografia duma solução padrão.

Determinação do espaço do sorbitol

Determinou-se em todo o tipo de preparações utilizadas neste estudo o espaço do sorbitol (considerado como espaço extracelular). Os tecidos foram incubados com 3 ml de solução de Krebs-Henseleit com 1 /uCi de sorbitol-^{14}C ou sorbitol-^{3}H durante o mesmo tempo em que se faziam as incubações com as catecolaminas. No fim da incubação doseou-se por cintilação líquida a radioactividade retida no tecido e a radioactividade duma amostra do líquido de incubação. Esses valores foram utilizados para calcular o espaço do sorbitol de cada tecido para as referidas condições experimentais. A partir do conhecimento desses valores (veia safena de Cão: 0,39 $\pm$ 0,02 ml/g; aorta de Coelho intacta; 0,37 $\pm$ 0,04 ml/g; média da aorta de Coelho isolada: 0,43 $\pm$ 0,04 ml/g; adventícia da aorta de Coelho isolada: 0,37 $\pm$ 0,04 ml/g; artérias umbilicais humanas: 0,37 $\pm$ 0,09 ml/g; canal torácico de Cão: 0,47 $\pm$

0,04 ml/g; pele de Rato: 0,32 ± 0,05 ml/g). Calculou-se a quantidade de amina-^{3}H intacta distribuida nesse espaço, de acordo com a respectiva concentração no meio de incubação. Os valores apresentados sobre a acumulação de amina intacta nos tecidos foram corrigidos por subtracção da quantidade de amina calculada para o espaço do sorbitol.

Preparação dos tecidos para estudo morfológico

As amostras de tecido foram fixadas por imersão em glutaraldeído a 3% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a 4°C, durante 90 minutos, lavadas por 4 mudanças (a 7 minutos de intervalo) em soluções frescas do mesmo tampão adicionado de sacarose (0,6 M), pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2% em tampão de cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a 4°C, durante 1 h, desidratadas por passagem por soluções de etanol progressivamente mais concentradas, passadas por óxido de propileno e incluídas em Epon 812.

No caso dos corações de Rato, e para se obterem cortes suficientemente extensos de modo a englobar vários tipos de vasos, fizeram-se também inclusões em parafina após uma fixação de ~ 18 h em glutaraldeído a 3% diluído em tampão de cacodilato, pH 7,3, seguida de desidratação com etanol e passagem por xilol.

Autorradiografias de luz

Prepararam-se num ultramicrótomo Ultrotome III, LKB, cortes semi-finos (2 µm) que, depois de colados em lâminas de vidro com cola de albumina, foram corados com áci-

do perclórico + Schiff e hematoxilina de Harris. As lâminas foram depois mergulhadas numa emulsão fotográfica Ilford K-5 diluida 1:1 com água destilada. Após a exposição (de 8 a 50 dias) as autorradiografias foram reveladas com revelador Kodak D-170 e observadas num microscópio de luz (Leitz).

Os grãos de prata contaram-se em áreas circulares de 0,007 mm^2, avaliando-se em geral 8 campos para cada situação experimental e cada animal.

As áreas relativas ocupadas por cada uma das estruturas teciduais foram calculadas através do peso das respectivas áreas após desenho em câmara clara e recorte do papel.

A radioactividade exprimiu-se em densidade de grãos de prata por mm^2 de cada estrutura.

Autorradiografias ultrastruturais

Em alguns casos fizeram-se também autorradiografias ultrastruturais: cortes ultrafinos (dourados) foram cobertos com emulsão Ilford L_4 diluída 1:4 com água destilada. Após a exposição (1 a 6 meses) as autorradiografias foram reveladas com revelador D-19b e fixadas em tiossulfato a 24%.

Após a revelação, os cortes foram corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo e observados num Siemens Elmiskop 101.

Morfologia ultrastrutural e morfometria

Independentemente do estudo das autorradiografias ultrastruturais, algum material foi cortado no ultramicrótomo (cortes de ~ 70 nm, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo) para observação puramente morfológica. Quando necessário, determinou-se a densidade volumétrica das componentes estruturais utilizando grelhas transparentes com retículos que eram sobrepostas às provas em papel das fotografias (feitas com uma ampliação constante) de acordo com o método descrito por Weibel (1972).

Análise estatística

Com os resultados obtidos por doseamento radioquímico das catecolaminas e seus metabolitos, bem como com os resultados da quantificação das autorradiografias de luz, determinaram-se os valores médios e desvios padrões da média.

O significado das diferenças das médias determinou-se por meio do teste t de Student.

Calcularam-se coeficientes de correlação (r) entre os dados obtidos por cintilometria líquida sobre a acumulação de ISO nos tecidos e o teor em grãos de prata das mesmas preparações.

As diferenças entre as médias, bem como os valores de r, foram considerados significativos quando se obtiveram para P valores $< 0,05$.

Fármacos utilizados

(-)-Adrenalina-^{3}H (11,009 Ci/mmol; lote 982-023, New England Nuclear Chemicals); clorgilina (cloridrato de clorgilina, May and Baker, Lda.); cocaína (cloridrato de cocaína, Uquipa); cortexona (Schwarz-Mann); (-) deprenil (oferta do Prof. J.Knoll, Departm. of Pharmacology, Semmelweiss University of Medicine, Budapest); 3',4'-di-hidroxi-2-metilpropiofenona (U-0521, Upjohn); (±)-isoprenalina-7-^{3}H (10 Ci/mmol; Radiochemical Centre, Amersham; 8,88 Ci/mmol, lote 1037-062 e 1,6 Ci/mmol, lote 1267-181, New England Nuclear Chemicals, Dreieich., Alemanha); (-)-noradrenalina-^{3}H (5,85 Ci/mmol, lote 971-286 e 3,2 Ci/mmol, lote 1271-115 - 74% do ^{3}H no C7; 26% do ^{3}H no C8 - New England Nuclear Chemicals, Dreieich., Alemanha); D-sorbitol-^{14}C (177 mCi/mmol) ou D-sorbitol-^{3}H (15,06 Ci/mmol ou 15,0 Ci/mmol), (New England Nuclear Chemicals, Dreieich., Alemanha).

b) RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Veia safena de Cão

a) Microscopia óptica - A veia safena de Cão é uma veia de calibre médio, constituída por uma delgada camada íntima, uma camada média relativamente espessa contendo células musculares dispostas um tanto irregularmente, separadas por tecido conjuntivo, e uma camada adventícia. A

densidade volumétrica das células musculares na média (0,54) é maior na zona mais próxima ao endotélio e vai diminuindo gradualmente até à adventícia que, por isso mesmo, e por não haver membrana elástica externa, não se demarca nitidamente da camada média. Na camada adventícia e nos espaços extramusculares da média encontra-se abundante colagéneo, algumas fibras elásticas (maiores e mais abundantes na adventícia), nervos e terminais nervosos acompanhados das células de Schwann e alguns fibroblastos.

Preparámos autorradiografias de luz e em alguns casos também ultrastruturais de tiras de veia incubadas durante 2 ou 8 minutos com isoprenalina-^{3}H (ISO) (2 micromol/l), em condições de controle bem como após pré-tratamento com U0521 (100 micromol/l), cortexona (60 micromol/l) ou cortexona + U0521.

Fizemos ainda algumas incubações à temperatura de 4°C e sem oxigenação.

Determinámos, em autorradiografias de luz com 30 dias de exposição, a densidade de grãos de prata sobre as componentes da camada média. A distribuição dos grãos de prata na adventícia não pareceu ser diferente da que registámos no tecido conjuntivo da média.

Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 1. Em condições de controle os grãos de prata marcavam, fundamentalmente, as células musculares. Na realidade, a densidade de grãos sobre aquelas células era cerca de 6,5 ve-

TABELA 1. Densidade de grãos de prata (nº de grãos x 10^3 por mm^2; média ± desvio padrão da média) sobre as componentes da camada média da veia safena de Cão, após incubação com isoprenalina-^3H (2 µmol/l) durante 8 minutos. V_v - densidade volumétrica. Valores obtidos em autorradiografias de luz com 30 dias de exposição. Valores estatisticamente diferentes dos valores de controle: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ (n=20)

	CEL.MUSCULARES (V_v = 54±12%)	TECIDO NÃO MUSCULAR (V_v = 46±10%)
Controle	37,5 ± 6,2	5,6 ± 3,7
U0521	120,0 ± 15,0**	11,2 ± 5,0*
Cortexona	15,0 ± 4,2**	9,5 ± 4,2*
U0521+Cortexona	47,5 ± 7,5	26,8 ± 6,2**
0°C	8,7 ± 2,0**	3,7 ± 3,0

zes superior à densidade no tecido não muscular.

O bloqueio da COMT pelo U0521 teve a maior repercussão também nas células musculares lisas: a densidade de grãos de prata aumentou 3 vezes em relação ao respectivo controle ($p < 0,001$), passando a ser 9,8 vezes superior ao valor do espaço extramuscular (Fig. 1).

A cortexona, por sua vez, diminuiu para 40% a densidade de grãos de prata das células musculares ($p < 0,001$), aumentando de 1,7 vezes a densidade no tecido não muscular ($p < 0,05$). Assim, a razão entre densidade de grãos no músculo/tecido não-muscular passou a ser apenas de 1,5.

Quando se adicionou U0521 à cortexona, aumentou novamente a densidade de grãos de prata nas células musculares lisas passando a ser muito semelhante ao valor do controle (intermédio entre os valores observados após o uso isolado de cortexona e de U0521). Pelo contrário, no tecido conjuntivo passou-se qualquer coisa muito diferente do que poderíamos prever: a densidade de grãos de prata, que tinha sido apenas discretamente afectada pela cortexona ou pelo U0521 quando usados isoladamente, aumentou 4,8 vezes em relação ao controle ($p < 0,001$). Além disso, os grãos dispunham-se duma forma peculiar, sugerindo a distribuição dos terminais adrenérgicos.

Os valores médios obtidos quanto à acumulação de grãos de prata não diferiam grandemente entre as preparações incubadas com ISO durante 2 e 8 minutos. No entanto, a distribuição dos grãos era bastante diferente: nas preparações incubadas com ISO durante 2 minutos, em condições de controle ou com tratamento apenas pelo U0521, a densidade de grãos era mais alta na metade interna do que na metade externa da camada média da veia (3,4 vezes no músculo e 1,7 vezes no tecido conjuntivo). Ao fim de 8 minutos de incubação a diferença entre as densidades de grãos dessas duas zonas já não era significativa (Tabela 2).

A preferência de distribuição dos grãos de prata, dependente do tempo de incubação, que acabámos de descrever, não se verificou nas preparações tratadas pela cortexona (isoladamente ou associada ao U0521).

TABELA 2. Comparação das densidades de grãos de prata (nº de grãos x 10^3 por mm^2; média ± desvio padrão da média) entre as metades interna e externa da camada média da veia safena de Cão, após incubação com isoprenalina-^3H (2 µmol/l) durante 2 e 8 minutos, em condições de controle. Diferenças estatisticamente significativas entre os valores da metade interna e externa da média: * $p < 0,01$; ** $p<0,001$ (n=20)

	CEL.MUSCULARES		TECIDO NÃO MUSCULAR	
	Met. Int.	Met. Ext.	Met. Int.	Met. Ext.
2 min	50 ± 7	15 ± 2**	7 ± 2	4 ± 1*
8 min	37 ± 4	35 ± 4	5 ± 1	6 ± 1

A incubação feita a 0°C, sem oxigenação, reduziu marcadamente a acumulação de grãos de prata nas células musculares (para 10% do controle aos 2 minutos e 21% aos 8 minutos; $p < 0,001$), verificando-se um efeito muito mais discreto no tecido não-muscular (30% do controle aos 2 minutos ; $p<0,01$; sem diferença significativa aos 8 minutos).

b) Microscopia ultrastrutural - A hipótese, sugerida pelo estudo das autorradiografias de luz, de que sob o tratamento pela cortexona + U0521 a ISO marcava os terminais adrenérgicos, levou-nos a preparar algumas autorradiografias para estudo ultrastrutural, com a finalidade de esclarecer esse aspecto. Cortámos blocos de preparações incubadas durante 8 min com ISO em condições de controle, após trata-

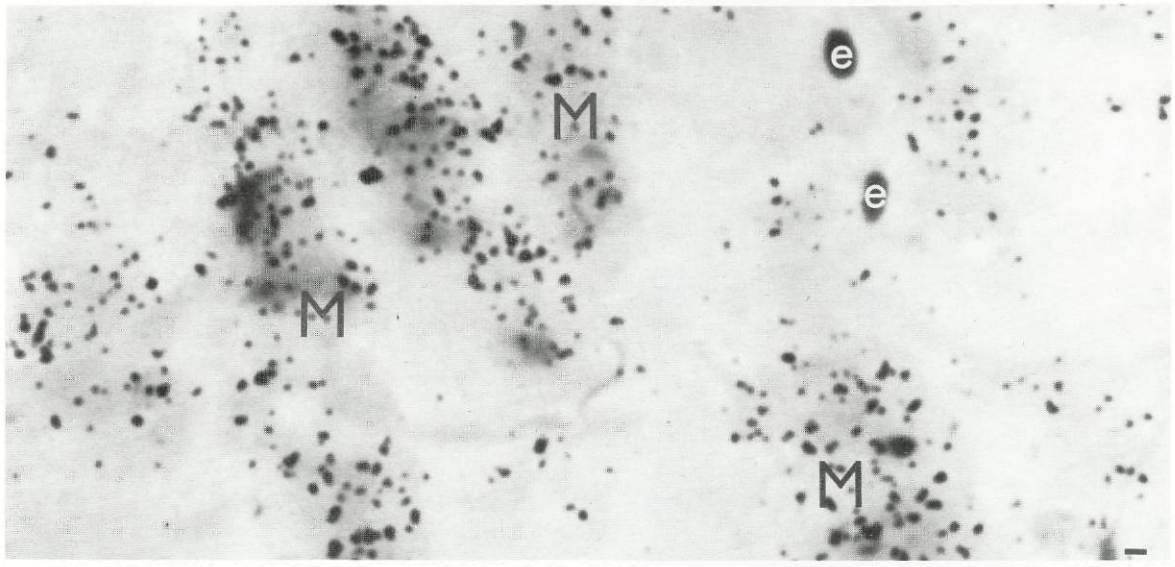
mento com cortexona + U0521 e após cocaína (12 micromol/l)+ + cortexona + U0521 .

Quando comparados com os das preparações de controle (em que a densidade de grãos de prata não era superior à densidade de grãos no músculo) (Fig. 2) os terminais adrenérgicos das preparações tratadas com cortexona + U0521 exibiam uma grande densidade de grãos de prata, superior à marcação de qualquer outra estrutura nas mesmas condições (Fig. 3). A cocaína suprimiu electivamente a marcação dos terminais adrenérgicos.

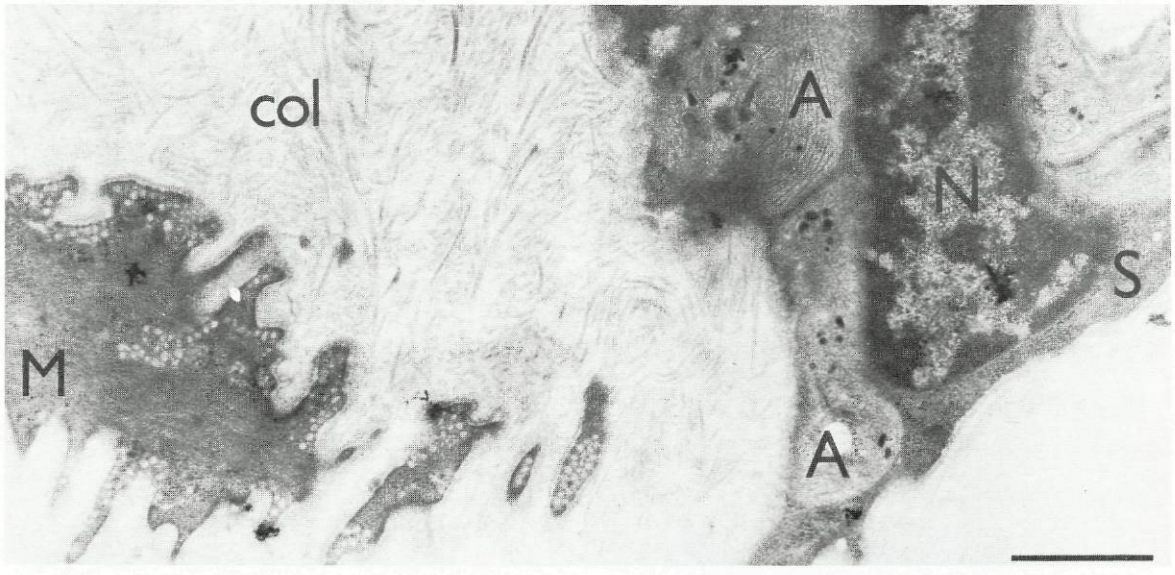
Nestas preparações pudemos ainda verificar que os fibroblastos, pouco abundantes, se interpunham frequentemente entre os nervos e as células musculares. Exibiam uma densidade de grãos de prata igual ou superior à das células musculares, o mesmo se observando em relação às células de Schwann.

Por outro lado, em todo o tipo de células observado (células musculares, fibroblastos, células de Schwann) era notória a marcação dos núcleos, que exibiam uma densidade de grãos de prata igual ou superior à do citoplasma. Curiosamente, a própria distribuição de grãos dentro do núcleo não parecia obedecer ao acaso, aparecendo os grãos sistematicamente na transição da eucromatina para a cromatina densa ou então sobre os nucléolos.

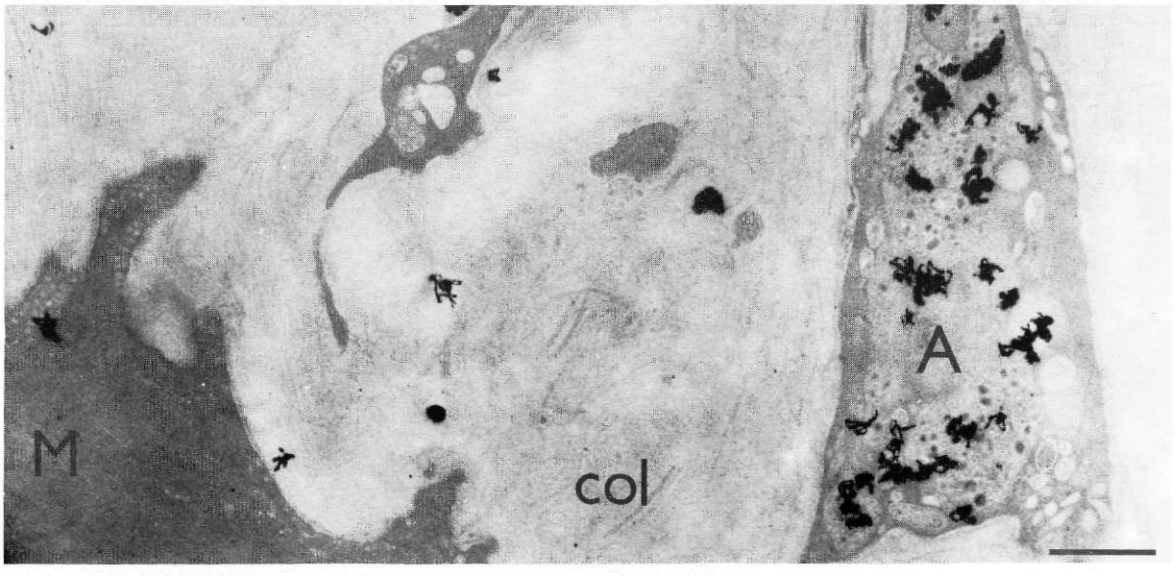
c) Doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H e O-metilisoprenalina-^{3}H - Os resultados relativos à acumulação de ISO e formação de OMI pelas tiras de veia encontram-se



1



2



3

Fig.1. Autorradiografia de luz (30 dias de exposição) duma preparação de veia safena de Cão incubada com isoprenalina-^{3}H (2 /umol/l), na presença de U0521, durante 8 minutos. Os grãos de prata marcam fundamentalmente as células musculares lisas (M). e - elastina. Barra = 1 /um

Fig.2. Autorradiografia ultrastrutural (100 dias de exposição) duma preparação de veia safena de Cão incubada com isoprenalina-^{3}H (2 /umol/l), em condições de controle, durante 8 minutos. Observam-se grãos de prata sobre as células musculares lisas (M), nervos adrenérgicos (A) e célula de Schwann (S), incluindo o núcleo (N). col - colagéneo. Barra = 1 /um

Fig.3. Autorradiografia ultrastrutural (100 dias de exposição) duma preparação de veia safena de Cão incubada com isoprenalina-^{3}H (2 /umol/l), na presença de U0521+cortexona, durante 8 minutos. Os grãos de prata acumulam-se electivamente sobre as varicosidades adrenérgicas (A). M - célula muscular lisa; col - colagéneo. Barra = 1 /um

TABELA 3. Remoção e acumulação de isoprenalina-^{3}H (ISO) e formação de O-metilisoprenalina-^{3}H (OMI) por tiras de veia safena de Cão durante 8 minutos de incubação com ISO (2 µmol/l). Média ± desvio padrão da média, em nmol/g. Valores estatisticamente diferentes dos de controle: * p< <0,05; ** p<0,02; *** p<0,01; **** p<0,001 (n=5)

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI
Controle	1,97 ± 0,02	0,28 ± 0,03	1,69 ± 0,04
U0521	1,52 ± 0,03*	1,29 ± 0,04***	0,60 ± 0,04****
Cortexona	1,26 ± 0,03***	0,19 ± 0,02	1,06 ± 0,02****
U0521+Cortexona	0,74 ± 0,04**	0,33 ± 0,04	0,39 ± 0,03****

representados na Tabela 3.

Em condições de controle, as tiras de veia removeram 1968±19 pmol/g de ISO durante 8 minutos de incubação; 86% da amina removida foram transformados em OMI. 65% da OMI formada encontrou-se no líquido de incubação.

O U0521 reduziu a remoção para 78% (p<0,05) e a metilação da ISO para 36% (p<0,001) dos valores de controle. Consequentemente, o valor de ISO acumulada aumentou (4,6 vezes; p<0,01).

A cortexona reduziu a remoção (para 64% do valor de controle; p<0,01) e a metilação (para 63% do controle; p<0,001). A acumulação foi aparentemente reduzida dum modo semelhante (para 67% do controle) não sendo, no entanto, a diferença

estatisticamente significativa.

O pré-tratamento com cortexona + U0521 reduziu ainda mais a remoção (para 38% do controle; $p<0,02$) e a metilação (para 23% do controle; $p<0,001$). A acumulação de ISO parece superior ao valor de controle mas não difere dele no ponto de vista estatístico.

Verificámos uma correlação linear positiva entre a quantidade de OMI existente no tecido e a quantidade total de OMI formada nas situações de controle, após tratamento pelo U0521 e após tratamento pela cortexona ($r=0,94$; $n=15$; $p<0,001$). Quando se usou simultaneamente a cortexona e o U0521, a totalidade da OMI formada ficou retida no tecido.

No intuito de investigar uma possível interferência da cortexona sobre o efeito de U0521, comparámos as alterações induzidas por este fármaco na ausência e na presença da cortexona. Nestas condições, encontrámos uma correlação linear entre os efeitos do U0521 sobre a remoção ($r=0,96$; $n=10$; $p<0,001$), a acumulação ($r=0,85$; $n=10$; $p<0,001$) e a O-metilação da ISO ($r=0,65$; $n=10$; $p<0,05$). Estes resultados sugerem, pois, que a cortexona não interfere com a actividade do U0521.

Calculámos a densidade de grãos de prata por unidade de volume das veias, a partir do conhecimento das densidades de grãos sobre cada tipo de estrutura e das densidades volumétricas das mesmas estruturas.

Quando comparámos a densidade de grãos de prata por unidade de volume das veias com as quantidades de ISO e OMI de

terminadas por doseamento radioquímico nas mesmas preparações, encontrámos uma correlação linear positiva entre a densidade de grãos e a ISO ($r=0,8997$; $n=6$; $p<0,01$) e nenhuma correlação entre densidade de grãos de prata e OMI. Isto indica claramente uma correspondência entre os grãos de prata observados nas preparações microscópicas e a ISO acumulada nos tecidos.

d) Discussão - A veia safena de Cão revelou, através destas experiências, possuir uma boa capacidade de remover e O-metilar a ISO. Tal facto não constituiu propriamente uma surpresa, uma vez que já era reconhecida (Gillespie e Muir, 1970, Burnstock e Costa, 1975) ao músculo liso vascular uma maior capacidade de acumular catecolaminas quando comparado com outros tipos de músculo liso, ganhando entretanto corpo a ideia dos vasos sanguíneos desempenhárem um papel relevante na remoção e inactivação das catecolaminas circulantes (Osswald e Branco, 1973, Bönisch et al, 1974, Osswald et al, 1975).

Nova e bastante interessante nos pareceu, em contrapartida, a evidência dum sistema de transporte de catecolaminas através do endotélio. A distribuição preferencial dos grãos de prata junto ao endotélio nos primeiros minutos de contacto com a amina é, na realidade, sugestiva da existência duma captação activa nesse endotélio, hipótese que é francamente apoiada pelo facto daquele fenómeno ser bloqueado pela cortexona. Este mecanismo do endotélio de certo modo reforça a ideia de conexão entre aminas circulantes

e células efectoras nas paredes vasculares. Gostaríamos de salientar que tal possibilidade tinha sido prevista por Rhodin (1967, 1968) a partir da observação de íntimas conexões estruturais entre células endoteliais e células musculares em vários tipos de vasos.

Da análise semi-quantitativa da microstrutura da veia safena e da observação das autorradiografias de luz (em situação de controle, com cortexona ou com U0521) ressalta imediatamente que a componente vascular responsável pela manipulação da ISO (tal como é apreciada "de fora" - isto é, pelo doseamento da amina acumulada e da produção de metabolito) é fundamentalmente o músculo liso. Assim, naquelas condições experimentais, os resultados radioquímicos obtidos para a veia podem ser atribuídos, com bastante segurança, ao músculo liso da veia. Tal conclusão vai ao encontro da hipótese levantada por Guimarães et al (1975) que, correlacionando a sensibilidade à ISO com a quantidade de músculo liso das veias safenas, atribuíam ao músculo liso a maior importância na remoção e inactivação daquela amina.

A presença da ISO dentro das células musculares parece dever-se a um transporte activo, uma vez que a baixa temperatura e a falta de oxigénio impediram praticamente quer a metilação quer a acumulação da amina no músculo liso.

Por outro lado, a cortexona, bloqueador clássico da captação extraneuronal das catecolaminas, reduziu apenas parcialmente a captação e metilação da ISO (quer se conside-

rem os resultados radioquímicos quer a densidade de grãos de prata no músculo liso). Tal facto leva-nos a pensar que, ou estamos perante um sistema de transporte extraneuronal com baixa sensibilidade à cortexona, ou o músculo liso da veia safena de Cão possui dois sistemas de captação diferentes. A ser verdadeira esta última hipótese, ambos os sistemas parecem dar acesso à COMT, uma vez que não há qualquer dissociação entre os efeitos da cortexona sobre a acumulação de ISO e a formação de OMI.

De qualquer modo os resultados sugerem que, haja um ou dois sistemas de transporte, a COMT está situada para aquém do sistema de transporte, por um lado, e que parte da amina que penetra na célula é rapidamente metilada e outra parte não (uma vez que reduzindo-se a captação, continua a ser metilada aproximadamente a mesma proporção da amina que entra).

Pelo contrário, bloqueando-se a metilação obtém-se um aumento na acumulação de ISO, ou seja, a COMT interfere com a acumulação de amina intacta dentro da célula. Esta conclusão coincide com a doutros autores (por ex. Graefe et al 1975).

O efeito do U0521 sobre a COMT foi parcial (tal como o da cortexona sobre a captação), restando uma metilação residual de 36% do valor de controle.

O facto do músculo liso da veia safena de Cão constituir, como dissemos, o elemento estrutural com mais peso na remoção, acumulação e metilação da ISO quando conside-

rados "de fora" (isto é, resultados radioquímicos, globais ou, por outras palavras, quando atendemos fundamentalmente à manipulação, pelo vaso, da catecolamina), ou quando considerados como repercussão sobre os receptores beta do próprio músculo liso (Guimarães et al, 1975), não nos deve levar a pensar que só o músculo capta aquela catecolamina ou que, em termos de economia celular individual, a captação para a célula muscular seja maior, tenha mais importância ou maior significado do que a captação para os outros tipos de células.

Quando descemos à escala da microscopia electrónica este facto torna-se evidente: estruturas pequenas e/ou escassas (relativamente às células musculares lisas) como os fibroblastos, as células de Schwann ou os terminais adrenérgicos, exibiam, em condições de controle, uma marcação de grãos de prata que não diferia muito da das células musculares. Por outro lado, tornou-se aparente uma marcação nuclear em todas aquelas células. E se tal facto, só por si, não nos pode levar a conclusões muito concretas, não deixa de levantar alguma inquietação; não só porque, conforme dissemos, a própria distribuição dos grãos dentro do núcleo não parecia feita ao acaso, como pelo facto de se saber que a passagem de substâncias entre o citoplasma e o núcleo não é livre mas sim selectiva (Goldstein, 1974). Finalmente, não é de esperar que haja qualquer inactivação enzimática da catecolamina dentro do núcleo (para considerar a perspectiva habitual de que a captação é igual

ou é seguida de inactivação).

Os terminais adrenérgicos apareceram densamente marcados com grãos de prata nas preparações tratadas com cortexona + U0521. Essa marcação selectiva desapareceu quando tratamos a preparação com cocaína, ficando assim demonstrada a existência de captação neuronal para a isoprenalina. Embora Burgen e Iversen (1965) tivessem verificado que altas concentrações de ISO inibiam a captação neuronal da noradrenalina, a opinião corrente na altura em que obtivemos estes resultados era a de que a ISO não tinha afinidade para o transporte neuronal (Hertting, 1964, Callingham e Burgen, 1966, Draskóczy e Trendelenburg, 1970). Entretanto surgiram provas adicionais acerca da captação neuronal da ISO (Branco e Osswald, 1980, Head et al, 1980).

Não sabemos porque é que o uso de cortexona + U0521 leva a uma marcação tão intensa dos nervos adrenérgicos. Parece-nos que estamos perante uma alteração qualitativa, uma vez que nesse aspecto os efeitos observados excedem a soma dos efeitos individuais da cortexona e do U0521. Dependerá o fenómeno primariamente de alterações nas características da membrana neuronal (permeabilidade, sistemas de transporte), que possam afectar quer a captação da ISO quer a entrada do U0521? Temos provas de que a cortexona induz alterações nas membranas dos fibroblastos e macrófagos (ver adiante, subcapítulo "Efeito da cortexona sobre a morfologia da membrana dos fibroblastos e macrófagos"). No entanto não podemos excluir as hipóteses de que a marcação

neuronal mais intensa se deva a uma maior fixação (ligação) da ISO dentro dos terminais, ou a uma maior oferta da amina à captação neuronal por bloqueio da captação e metabolização extraneuronais.

De qualquer modo parece-nos interessante salientar que, nas referidas condições experimentais (cortexona + U0521), a totalidade de OMI formada ficou retida no tecido, não havendo quantidade doseável no líquido de incubação. Este pormenor é estranho, tendo sido aliás também verificado na aorta de Coelho.

Parece, portanto, que também para a OMI, na presença de cortexona + U0521, se modificam as condições de difusão, transporte activo e/ou ligação intracelular.

Assim, aquela conclusão aparentemente tão linear de que a cortexona não interfere com a actividade do U0521 (que parece indiscutível a partir da análise dos resultados radioquímicos) parece-nos posta em dúvida pelos resultados autorradiográficos. Provavelmente a cortexona exerce efeitos de sentido oposto em estruturas diferentes ou sobre mecanismos diferentes em relação à cinética do U0521 e/ou das aminas e seus metabolitos, de tal maneira que essas alterações passam desapercebidas nos resultados globais.

2. Artéria aorta de Coelho

Este vaso foi usado intacto (como habitualmente, isto é, em segmentos isolados e abertos longitudinalmente) ou

após separação mecânica entre a média e a adventícia(segundo o método descrito por Maxwell et al, 1968, e que tem por objectivo, obviamente, a obtenção de modelos anatomicamente mais simples), processando-se experiências paralelas com essas duas componentes.

Os três tipos de preparações (aorta intacta, média e adventícia) foram incubadas com ISO (2 micromol/l) durante 8 ou 30 minutos. No fim da incubação os tecidos e os líquidos de incubação foram preparados para doseamento radioquímico da ISO e OMI, e pequenas amostras de tecido preparadas para estudo autorradiográfico, segundo o nosso protocolo geral.

a) Microscopia óptica - A artéria aorta é constituída por uma camada íntima, uma média composta por múltiplas camadas de células musculares separadas por lâminas elásticas e uma camada adventícia de certa complexidade estrutural. Na realidade, encontram-se nesta camada, além de elementos inertes como colagéneo e elastina, nervos adrenérgicos acompanhados das células de Schwann, fibroblastos, vasa vasorum e adipócitos.

A separação entre a média e a adventícia fez-se, dum modo geral, por um plano que passava pela 2ª ou 3ª lâmina elástica (a contar da adventícia). Isso significa que no tecido que classificámos de adventícia isolada havia ainda uma ou duas camadas de células musculares. Como a adventícia propriamente dita é uma camada relativamente pouco espessa, aquelas células musculares não devem ser esquecidas

na interpretação dos resultados relativos à adventícia isolada (ocupam cerca de 20% do volume das referidas adventícias).

Nas autorradiografias observámos grãos de prata em todas as componentes do vaso, mas segundo densidades diferentes (Fig. 4). Na camada média há um único tipo de células, as células musculares lisas. Em preparações incubadas durante 30 minutos em condições de controle, a densidade de grãos sobre as células musculares era de 6,0 e 6,9 vezes superior às densidades sobre a elastina e colagéneo, respectivamente (Tabela 4).

TABELA 4. Densidade de grãos de prata (nº de grãos x 10^3 por mm^2; média ± desvio padrão da média) sobre as componentes da camada média da aorta de Coelho, após incubação com isoprenalina-^3H (2 µmol/l) durante 30 minutos. V_v - densidade volumétrica. Valores obtidos em autorradiografias de luz com 50 dias de exposição

	CEL.MUSCULARES (V_v = 23±3%)	ELASTINA (V_v = 24±4%)	COLAGENEO* (V_v = 53±5%)
Controle	32,4 ± 4,9	5,5 ± 1,4	4,7 ± 0,9
U0521	51,2 ± 14,1	8,5 ± 2,7	5,1 ± 1,1
Cortexona	23,6 ± 8,4	6,9 ± 1,0	4,8 ± 0,8
U0521+Cortexona	23,6 ± 4,3	6,1 ± 1,2	5,1 ± 1,0
Cocaína	32,6 ± 9,1	6,4 ± 1,1	5,0 ± 0,9

* Designamos por colagéneo tecido não muscular, não elástico, muito rico em fibras de colagéneo

O bloqueio da COMT pelo U0521 levou a um aumento da densidade de grãos de prata fundamentalmente sobre as células musculares. A cortexona, por sua vez, reduziu a densidade de grãos de prata também nas células musculares lisas.

A marcação da elastina e colagéneo não foi afectada por qualquer dos fármacos.

A densidade de grãos de prata sobre os constituintes da adventícia foi bastante mais difícil de determinar dado que algumas componentes densamente marcadas com grãos de prata eram de dimensões reduzidas (como os terminais adrenérgicos e fibroblastos) ou não apareciam em todas as preparações (como as células adiposas). De qualquer modo era evidente que os terminais adrenérgicos tinham a maior densidade de grãos de prata, seguidos dos adipócitos, fibroblastos, vasa vasorum e células musculares lisas. A elastina e o colagéneo apresentavam as densidades mais baixas (Tabela 5). O tratamento pela cocaína suprimiu a marcação dos terminais adrenérgicos.

Quando comparámos as preparações incubadas durante 8 e 30 minutos, verificámos que a densidade de grãos de prata só aumentou significativamente, com o tempo, na elastina.

b) Microscopia ultrastrutural - Preparámos cortes ultrafinos de 5 blocos de aorta inteira e de 5 blocos de adventícia isolada, com o objectivo de avaliar, respectivamente, a fracção de volume ocupada pelas células muscu-

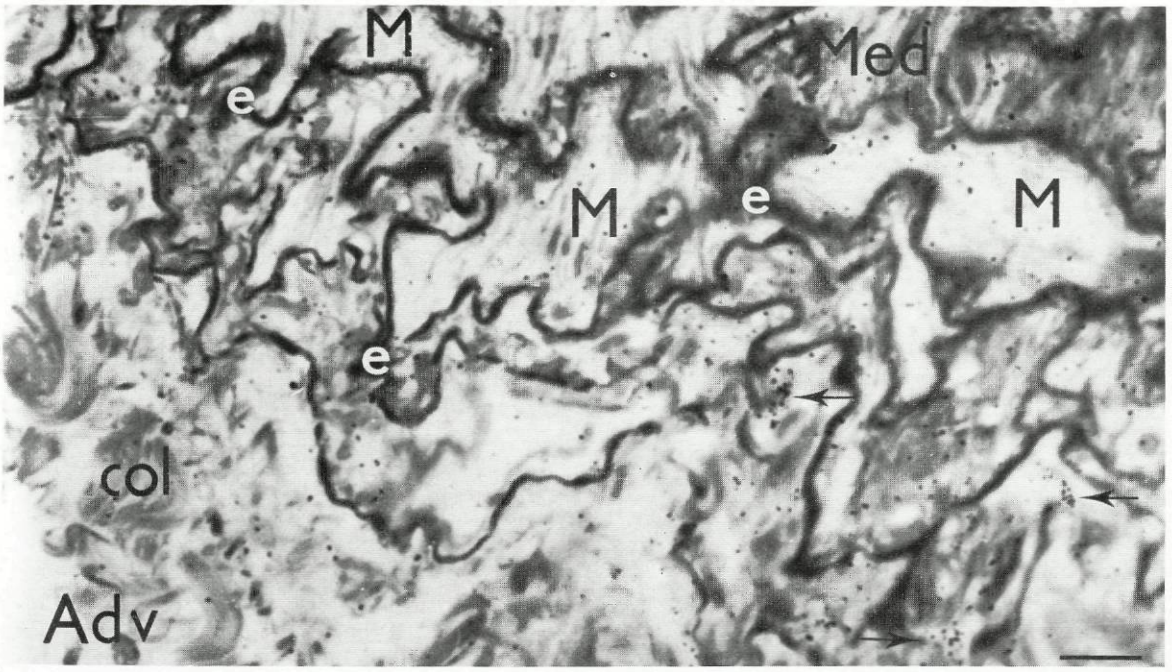
TABELA 5. Densidade de grãos de prata (nº de grãos x 10^3 por mm^2; média ± desvio padrão da média) sobre as componentes da camada adventícia da aorta de Coelho, após incubação com isoprenalina-^3H (2 µmol/l) durante 30 minutos. V_v- densidade volumétrica. Valores obtidos em autorradiografias de luz com 30 dias de exposição. 1 - Controle; 2 - U0521; 3 - U0521+Cortexona; 4 - U0521+Cortexona+Cocaína

	ELASTINA (V_v=7,2±6,4%)	COLAGENEO (V_v=28,3±21,4%)	VARIC.ADRENERGICAS (V_v=1,0±0,6%)
1.	3,7 ± 2,4	1,5 ± 1,0	110,7 ± 30,7
2.	4,8 ± 1,0	2,0 ± 0,9	229,7 ± 96,6
3.	3,0 ± 1,5	1,9 ± 0,6	93,6 ± 31,2
4.	2,5 ± 1,7	1,3 ± 0,9	não detectáveis

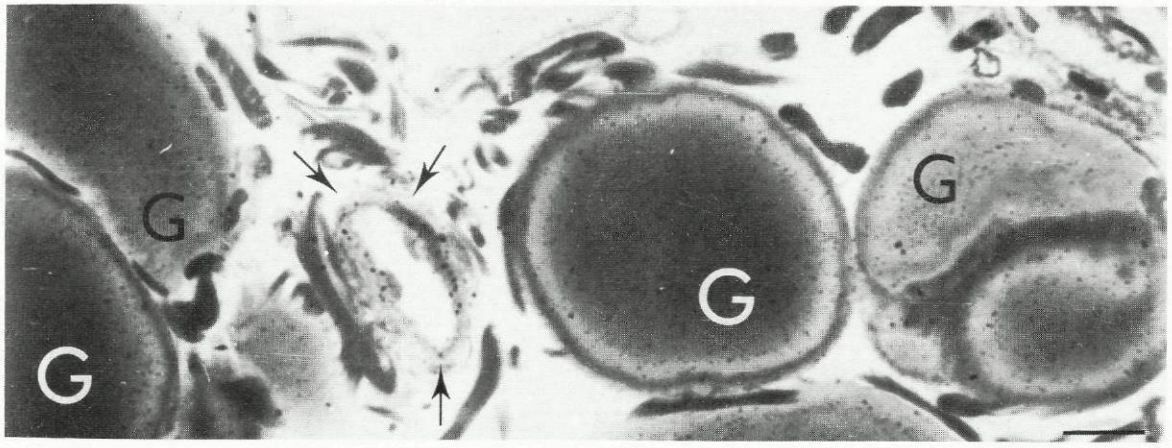
Nota: Quando presentes, os adipócitos apresentavam uma densidade de 8,0 a 35,0 x 10^3 grãos/mm^2; os fibroblastos, 3,7 a 10,0 x 10^3 grãos/mm^2. Os resultados apresentados na tabela referem-se apenas aos principais constituintes, encontrando-se a análise limitada pelo poder resolutivo do microscópio óptico, por um lado, e pela complexidade e variabilidade estrutural da adventícia, por outro.

lares nos espaços delimitados pelas lâminas elásticas - tendo estes resultados sido utilizados para calcular com mais precisão as densidades de grãos de prata sobre as células musculares, e os estragos eventualmente causados na adventícia pela separação mecânica da média.

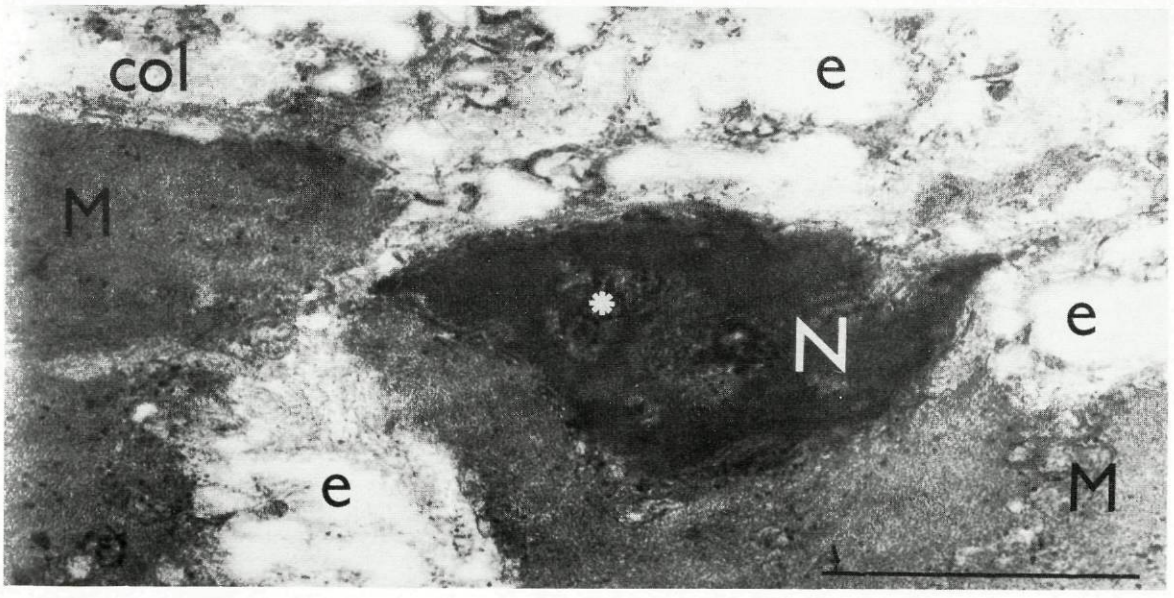
Quanto ao primeiro aspecto, verificámos que as células



4a



4b



5

Fig.4. Autorradiografias de luz (30 dias de exposição) duma preparação de artéria aorta de Coelho incubada com isoprenalina-^{3}H (2/umol/l), em condições de controle, durante 30 minutos. a. zona adventício (Adv) - medial (Med). Observam-se grãos de prata sobre as células musculares lisas (M), elastina (e), colagéneo (col) e varicosidades adrenérgicas (setas). b. zona mais periférica do vaso. Acumulação de grãos de prata sobre um pequeno vaso (setas)e nos depósitos de gordura (G). Barra = 10/um

Fig.5. Células musculares (M) na camada média duma preparação de aorta de Coelho incubada com isoprenalina-^{3}H (2/umol/l), na presença de U0521, durante 30 minutos. Numa das células vê-se o núcleo (N), com condensação quase total da cromatina, encostado à periferia da célula. * - grânulos de tipo pericromatínico; e - elastina; col - colagéneo. Barra = 1/um

musculares ocupavam apenas cerca de 30% do espaço compreendido entre duas lâminas elásticas consecutivas, encontrando-se rodeadas de elementos extracelulares, sobretudo colagéneo. As células musculares apresentavam uma forma peculiar, com contornos bastante irregulares e volumoso retículo endoplasmático rugoso.

Os núcleos das células musculares, bem como os dos fibroblastos/fibrócitos observados na adventícia, apresentavam um aspecto bastante anormal, com uma condensação quase total da cromatina à volta dum pequeno centro claro com grânulos de tipo pericromatínico (Fig. 5). Por vezes os núcleos encontravam-se encostados à membrana celular (Fig.5).

Nas adventícias isoladas observavam-se estragos em algumas células musculares (desinserção dos elementos extracelulares, rotura da membrana celular e fragmentação do citoplasma) e sobretudo nos terminais nervosos (desagregação).

c) Doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H e O-metilisoprenalina-^{3}H - Como se pode ver na Tabela 6, os três tipos de preparações acumularam e O-metilaram a ISO. No entanto, a separação entre a adventícia e a média levou a uma diminuição da capacidade metilante das duas componentes, quando comparada com a da artéria intacta.

Como era de esperar, o U0521 reduziu a metilação, levando a uma maior acumulação de ISO (Tabela 7). Estes efeitos do U0521 foram bastante menos intensos na adventícia isolada do que na artéria intacta ou na média isolada.

TABELA 6. Remoção e acumulação de isoprenalina-^{3}H (ISO) e formação de O-metilisoprenalina-^{3}H (OMI) por tiras de aorta de Coelho intacta, de adventícia isolada e de média isolada durante 8 (A) ou 30 minutos (B) de incubação com ISO (2 μmol/l). Média ± desvio padrão da média, em nmol/g. (A: n=5; B: n=10)

		REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI
A.	**Aorta intacta**	2,67 ± 0,11	1,04 ± 0,08	1,63 ± 0,12
	Adventícia	1,89 ± 0,04	1,29 ± 0,04	0,60 ± 0,02
	Média	2,20 ± 0,08	1,28 ± 0,09	0,92 ± 0,04
B.	Aorta intacta	8,68 ± 0,52	1,79 ± 0,11	6,89 ± 0,68
	Adventícia	2,83 ± 0,13	1,56 ± 0,09	1,27 ± 0,13
	Média	5,07 ± 0,18	2,31 ± 0,09	2,76 ± 0,24
B/A.	Aorta intacta	3,25	1,72	4,23
	Adventícia	1,50	1,21	2,12
	Média	2,30	1,80	3,00

A cortexona também exerceu efeitos mais marcados na média isolada e na artéria intacta do que na adventícia. Esses efeitos consistiram numa redução da acumulação e redução ainda maior da O-metilação. A adição de U0521 à cortexona aumentou de novo a acumulação na média e na artéria intacta (mas não na adventícia), reduzindo mais a metilação (mais na artéria intacta e na média do que na adventícia).

A cocaína, isoladamente, reduziu a acumulação de ISO

TABELA 7. Influência do U0521 (100 µmol/l), cortexona (60 µmol/l), cocaína (16 µmol/l) e de associações destes fármacos na remoção, acumulação e O-metilação de isoprenalina-^{3}H (ISO) por tiras de aorta de Coelho intacta, de adventícia isolada e de média isolada durante 30 minutos de incubação com ISO (2 µmol/l). 1 - U0521 (n=5); 2 - Cortexona (n=4); 3 - U0521+Cortexona (n=3); 4 - Cocaína (n=12); 5 - U0521+Cortexona+Cocaína (n=4). Média ± desvio padrão da média, em nmol/g. Valores estatisticamente diferentes dos de controle (referidos na Tabela 6): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI
1. Aorta intacta	4,55±0,10**	4,18±0,10***	0,37±0,04***
Adventícia	2,54±0,19	2,13±0,21*	0,41±0,05***
Média	4,16±0,19	3,95±0,28**	0,21±0,02***
2. Aorta intacta	4,53±0,21**	1,26±0,03*	3,27±0,40*
Adventícia	2,50±0,10	1,74±0,06	0,76±0,06*
Média	2,42±0,08**	1,75±0,05***	0,67±0,06***
3. Aorta intacta	2,47±0,04***	2,31±0,01*	0,16±0,03***
Adventícia	1,86±0,03	1,69±0,05	0,17±0,01***
Média	2,07±0,03**	1,95±0,03	0,12±0,01***
4. Aorta intacta	7,24±0,21	1,44±0,02**	5,80±0,53
Adventícia	2,37±0,10	1,54±0,09	0,83±0,09*
Média	4,60±0,11	2,08±0,08	2,52±0,17
5. Aorta intacta	2,97±0,11***	2,13±0,11	0,84±0,09***
Adventícia	2,10±0,09	1,59±0,09	0,51±0,06**
Média	2,25±0,07**	1,69±0,08**	0,56±0,01***

na aorta intacta, e reduziu ligeiramente a O-metilação pela adventícia. No entanto, e surpreendentemente, a adição de cocaína à combinação cortexona+U0521 levou a um aumento da O-metilação, ou seja, levou a uma recuperação parcial da O-metilação.

Quando se aumentou o tempo de incubação de 8 para 30 minutos, a acumulação de ISO aumentou ligeiramente na média isolada e na aorta intacta e muito menos na adventícia. A O-metilação aumentou muito mais do que a acumulação de ISO com o factor tempo e proporcionalmente mais na artéria intacta do que na média, aumentando ainda menos na adventícia.

Comparámos a densidade de grãos de prata por unidade de volume de tecido com as quantidades de ISO e ISO+OMI detectadas nas mesmas preparações por doseamento radioquímico (aorta intacta e média isolada, em condições de controle e na presença de U0521, após incubações de 8 e 30 minutos). Encontrámos uma correlação linear positiva entre quantidade de grãos e quantidade de ISO ($r=0,97$; $n=8$; $P < 0,001$) não havendo correlação significativa com ISO+OMI ($r=0,64$; $n=8$; $P > 0,05$). Estes dados indicam que podemos considerar os grãos de prata como correspondendo essencialmente a ISO intacta.

d) Discussão - Vamos considerar em primeiro lugar os resultados relativos à artéria aorta intacta, tomando como termo de comparação, fundamentalmente, os resultados obtidos com a veia safena de Cão (apresentados no capítulo an-

terior e obtidos com metodologia muito semelhante).

Assim, verificámos que a aorta de Coelho tem boa capacidade de remover a ISO, acumulando proporcionalmente mais e metilando menos do que a veia safena de Cão incubada durante o mesmo tempo (8 minutos). Tal facto parece-nos compreensível quando consideramos que a artéria tem uma maior densidade volumétrica de elementos que acumulam ISO, conforme se vê nas autorradiografias, e que são obviamente desprovidos de capacidade metilante (elastina - 24% da camada média; colagéneo - 53% da camada média; depósitos de gordura - fracção apreciável de algumas preparações).

Não sendo a ligação da ISO à elastina e colagéneo afectada pelos fármacos bloqueadores da captação neuronal e extraneuronal de catecolaminas ou da COMT (como mostram os resultados autorradiográficos) e representando aqueles elementos estruturais, repetimos, uma importante fracção volumétrica do vaso (em condições de controle fixam cerca de 35% da ISO acumulada na média da artéria) podemos concluir que as alterações induzidas pelos vários tratamentos na acumulação da ISO vêm amortecidas pela existência daquele importante compartimento inerte.

Assim, a cortexona reduziu mais a metilação (para 47% do controle) do que a acumulação (para 70% do controle) quando na veia safena tinha reduzido os dois parâmetros dum modo muito semelhante. Por outro lado o U0521, que bloqueou mais eficazmente a metilação na artéria aorta (para 5% do controle) do que na veia safena (para 36% do contro-

le), aumentou mais a acumulação nesta última (4,6 vezes) do que na primeira (2,3 vezes).

Enquanto nos foi muito difícil avaliar os efeitos dos vários tratamentos sobre a densidade de grãos de prata nas componentes da adventícia pelos motivos que já referimos, e à excepção do efeito da cocaína que aboliu a marcação dos nervos, os resultados relativos à média não deixam dúvidas quanto ao facto de a captação activa de ISO, sensível à cortexona e seguida da intervenção da COMT, se referir às células musculares lisas. Isso não significa, no entanto, que toda a ISO existente nas células musculares lisas no fim das incubações tenha sido captada por esse sistema de transporte: as células musculares ainda têm uma densidade de grãos considerável após a cortexona que, na realidade, reduz apenas de 30% a acumulação de ISO (detectada por doseamento radioquímico) quando a quantidade contida nas células musculares deve andar, aproximadamente, pelos 60% do total na situação de controle.

Os efeitos do U0521 não parecem ter sido modificados pela cortexona, se bem que, à semelhança do que acontece com a veia safena, a totalidade de OMI formada nessas condições tenha ficado retida no tecido.

A cocaína, que, isoladamente, reduziu um pouco a acumulação de ISO e a metilação (este último efeito, no entanto, sem significado estatístico), quando associada à cortexona+U0521 levou a resultados absolutamente inesperados: a acumulação não foi praticamente modificada, a meti

lação aumentou cerca de 5 vezes. Donde permanece a hipótese (já levantada a partir dos resultados da veia safena) de que o uso de cortexona + U0521 leve a alterações qualitativas dos tecidos.

A separação mecânica entre a média e a adventícia introduziu notável perturbação nos mecanismos de captação e metabolização da ISO. Na realidade, não só a remoção e metabolização da ISO pela média e adventícia isoladas foram bastante menos eficazes do que pela aorta intacta em condições de controle, como os efeitos do U0521 e da cortexona foram menos marcados após a separação das duas componentes. Não nos parece que a quantidade de células morfologicamente danificadas pelo arrancamento da adventícia justifique, só por si, tal redução no transporte e metilação da ISO. Por enquanto não podemos dar uma explicação para aquele fenómeno.

De qualquer modo, pudemos confirmar que a média remove e metila mais ISO do que a adventícia, e que os efeitos do U0521 e da cortexona também são muito mais marcados na média do que na adventícia. Assim permanece a conclusão de que a captação extraneuronal de catecolaminas, sensível à cortexona e seguida de O-metilação, se identifica, primordialmente, com as células musculares lisas. Os próprios efeitos da cortexona e do U0521 sobre as adventícias isoladas devem ter sido, em grande parte, exercidos sobre as células musculares aí existentes.

Por outro lado, uma parte importante da captação e me-

tilação na adventícia isolada mostrou-se resistente ao bloqueio pela cortexona. Uma proporção bastante menor da captação e metilação pela média isolada também resistiu ao bloqueio pela cortexona. O U0521, por sua vez, bloqueou quase totalmente a metilação pela média, enquanto que na adventícia restou ainda uma metilação residual de 32%.

A comparação dos resultados relativos a preparações incubadas durante 8 e 30 minutos mostrou que a metilação aumentou muito mais com o factor tempo do que a acumulação de ISO intacta,e que o aumento da última foi mais marcado na média isolada e na aorta intacta do que na adventícia, tendo as autorradiografias revelado a elastina como o elemento primordialmente responsável por esse aumento.

Somos levados a concluir, pelas razões expostas, que a média isolada da artéria aorta de Coelho (pelo menos isolada segundo a técnica de Maxwell et al , 1968, também frequentemente utilizada por Levin - 1974, 1977, 1981) não constitui um modelo de músculo liso vascular muito melhor que a própria aorta intacta. Quanto à adventícia isolada, que aqueles autores preconizavam como um bom modelo para estudar mecanismos neuronais de remoção e metabolização de catecolaminas, não parece ser, afinal, um bom modelo desse tipo de mecanismos. Na realidade os efeitos da cocaína sobre a adventícia isolada foram discretos, chegando a ser, por vezes, menos intensos que os exercidos sobre a aorta intacta. Pensamos que tal facto se deve, pelo menos em parte, à destruição de alguns terminais nervosos durante o

processo de separação da artéria entre a adventícia e a média. Por outro lado, a adventícia revelou-se como sede de importantes mecanismos extraneuronais, em parte sensíveis e em parte resistentes à cortexona. A base estrutural desses mecanismos extraneuronais consiste não só em algumas células musculares mas inclui fibroblastos/fibrócitos, células de Schwann, *vasa vasorum* e adipócitos.

A parte morfológica deste estudo, apesar de ter sido bastante morosa de realizar e de ter dado resultados incompletos, constituiu um importante contributo para a compreensão dos resultados radioquímicos, por um lado, e abriu, por outro, novas perspectivas para a investigação de efeitos intracelulares das catecolaminas.

3. Artérias umbilicais humanas

Consideradas um modelo de interesse particular pelo facto de serem desprovidas de inervação adrenérgica (Walker e McLean, 1971, Burnstock *et al*, 1971, Gulati e Sivaramakrishna, 1975) têm sido várias vezes estudadas quer no que diz respeito à farmacodinâmica quer à farmacocinética das catecolaminas, com resultados pouco consistentes.

Burnstock *et al* (1971) referem que as artérias umbilicais humanas captam a noradrenalina por um processo resistente à fenoxibenzamina e normetanefrina, sendo também a metilação da amina resistente aos bloqueadores da catecol-O-metiltransférase. Assim foram estes autores

levados a concluir que a captação de noradrenalina pelas artérias umbilicais humanas é diferente do clássico "uptake 2". Esta é, aliás, a opinião mais geralmente aceite (por ex. Bevan et al, 1980).

Pelo contrário, Gulati e Sivaramakrishna (1975) referem que as artérias umbilicais captam noradrenalina por um processo activo, saturável, dependente do sódio, resistente à cocaína e sensível à normetanefrina, concluindo que a captação extraneuronal neste vaso é semelhante ao clássico "uptake 2". Convém salientar que estes autores fizeram as experiências num número muito restrito de artérias (3).

Assim, a captação extraneuronal de catecolaminas por estas artérias continua a ser um problema por esclarecer.

Numa fase preliminar incubámos tiras de artérias umbilicais (obtidas de gestações de termo) com noradrenalina-^{3}H, com adrenalina-^{3}H ou com isoprenalina-^{3}H, todas na concentração de 2 micromol/l, durante 8 minutos. A isoprenalina foi usada não só em condições de controle mas também com pré-tratamento pela cortexona ou pelo U0521. Todas as modalidades experimentais foram executadas com tiras da mesma artéria, de modo a podermos comparar em melhores condições a captação e metabolização das três aminas.

No fim da incubação os tecidos e os líquidos de incubação foram processados para doseamento radioquímico das aminas e respectivos metabolitos, e pequenos fragmentos dos

tecidos foram preparados para estudo histológico e autorradiográfico.

a) Microscopia óptica - As artérias umbilicais são artérias de médio calibre e encontram-se muitíssimo contraídas, com lume punctiforme, quando se dissecam do cordão, permanecendo assim durante bastante tempo. Isolam-se facilmente da geleia que as envolve, aparecendo ao microscópio óptico como constituídas apenas por endotélio e uma camada equivalente à camada média dos outros vasos, com células musculares dispostas bastante irregularmente, duma forma mais compacta junto ao endotélio e mais separadamente na parte externa do vaso (densidade volumétrica: 43±8%). Entre as células musculares encontra-se um tecido conjuntivo pouco denso. Num dos vasos observados havia deposição de gordura no tecido conjuntivo da média. Não se encontra, nestas artérias, uma camada adventícia organizada, como nos outros vasos.

Nas autorradiografias observámos grãos de prata concentrados nas células musculares, incluindo o núcleo. A densidade de grãos era máxima nas preparações incubadas com noradrenalina, mais baixa nas preparações em que se usou a adrenalina e menor ainda nas que foram incubadas com isoprenalina.

b) Microscopia ultrastrutural - Encontrámos no mesmo corte células com perfis muito diversos, confirmando-se assim a disposição irregular das células musculares nestas

artérias. As células apresentavam grande densidade de microfilamentos embora também dispusessem de um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, núcleos com alta relação superfície/volume e nucléolos proeminentes, aspectos que sugerem grande actividade de síntese proteica.

Entre as células musculares o tecido conjuntivo tem algumas fibras, incluindo colagéneo e alguma elastina.

Não encontrámos qualquer estrutura nervosa.

c) Doseamento radioquímico das aminas e respectivos metabolitos - Os resultados relativos a estas experiências encontram-se apresentados individualmente na Tabela 8. Como se vê na tabela as duas artérias apresentam valores bastante divergentes, embora nos pareça que cada uma delas se comportou duma maneira bastante consistente em relação às três catecolaminas e até aos efeitos dos fármacos. Na realidade, a artéria (1) removeu muito mais noradrenalina do que adrenalina ou isoprenalina e metabolizou muito mais eficazmente também a noradrenalina, fundamentalmente por desaminação oxidativa. Por outro lado, a cortexona e o U0521 não exerceram qualquer efeito sobre a captação e metilação da isoprenalina. Esta era a artéria que apresentava deposição de gordura no tecido conjuntivo da média.

Ao contrário, a artéria (2) removeu e metabolizou mais adrenalina e isoprenalina do que noradrenalina, os metabolitos preponderantes da adrenalina foram em qualquer caso os O-metilados e desaminados (ao contrário dos da noradre-

TABELA 8. Remoção, acumulação e metabolização de isoprenalina-^{3}H(ISO), adrenalina-^{3}H (ADR) e noradrenalina-^{3}H (NOR) por tiras de artérias umbilicais humanas durante 8 minutos de incubação com as aminas (2/umol/l). Os resultados estão apresentados individualmente para as artérias (1) e (2) (nmol/g). A artéria (1) apresentava acumulação de gordura na camada muscular

ISOPRENALINA

		REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI
Controle	(1)	3,52	1,13	2,39
	(2)	4,82	1,60	3,22
U-0521	(1)	4,02	1,03	3,00
	(2)	3,82	1,33	2,50
Cortexona	(1)	4,02	0,82	3,20
	(2)	3,57	1,24	2,32

ADRENALINA

		REMOÇÃO	ADR no tecido	MOPEG+VMA	MN	DOPEG	DOMA	MET. TOTAIS
Controle	(1)	2,51	0,81	1,51	0,06	0,03	0,09	1,70
	(2)	5,47	1,10	3,75	0,44	0,06	0,12	4,37

NORADRENALINA

		REMOÇÃO	NOR no tecido	MOPEG+VMA	NMN	DOPEG	DOMA	MET. TOTAIS
Controle	(1)	7,31	0,64	0,53	0,03	3,71	2,41	6,68
	(2)	1,83	0,91	0,10	0,02	0,25	0,56	0,93

nalina que eram sobretudo os desaminados); e a cortexona e o U0521 exerceram algum efeito, embora não muito acentuado, sobre a remoção e metilação da isoprenalina.

Da correlação entre os dados cintilométricos e autorradiográficos ressaltava o facto da densidade de grãos de prata depender mais do tipo de catecolamina do que da quantidade de amina acumulada nos tecidos, dado que as preparações incubadas com noradrenalina tinham em qualquer dos casos uma densidade de grãos superior às das outras preparações. Daqui parece-nos podermos concluir que a densidade de grãos de prata depende não só da quantidade de amina existente num tecido mas também da forma como a catecolamina se encontra depositada no tecido, possivelmente da ligação intracelular. Não podemos, no entanto, excluir a hipótese de alguns metabolitos da noradrenalina ficarem também retidos no tecido.

Os resultados radioquímicos não nos pareceram muito claros, tanto mais que na altura nos limitámos a fazer as médias, diluindo assim as diferenças que agora nos parecem importantes. De qualquer modo pareceu-nos curioso que um modelo desprovido de estruturas neuronais pudesse remover noradrenalina mais eficazmente que isoprenalina, produzindo maior quantidade de metabolitos desaminados do que metilados.

Assim, resolvemos estudar com mais pormenor a captação e metabolização da noradrenalina pelas artérias umbilicais. Incubámos tiras de artérias obtidas de 4 cordões com

noradrenalina-^{3}H (2 micromol/l) durante 30 minutos, em condições de controle e após tratamento pela cortexona, cocaína, clorgilina ou deprenil, na tentativa de caracterizarmos melhor a captação de noradrenalina e o tipo de monoaminoxídase envolvida na sua desaminação.

Os resultados, obtidos bastante tempo depois dos da primeira série, com um lote de noradrenalina marcado diferentemente (74% do trítio no C7 e 26% no C8), não podem ser comparados com os primeiros, mas apenas entre si (Tabela 9).

Quando comparámos as médias obtidas com os resultados das 4 artérias não parecia que os vários tratamentos tivessem afectado significativamente a remoção e metabolização da noradrenalina, à excepção da cortexona que diminuía dum modo estatisticamente significativo a remoção e a metabolização, mais especificamente a formação de normetanefrina. Mas numa das artérias esse efeito da cortexona era muito mais acentuado do que nas outras três. Resolvemos então excluir os resultados dessa artéria, particularmente sensível à cortexona, nas outras situações experimentais, comparando as médias das restantes três artérias. São essas as médias apresentadas na Tabela 9, estando referidos separadamente os valores relativos à artéria mais sensível à cortexona. Como pode ver-se, a cocaína reduziu significativamente a remoção e os metabolitos totais, estes especificamente à custa dos desaminados. Curiosamente a clorgilina (bloqueador específico da monoaminoxídase tipo A) exerceu efeitos de resultados bastante sobreponíveis aos da cocaína, à excepção

TABELA 9. Remoção, acumulação e metabolização de noradrenalina-^{3}H (NOR) por tiras de artérias umbilicais humanas durante 30 minutos de incubação com NOR (2 µmol/l). 1 - controle; 2 - cortexona; 3 - cocaína; 4 - clorgilina; 5 - deprenil. Para cada situação experimental referem-se em 1º lugar os valores da média ± desvio padrão da média relativos a 3 artérias (nmol/g); na linha seguinte apresentam-se os resultados da 4ª artéria, que se distingue das outras 3 por ser mais sensível à cortexona e menos sensível à cocaína e clorgilina. Valores estatisticamente diferentes dos de controle (* - quando se comparam as médias das 4 artérias; • - quando se comparam as médias das 3 artérias): * • $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,01$

	REMOÇÃO	NOR no tecido	MOPEG+VMA	NMN	DOPEG	DOMA	MET.TOTAIS
1.	2,40±0,45	0,81±0,27	0,34±0,15	0,61±0,17	0,15±0,08	0,45±0,18	1,59±0,30
	1,94	1,13	0,15	0,58	0,01	0,06	0,81
2.	1,85±0,42*	0,94±0,18	0,25±0,07	0,24±0,28***	0,13±0,07	0,29±0,14	0,91±0,25*
	1,55	0,97	0,33	0,05	0,05	0,16	0,58
3.	1,88±0,33•	0,88±0,27	0,16±0,08	0,61±0,11	0,04±0,03	0,18±0,10•	0,99±0,11•
	1,87	0,83	0,46	0,41	0,02	0,16	1,04
4.	1,86±0,28•	1,01±0,26•	0,06±0,01	0,64±0,06	0,01±0,01	0,15±0,10•	0,85±0,17•
	2,24	1,01	0,37	0,81	0,01	0,04	1,23
5.	1,89±0,17**	1,11±0,30	0,12±0,11*	0,46±0,26*	0,03±0,03	0,16±0,11	0,78±0,15*
	1,52	1,19	0,04	0,25	0,01	0,05	0,34

do efeito sobre a acumulação de amina intacta no tecido que no caso da clorgilina aumentou significativamente, como aliás seria de esperar.

Os efeitos do deprenil (bloqueador específico da monoaminoxídase tipo B) foram menos intensos que os da clorgilina (apesar de se ter usado uma concentração 10 vezes superior de deprenil) e sobretudo parecem-nos muito menos consistentes, quer quanto à especificidade de efeitos sobre os vários metabolitos, quer quanto à especificidade de acção sobre o tipo de artérias - cocaíno-sensíveis e cortexono-sensíveis.

Na realidade estes resultados, tal como os das duas primeiras experiências, apontam para a existência de pelo menos dois sistemas de transporte para a noradrenalina nas artérias umbilicais, um deles sensível à cocaína e dando acesso preferencial à monoaminoxídase tipo A, o outro sensível à cortexona e dando acesso preferencial à catecol-O-metil-transférase. A preponderância do tipo de sistema de transporte e/ou da actividade enzimática varia de artéria para artéria, parecendo possível a classificação das artérias em dois grupos: com preponderância do sistema cortexono-sensível, com preponderância do sistema cocaíno-sensível.

A especulação sobre os motivos desta discrepância entre as artérias levou-nos a considerar em primeiro lugar o factor idade da gestação. Não havendo correspondência perfeita entre idade cronológica e idade biológica, por um lado, e havendo rápidas modificações do sistema feto-placenta duran

te as últimas semanas, pareceu-nos provável que entre gestações aparentemente de termo houvesse real variabilidade na idade biológica.

Assim, planeámos uma série adicional de experiências a realizar com artérias umbilicais de partos prematuros.

Incubámos tiras de artérias umbilicais de 5 cordões obtidos de gestações de 37 semanas com isoprenalina-^{3}H (2 micromol/l) durante 30 minutos, em condições de controle e após tratamento com cortexona ou com U0521.

Os resultados encontram-se referidos na Tabela 10. Estas artérias removeram a isoprenalina duma maneira quantitativamente semelhante à remoção da noradrenalina pelas artérias da série anterior. O U0521 reduziu a metilação a 23% do valor de controle, aumentando a acumulação de amina intacta. A cortexona reduziu a remoção (para 76% do controle) e a metilação (para 34% do controle), enquanto que a acumulação de amina no tecido não diminuiu mas, pelo contrário, até mostrou tendência para aumentar.

TABELA 10. Remoção, acumulação e O-metilação de isoprenalina-^{3}H (ISO) por tiras de artérias umbilicais humanas obtidas de gestações de 37 semanas. As tiras foram incubadas durante 30 minutos com ISO (2 µmol/l). Valores estatisticamente diferentes dos de controle:* $p < 0,05$;** $p < 0,02$ ($n=5$)

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI
Controle	2,46 ± 0,47	1,17 ± 0,33	1,25 ± 0,70
U0521	2,26 ± 0,81	1,92 ± 0,48	0,29 ± 0,33**
Cortexona	1,87 ± 0,23*	1,40 ± 0,17	0,43 ± 0,31

d) Discussão - Para um vaso de morfologia tão simples, a artéria umbilical humana está, na realidade, longe de ter um comportamento simples no que respeita à captação e metabolização das catecolaminas. Os nossos resultados, revelando a existência de dois mecanismos de transporte diferentes, sensíveis respectivamente ao bloqueio pela cortexona e pela cocaína, com importância relativa diferente de cordão para cordão, notando-se até, no caso da noradrenalina, reforço dum dos sistemas quando se bloqueia o outro, faz-nos pensar que as discrepâncias existentes na literatura não se devem apenas ao uso de metodologias diferentes mas correspondem à evidenciação preferencial (provavelmente pelas condições experimentais em causa) dum ou outro sistema.

Parece-nos extremamente interessante a analogia entre os efeitos do U0521 quando comparados com os da cortexona e os efeitos da clorgilina quando comparados com os da cocaína. Cada bloqueador enzimático e o correspondente bloqueador de transporte reduzem dum modo semelhante o mesmo tipo de metabolitos, os bloqueadores enzimáticos aumentando a acumulação de amina intacta, os bloqueadores do transporte reduzindo também a acumulação de amina intacta. Tais aspectos são, na realidade, sugestivos de que o sistema cortexono-sensível dá acesso à catecol-O-metiltransférase como o sistema cocaíno-sensível dá acesso à monoaminoxídase. É ainda curioso que possuíndo as artérias umbilicais maior quantidade de monoaminoxídase tipo B do que do tipo A (Caramona, 1981), a última pareça ter um papel fisiológico

mais activo, pelo menos relacionada com um determinado sistema de transporte para as catecolaminas. A partir destes factos surge uma questão de grande importância: é este 2º sistema de captação extraneuronal, sensível à cocaína, específico das artérias umbilicais, ou terá uma existência mais generalizada, passando habitualmente desapercebido nos outros vasos por se atribuírem os efeitos da cocaína exclusivamente ao bloqueio da captação neuronal? (ver também Bevan et al , 1980).

Gostaríamos agora de salientar, antes de discutirmos possíveis causas para a variabilidade de comportamento das artérias umbilicais na captação e metabolização das catecolaminas, que idêntica variabilidade existe na sensibilidade das artérias umbilicais humanas às catecolaminas. Somlyo et al (1965) referem que alguns vasos respondem por constrição à noradrenalina enquanto que outros não respondem nem a concentrações muito elevadas. Estes autores não conseguiram demonstrar uma vasodilatação mediada por receptores beta.

Gokhale et al (1966), por sua vez, em estudos do mesmo tipo, verificaram que uma parte das artérias responde por constrição à adrenalina e à noradrenalina, outras não dão qualquer resposta e um terceiro grupo responde por dilatação. A isoprenalina não desencadeou qualquer resposta (em 5 artérias) e as respostas inibidoras das outras catecolaminas eram bloqueadas pela fentolamina mas não pelo pronetalol, pelo que os autores concluem também que as artérias umbilicais humanas não possuem receptores beta. Estes autores

referem ainda que algumas artérias mantinham durante bastante tempo a sua sensibilidade às catecolaminas enquanto outras a perdiam muito depressa.

Mais recentemente, Soares de Moura (1978) verificou diminuições na pressão de perfusão do sistema artérias umbilicais-placenta provocadas pela isoprenalina, salbutamol, terbutalina, adrenalina + fentolamina, (após constrição pela angiotensina), sempre bloqueáveis pelo propranolol. No entanto parece-nos mais provável que estes resultados digam respeito à microcirculação placentária mais do que às artérias umbilicais, até porque nos primeiros trabalhos que referimos os autores descrevem refractoriedade das artérias umbilicais à angiotensina. De qualquer modo, parece-nos bastante importante a demonstração da existência de receptores beta no sistema artérias umbilicais-placenta, porque assim se pode pôr de lado a hipótese de que este sistema biológico especial seja constitucionalmente desprovido daquele tipo de receptores.

A inconstância das artérias umbilicais na sensibilidade às catecolaminas faz-se acompanhar, como vimos, de inconstância na maneira como aquelas artérias captam e metabolizam as mesmas catecolaminas. Procurar uma relação, um paralelismo, entre os dois tipos de comportamento teria o maior interesse. Por enquanto não podemos saber se os dois fenómenos são independentes (para nós a hipótese menos provável), se um depende do outro ou se dependem ambos de outra ou outras influências.

Para além de causas neste momento imponderáveis, três ordens de factores merecem ser apontadas. O factor idade parece ter alguma importância. Embora os nossos resultados, em relação a esse problema, devam ser considerados como preliminares, a verdade é que em artérias umbilicais com apenas menos três semanas de existência do que as artérias de termo, mais geralmente utilizadas, a remoção e metilação da isoprenalina é feita dum modo que se aproxima bastante do que está descrito para outros vasos (ver resultados da veia safena de Cão e da artéria aorta de Coelho), sendo a metilação reduzida a 23% pelo U0521 e a 34% pela cortexona. Num sistema que cumpre o seu ciclo vital em tão curto espaço de tempo (40 semanas), 3 ou 4 semanas podem permitir sensíveis modificações. Sabe-se ainda muito pouco sobre a evolução do sistema adrenérgico com a idade, mas a informação existente aponta para uma diminuição do número de receptores beta com a idade (Lakatta, 1980). Gostaríamos muito de saber se o sistema de captação extraneuronal, sensível à cortexona, também se modifica com a idade.

Também não nos parece que a idade, só por si, justifique tão grande variabilidade, havendo, como dizíamos, pelo menos mais dois factores a considerar. Um deles tem a ver com a variabilidade na concentração de hormonas, nomeadamente estrogéneos e progesterona, no sangue da feto (note-se que qualquer daquelas hormonas existe em maior concentração livre no sangue do feto do que no da mãe, mostrando as estatísticas sempre uma grande dispersão nos valores de

ambos os tipos de hormonas, quer no sangue do feto quer no da mãe - Klopper, 1980). A influência dos estrogéneos ou da relação estrogéneos/progesterona sobre mecanismos adrenérgicos só começou a ser avaliada muito recentemente e apenas no útero (de Coelho), ou seja, num dos evidentes órgãos - alvo daquelas hormonas (Miller e Marshall, 1965, Nesheim, 1974, Roberts et al , 1977 a e b, 1979, Williams e Lefkowitz, 1977, 1978). Como é habitual começou-se por estudos de sensibilidade às catecolaminas, tendo os diferentes autores chegado à conclusão de que há uma relação directa entre a concentração de estrogéneos ou a relação estrogéneos/progesterona e o número de receptores adrenérgicos alfa. Roberts et al (1977 b) verificaram ainda que o número de receptores beta não sofre alteração com a oscilação na concentração das hormonas, dependendo o efeito da sua estimulação do número de receptores alfa (quando atingem valores suficientemente baixos manifesta-se o efeito beta).

Não podemos nem queremos extrapolar destes resultados para outros aspectos da fisiologia adrenérgica, nem tão pouco para outros órgãos ou tecidos. No entanto, como salienta Klopper (1980), dificilmente se encontra um órgão ou um tecido que não seja afectado pelos estrogéneos ... De qualquer modo, esta é apenas mais uma hipótese a encarar em qualquer planeamento futuro para a continuação do estudo das artérias umbilicais.

O último factor a que nos referíamos, na especulação sobre o comportamento variável das artérias umbilicais na sua

sensibilidade às catecolaminas e nos seus sistemas de transporte/enzimas metabolizadoras, consiste nas altas concentrações de catecolaminas, nomeadamente noradrenalina, existentes no sangue do nascituro durante o trabalho de parto natural (Artal et al 1979, Lagercrantz et al 1979).

Essas concentrações de catecolaminas no sangue do recém nascido são mesmo mais altas do que as do sangue da mãe durante o trabalho de parto, mais altas nos partos complicados e em situações de anóxia fetal. Atribui-se-lhes, obviamente, um papel importante na adaptação do nascituro ao novo meio ambiente. Não se poderá admitir que essas altas concentrações de catecolaminas circulantes modifiquem os receptores adrenérgicos ou os efeitos da estimulação desses receptores nas artérias umbilicais, tal como está demonstrado num sem número de modelos experimentais in vitro e in vivo (Revisão por Hurwitz e McGuffe, 1979)? Por outro lado, e finalmente, o contacto prolongado com altas concentrações de catecolaminas não modificará outros parâmetros da função adrenérgica, para além da bem conhecida dessensibilização de receptores?

4. Coração de Rato

Como já referimos na Introdução, o coração de Rato perfundido foi estudado com bastante pormenor pelos investigadores de Würzburg no que diz respeito à captação, acumulação, O-metilação e cinética de efluxo da isoprenalina-

-^{3}H (ISO). Através desses estudos, aqueles autores chegaram às seguintes conclusões (Bönisch et al 1974):

1) O coração de Rato perfundido tem uma altíssima capacidade de remover, acumular e O-metilar a ISO.

2) Após 30 minutos de perfusão com ISO (0,95 micromol/l), na presença de U0521 (100 micromol/l), a amina acumulada no coração está distribuida por dois compartimentos: 4,836 nmol/g no chamado compartimento III (caracterizado por uma semi-vida de efluxo de 10 minutos) e 5,315 nmol/g no compartimento IV (caracterizado por uma semi-vida de efluxo de 22,6 minutos).

O compartimento III caracterizava-se ainda por a) se equilibrar mais rapidamente com o líquido de perfusão, b) ter a maior parte ou a totalidade da catecol-O-metiltransférase e c) mostrar um preenchimento preferencial quando se perfundiam os corações com ISO na concentração de 0,1 micromol/l.

3) A corticosterona (20 micromol/l) reduzia a acumulação de ISO nos compartimentos III e IV (para 0,733 e 1,196 nmol/g respectivamente). Por outro lado, o efluxo de amina (após acumulação prévia até uma situação de equilíbrio), na presença de corticosterona, definia um único compartimento, com uma semi-vida de 29,4 minutos.

Por motivos implícitos nas conclusões apresentadas e também porque a incubação de fatias de coração com ISO reduzia a acumulação de amina a 1/4 e a formação total de O-metilisoprenalina (OMI) a 1/50 dos valores obtidos com

o coração perfundido, os autores tendem a identificar o compartimento III com os vasos coronários e o compartimento IV com o miocárdio propriamente dito. Com o objectivo de verificar essa hipótese, para o que era indispensável o recurso a técnicas de morfologia, propusémos-nos realizar o presente estudo, em colaboração com Bönisch e Trendelenburg.

Os corações foram perfundidos com solução de Tyrode contendo ISO (0,95 micromol/l) de acordo com os protocolos iniciais (Bönisch et al 1974). No fim das perfusões ou no fim das experiências de efluxo, colhiam-se fragmentos de tecido cardíaco (da zona antero-superior do septo interventricular) para solução de glutaraldeído a 3% em tampão de cacodilato (pH 7,3) a 4°C. Alguns fragmentos foram fixados no glutaraldeído durante 90 minutos, pós-fixados em ósmio e incluídos em Epon como habitualmente. Destes blocos de Epon prepararam-se cortes semi-finos que, depois de corados com azul de toluidina, permitiram a identificação dos pequenos vasos. Preparavam-se então cortes finos dos pequenos vasos para estudo ultrastrutural.

Calculou-se em 50 microfotografias (correspondentes a 50 cortes de miocárdio ventricular), preparadas com uma ampliação final de 18.000X, a relação superfície de membrana/volume celular, como está descrito por Weibel (1972), para os diferentes tipos de estruturas.

Alguns fragmentos de miocárdio ventricular foram fixados no glutaraldeído durante ~ 18 horas, desidratados e

incluídos em parafina. Destes blocos prepararam-se cortes de 5 µm que foram utilizados para estudo autorradiográfico (ver Métodos).

a) Microscopia óptica - O coração apresenta-se ao microscópio como um órgão estruturalmente muito complexo. Além disso, a perfusão dos corações levou à formação dum volumoso edema como se pode avaliar pela grande densidade volumétrica do espaço extramuscular (Tabela 11).

A resolução das autorradiografias dos cortes de parafina pareceu-nos bastante satisfatória em relação ao objectivo do nosso trabalho, ou seja, comparar as densidades de grãos de prata nos vasos sanguíneos e no miocárdio propriamente dito. No entanto não permitiu a separação de estruturas mais pequenas (células dos capilares, fibroblastos, nervos, células de Schwann, mastócitos, etc.) que aparecem incluídas no que chamamos espaço extramuscular.

Os resultados da quantificação das autorradiografias estão representados na Tabela 11. Note-se que o erro na contagem dos grãos de prata deve ter sido máximo para as pequenas estruturas (contidas no espaço extramuscular), a seguir para os vasos sanguíneos, e menor para as células miocárdicas (dado o seu grande tamanho em relação às dimensões dos grãos, por um lado, e dada também a sua forma muito mais esferóide, com menor extensão de membrana - ver Tabela 12 - uma vez que, obviamente, é mais falível a contagem de grãos nas "fronteiras").

De qualquer modo, e apesar da grande dispersão dos re

TABELA 11. Densidade de grãos de prata (nº de grãos x 10^3 por mm^2; média ± desvio padrão da média) sobre as componentes estruturais do miocárdio ventricular de Rato, após perfusão com isoprenalina-^3H (ISO) (0,95/umol/l). V_v - densidade volumétrica. 1 - ISO 30min; 2 - ISO + +U0521 5 min; 3 - ISO+U0521 20 min; 4 - ISO+U0521 60 min; 5 - ISO+U0521+Cort. 30 min; 6-ISO+ + U0521 +Cort.+Cocaína 30 min; 7 - ISO+U0521 30 min - lavagem 30 min, cort.+U0521; 8 - ISO+ +U0521 30 min - lavagem 30min cort. Valores obtidos em autorradiografias de luz com 50 dias de exposição. Diferenças estatisticamente significativas: 1,2,4,5,7 e 8 vs 3; 6 vs 5 - * $p<0,05$; ** $p<0,02$; *** $p<0,01$; **** $p<0,001$. n.d. - não detectáveis

	C.MIOCARDICAS (V_v=52±14%)	n	ESPAÇO EXTRAM. (V_v=45±8%)	n	ARTERIOLAS (V_v=0,4±0,6%)	n	VÊNULAS (V_v=1,5±1,7%)	n	CEL.PURKINJE
1.	8,1 ± 2,6***	18	1,2 ± 1,2	18	27,9 ± 9,1	8	48,1 ± 22,0	10	n.d.
2.	5,9 ± 1,6***	18	0,7 ± 0,4**	17	32,2 ± 10,3	6	27,4 ± 13,6*	9	n.d.
3.	12,8 ± 2,3	14	2,2 ± 2,0	14	34,3 ± 11,0	3	40,8 ± 7,3	6	n.d.
4.	21,5 ± 7,0****	18	3,1 ± 2,0	18	91,9 ± 34,3***	8	105,4 ± 46,7***	10	75,1 ± 3,7
5.	8,2 ± 2,7****	18	0,9 ± 0,8*	18	55,4 ± 45,0	5	45,4 ± 26,3	7	52,4 ± 18,3
6.	7,5 ± 2,5	12	0,2 ± 0,3***	12	30,0 ± 9,8	2	47,2 ± 10,9	8	n.d.
7.	8,3 ± 2,4****	12	0,7 ± 0,6*	11	28,8 ± 17,1	6	29,3 ± 5,9***	7	75,4
8	9,8 ± 2,8***	12	1,0 ± 0,8	12	14,1 ± 10,6	3	25,6 ± 20,8	6	n.d.

sultados, há diferenças bem evidentes nas densidades de grãos de prata sobre os diversos constituintes do coração, por um lado, e diferenças estatisticamente significativas entre os resultados das várias situações experimentais (Tabela 11).

A perfusão dos corações com ISO (séries experimentais 1 a 6) levou a uma acumulação de grãos de prata nos pequenos vasos (arteríolas e vénulas) sempre superior (pelo menos 3 vezes) à densidade sobre as células miocárdicas.

A perfusão mais curta (5 minutos - série experimental 2), em princípio e comparativamente às outras modalidades experimentais a que melhor indica a eficácia dos sistemas de transporte, revelou os pequenos vasos coronários (em primeiro lugar as arteríolas) como as componentes que captam a ISO com maior avidez. O prolongamento do tempo de exposição à ISO (série experimental 3) diluiu parcialmente as diferenças entre as densidades de grãos nas várias estruturas.

A perfusão dos corações durante 60 minutos (série experimental 4) originou os resultados mais difíceis de interpretar e que vamos comentar apenas na Discussão. Lembremos que esta é a situação em que qualquer distribuição diferencial eventualmente existente tende a ser anulada pela oferta maciça da amina durante o longo tempo de perfusão.

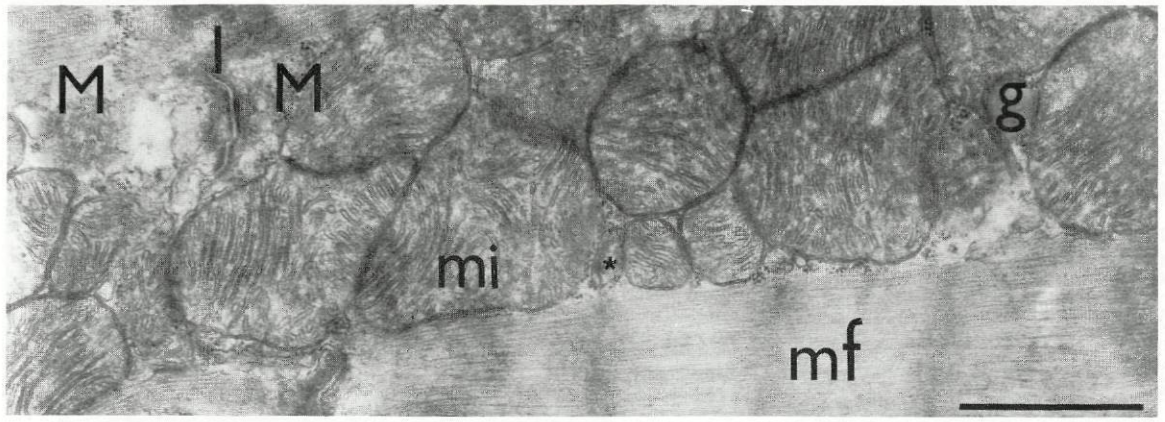
A série experimental 5 (perfusão durante 30 minutos

com ISO + U0521 + Corticosterona) mostra que a corticosterona reduziu a acumulação de ISO nas células miocárdicas e que, curiosamente, as arteríolas apresentam uma grande densidade de grãos de prata, com grande dispersão de valores, aparecendo também densamente marcadas as células de Purkinje. Estes últimos aspectos (grande densidade de grãos nas arteríolas com grande desvio padrão da média, e alta marcação das células de Purkinje) foram todos modificados pela cocaína (série experimental 6).

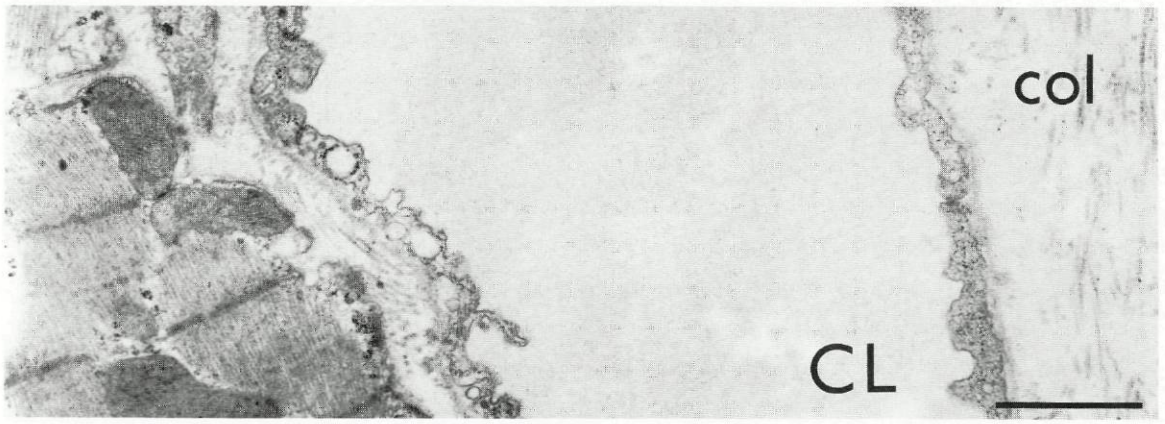
As experiências de efluxo mostram que a lavagem do miocárdio se fez tão bem ou melhor que a dos vasos (série experimental 7) ao fim de 30 minutos de perfusão com solução de Tyrode, por um lado, e que a desinibição da catecol-O-metiltransférase (série experimental 7 para 8) teve a maior repercussão nos pequenos vasos, nomeadamente nas arteríolas.

Quando se encontraram vasos sanguíneos de maiores dimensões (muitíssimo menos frequentes que as arteríolas e vénulas referidas na Tabela), eles apresentavam uma densidade de grãos de prata muito menor que a dos pequenos vasos, aproximando-se mais da do miocárdio.

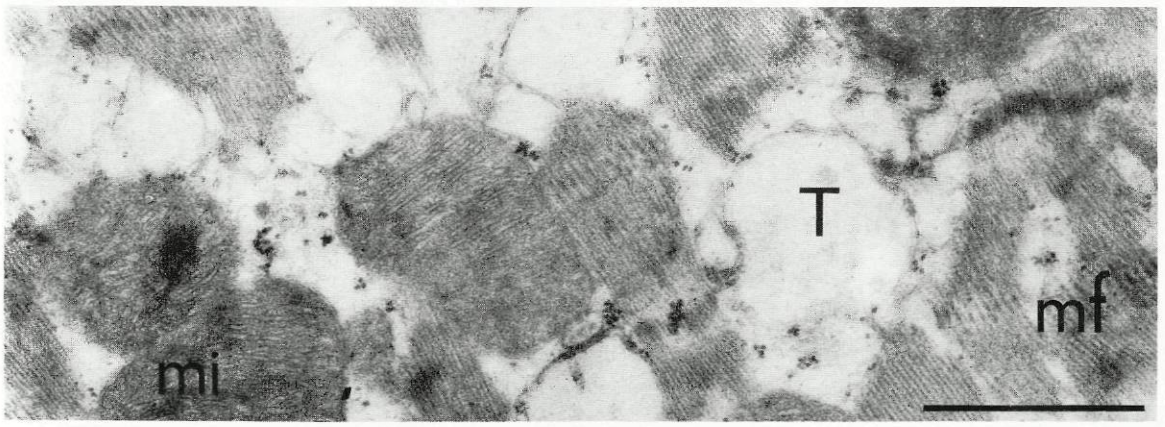
b) Microscopia ultrastrutural - Estudámos ao microscópio electrónico 10 blocos de corações de controle (isto é, perfundidos apenas com solução de Tyrode) (Fig. 6), 10 blocos de corações perfundidos com ISO (0,95 micromol/l) durante 30 minutos, e 10 blocos de corações perfundidos com ISO (0,1 micromol/l) + U0521 durante 10 minutos.



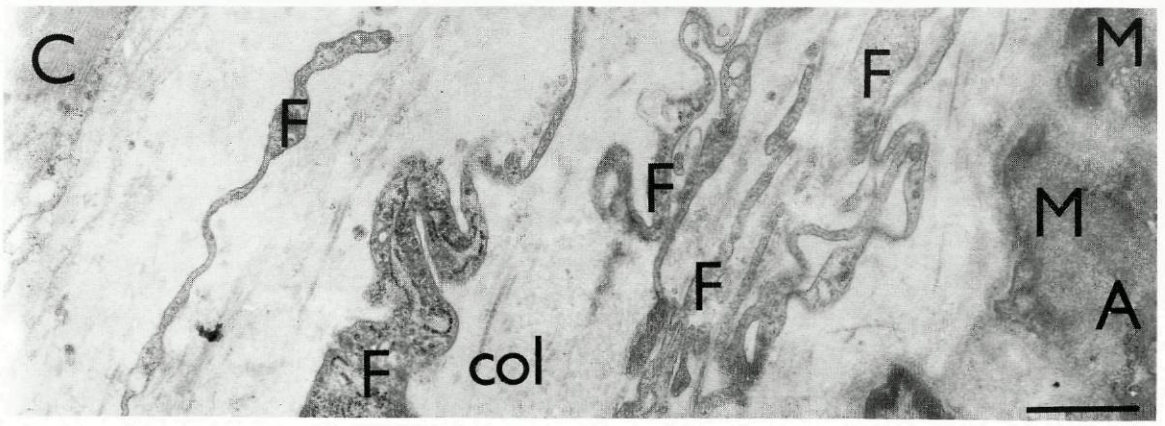
6



7



8



9

Fig.6. Fragmentos de duas células miocárdicas (M), ligadas pelo disco intercalar (I). mf - miofibrilhas; mi - mitocôndrias; * - túbulos T; g - gotícula de gordura. Coração de Rato perfundido com solução de Tyrode durante 30 minutos, em condições de controle. Barra = 1 µm

Fig.7. Capilar linfático (CL) dilatado num coração de Rato perfundido com solução de Tyrode durante 30 minutos, em condições de controle. col - colagéneo. Barra = 1 µm

Fig.8. Túbulos transversos (T) muito dilatados num coração de Rato perfundido com solução de Tyrode contendo isoprenalina (0,95 µmol/l), durante 30 minutos. mf - miofibrilhas; mi - mitocôndrias. Barra = 1 µm

Fig.9. Fibroblastos/fibrócitos (F) dispostos em camadas, paralelamente ao eixo duma arteríola não inervada (A), interpondo-se entre esta e o tecido miocárdico (C). M - células musculares lisas; col - colagéneo. Barra = 1 µm

Em primeiro lugar, pudemos confirmar algumas das observações feitas no microscópio óptico: o coração é um órgão muito complexo, com mais de 12 tipos celulares diferentes; a perfusão dos corações com solução de Tyrode provocou um volumoso edema, encontrando-se muitos capilares sanguíneos colapsados enquanto que os capilares linfáticos se apresentavam muito dilatados (Fig. 7).

Os corações perfundidos com a concentração mais alta de ISO (0,95 micromol/l) mostravam sinais dum edema ainda maior ou, pelo menos, duma maior tensão no espaço extracelular, com dilatação dos túbulos transversos (T) (Fig.8), quando comparados com os corações controle ou perfundidos com uma concentração de ISO dez vezes menor. Aqueles corações mostravam ainda esgotamento das gotículas de gordura (provavelmente como consequência da grande actividade física a que estiveram submetidos, ou devido ao efeito lipolítico directo da isoprenalina - Himms-Hagen, 1972). Ocasionalmente observámos células miocárdicas separadas ao nível dos discos intercalares.

Nestas preparações, muitos dos núcleos observados apresentavam condensação da cromatina à periferia, sendo a intensidade desse efeito muito variável com o tipo de célula. As células mais vulneráveis a esse feito da ISO eram as células das vénulas (endotélio e células musculares), os fibroblastos do espaço intersticial, e finalmente as células das arteríolas. As células miocárdicas pareciam bastante resistentes a esse tipo de efeito, embora

em algumas delas, em geral menos volumosas que a maioria, se detectassem sinais de segregação nucleolar (ou seja, separação das componentes nucleolares).

As vénulas (referidas nas Tabelas) são constituídas por um endotélio, 1 ou 2 camadas de células musculares alongadas, e uma camada (incompleta) de fibroblastos. Têm uma inervação escassa.

Encontrámos 2 tipos de arteríolas; num deles os vasos são constituídos por endotélio, 2 a 3 camadas de células musculares lisas, e 4 a 5 camadas de fibroblastos. Estes estendem-se em delgados folhetos de citoplasma orientados de maneira a formar uma barreira à volta da arteríola (Fig.9). Estas arteríolas são totalmente desprovidas de inervação.

As arteríolas do segundo tipo são constituídas por endotélio, 1 a 2 camadas de células musculares lisas, 1 camada de fibroblastos, e são densamente inervadas.

Estes dois tipos de arteríolas, que não tínhamos distinguido entre si ao microscópio óptico, estão considerados em conjunto na Tabela 11.

Na Tabela 12 referem-se os valores obtidos para a relação superfície de membrana/volume de vários tipos de células do coração de Rato, conforme a metodologia descrita na mesma tabela.

c) Doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H e O-metilisoprenalina-^{3}H - Como já dissemos atrás, vamos dispensar-nos de apresentar e discutir estes resultados, que não diferem dos já publicados e amplamente discutidos por Bönisch et al (1974). Na Tabela 13 encontram-se referi-

TABELA 12. Relação superfície de membrana/volume de vários tipos de células do coração de Rato ($/um^2/um^3$; média ± ± desvio padrão da média)

CELULAS MIOCARDICAS	0,67 ± 0,46
CELULAS ENDOTELIAIS	7,47 ± 7,68
CELULAS MUSCULARES ARTERIOLARES	2,61 ± 0,68
FIBROBLASTOS	9,87 ± 11,7
VARICOSIDADES NERVOSAS	3,73 ± 2,43

Determinou-se a relação superfície de membrana/volume, pela fórmula $S/V = \frac{4I}{P}$ (Weibel 1972). I e P correspondem, respectivamente, ao número de intersecções das linhas teste com as membranas celulares e ao número de pontos teste que caem dentro das células, quando se sobrepõe uma área teste transparente (18 x 15 cm), com 50 linhas-teste (1,8 cm de comprimento) dispostas em 10 fiadas paralelas equidistantes, sobre microfotografias obtidas ao microscópio electrónico, sob ampliação constante. Os pontos-teste são as extremidades das linhas-teste.

dos os valores de ISO intacta acumulada nas amostras de coração no fim das nossas experiências, para que se possam comparar com os resultados das autorradiografias correspondentes.

d) Discussão - Antes de mais gostaríamos de lembrar que nesta fase do nosso trabalho temos motivos para pensar que a densidade de grãos de prata nas autorradiografias corresponde a, ou indica, a quantidade de ISO intacta acumu-

TABELA 13. Densidade de grãos de prata por 100 mm^2 de tecido total, determinada nas mesmas preparações referidas na tabela 11. Na segunda coluna apresentam-se os valores obtidos por doseamento radioquímico da ISO (nmol/g) nas mesmas preparações

	Nº total de grãos/100 mm^2	ISO (nmol/g)
ISO 30 min	572,4	1,43 ± 0,31
ISO+U0521 5 min	387,6	1,56 ± 0,14
ISO+U0521 20 min	821,8	4,18 ± 0,19
ISO+U0521 60 min	1502,2	6,72 ± 0,22
ISO+U0521+cort. 30 min	521,1	1,45 ± 0,21
ISO+U0521+cort.+coc. 30 min	460,1	1,54 ± 0,23
ISO+U0521 30 min; lavagem 30 min (cort.+U0521)	543,8	2,08 ± 0,23
ISO+U0521 30 min; lavagem 30 min (cort.)	674,2	1,91 ± 0,07

lada numa determinada componente do tecido no momento da observação (isto é, no fim da experiência) (ver capítulos Veia safena de Cão e Artéria aorta de Coelho).

Nos resultados relativos à perfusão de corações de Rato com ISO, mais uma vez se confirmou essa correspondência, podendo verificar-se a existência duma correlação positiva, altamente significativa, entre o número de grãos de prata por unidade de volume de tecido e a quantidade de

ISO intacta acumulada nas mesmas amostras ($r = 0,96$; $n=8$; $p < 0,001$).

Note-se que apesar de estarmos perante um órgão muito menos homogéneo que os vasos sanguíneos referidos nos capítulos anteriores, as amostras do miocárdio ventricular, que estudámos, ou seja, da componente mais importante do coração em termos de peso, parecem ser representativos do órgão. Mesmo assim não podemos esquecer que o nosso estudo autorradiográfico deixou de fora o miocárdio auricular e os tecidos especiais nodal e de condução.

As células auriculares diferem das ventriculares em muitos aspectos: são mais pequenas, têm poucos ou nenhuns túbulos T, possuem uma grande quantidade de grânulos atriais específicos (que não existem nas células ventriculares e que se supõe constituirem um depósito de 5-hidroxitriptamina - Theron et al 1978, Hibbs e Ferrans, 1971, Simpson et al 1973), possuem uma quantidade diferente de colinestérases (James e Spence, 1966, Hegab e Ferrans, 1966) e têm uma inervação adrenérgica mais densa e menor quantidade de receptores adrenérgicos beta, pelo menos no coração do Cão (Baker e Potter, 1980).

Embora estes factos não nos conduzam à conclusão de que as células atriais captam e metabolizam as catecolaminas duma maneira diferente da das células ventriculares, devem alertar-nos para essa possibilidade.

No que diz respeito aos tecidos nodal e de condução, deparámos neste estudo com resultados novos e imprevistos: as

células de Purkinje parecem comportar-se muito mais como células nervosas do que como células musculares na captação da ISO. Exibem uma alta densidade de grãos de prata exactamente nas mesmas condições que facilitam a captação (ou acumulação) neuronal de ISO, isto é, quando o corticosteróide e o U0521 estão simultaneamente presentes (ver Capítulo Veia safena de Cão). Além disso, a cocaína parece abolir a captação de ISO pelas células de Purkinje.

Nos presentes resultados obtivemos prova adicional acerca daquele comportamento dos terminais nervosos adrenérgicos: a cocaína (nos corações tratados com corticosterona + U0521) diminuiu o número de grãos de prata no espaço extramuscular e nas arteríolas (as componentes teciduais que têm maior densidade de nervos). Curiosamente, aquele efeito da cocaína sobre as arteríolas acompanhou-se duma diminuição significativa do valor do desvio padrão da média (série experimental 5 para a 6). Este facto reforça a nossa conclusão de que parte dos grãos contados nas arteríolas, em presença de corticosterona + U0521, está na realidade dentro dos terminais nervosos. Como algumas arteríolas são densamente inervadas enquanto outras não possuem nervos, sempre que os nervos estão densamente marcados com grãos de prata temos nas arteríolas grande dispersão dos valores da densidade de grãos de prata.

Voltando ao sistema nodal e de condução, ele constitui uma proporção de tecido seguramente menor que o miocárdio auricular mas muito mais volumosa que os nervos adrenérgi-

cos no seu conjunto (Sommer e Johnson, 1968 a e b, Virágh e Challice, 1973). As células de Purkinje que observámos no nosso material são provavelmente de tipo II (maiores e mais claras que as células miocárdicas comuns) e não podemos extrapolar os resultados para os outros tipos de células especiais (nodais, Purkinje I, Purkinje III). De qualquer modo, estas células não podem ser ignoradas em estudos que visem comparar mecanismos de captação "neuronal" versus "extraneuronal" no coração.

Apesar das limitações do nosso estudo, acabadas de mencionar, pensamos que os nossos resultados morfológicos (autorradiográficos e ultrastruturais) nos aproximaram da resposta que procurávamos.

Em primeiro lugar devemos ter em conta que a perfusão dum leito vascular com soluções sem proteínas origina no tecido um edema que passa a ser drenado fundamentalmente pelos linfáticos. Os nossos resultados estão perfeitamente de acordo com aqueles dados clássicos da fisiologia (ver também Rippe et al 1979).

Para além disso, as diferenças na morfologia dos tecidos perfundidos respectivamente com a concentração mais alta ou com a concentração mais baixa de ISO sugerem que a quantidade de líquido de perfusão que passou pelo interstício miocárdico deve ter sido maior na primeira situação (maior distorsão da arquitectura geral, dilatação dos túbulos T).

Na falta de resultados fisio-farmacológicos obtidos

com o leito vascular coronário, parece lícito considerar a informação, que nos parece bastante interessante, existente sobre a pata perfundida de Rato: Lundvall e Hillman (1978) descrevem um aumento no coeficiente de filtração capilar (reflectindo o número de capilares patentes) devido a activação de receptores adrenérgicos beta dos esfíncteres pré-capilares pela noradrenalina.

Alguma outra informação existente na literatura sobre a existência de arteríolas desprovidas de inervação no omentum humano (Aalkjaer e Mulvany, 1980) e sobre a chamada "componente dilatadora adrenérgica beta" da resposta simpática vascular no músculo esquelético (Lundvall e Järhult, 1976, Lundvall et al, 1980, Rippe e Folkow, 1980) e na pele (Lundvall et al, 1980) leva-nos a admitir a hipótese de que as "arteríolas" não inervadas, por nós descritas como sendo muito eficazes na captação de ISO, e provavelmente muito ricas em receptores beta, sejam o equivalente dos esfíncteres pré-capilares descritos como controladores do número de capilares patentes nas outras áreas vasculares.

Em 1979 Bönisch et al publicaram resultados mostrando que o leito vascular coronário (do Rato) reage a uma diminuição no fluxo de perfusão, assim como a uma diminuição na temperatura do líquido de perfusão, com um aumento da resistência ao fluxo.

Assim, não podemos deixar de concluir que no coração perfundido de Rato o líquido de perfusão não só se divide

por dois circuitos paralelos (após um curto percurso único) - um através das arteríolas, capilares, espaço intersticial (a partir do qual se efectuam as trocas com as células miocárdicas, fibroblastos, nervos, etc) e linfáticos, o outro do sector arterial para o sector venoso através de passagens curtas - mas também que a quantidade de líquido que segue por cada um deles é variável, dependendo das condições experimentais (ver Young, 1968).

Chegados a este ponto parece que nos encaminhamos para a conclusão de que o compartimento III de Bönisch et al (1974) (isto é, o compartimento que se equilibra mais depressa com o líquido de perfusão, que tem uma semi-vida de efluxo mais curta, que contém a maior parte da catecol-O-metiltransférase e que é preferencialmente preenchido quando se perfunde o coração com ISO na concentração de 0,1 micromol/l) corresponde efectivamente aos vasos coronários. Contudo, os resultados autorradiográficos, juntamente com o estudo morfométrico do coração, mostram claramente que tal conclusão é impossível. Quando comparamos a quantidade de grãos de prata acumulada nas células miocárdicas - 12.800x52 = 665.600 com a quantidade existente nos vasos sanguíneos - 34.300x0,4 + 40.800x1,5 = 74.920 (série experimental 3 - perfusão com ISO, 0,95 micromol/l + U0521, durante 20 minutos) verificamos imediatamente que não há qualquer correspondência com os 5,315 vs 4,836 nmol/g contidos nos "compartimentos" com semi-vidas de efluxo de 22 e 10 minutos respectivamente.

Dada a enorme densidade volumétrica das células miocárdicas (~52%) quando comparada com a dos pequenos vasos coronários (~1%), não podemos admitir que, em condições de equilíbrio, aproximadamente metade da ISO acumulada no coração esteja nos vasos sanguíneos. Ao contrário, o que os mesmos resultados permitem concluir é que o miocárdio propriamente dito representa claramente o compartimento de acumulação mais importante.

Parece-nos evidente que as células miocárdicas captam a ISO através dum transporte activo - a corticosterona reduz a acumulação de ISO em ambos os compartimentos III e IV, e reduz a acumulação de grãos de prata no miocárdio.

Como dissemos há pouco, uma grande quantidade de ISO deve ser acumulada no miocárdio durante os 30 minutos de perfusão (0,95 micromol/l). Como o número de sistemas de transporte não é, com toda a probabilidade, proporcional à capacidade acumuladora destas células (ver abaixo), durante a fase de efluxo uma parte da radioactividade acumulada no miocárdio tem oportunidade de sair por difusão (a ISO é capaz de difundir, o alto gradiente de concentrações entre as células e o espaço extracelular é favorável). Note-se que a hipótese da ISO sair do compartimento IV por difusão já foi levantada por Bönisch em 1978.

Os vasos coronários têm uma das mais altas capacidades para remover e O-metilar a ISO (Bönisch et al, 1974). Ora, mesmo se assumirmos que a densidade de sistemas de transporte nas membranas de diferentes tipos celulares é

a mesma (o que pode perfeitamente não acontecer), a baixa relação superfície de membrana/volume celular das células miocárdicas quando comparada com a dos outros elementos do coração (Tabela 13) justificaria a desproporção entre a capacidade de captação e a capacidade de acumulação do miocárdio já referida. Também se explicaria assim a necessidade dum maior tempo para o miocárdio entrar em equilíbrio com o líquido de perfusão.

A este argumento poderia contrapôr-se o facto do sistema de túbulos transversos do coração, em comunicação com o espaço extracelular (Girardier e Pollet, 1964, Sommer e Johnson, 1968 a e b), aumentar a extensão de membrana das células cardíacas. No entanto, estudos morfométricos (Pager, 1971) ou cálculos baseados em dados teóricos (Sommer e Johnson, 1968 a) mostraram que a membrana dos túbulos T aumenta a área total da membrana segundo um factor de 1,25 e 2,5, respectivamente. Após uma correcção dessas ainda se manteria uma diferença significativa nos nossos cálculos, para não falar na possibilidade da membrana dos túbulos T ser diferente do sarcolema periférico. Na realidade sabe-se que diferem nas características de permeabilidade a iões (Sommer e Johnson, 1968 a).

A tentativa de localizar a catecol-O-metiltransférase através da análise das autorradiografias não foi muito concludente quando procurámos a localização do aumento na acumulação da ISO pelo bloqueio da enzima. Mas não podemos partir do princípio de que o aumento na acumulação de

ISO seja proporcional ao conteúdo em catecol-O-metiltransférase da respectiva componente tecidual, uma vez que a acumulação também depende da capacidade de acumulação da estrutura em causa e do factor tempo. Na realidade, quando se atinge uma determinada concentração de ISO dentro das células, a difusão (para fora) impede um aumento adicional da concentração intracelular.

O comentário de Bönisch (1978), sobre o facto da catecol-O-metiltransférase acelerar a perda de radioactividade dos tecidos durante as experiências de efluxo, fez-nos valorizar melhor as autorradiografias relativas a esse tipo de experiências (7 e 8). Aí verificámos que quando se suprimiu o U0521 durante o efluxo de ISO (série experimental 8 vs 7) a densidade de grãos diminuiu sobretudo nas arteríolas e depois nas vénulas, não se notando efeito sobre o miocárdio (onde a quantidade relativamente pequena de enzima deve ter tido o seu efeito obscurecido por uma perda de ISO por difusão de certa importância - ver acima). Daqui concluimos que os elementos mais ricos em catecol-O-metiltransférase parecem ser efectivamente os pequenos vasos coronários.

Nos resultados autorradiográficos torna-se ainda aparente o efeito dum outro factor interveniente na manipulação da ISO, a ligação ou fixação intracelular. Os pequenos vasos sanguíneos estão sempre mais marcados com grãos de prata do que qualquer outra estrutura, mesmo em condições de equilíbrio e, sobretudo, mesmo após 30 minutos de

lavagem (quando se esperava que o compartimento III, hipoteticamente os vasos sanguíneos, com uma semi-vida de efluxo de 10 minutos, tivesse menos radioactividade que qualquer outra estrutura), o que faz pensar numa maior riqueza em sítios de ligação para a ISO nesses vasos. É de esperar, de facto, como já apontámos, que eles tenham grande densidade de receptores beta e catecol-O-metiltransférase, dois tipos de sítios de ligação previsíveis.

A perfusão dos corações com ISO (0,95 micromol/l) + + U0521 durante 60 minutos deu origem a resultados de difícel interpretação. Na realidade a mundança do factor tempo (série experimental 3 para 4) introduziu alterações qualitativas nos resultados, incluindo uma marcação acentuada das células de Purkinje e provavelmente também dos terminais adrenérgicos.

Há um pormenor de observação que pode, porventura, ter alguma relação com o fenómeno que acabámos de referir. Aparecem, por vezes, nos corações perfundidos com ISO durante 30 minutos, células miocárdicas separadas ao nível dos discos intercalares. Tal fenómeno só costuma ocorrer quando se retira o cálcio dos tecidos (com EDTA), sendo impossível separar por processos mecânicos aquelas junções especializadas (Muir, 1965, 1967). Os corações de Rato foram perfundidos com baixa concentração de cálcio para se evitar a indução de fibrilação cardíaca pela ISO (Bönisch e Trendelenburg, 1974). Talvez, naquelas condições, se tenha processado uma depleção gradual do cálcio, vindo esta

a ser tanto mais acentuada quanto mais prolongada a perfusão. Por sua vez, uma alteração no conteúdo de cálcio e/ou alterações concomitantes ou subsequentes doutros iões poderiam interferir com o movimento da ISO através das membranas ou com a sua ligação intracelular.

Finalmente, uma última questão a discutir: Por que é que a perfusão dos corações com ISO numa concentração mais baixa (0,1 micromol/l) leva a um preenchimento preferencial do compartimento III ?

Rippe e Folkow (1980) verificaram na pata perfundida de Rato que um aumento da resistência ao fluxo de perfusão diminuía a capacidade de difusão para o Cr-EDTA. Verificaram ainda que a "capacidade de difusão" era mais afectada por uma redução do fluxo e heterogeneidade dos capilares perfundidos do que o "coeficiente de filtração capilar".

Bönisch et al (1979) também verificaram nos corações de Rato que a difusão da ISO e da OMI eram significativamente afectadas por uma redução do fluxo de perfusão enquanto que a captação activa da ISO o era em muito menor grau. Note-se que a extensão desta conclusão à OMI é da nossa responsabilidade. O que aqueles autores verificaram foi que o efluxo de OMI não era aparentemente afectado nem por uma redução do fluxo de perfusão nem pela corticosterona. Apenas quando perfundiam os corações com líquido nutritivo a baixa temperatura (que aqueles autores verificaram reduzir o fluxo de perfusão e que se sabe interferir com a actividade dos sistemas de transporte) é que obti-

nham uma redução apreciável no efluxo da OMI.

O que nós pensamos é que se os processos de difusão dependem do fluxo de perfusão e do tipo de perfusão capilar enquanto que o funcionamento dos sistemas de transporte activo depende muito menos daqueles factores, a OMI, sendo difusível e podendo utilizar o sistema de transporte activo, só tem o seu efluxo apreciavelmente diminuído quando se interfere simultâneamente com ambos os processos (condições para difundir e sistema de transporte). Noutras circunstâncias, o bloqueio dum só dos processos de saída aparece compensado pela utilização do segundo processo.

Mas voltando ao nosso tema: a perfusão dos corações com ISO (0,1 micromol/l) levou provavelmente a uma perfusão menos eficaz do interstício do miocárdio (quando comparada com a utilização duma concentração 10 vezes superior de amina) devido a menor dilatação dos esfíncteres pré-capilares. Nestas condições, a saída de ISO por difusão, processo provavelmente mais importante para o miocárdio propriamente dito do que para os vasos (ver atrás), está dificultada. A captação e efluxo da ISO através do transporte activo está menos afectada.

Portanto, o "compartimento III" corresponde provavelmente em parte aos vasos coronários, em parte ao miocárdio. Definido como capacidade de captar ISO, existe com muito maior densidade nos vasos. Definido como um espaço cheio de ISO, depois de se perfundir o coração com 0,95

micromol/l de amina durante meia hora, grande parte desse espaço é representado pelo miocárdio. Definido pela semi-vida de efluxo, tem mais a ver com o processo como a ISO sai do tecido do que com o lugar donde sai.

O compartimento IV é fundamentalmente da responsabilidade do miocárdio (captação activa, grande capacidade de acumulação). Definido pela semi-vida de efluxo, corresponde fundamentalmente a uma parte da ISO acumulada no miocárdio (embora provavelmente também a uma pequena parte vinda das outras estruturas).

Pensando melhor, as conclusões deste trabalho poderiam ter sido previstas à partida: não existem compartimentos estanques nos tecidos vivos.

Para mediadores libertados em condições fisiológicas, e até um determinado limite, achamos provável que barreiras biológicas mantenham gradientes de concentração entre biofases diferentes. É exactamente uma barreira desse tipo que nos sugere a imagem das múltiplas camadas de fibroblastos à volta das arteríolas não-inervadas: sendo os fibroblastos muito eficazes na captação e metilação da ISO (ver o capítulo seguinte), provavelmente defendem as arteríolas da actividade dos nervos adrenérgicos da vizinhança, ou seja, reforçam o carácter "não inervado" deste tipo especial de vasos.

Mas apesar desta e talvez dalgumas outras limitações relativas, quando se perfunde prolongadamente um órgão com uma dada concentração de ISO, ela provavelmente vai passan

do de célula para célula, para o espaço extracelular e daí para outra célula, como sabemos que acontece com velocidade apreciável através do endotélio dos vasos sanguíneos. A "fronteira" entre os vasos sanguíneos e o miocárdio (definida pela existência de diferentes concentrações de amina em cada um dos sectores) deve ser flutuante, dependendo do tempo de perfusão, do tipo de perfusão (incluindo as variantes ao nível da microcirculação), do tempo de lavagem, etc.

5. Canal torácico de Cão

O canal torácico de Cão é um vaso relativamente curto. Quando cheio de linfa aparenta um calibre razoável (equivalente ao duma veia safena do mesmo animal) mas quando vazio disseca-se com dificuldade do tecido conjuntivo que o envolve pelo facto de ter uma parede extremamente delgada. Assim, a quantidade de tecido conjuntivo que vem aderente ao vaso é forçosamente variável. O escasso peso do canal torácico obriga geralmente à utilização do vaso inteiro em cada experiência, não permitindo a obtenção de valores emparelhados.

Incubámos os canais, abertos longitudinalmente, com isoprenalina-^{3}H (ISO) (2 micromol/l) durante 8 minutos, em situação de controle e com tratamento pela cortexona ou pelo U0521. No fim da incubação colheram-se pequenos fragmentos do canal para estudo morfológico (fixação em glutaraldeído-ósmio e inclusão em Epon), tendo o restante tecido

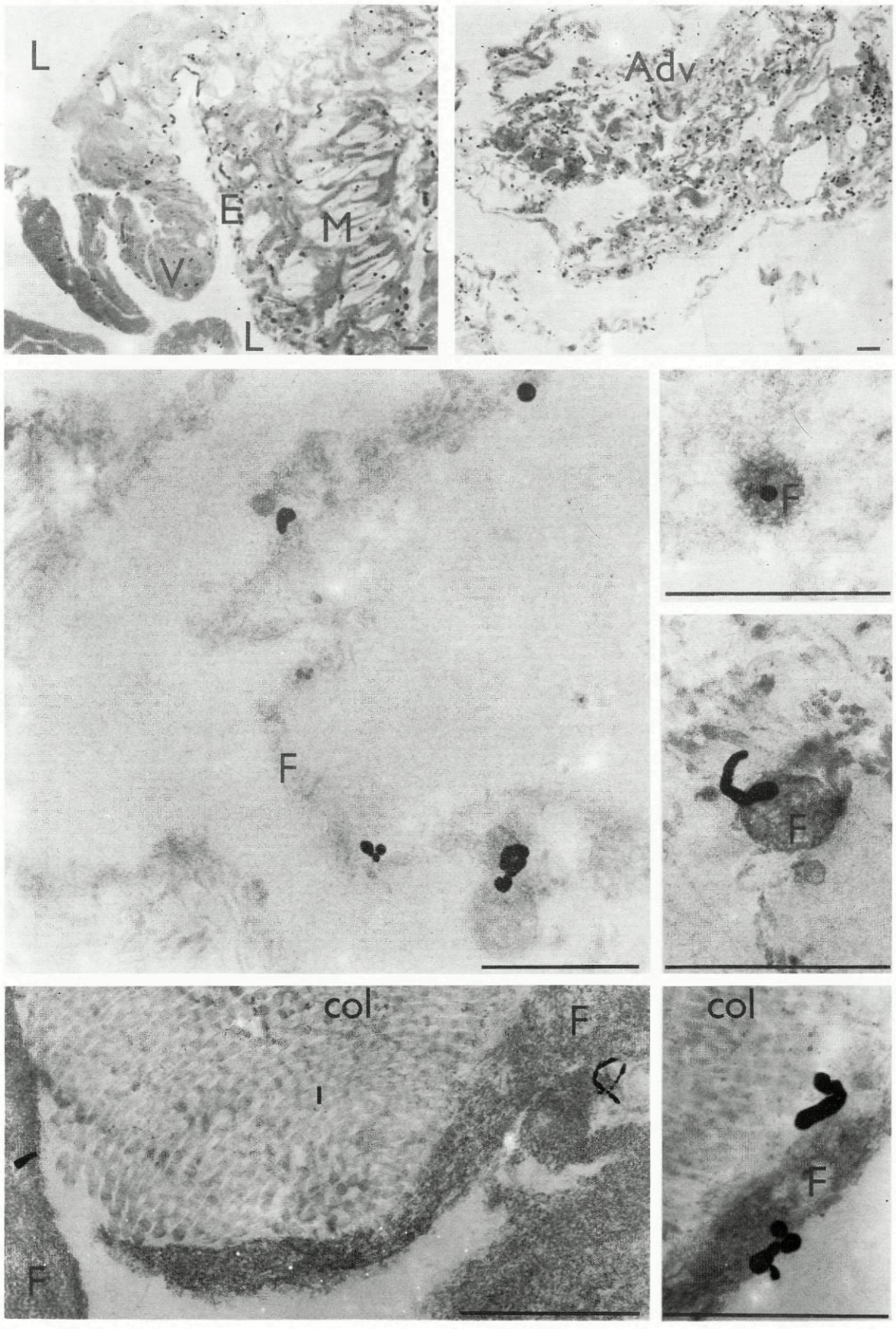
assim como os líquidos de incubação sido preparados para doseamento radioquímico da ISO e do seu metabolito, a O--metilisoprenalina-^{3}H (OMI).

a) Microscopia óptica - O canal torácico de Cão é um vaso de parede muito delgada em relação às dimensões do lume, parede essa constituída por um endotélio espesso, uma, duas ou três camadas de células musculares lisas (conforme se caminha do terço caudal para o terço craneal) e uma camada adventícia cerca de duas vezes mais espessa que a camada muscular. A adventícia é constituída por tecido conjuntivo denso.

Encontram-se com frequência válvulas, constituídas por tecido conjuntivo revestido de endotélio. Não há nenhuma disposição muscular especial na base das válvulas que entretanto são absolutamente competentes.

Nas autorradiografias preparadas de canais incubados em condições de controle, observámos uma intensa marcação com grãos de prata no tecido conjuntivo da adventícia, com agrupamentos de grãos que ultrapassavam mesmo, em densidade, a marcação das células musculares (Fig. 10). Para esclarecer exactamente o tipo de estrutura responsável pelos grãos de prata da adventícia preparámos autorradiografias para observação ultrastrutural.

b) Microscopia ultrastrutural - Encontrámos um endotélio bastante espesso, chegando a observar-se duas e três células endoteliais sobrepostas, intimamente ligadas entre



10

11a

11b

Fig.10. Autorradiografias de luz (15 dias de exposição) duma preparação de canal torácico de Cão incubado com isoprenalina-^{3}H (2/umol/l), em condições de controle, durante 8 minutos. Os grãos de prata aparecem com maior densidade sobre o tecido conjuntivo da adventícia (Adv). E - endotélio; V - válvula; L - lume do vaso; M - células musculares lisas. Barras = 10/um

Fig.11. Autorradiografias ultrastruturais (70 dias de exposição) de tecido conjuntivo laxo (a) e denso (b), na adventícia duma preparação de canal torácico de Cão incubado com isoprenalina-^{3}H (2/umol/l), em condições de controle, durante 8 minutos. Os grãos de prata aparecem fundamentalmente sobre os fibroblastos/fibrócitos (F). col - colagéneo. Barras = 1/um

si e às células vizinhas.

Na adventícia encontram-se densos e volumosos feixes de colagéneo com abundantes fibroblastos/fibrócitos e alguns macrófagos. Há uma escassa inervação adrenérgica, encontrando-se terminais na proximidade dos vasa vasorum e também, por vezes encostados ao endotélio.

Nas autorradiografias pudemos verificar que a acumulação de grãos de prata se fazia sobre os fibroblastos/fibrócitos (Fig. 11), havendo também grãos sobre os macrófagos e alguns (muito poucos) sobre o colagéneo.

c) Doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H e O-metilisoprenalina-^{3}H - Os resultados obtidos por doseamento radioquímico da ISO e OMI encontram-se na Tabela 14. Na situação de controle o canal removeu cerca de 9000 picomol

TABELA 14. Remoção e acumulação de isoprenalina-^{3}H (ISO) e formação de O-metilisoprenalina (OMI) pelo canal torácico de Cão durante 8 minutos de incubação com ISO (2 µmol/l) Média ± desvio padrão da média, em nmol/g

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI	n
Controle	8,82 ± 9,36	1,18 ± 1,12	5,65 ± 5,37	7
U0521	5,14 ± 2,65	1,11 ± 0,27	4,02 ± 2,66	5
Cortexona	6,65 ± 3,61	1,09 ± 0,87	5,38 ± 3,09	4

de ISO em 8 minutos, correspondento 74% desse valor à formação de metabolito. A cortexona e o U0521 pareceram reduzir a metilação, não tendo, no entanto, essa diminuição significado estatístico. O efeito do U0521 foi aparentemente mais acentuado que o da cortexona.

Deve salientar-se o facto de ter havido uma grande variabilidade nos valores individuais.

d) Discussão - Optámos, em determinada fase do nosso trabalho, por estudar o canal torácico de Cão, na procura duma estrutura vascular com uma fisiologia diferente da dos vasos sanguíneos que estudáramos até então. Na realidade, a contractilidade dos colectores linfáticos depende essencialmente de estímulos miogénicos (Hargens e Zweifach, 1977, Johnson, 1980), o que, associadamente à anatomia especial destes vasos, com grande riqueza de válvulas perfeitamente competentes, assegura a drenagem da linfa. Os factores de regulação extrínsecos, incluindo o sistema nervoso adrenérgico, devem ter um papel muito discreto.

O canal torácico de Cão revelou uma enorme capacidade de captar ou pelo menor metilar a ISO. Não se tendo obtido, em nenhuma circunstância, uma relação de concentrações tecido/meio superior à unidade, por um lado, e não se tendo bloqueado significativamente a remoção da ISO pela cortexona, por outro, não podemos efectivamente saber se a enorme remoção de ISO pelo canal torácico se deve a um sistema de transporte activo. No entanto parecer-nos-ia estranho que, por um processo de difusão simples, o canal torácico remo

vesse muito mais eficazmente a ISO do que a veia safena de Cão ou a aorta de Coelho, onde sabemos que a remoção se deve, pelo menos em grande parte, a transporte activo.

Os resultados morfológicos e autorradiográficos, revelando os fibroblastos/fibrócitos como o tipo celular de mais peso na acumulação de ISO pelo canal torácico, tornaram a situação um pouco mais clara. Já na veia safena de Cão e na aorta de Coelho, sobretudo na adventícia isolada deste último vaso, encontráramos uma componente de captação e metilação de ISO resistente à cortexona. Também nestas estruturas uma parte da metilação não era bloqueável pelo U0521, substância que, no presente estudo, teve um efeito muito discreto sobre o funcionamento da catecol-O-metiltransférase. Por outro lado, em todos os tecidos que estudámos até à data, registámos a observação ocasional de fibroblastos/fibrócitos densamente marcados com grãos de prata, correspondentes a catecolaminas. Assim, parece que através do presente estudo encontrámos o-ou um dos - substractos morfológicos da captação de catecolaminas resistente à cortexona e que é seguida duma catecol-O-metiltransférase que não é sensível ou a que não tem acesso o U0521.

É possível que os modestos efeitos da cortexona e do U0521 sejam devidos a intervenção sobre as células musculares, que também aparecem marcadas pelos grãos de prata. A pequena densidade volumétrica destas células no canal torácico, e a variação na quantidade de tecido conjuntivo que vem aderente ao vaso, fazem provavelmente com que aqueles

efeitos sejam não só discretos mas também variáveis, não se conseguindo obter diferenças estatisticamente significativas entre os resultados correspondentes às várias situações experimentais.

6. Pele de Rato / Tecido de cicatrização

A surpresa que para nós constituiram os resultados obtidos com o canal torácico no que respeita à captação e metilação da isoprenalina (ISO) pelos fibroblastos/fibrócitos, e o ganho que tal facto poderia representar no caminho da compreensão do significado fisiológico da captação extraneuronal das catecolaminas, criaram-nos, antes de mais, a necessidade de confirmar o referido comportamento dos fibroblastos/fibrócitos num modelo diferente.

Uma meditação sobre as funções conhecidas dos fibroblastos (classicamente a produção do material extracelular do tecido conjuntivo, nomeadamente as fibras de colagéneo) e sobre o possível papel dos mediadores adrenérgicos no controle da actividade daquelas células (que pensamos ser talvez mais fácil de descobrir em situações de alteração patológica ou farmacológica das funções dos fibroblastos -- por exemplo situações de cicatrização excessiva ou de fibrose devida a situações patológicas ou a intervenções medicamentosas) levaram-nos a escolher exactamente um modelo de cicatriz (provocada por incisão linear na pele do dorso do Rato), como tecido rico em fibroblastos, para repetirmos as experiências feitas com o canal torácico.

Anestesiámos ratos adultos com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.). Depois de cortarmos o pêlo em duas áreas simétricas do dorso fizemos, com uma lâmina de bisturi, uma incisão linear paralela à linha média, com 2 cm de comprimento, até ao plano de clivagem natural do tecido celular subcutâneo. Deixamos cicatrizar a incisão espontaneamente, sem suturar.

Numa primeira fase, destinada à escolha do tempo de cicatrização mais conveniente, sacrificámos os animais, por decapitação, 24 horas ou 5 dias após a intervenção. Cortámos pequenos retalhos de pele, um do lado controle e outro contendo a cicatriz (isto é, forçando uma deiscência da cicatriz que passou a constituir uma das faces do retalho de pele). Incubámos então cada um dos fragmentos em frascos com solução de Krebs-Henseleit contendo ISO numa concentração de 2 micromol/l, durante 30 minutos. No fim da incubação preparámos os tecidos e os líquidos de incubação para doseamento radioquímico da ISO e O-metilisoprenalina-^{3}H (OMI).

Entretanto fixámos pequenas amostras de cicatriz e pele normal em solução de Bouin que, depois de desidratadas, incluídas em parafina, cortadas e coradas pela hemateína-eosina, nos permitiram estudar a composição histológica dos tecidos.

a) Microscopia óptica - Os retalhos de pele, com a forma de paralelipípedos rectângulos, possuíam como faces

maiores a epiderme (através da qual as trocas com o meio devem ser muito lentas, se existirem) e um revestimento de tecido conjuntivo laxo (tecido celular subcutâneo). Em corte (o que dá a imagem das 4 faces restantes do retalho controle) encontrámos por baixo da epiderme uma espessa camada de tecido conjuntivo denso, rico em fibroblastos/fibrócitos, alguns apêndices cutâneos (glândulas e folículos pilosos), uma camada mais pequena de tecido adiposo e ainda delgados feixes de músculo esquelético (cuticular do Rato).

O retalho correspondente à cicatriz era bastante semelhante ao controle, possuíndo apenas, como uma das faces laterais o tecido de cicatrização. Este constituía uma fracção bastante pequena do retalho de pele delimitando-se nitidamente, linearmente, do tecido são.

Na cicatriz de 24 horas encontravam-se bastantes polimorfonucleares, além de alguns linfócitos, monócitos e fibroblastos. Na cicatriz de 5 dias havia muito mais fibroblastos, embora se encontrassem ainda macrófagos, alguns polimorfonucleares e vasos de neoformação.

b) Doseamento radioquímico da isoprenalina-^{3}H e O-metilsoprenalina-^{3}H - Os retalhos de pele controle removeram cerca de 1000 picomol de ISO em 30 minutos, correspondendo 70% desse valor à formação de OMI (Tabela 15). A pele com cicatriz de 24 horas removeu, acumulou e O-metilou cerca de 2,5 vezes mais que o controle, sendo todos esses aumentos estatisticamente significativos. A pele com a cicatriz de 5 dias removeu e metilou uma quantidade de ISO ainda

TABELA 15. Remoção e acumulação de isoprenalina-^{3}H (ISO) e formação de O-metilisoprenalina (OMI) por retalhos de pele controle e pele com tecido de cicatrização (em que a cicatriz constituía uma das faces do tecido) durante 30 minutos de incubação com ISO (2 μmol/l). Média ± desvio padrão da média, em nmol/g. Valores estatisticamente diferentes dos de controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI	n
Controle	1,16 ± 0,39	0,35 ± 0,26	0,82 ± 0,18	5
Cic. 24 h	2,95 ± 0,38**	0,86 ± 0,11*	2,10 ± 0,49**	2
Cic. 5 d	3,89 ± 0,79***	0,58 ± 0,19	3,31 ± 0,82***	3

maior do que a cicatriz de 24 horas, acumulando relativamente menos amina intacta.

Apesar da heterogeneidade histológica do tecido em estudo, e da pequena fracção de volume ocupada pela cicatriz, foram detectáveis as diferentas devidas à presença do tecido de cicatrização e portanto, provavelmente, aos fibro - blastos. Assim decidimos prosseguir com o nosso estudo investigando os efeitos do U0521 e da cortexona sobre a remoção e metilação da ISO pela pele controle e pelo tecido de cicatrização.

Repetimos a realização das incisões cutâneas tal como anteriormente, sacrificando os animais aos 5 dias. Introduzimos uma modificação na colheita das cicatrizes que se veio a revelar contraproducente: impressionados pelo peque

no volume do tecido de cicatrização em relação ao volume total do retalho de pele, decidimos cortar a pele de ambos os lados da cicatriz que passou, portanto, a ficar contida no centro do retalho e seccionada apenas nos dois topos. Incubámos então as amostras de tecido nas mesmas condições referidas anteriormente, fazendo também incubações na presença de U0521 ou de cortexona. Os resultados estão resumidos na Tabela 16.

TABELA 16. Remoção e acumulação de isoprenalina-^{3}H (ISO) e formação de O-metilisoprenalina-^{3}H (OMI) por retalhos de pele controle e pele com tecido de cicatrização (cicatriz contida no interior do tecido) durante 30 minutos de incubação com ISO (2 µmol/l), na ausência e na presença de U0521 ou de cortexona. Média ± desvio padrão da média; em nmol/g. Valores estatisticamente diferentes dos de controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$

	REMOÇÃO	ISO no tecido	OMI	n
CONTROLE				
Controle	1,69±0,38	0,34±0,12	1,31±0,27	8
U0521	1,15±0,20**	0,83±0,08****	0,32±0,14****	5
Cortexona	1,22±0,20*	0,54±0,25	0,69±0,35***	5
CICATRIZ				
Controle	2,10±0,33*	0,61±0,23***	1,49±0,28	8
U0521	1,12±0,19****	0,86±0,15	0,26±0,11****	5
Cortexona	1,93±0,27	0,72±0,20	1,21±0,26	5

Como se pode ver na referida tabela, o U0521 bloqueou apreciavelmente a metilação da ISO na pele controle, reduzindo também a remoção e aumentando a acumulação de amina intacta. Quer dizer que o U0521 exerceu um efeito sobre a remoção e metilação da ISO pela pele de Rato mais parecido ao que observámos na veia safena e na artéria aorta do que ao observado no canal torácico. A cortexona reduziu a metilação da ISO a metade e não reduziu a acumulação de amina intacta que, pelo contrário, mostra tendência para aumentar.

As diferenças do tecido de cicatrização incubado em condições de controle, em relação à pele normal, são discretas, ao contrário do que acontecera nas nossas experiências preliminares, embora continuem a ser estatisticamente significativas. O U0521, por sua vez, teve um efeito sobre o tecido com a cicatriz do mesmo tipo e não menos intenso do que o exercido no tecido de controle, enquanto que a cortexona, que reduzira significativamente a remoção e a metilação da ISO pela pele normal, deixou de ter esse efeito sobre a pele com a cicatriz.

c) Discussão - A primeira conclusão deste trabalho é evidente perante a histologia do nosso tecido de controle: a pele é um mau modelo, com uma estrutura imensamente complexa, sendo neste momento desconhecidas as características de captação e metabolização de catecolaminas de grande parte dos seus constituintes (epiderme, tecido adiposo,

glândulas, músculo esquelético, etc.). Para além disso, o tecido de cicatrização (o alvo fundamental deste estudo), que correspondia a uma ferida mínima (incisão linear limpa), revelou-se muito escasso, apresentando dimensões muito pequenas em relação ao volume de tecido em que vinha inserido. Apesar deste facto, as células do tecido de cicatrização mostraram bem a sua capacidade de remover e metilar a ISO nas nossas primeiras experiências (Tabela 15), provavelmente por termos conseguido uma exposição óptima do tecido de cicatriz ao líquido de incubação. Como aquela capacidade era sensivelmente maior aos 5 dias do que às 24 horas após a realização da incisão, ela parecia relacionar-se primordialmente com a presença dos fibroblastos, macrófagos e/ou células endoteliais capilares, dado que o infiltrado de polimorfonucleares diminuiu nitidamente das 24 horas para os 5 dias.

Na tentativa de aumentarmos a proporção de tecido cicatricial nos retalhos de pele, passámos a retirar retalhos contendo a cicatriz no seu seio. A cicatriz era assim seccionada apenas nos 2 topos. O que conseguimos com isto foi, aparentemente, isolar a cicatriz, tornando bem evidente a dificuldade de difusão através da pele o que, aliás, já era sugerido pelo facto de nas primeiras experiências uma pequena fracção do tecido (cicatriz) desempenhar tão grande papel na remoção e metilação da ISO pelo bloco de pele.

Apesar de todas as limitações, este estudo deixa-nos alguns dados interessantes:

a) A pele, órgão estruturalmente muito complexo, composto de elementos celulares em relação aos quais não se tem pensado ou pelo menos não se têm estudado como elementos manipuladores de catecolaminas, revela, afinal, uma capacidade de remover e metilar a ISO que não difere muito da das estruturas vasculares quando incubadas com aquela amina em condições semelhantes (ver Bönisch e Trendelenburg, 1974, e os nossos resultados sobre a veia safena, artéria aorta e artérias umbilicais). Na realidade, os resultados obtidos com a pele de Rato reforçam a nossa impressão de que a captação de catecolaminas corresponde a um mecanismo bastante geral, partilhado por praticamente todo o tipo de células dos mamíferos.

b) A repercussão que uma pequena porção de tecido de cicatrização teve, quando constituia uma face do tecido exposta ao líquido de incubação, sobre a remoção e metilação de ISO pelos blocos de pele, por um lado, e a dificuldade com que a presença do mesmo tipo de tecido se fez notar quando contido no centro do retalho de pele, por outro, tornam, a nosso ver, aparente a dificuldade de difusão da amina através do tecido, o que aliás nos parece poder explicar, em parte, a grande disparidade na eficácia com que um tecido remove uma amina conforme é perfundido ou incubado com o líquido nutritivo que a contém (Bönisch e Trendelenburg, 1974).

c) Dado que as alterações que se seguiram à incisão ci

rúrgica (cicatrização) não ultrapassavam, histologicamente, um plano bem definido que separava a cicatriz do tecido são, dado morfológico que é curiosamente confirmado pela referência a um isolamento funcional entre os sistemas de comunicação das células do tecido de cicatrização e do tecido normal que lhe está adjacente (Loewenstein e Penn, 1967), parece-nos que não há grande possibilidade de erro em atribuir ao tecido de cicatrização as diferenças na remoção e metilação da ISO que acompanharam a sua presença nos retalhos de pele. Por outro lado, nas cicatrizes com 5 dias, os fibroblastos representavam, em número, o elemento celular mais importante. Assim, comparando os tecidos com cicatriz com a pele controle, verificamos que os fibroblastos aumentaram a remoção e acumulação de ISO pelos retalhos de pele, por um lado, e que o U0521 foi capaz de bloquear a catecol-O-metiltransférase desses fibroblastos, uma vez que a fracção de OMI resistente ao U0521 não aumentou mas até, pelo contrário, pareceu diminuir nos tecidos com cicatriz. Em contrapartida a cortexona, que reduzira a remoção e metilação da ISO pela pele normal, deixou de ter efeito significativo sobre os tecidos com cicatriz.

Assim, enquanto que o efeito do U0521 sobre a cicatriz nos faz pensar que os fibroblastos jovens, ao contrário dos fibrócitos, metilam a ISO por um processo sensível ao U0521, tal sensibilidade parece não ser acompanhada pela existência de sensibilidade do sistema de captação à corte

xona, o que está em desacordo com o que se verifica habitualmente.

Ocorreu-nos então que ao observar preparações de vasos tratados com cortexona encontrávamos, por vezes, fibroblastos com aspecto anormal, exibindo múltiplos prolongamentos celulares e acentuada vacuolização do citoplasma. Pareceu-nos possível que, num tecido rico em fibroblastos, um efeito da cortexona desse tipo pudesse, através do aumento da superfície da membrana com a consequente facilitação da difusão simples (Cohn, 1971), mascarar um bloqueio do sistema de transporte activo.

Decidimos então empreender uma série adicional de experiências para verificar se a cortexona aumentava, de facto, a superfície de membrana dos fibroblastos.

6. A. Efeito da cortexona sobre a morfologia da membrana dos fibroblastos e macrófagos

Pelos motivos que acabámos de expôr, preparámos mais algumas cicatrizes por incisão linear da pele do dorso de ratos, tal como se descreveu em 6. Aos 5 dias após a intervenção sacrificámos os animais, retirámos o tecido de cicatriz e incubámo-lo em solução de Krebs-Henseleit, a 37° e com oxigenação. Algumas preparações foram incubadas somente em solução de Krebs-Henseleit (controle), outras em solução de Krebs com etanol (10 µl de etanol em 3 ml de Krebs), outras em solução de Krebs com cortexona numa concentração de 60 micromol/l e outras em solução de Krebs

com cortexona numa concentração de 120 micromol/l. Preparámos 2 soluções diferentes de cortexona (em etanol) de modo a que, para obtermos as duas concentrações diferentes de cortexona na solução de Krebs tivéssemos que adicionar o mesmo volume de solvente (10 µl de etanol para 3 ml de solução de Krebs). A incubação durou 30 minutos.

No fim da incubação os tecidos foram fixados em glutaraldeído-ósmio, desidratados e incluídos em Epon, como habitualmente (ver METODOS).

Preparámos cortes semi-finos (1 µm), corados com azul de toluidina, e cortes ultrafinos, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo.

A observação dos cortes semi-finos, no microscópio óptico, revelou um tecido bastante rico em células, nomeadamente fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos. A este nível de observação era já visível, nas preparações tratadas com cortexona, uma vacuolização do citoplasma de muitas das células, assim como uma alteração da organização do próprio tecido: muitas das células (fibroblastos) pareciam "soltas", desinseridas dos pontos de apoio que no tecido normal as mantêm estendidas segundo uma determinada orientação.

Ao microscópio electrónico os fibroblastos apresentavam, nas preparações de controle, contornos um pouco irregulares, com um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e abundantes microfilamentos (Fig. 12). Observavam-se vesículas de micropinocitose, não muito numerosas

e de dimensões pequenas.

As preparações incubadas com solução de Krebs e etanol não se distinguiam das preparações de controle.

Nas preparações tratadas com cortexona (60 micromol/l, durante 30 minutos) os fibroblastos exibiam contornos muito irregulares, com prolongamentos de várias formas e tamanhos e uma intensa vacuolização do citoplasma (Fig.13). Os microfilamentos que, como referimos, eram muito abundantes nos fibroblastos das preparações de controle, foram reduzidos dum modo evidente pela cortexona.

Para além dos fibroblastos, os macrófagos também sofreram alterações morfológicas sob o efeito da cortexona: os seus prolongamentos alongaram-se bastante, acumulando-se grandes vacúolos ou pseudo-vacúolos no citoplasma (Fig.14).

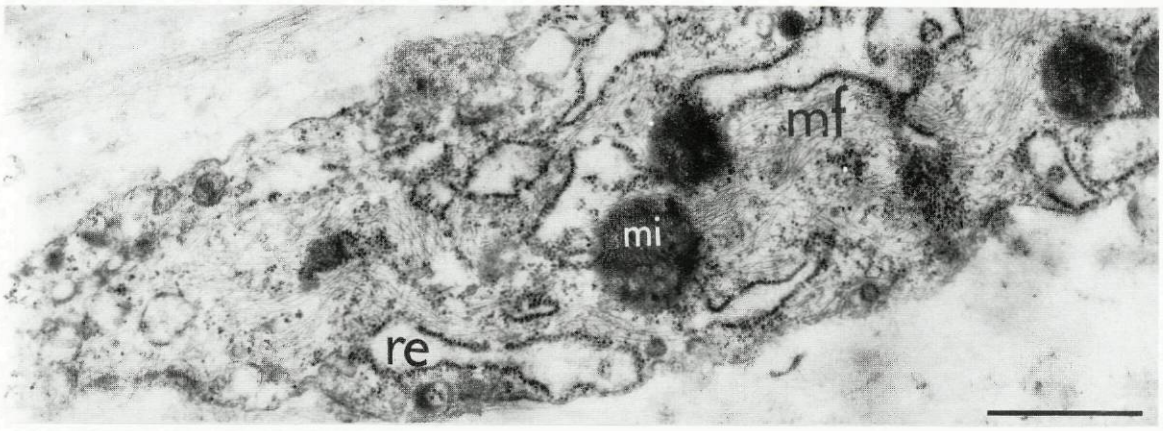
Os miofibroblastos, células que, na realidade, não se distinguem, morfológicamente, de células musculares lisas, incluindo uma membrana basal bem desenvolvida, pareciam não ter sido afectados pela cortexona. No entanto, nas preparações tratadas com uma concentração dupla de cortexona, não só todas as alterações já descritas se apresentavam com maior intensidade, como os próprios miofibroblastos mostravam sinais de terem sofrido importantes alterações das suas estruturas membranosas. Nestas células as alterações assumem um aspecto curioso: aparentemente devido a uma função esquelética da membrana basal, as células não emitem prolongamentos, sofrendo antes extensas invaginações da membrana celular que se enrola sobre si mesma, duma forma por

vezes bastante compacta, assumindo o aspecto da mielina ou de casca de cebola (Fig. 15).

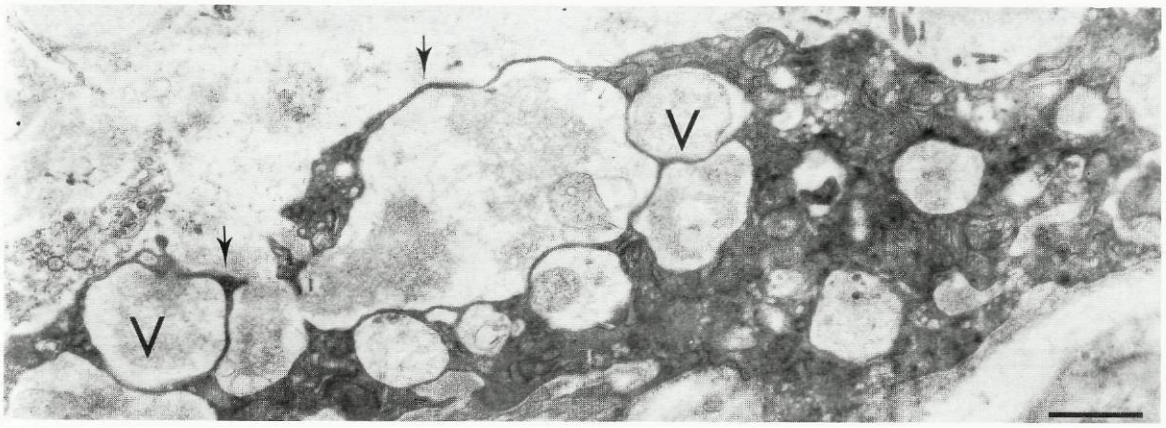
Os resultados morfológicos obtidos com estas experiências impressionaram-nos pela sua intensidade e extensão: na realidade, e de acordo com a hipótese que nos levou à realização deste estudo, a cortexona induziu marcadas alterações na morfologia dos fibroblastos, aumentando notavelmente a extensão da membrana celular através de prolongamentos celulares, invaginações e vacúolos ou pseudo-vacúolos, sendo ainda aparente uma diminuição no número de microfilamentos. Para além disso, os efeitos da cortexona englobaram também os macrófagos e os miofibroblastos.

Não conseguimos encontrar na literatura qualquer referência a este tipo de efeitos dos corticosteróides, o que nos parece estranho, mas que afinal é apenas um exemplo do que está por fazer no campo da morfofarmacologia, ou seja, quase tudo.

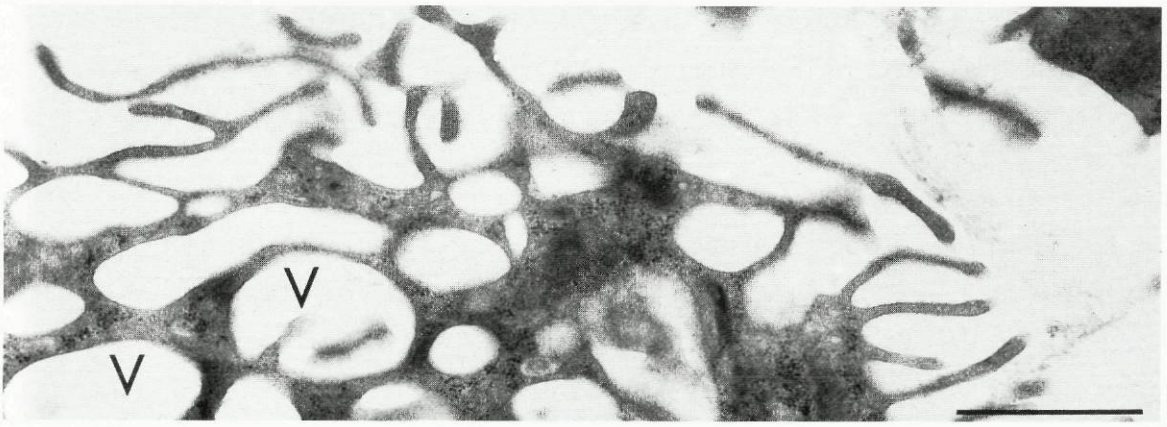
Na realidade, estão descritas alterações da morfologia dos fibroblastos e macrófagos (em cultura), eventualmente associadas a alterações da fagocitose, induzidas por substâncias que interferem com a função dos microfilamentos e/ou microtúbulos como a citocalasina B (Helentjaris et al, 1976, Mazur e Williamson, 1977) ou a concanavalina A (Hoffstein et al, 1976). Por outro lado, parece haver uma relação entre microtúbulos e microfilamentos e a libertação de enzimas lisosómicas, segundo indicam os resultados obtidos por Wright e Malawista (1972) e Hoffstein e Weissman



12



13



14



15

Fig.12. Fibroblasto numa preparação de cicatriz de pele de Rato incubada em solução de Krebs-Henseleit, em condições de controle, durante 30 minutos. mf - miofilamentos; mi - mitocôndrias; re - retículo endoplasmático rugoso. Barra = 1/um

Fig.13. Fibroblasto duma cicatriz incubada com cortexona (60/umol/l) durante 30 minutos. Observam-se múltiplos vacúolos (V) e prolongamentos do citoplasma (setas). Barra = 1/um

Fig.14. Macrófago numa cicatriz de pele de Rato incubada com cortexona (60/umol/l) durante 30 minutos. E evidente a intensa vacuolização (V) do citoplasma. Barra = = 1/um

Fig.15. Miofibroblasto duma cicatriz de pele de Rato incubada com cortexona (120/umol/l) durante 30 minutos. N - núcleo; seta - membrana basal; V - vacúolos; EM - estrutura membranosa anormal. Barra = 1/um

(1978) em polimorfonucleares humanos. Sendo a chamada "estabilização dos lisosomas" considerada um dos mecanismos de acção anti-inflamatória dos corticosteróides (Ringrose et al, 1975, Melby, 1977, Davies e Allison,1978, Ferreira e Vane, 1979), não podemos deixar de considerar os nossos actuais dados de observação como bastante interessantes. Eles relacionam-se, aliás, com efeitos de membrana dos corticosteróides,avaliados através de métodos não morfológicos (Agarwal e Garby, 1964, Gershfeld e Pat, 1968, Seeman, 1972).

De qualquer modo esta discussão, necessariamente superficial, ultrapassa a nossa linha de investigação actual. Dentro dessa linha, é relevante a conclusão de que a cortexona, na concentração em que geralmente a utilizámos (60 micromol/l), induz marcadas alterações das membranas dos fibroblastos. Essas alterações, através do aumento da extensão de membrana, conduzirão, no mínimo, a um aumento proporcional da difusão das catecolaminas. Dizemos no mínimo porque não podemos saber o que se passou em relação a outras características da membrana (constituição, fluidez, actividade de pinocitose, etc).

A existência de tão marcados efeitos da cortexona sobre a membrana celular dos fibroblastos impede-nos, obviamente, de interpretar os efeitos da cortexona sobre a captação duma catecolamina por um tecido rico em fibroblastos e/ou macrófagos, em função do efeito específico daquele corticoide sobre o sistema de captação extraneuronal das catecolaminas.

ALTERAÇÕES DA ULTRASTRUTURA NUCLEAR INDUZIDAS PELA ISOPRENALINA NAS CELULAS MUSCULARES, FIBROBLASTOS E FIBROCITOS DA AORTA DE RATOS JOVENS

Ao longo do nosso trabalho, e conforme oportunamente referimos, o núcleo celular evidenciou-se por duas ordens de razões: a) exibia, dum modo geral, grande densidade de grãos de prata nas autorradiografias, parecendo constituir um importante factor de acumulação/fixação das aminas dentro da célula e b) sofria importantes alterações morfológicas após exposição às mesmas catecolaminas. Estas alterações morfológicas só se evidenciavam nitidamente em preparações expostas às aminas durante 30 ou mais minutos, variavam de intensidade com o tipo de célula e mesmo entre várias células do mesmo tipo, e eram sempre num sentido que sugeria uma frenação da actividade nuclear: condensação da cromatina, segregação dos componentes nucleolares, aparecimento ocasional de "material de lesão" (estruturas não normais).

Já no princípio da década de 70, estudos sobre a acumulação de catecolaminas, conduzidos com técnicas de histofluorescência (Gillespie et al, 1970, Burnstock et al, 1971), tinham revelado o núcleo celular como um importante elemento de fixação de catecolaminas. Gillespie chamou re-

petidamente a atenção para esse facto (Gillespie et al, 1970, Gillespie, 1976), considerando o significado potencial do mesmo.

Não tendo encontrado na literatura referência a alterações ultrastruturais nucleares idênticas às que observámos, provocadas por catecolaminas, planeámos uma série adicional de experiências com o objectivo de verificar se a isoprenalina (ISO), na concentração que geralmente utilizámos (2micromol/l), era capaz, por si só, de induzir alterações estruturais no núcleo celular. Para além disso, e porque as catecolaminas se ligam fortemente ao núcleo, parecia-nos sustentável a hipótese de que o efeito das catecolaminas sobre o núcleo fosse exercido localmente. A ser assim, isto é, se o bloqueio da captação das catecolaminas evitasse o aparecimento de alterações do núcleo, estar-se-ía perante um novo tipo de efeitos das catecolaminas, mediado por receptores intracelulares, adquirindo o seu complexo sistema de captação extraneuronal um novo significado fisiológico. Para testar esta hipótese escolhemos a metanefrina como bloqueador do sistema de captação. Tal escolha baseou-se em duas razões: não podíamos usar os corticosteróides porque têm efeitos nucleares próprios, bem conhecidos, e agradava-nos o uso dum inibidor fisiológico da captação extraneuronal.

Escolhemos para estas experiências a aorta de ratos jovens: por um lado porque tinha sido na aorta (de Coelho) que tínhamos observado as alterações mais intensas; por ou

tro lado, tendo as células da zona adventício-medial da aorta de animais jovens uma intensa actividade de síntese proteica e divisão celular (Karrer, 1961; Ross e Klebanoff, 1971), parecia-nos de esperar que uma frenação da actividade nuclear tivesse uma tradução morfológica bem evidente naquelas células; por último, aquela zona permitir-nos-ia estudar comparativamente três tipos de células (células musculares lisas, fibroblastos e fibrócitos) com características diversas de captação extraneuronal de catecolaminas.

Material e métodos

7 ratos jovens (70-100 g de peso) foram mortos por decapitação, sendo a aorta torácica rapidamente exposta e colhida para solução de Krebs-Henseleit, previamente oxigenada, à temperatura de 4°C. Depois de limpa e aberta longitudinalmente cortavam-se três pequenos fragmentos para balões de incubação, contendo cada um 3 ml de solução de Krebs, com oxigenação constante e em banho de água à temperatura de 37°C. Um dos balões continha metanefrina (100 /umol/l). Após um período de repouso de 15-20 minutos os fragmentos de aorta eram mudados para novos balões que continham apenas solução de Krebs (controle), ISO (2/umol/l) ou ISO (2/umol/l) e metanefrina (100/umol/l). Após 30 minutos de incubação nestas condições os fragmentos de aorta eram retirados e fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 3% em tampão de cacodilato (0,1 mol/l), pH 7,3, a

4° C, durante 90 minutos, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão e à mesma temperatura, desidratados e incluídos em Epon. Observaram-se cortes ultrafinos da zona adventício-medial (cortaram-se 3 blocos de cada preparação), corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, num Siemens Elmiskope 101 a 80 Kv.

Resultados

Tal como está descrito para as artérias aortas em geral, as células musculares dispunham-se em camadas, separadas por lâminas elásticas bem desenvolvidas. Para dentro da última lâmina elástica bem definida, os espaços entre as lâminas eram ocupados por células musculares e elementos extracelulares, sobretudo colagéneo. Para fora dessa última lâmina elástica coexistiam células musculares (o tipo celular mais frequente), alguns fibroblastos e ainda menos fibrócitos. Estes dispunham-se mais à periferia da artéria, em delgadas folhas de citoplasma, paralelamente ao eixo do vaso. Assumiam assim a sua forma e disposição características, aparentemente demasiado estruturadas para poderem ser consideradas simples formas de involução ou degenerescência dos fibroblastos.

Não encontrámos qualquer tipo de estrutura nervosa.

As células musculares tinham um aspecto relativamente indiferenciado, ou seja, um corpo celular de contornos irregulares, muitas vezes abraçando elastina ou feixes de colagéneo, um retículo endoplasmático rugoso exuberante,

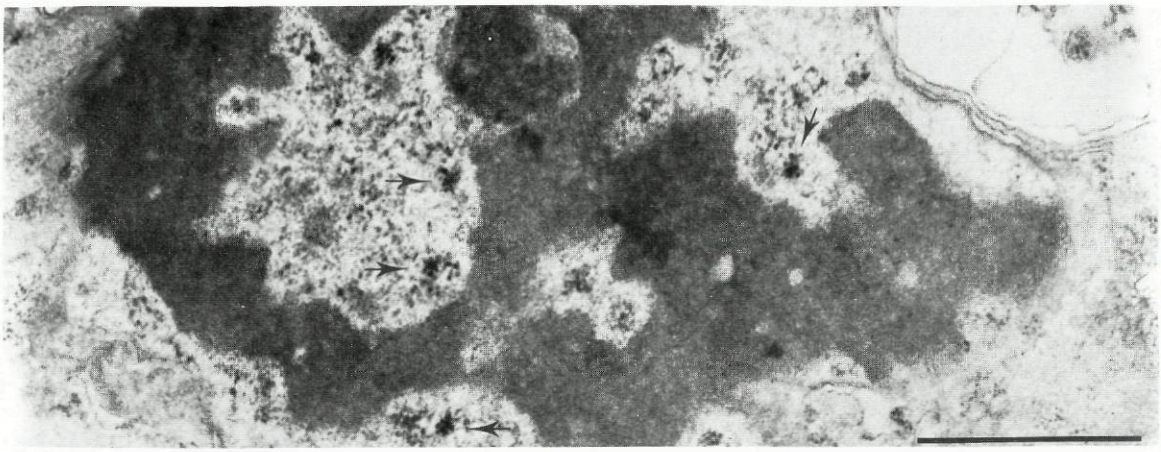
e consequentemente uma menor densidade volumétrica de elementos contrácteis.

A ISO (2micromol/l) provocou importantes alterações na estrutura dos núcleos de todos os tipos de células observados, ou seja, das células musculares lisas, fibroblastos e fibrócitos da zona adventício-medial das aortas, quando comparados com os respectivos controles. Essas alterações consistiam, fundamentalmente, numa condensação da cromatina (Fig.16 e 17), na segregação das componentes nucleolares (Fig.18) e no aparecimento dum grande número de grânulos de tipo pericromatínico dispersos por todo o nucleoplasma ou concentrados à volta do nucléolo. Estes grânulos diferiam dos grânulos pericromatínicos normais por terem dimensões em geral superiores e um tanto variáveis, por não se localizarem exclusivamente junto à cromatina e por se agruparem, por vezes, sobre pequenas estruturas esferoides, de matriz amorfa (Fig. 16).

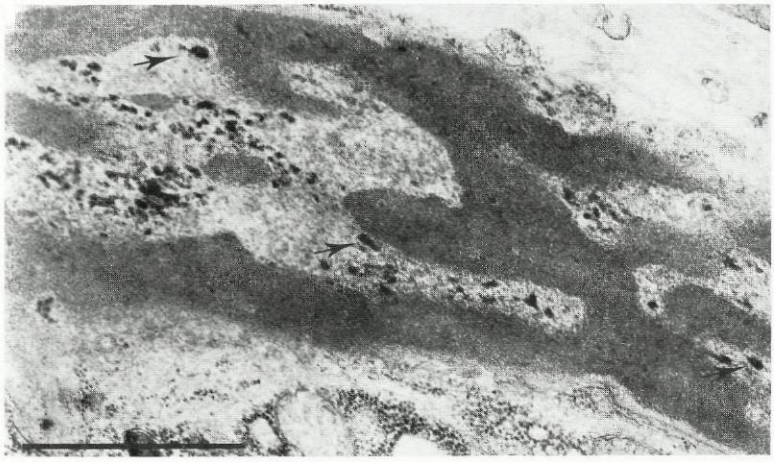
Em alguns núcleos apareciam ainda umas esférulas densas, de tamanho variável (até 0,2 μm de diâmetro), localizando-se preferencialmente junto à cromatina densa (Fig.17).

Todas estas alterações se apresentavam com uma intensidade variável nas células duma mesma preparação, encontrando-se raramente células com núcleos de aspecto normal (aprox.5%).

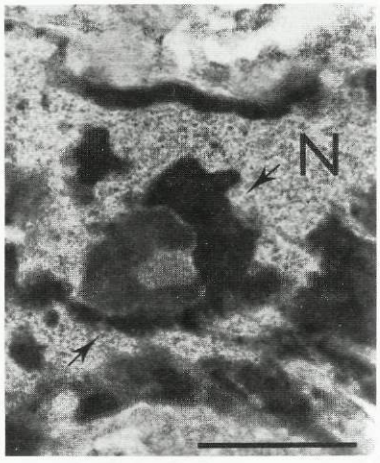
As alterações da morfologia nuclear eram do mesmo tipo nas células musculares lisas, nos fibroblastos e nos fibrócitos. Elas eram, no entanto, relativamente menos marcadas



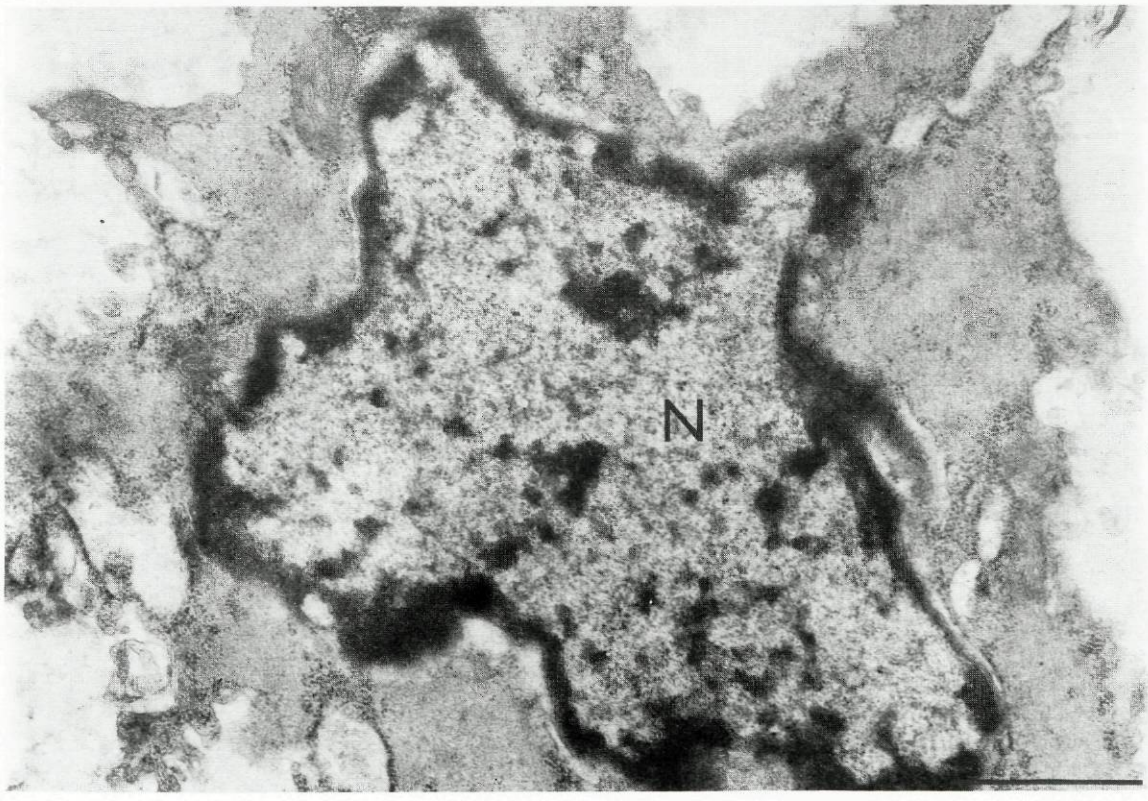
16



17



18



19

Fig.16. Condensação da cromatina e acumulação de grânulos de tipo pericromatínico (setas) no núcleo duma célula muscular lisa duma preparação de aorta de Rato incubada com isoprenalina (2 /umol/l), em condições de controle, durante 30 minutos. Barra = 1 /um

Fig.17. Condensação da cromatina, com acumulação de grânulos de tipo pericromatínico e esférulas densas (setas) no núcleo dum fibroblasto duma preparação de aorta de Rato incubada com isoprenalina (2 /umol/l), em condições de controle, durante 30 minutos. Barra = 1 /um

Fig.18. Segregação nucleolar (setas) no núcleo (N) duma célula muscular duma preparação de aorta de Rato incubada com isoprenalina (2 /umol/l), em condições de controle, durante 30 minutos. Barra = 1 /um

Fig.19. Núcleo (N) duma célula muscular lisa duma preparação de aorta de Rato incubada com isoprenalina (2 /umol/l), na presença de metanefrina (100 /umol/l), durante 30 minutos. Barra = 1 /um

nestas últimas células, que possuem naturalmente núcleos menos exuberantes que os fibroblastos e células musculares.

Nas preparações tratadas pela metanefrina, a ISO não exerceu qualquer efeito sobre a ultrastrutura nuclear das células musculares lisas e dos fibroblastos. Na realidade, os núcleos destas células, nestas condições experimentais (metanefrina + ISO) (Fig.19), não se distinguiam dos núcleos celulares das preparações de controle. Pelo contrário, o efeito da ISO sobre o núcleo dos fibrócitos não foi aparentemente bloqueado pela metanefrina.

Discussão

De acordo com a hipótese que tínhamos levantado, a partir da observação das alterações nucleares nas células de tecidos tratados durante 30 minutos com ISO, esta catecolamina confirmou ser capaz, de, por si só, alterar a estrutura nuclear num sentido que genericamente podemos considerar como de frenação da actividade nuclear (condensação da cromatina, segregação nucleolar, acumulação de grânulos de tipo pericromatínico).

Não podemos, como é óbvio, tirar muitas conclusões sobre as alterações ultrastruturais induzidas pela ISO nos núcleos e seu significado funcional, dado que recorremos a um protocolo experimental muito simples que, aliás, tinha por objectivo resolver um problema também muito simples: "exerce a isoprenalina algum efeito sobre o núcleo celular?"

e, se exerce,"depende ou não esse efeito da captação da amina para dentro das células?"

Nesse sentido, os resultados parecem-nos muito claros: a ISO provocou marcadas alterações da estrutura nuclear nos três tipos de células observados, comparativamente aos controles processados nas mesmas condições. Tal efeito parece depender da entrada da catecolamina para o interior das células, visto que a metanefrina, inibidor da captação extraneuronal das catecolaminas (Iversen, 1965, Draskóczy e Trendelenburg, 1970, Gillespie et al, 1970) impediu o aparecimento das referidas alterações nos núcleos das células musculares e fibroblastos. Como já referimos noutros capítulos deste trabalho (Canal torácico de Cão, Pele de Rato/Cicatrização) os fibrócitos têm grande capacidade de captar ISO por um processo não sensível aos bloqueadores clássicos da captação extraneuronal.

Note-se que não excluímos a possibilidade das catecolaminas exercerem efeitos moduladores sobre o núcleo das células efectoras através da activação de receptores de membrana. Podemos adiantar que, nas nossas condições experimentais, tais efeitos, a existirem, serão muito discretos, não se acompanhando duma tradução morfológica. Pelo contrário, o que afirmamos é que as evidentes alterações estruturais que observámos foram induzidas intracelularmente pela ISO.

A condensação da cromatina traduz, com toda a probabilidade, uma diminuição da actividade nuclear, uma vez que

é aceite que a transcrição se faz a partir da eucromatina e não da heterocromatina ou cromatina densa (Bloom e Fawcett, 1968, Bouteille et al, 1974, Ghadially, 1975). Parece ser uma modificação relativamente inespecífica. Pelo contrário, a segregação nucleolar tem sido observada como resposta a um conjunto de substâncias (citostáticos como a actinomicina D, citotóxicos como a alfa-amanitina, carcinogénicos como a aflatoxina e lasiocarpina, etc.) que têm em comum a capacidade de se ligarem ao ADN, impedindo a sua transcrição (Reynolds et al, 1964, Monneron et al,1970, Recher et al, 1971, Simard et al, 1974, Gajkowska et al, 1977, Derenzini e Moyne, 1978, Barsotti e Marinozzi, 1979). Não nos parece, no entanto, que o fenómeno esteja suficientemente bem estudado para podermos concluir que a ISO, ao induzir segregação nucleolar, o faça por se ligar ao ADN. Essa é apenas uma hipótese, bem interessante, a considerar futuramente na continuação deste estudo.

A segregação nucleolar, em si, significa interrupção na síntese do ARN nucleolar (Simard et al, 1974, Smetana e Busch, 1974). Podemos pois concluir que, nas nossas condições experimentais, a ISO poderá condicionar um bloqueio da síntese do ARN ribossómico.

A acumulação de grânulos de tipo pericromatínico tem sido frequentemente descrita associadamente à segregação nucleolar (Monneron et al, 1970, Recher et al, 1972,1976, Gajkowska et al, 1977, Derenzini e Moyne, 1978, Barsotti e

Marinozzi, 1979). Há, contudo, alguma variabilidade na descrição desse fenómeno, complicada ainda pelo uso duma nomenclatura não uniforme. A tendência mais recente é para interpretar a acumulação desses grânulos como o resultado duma alteração na maturação do ARN ribossómico, sintetizado antes do bloqueio da função nucleolar (Gajkowska et al, 1977, Derenzini e Moyne, 1978, Barsotti e Marinozzi, 1979).

A identificação dos "grânulos de lesão" observados nas nossas preparações com os "grânulos de tipo pericromatínico", "corpos pericromatínicos multigranulares", "microesférulas", etc, descritos na literatura já indicada, bem como uma melhor compreensão do seu significado fisiopatológico, só serão possíveis após uma análise muito mais pormenorizada dos efeitos das catecolaminas sobre os núcleos, nomeadamente relacionando os efeitos com as doses das aminas, tempo de actuação, uso de bloqueadores, e tentando identificar as neoestruturas com adequadas técnicas de histoquímica, bioquímica e eventualmente autorradiográficas.

Tal investigação, que nos parece do maior interesse, encontra, apesar das lacunas que ainda temos no conhecimento da histofisiologia nuclear e nucleolar, pistas bem delineadas pelos investigadores do cancro e dos mecanismos de acção dos citostáticos.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

"Tout ce que nous regardons se précise"

P. Teilhard de Chardin

Em revisão recente Trendelenburg (1980) analisa os resultados existentes acerca da captação e metabolização extraneuronais das catecolaminas, valorizando maximamente os dados de natureza cinética. Não é um propósito fácil: as catecolaminas podem entrar nas células por mais do que um processo; as enzimas metabolizadoras estão para dentro da membrana celular (sendo-lhes dado ou não acesso preferencial através dum determinado sistema de transporte), o que significa que o estudo cinético das enzimas é sempre limitado pela interposição dos fenómenos que se passam ao nível da membrana; há uma série de variáveis, nos modelos experimentais utilizados, ainda muito difíceis de valorizar, tais como a maneira como as catecolaminas difundem através dos diferentes tecidos, o modo como os próprios efeitos farmacodinâmicos interferem com a cinética das catecolaminas, a possibilidade de os metabolitos entretanto formados interferirem com a captação subsequente das catecolaminas, o grau e variabilidade da ligação a estruturas extracelulares e sobretudo intracelulares, etc. (ver tam-

bém Graefe, 1976).

De qualquer modo, Trendelenburg consegue chegar desde já a algumas conclusões bastante interessantes, que se orientam segundo duas tendências:

a) Uniformidade - em relação a todos os tecidos sobre os quais existem dados de análise cinética minimamente suficientes (coração de Rato, membrana nictitante de Gato, média da artéria aorta de Coelho, glândula submaxilar do Rato, veia safena de Cão, artéria da orelha de Coelho, traqueia de Cobaia) se verifica a existência dum sistema extraneuronal saturável, O-metilante, com alta afinidade para as catecolaminas (baixo Km) e sensível ao bloqueio pelos corticosteroides.

b) Variabilidade - para além da existência constante do sistema referido em a), há grande variabilidade de tecido para tecido e de espécie para espécie quanto à entrada das catecolaminas para dentro das células por processos não saturáveis, resistentes aos corticosteroides, assim como quanto à existência dum segundo sistema metilante, de baixa afinidade para as catecolaminas (alto Km), e ainda quanto à sensibilidade ou resistência deste segundo sistema metilante aos corticosteroides.

O nosso estudo, conduzido segundo uma perspectiva diferente, visava essencialmente integrar resultados de índole morfológica com os valores radioquímicos simultaneamente obtidos. Havia, nesse sentido, dois tipos de questões fundamentais a esclarecer: a) quais as células res -

ponsáveis pela captação e metabolização das catecolaminas e b) perante a existência de mais do que um processo de captação de catecolaminas por um determinado tecido, ou seja, em linguagem cinética, perante a existência de mais do que um "compartimento" de acumulação e/ou metabolização, saber se os diferentes processos cinéticos correspondem a diferentes tipos de células ou, pelo contrário, coexistem nas mesmas células.

A metodologia escolhida para o estudo morfológico (autorradiografia de luz e ultrastrutural) revelou-se bastante satisfatória. Apesar das reservas com que é, por vezes, encarada (por ex. Van Orden III, 1976), permitiu-nos obter resultados cuja harmonia - quer quando se comparam as autorradiografias de luz com as ultrastruturais equivalentes, quer quando se comparam os dados quantitativos das autorradiografias com os valores do doseamento radioquímico da catecolamina nas mesmas preparações - se nos afigura tranquilizadora. Como todos os métodos, tem as suas limitações próprias. Durante o processo de fixação os tecidos perdem uma certa quantidade de substâncias radioactivas, recuperáveis no líquido fixador. Em relação à isoprenalina, encontrámos sempre correlação positiva, altamente significativa, entre a quantidade de grãos de prata existente em cada preparação e o teor em isoprenalina das mesmas amostras, depois de descontada a quantidade existente no espaço extracelular. Como não havia qualquer correspondência entre quantidade de grãos de prata e teor em O-metilisoprenalina

dos mesmos tecidos, parece bastante provável que a radioactividade perdida pelo tecido para o fixador diga respeito ao metabolito e à isoprenalina presente no espaço extracelular (espaço do sorbitol). Os grãos de prata corresponderão assim à isoprenalina fixada no tecido. O mesmo tipo de conclusões foi apresentado por Gershon e Ross (1966 a e b) quanto à 5-hidroxitriptamina.

Em relação à noradrenalina, que só utilizámos uma vez (artérias umbilicais), os resultados não são tão simples. Conforme referimos, as preparações incubadas com a noradrenalina apresentam proporcionalmente mais grãos de prata do que as incubadas com isoprenalina, quando se comparam com o teor em amina intacta das respectivas amostras de tecido. Não aprofundámos a investigação desse problema porque nem no referido estudo nem posteriormente fizemos qualquer avaliação quantitativa de autorradiografias da noradrenalina. De qualquer modo, parece-nos de encarar a possibilidade de que haja nas células mais locais de ligação para a noradrenalina do que para a isoprenalina (porque aquela se liga a receptores alfa e beta e é substrato da monoaminoxídase e da catecol-O-metiltransférase); por outro lado, é possível que nas autorradiografias se detectem ainda os metabolitos ácidos da noradrenalina (ácidos dihidroximandélico e metoxihidroximandélico) de acordo com as longas semi-vidas de efluxo destes metabolitos (Fiebig e Trendelenburg, 1978 b, Mack e Bönisch, 1979).

Em resumo, parece-nos que se não utilizarmos concentrações muito altas de isoprenalina (que levariam a uma acumulação forçada de amina nos tecidos) e se não quisermos valorizar pequenas diferenças na comparação de densidades de grãos de prata entre diferentes preparações, a actual metodologia é satisfatória.

Escolhemos, entre as catecolaminas, a isoprenalina para iniciar e para realizar a maior parte do nosso trabalho, uma vez que, em relação à captação e metabolização extraneuronais, a isoprenalina era considerada um modelo mais simples (Draskóczy e Trendelenburg, 1970, Bönisch e Trendelenburg, 1974). Apesar de algumas limitações que do seu uso vieram a resultar (ver adiante), não deixou de ser possível a obtenção de resultados compreensíveis e, tanto quanto o indicam dados obtidos com as diferentes catecolaminas nas mesmas preparações (veia safena de Cão - nossos resultados e os de Paiva e Guimarães, 1978; artéria aorta de Coelho - nossos resultados e os de Levin, 1974 e Levin e Wilson, 1977; artérias umbilicais humanas - nossos resultados), extrapoláveis, pelo menos em termos qualitativos, às outras catecolaminas, nomeadamente à noradrenalina e adrenalina.

Para além dos aspectos autorradiográficos, os dados puramente morfológicos, qualitativos ou morfométricos, relativos ao estudo de preparações histológicas dos tecidos de controle ou dos tecidos prétratados com as catecolaminas (evidenciando-se neste caso, por vezes, efeitos farmacodi-

nâmicos das mesmas catecolaminas) contribuíram dum modo extremamente generoso para a compreensão dos fenómenos em estudo.

No seu conjunto, os nossos resultados levam-nos a conclusões que em alguns aspectos corroboram as de Trendelenburg (1980):

a) Não só todos os tecidos, mas todas as células e, dentro das células, todos os núcleos estudados fixaram as catecolaminas. A captação extraneuronal das catecolaminas parece ser, assim, um processo geral da biologia celular nos mamíferos.

Não tendo determinado, como já referimos, as constantes cinéticas da captação e metabolização das catecolaminas pelos nossos modelos experimentais, não podemos saber se, efectivamente, aquela captação geral, exibida por todas as células, tem ou não conexão com o sistema O-metilante, de baixo Km, referido por Trendelenburg. No entanto, talvez se deva salientar o facto de termos usado sempre concentrações relativamente baixas de catecolaminas (nunca mais de 2 micromol/l) e em 4 dos 6 tecidos estudados, tempos de exposição relativamente curtos (2 a 8 minutos). E nessas circunstâncias, repetimos, foi detectável a captação de catecolaminas por todos os tipos de células.

Quanto aos efeitos dos corticosteroides, eles afectaram a captação das catecolaminas por todos os tecidos à excepção, aparentemente, do canal torácico. Tiveram um efeito pequeno sobre a adventícia isolada da aorta de Coelho.

Ao nível celular, e tal como resulta da observação directa das autorradiografias ou da análise da composição celular dos tecidos em termos pelo menos semi-quantitativos, podemos dizer que, nas nossas condições experimentais, foi detectável a redução da captação das catecolaminas por todos os tipos de células, à excepção dos fibrócitos. Não dispomos de informação, no entanto, quanto a este aspecto, acerca das células de Schwann.

Note-se, no entanto, que não estamos na posição de considerar como definitiva esta informação sobre a resistência do ou dos sistemas de captação dos fibrócitos aos corticosteroides ou outros bloqueadores da captação extraneuronal. A esse propósito parece-nos oportuna, neste momento, uma análise das várias fases por que passou a investigação da captação extraneuronal das catecolaminas. Verificamos que se começou pelo uso de concentrações bastante altas de aminas (Iversen, 1965, Gillespie e Hamilton, 1967, Avakian e Gillespie, 1968, Clarke *et al*, 1969, Draskóczy e Trendelenburg, 1970, Gillespie *et al*, 1970, Jacobowitz e Brus, 1971), com tendência para se confundir captação com acumulação de amina nos tecidos.

Verificou-se, entretanto (Lightman e Iversen, 1969), que há captação extraneuronal mesmo quando se usam concentrações baixas de catecolaminas, desde que se bloqueiem as enzimas metabolizadoras (monoaminoxídase e catecol-O-metil transférase). Ou seja, a captação é seguida de metabolização e/ou acumulação quando, neste último caso, se ultrapas

sa a capacidade metabolizadora dos tecidos ou se bloqueiam as respectivas enzimas.

Tomou-se então consciência de que para estudar os processos de captação de catecolaminas era necessário: ou determinar a remoção de amina através das diferenças artério-venosas no líquido de perfusão (método de Lindmar e Muscholl, 1964), ou determinar a acumulação de amina intacta no tecido e a formação total de metabolitos (Bönisch e Trendelenburg, 1974, Graefe, 1976). Como alguns metabolitos abandonam os tecidos relativamente depressa (Bönisch e Trendelenburg, 1974, Levin, 1974, Fiebig e Trendelenburg, 1978 b), é necessário doseá-los nos tecidos e nos líquidos de incubação ou perfusão, simultâneamente.

A possibilidade de se recorrer a catecolaminas marcadas com trítio aumentou sensivelmente o poder de resolução da metodologia. A orientação cinética da investigação subsequente aumentou ainda mais o poder de destrinça da fase anterior. Não duvidamos de que o aprofundamento da investigação a um nível celular e até subcelular poderá trazer informações complementares extremamente úteis.

Se atentarmos agora na evolução dos conhecimentos sobre a captação extraneuronal das catecolaminas, naturalmente dependente da evolução da metodologia, verificamos que a captação extraneuronal era inicialmente considerada como ocorrendo apenas em relação ao uso de concentrações altas de aminas, para depois se verificar que ocorria também para concentrações baixas, desde que se bloqueassem as enzimas

metabolizadoras;por exemplo, em relação ao coração de Rato, a captação de catecolaminas foi considerada só parcialmente sensível aos bloqueadores da captação extraneuronal (Clarke et al, 1969), depois foi considerada saturável e sensível aos referidos bloqueadores (Bönisch e Trendelenburg, 1974, Bönisch et al, 1974) e mais tarde revelou-se como composta por dois mecanismos diferentes, um saturável e sensível à hidrocortisona e outro não saturável e resistente à hidrocortisona (Bönisch, 1978; Fiebig e Trendelenburg, 1978 b). Este mecanismo não saturável só é detectável quando se usam concentrações de aminas superiores a 300 ou 400 micromol/l. No entanto, é evidente que ele está em funcionamento para qualquer concentração; o que acontece é que, quando se usam concentrações baixas, a importância do mecanismo activo é tão grande quando comparada com a de qualquer mecanismo passivo (i.e. a quantidade de amina que é transportada pelo primeiro é tão grande em relação à quantidade que entra através do segundo), que parece existir somente a captação activa.

No caso das artérias umbilicais humanas passou-se por uma evolução semelhante: inicialmente Burnstock et al(1971) referem que aquelas artérias captam a noradrenalina por um processo resistente aos bloqueadores clássicos da captação extraneuronal; depois, sob condições experimentais já diferentes, Gulati e Sivarakrishna (1975) descrevem uma captação de noradrenalina,sensível à metanefrina,pelas mesmas artérias umbilicais; no presente estudo, através duma aná-

lise mais detalhada, chegámos à conclusão de que as artérias umbilicais captam a noradrenalina por dois processos distintos, um sensível e outro resistente ao bloqueio pela cortexona.

Parece-nos pois, que devemos usar da máxima prudência para negar a existência de qualquer mecanismo de passagem de catecolaminas através das membranas. Ou seja, perante os resultados obtidos com o canal torácico de Cão, com a adventícia da aorta de Coelho e os fibrócitos, o que podemos afirmar é que estas células, que, como referimos, representam uma fracção celular muito importante naquelas estruturas, exibem uma enorme capacidade de captar e metabolizar a isoprenalina por um processo resistente aos bloqueadores clássicos da captação extraneuronal. Pensamos até, como exporemos adiante, que essa capacidade pode corresponder a uma diferenciação daquelas células. Quanto à existência ou inexistência nos fibrócitos dum sistema de captação de catecolaminas saturável e sensível ao bloqueio pelos corticosteróides, como parece existir em todas as outras células, só uma análise cinética pormenorizada sobre a manipulação das catecolaminas pelos fibrócitos - que aliás nos parece difícil de realizar - nos poderá dar uma resposta definitiva.

b) Paralelamente à existência do sistema de captação de catecolaminas, sensível ao bloqueio pelos corticosteróides, referido em a), em todos os tecidos estudados encontrámos uma componente, maior ou menor, de captação e metabolização

de catecolaminas resistente àqueles bloqueadores. Como dissemos, houve grande variabilidade de tecido para tecido quanto a este segundo processo de remoção das catecolaminas. Este processo mostrou ser da maior importância no canal torácico de Cão, seguindo-se a adventícia isolada da aorta de Coelho. A correlação desses dados com a composição celular dos tecidos respectivos leva-nos a uma associação entre captação de catecolaminas resistente aos corticosteróides e fibrócitos. Esta parece-nos uma conclusão muito clara: os fibrócitos têm grande capacidade de remover e metilar isoprenalina por um processo resistente aos corticosteróides.

No entanto, isso não significa que os diferentes processos de remoção de catecolaminas pelos vários tecidos se identifiquem dum modo simples, linear, com as diferentes células constituintes dos mesmos. Esta é também uma conclusão clara que se baseia nos resultados obtidos com a média isolada da aorta de Coelho e com as artérias umbilicais humanas: em ambos os casos os resultados radioquímicos dizem respeito a praticamente um só tipo de células - as células musculares lisas - verificando-se a existência de remoção e metabolização de catecolaminas parcialmente sensíveis e parcialmente resistentes ao bloqueio pelos corticosteróides. Estes resultados parecem-nos tanto mais importantes quanto as células musculares lisas incarnam o modelo estrutural mais comummente associado à captação extraneuronal saturável, sensível aos corticosteróides, quer em termos

de importância na remoção de catecolaminas circulantes, por exemplo, quer em termos de potenciação de efeitos adrenérgicos pelo bloqueio da referida captação extraneuronal.

Pela sua variedade, os processos de remoção e metabolização de catecolaminas que se afastam da regra geral definida em a) vão ser mais difíceis de analisar e sistematizar. Parece-nos muito importante separá-los desde já em dois grupos: os mecanismos passivos, não saturáveis, e os mecanismos activos. Embora difíceis de analisar cineticamente, repetimos, por interferência doutros processos simultâneos, os mecanismos passivos são acessíveis a uma análise teórica baseada em conhecimentos gerais sobre a passagem de solutos através de membranas, por um lado, e sobre os processos de comunicação das células entre si e com o meio ambiente, por outro.

Assim, o mecanismo de difusão simples ou passiva, que em condições fisiológicas (isto é, as que se referem à distribuição de catecolaminas circulantes ou libertadas dos nervos, in vivo) não deve ter qualquer significado, pode intervir dum modo relevante em determinadas condições experimentais, nomeadamente quando se criam altos gradientes de concentrações de catecolaminas, quando se alteram as características de fluidez e extensão das membranas celulares (Cohn, 1971, por exemplo), e quando se utiliza a isoprenalina em vez das catecolaminas fisiológicas (Mack e Bönisch, 1979). Devido às suas características de lipossolubilidade, de que suspeitávamos a partir dos nossos resul

tados autorradiográficos com a aorta de Coelho (em que verificámos grande acumulação de grãos de prata na gordura dos adipócitos), mas só definidas concretamente há relativamente pouco tempo (Mack e Bönisch, 1979), a isoprenalina perde grande parte do interesse que lhe tinha sido atribuido como instrumento de estudo da captação de catecolaminas. De facto, por ser mais lipossolúvel que a noradrenalina, a isoprenalina tem a sua captação e O-metilação menos claramente afectada pelos corticosteróides do que a noradrenalina, como se pode ver pelos resultados de Graefe e Trendelenburg (1974; ver também Trendelenburg, 1980) com a membrana nictitante e pelos nossos resultados com as artérias umbilicais humanas. Por outro lado, o próprio destino intracelular da isoprenalina pode ser afectado pela sua lipossolubilidade, o que aumentará ainda mais a distorsão dos resultados finais.

Outro mecanismo não saturável, que poderá transportar quantidades apreciáveis de catecolaminas para dentro das células, é o mecanismo de pinocitose (micropinocitose, pinocitose simples - interiorização de gotículos do líquido extracelular pelas células). É uma actividade celular que se afigura de grande interesse biológico (ver Burnstock, 1970, Steinman et al, 1976), que tem sido frequentemente estudada, inclusivamente dum modo quantitativo (Bennett, 1956, Caeser et al, 1957, Clark, 1959, Kameya, 1964, Cohn, 1966, Cohn e Ehrenreich, 1969, Ehrenreich e Cohn, 1969, Schulman e Bradley, 1970, Wagner et al, 1971, Von Figura e Kresse,

1974, Steinman et al, 1974, 1976) e que não obstante continua largamente desconhecida quando ao seu real significado. Sendo uma função particularmente bem desenvolvida nos macrófagos, fibroblastos (Steinman et al, 1974, 1976) e músculo liso (neste caso por oposição a outros tipos de músculo - ver Burnstock, 1970), surge-nos como candidato bastante provável para a remoção não saturável de catecolaminas pela membrana nictitante de Gato que, conforme salienta Trendelenburg (1980), é naquele tecido uma componente de captação muitíssimo mais importante do que no coração de Rato.

Daquilo que se sabe sobre o destino intracelular das vesículas de pinocitose, elas fundem-se com os lisosomas para formar os lisosomas secundários (Cohn et al, 1966, Ehrenreich e Cohn, 1967, Steinman e Cohn, 1972, Steinman et al, 1974, 1976). A água, substâncias lipossolúveis e substâncias hidrofílicas com peso molecular inferior a 200-230 abandonam o lisosoma secundário rapidamente, saíndo para o citoplasma e daí, eventualmente, para fora da célula. A membrana lisosómica tem, de facto, características de permeabilidade diferentes das da membrana citoplasmática (Cohn e Ehrenreich, 1969, Ehrenreich e Cohn, 1969, Schulman e Bradley, 1970). Assim, catecolaminas que entrem nas células pelas vesículas de pinocitose, alcançarão aparentemente o citoplasma livre sem dificuldade, e aí poderão ser metabolizadas por enzimas do citosol ou dos organitos.

Temos estado a referir-nos à pinocitose simples (i.e. aquela que decorre da actividade normal, espontânea, das células), que nos parece, à luz dos conhecimentos actuais, constituir um mecanismo dificilmente contestável para a captação não saturável de solutos existentes no meio extracelular.

Uma análise quantitativa da pinocitose revelou que macrófagos e fibroblastos em cultura removem quantidades apreciáveis de solutos na unidade de tempo (0,43% do volume do macrófago e 0,05% a 0,2% do volume do fibroblasto, por minuto, respectivamente - Steinman et al, 1976). Não podemos, evidentemente, extrapolar daqueles resultados para os nossos modelos, tanto mais que se sabe que a actividade de pinocitose varia não só com o tipo celular mas também com as condições ambienciais (Cohn, 1966, Steinman et al, 1974, por exemplo) e com as características de crescimento celular - diferenciação (Cohn e Benson, 1965, Steinman et al, 1974).

De qualquer modo, para concentrações muito baixas de catecolaminas, parece-nos de admitir que a pinocitose simples, só por si, não possa justificar a enorme capacidade de remover e metilar a isoprenalina que exibe, por exemplo, o canal torácico de Cão. Mencionamos o canal torácico de Cão porque, tal como a membrana nictitante, ele tem uma grande capacidade de remover e metilar a isoprenalina por um processo resistente aos corticosteróides. Por outro lado, histologicamente, a membrana nictitante é fundamentalmente composta de músculo liso e abundante tecido conjuntivo

(Weiner et al, 1967), à semelhança do que se passa com o canal torácico.

O problema que gostaríamos, agora, de considerar, dum modo meramente especulativo, e com vista à continuação do estudo deste problema, tem a ver com uma possível relação entre captação activa de catecolaminas (para além da captação sensível aos corticosteróides referida em a) e actividade pinocitótica. Existindo aquele tipo de captação resistente aos corticosteróides sobretudo em células dotadas de franca actividade pinocitótica (i.e. fibroblastos e células musculares lisas) parece tentadora a ideia de que a própria pinocitose seja activa, isto é, activada pelas catecolaminas. Teoricamente tal fenómeno poderia processar-se através de, pelo menos, dois processos:
1) pinocitose de adsorção (i.e., a ligação da catecolamina à membrana celular levaria à endocitose desse segmento de membrana) - processo de captação de solutos muito mais eficiente que a pinocitose simples (Von Figura e Kresse, 1974, Steinman et al, 1976) ou 2) estimulação da pinocitose pelas catecolaminas, dum modo diferente do referido em 1). Sabe-se, por exemplo, que alguns fenómenos exo e endocitóticos são regulados pelo AMP cíclico (Cox e Karnovsky, 1973). Finalmente, em relação à captação extraneuronal subsequente à estimulação nervosa, o ATP libertado dos terminais adrenérgicos (Su et al, 1971, Burnstock e Costa, 1975) poderia estimular a pinocitose nas células dotadas

desse tipo de actividade (Cohn e Parks, 1967).

Feita, tanto quanto possível, uma apreciação sistematizada dos nossos resultados, em confrontação com os dados existentes na literatura, chegamos à questão crucial do nosso tema: se, e de que modo, lançam os nossos resultados alguma luz sobre o significado fisiológico da captação extraneuronal das catecolaminas.

Desde logo nos pareceu que estávamos perante um sistema demasiado elaborado para que se pudesse aceitar como sua finalidade única ou principal a inactivação das catecolaminas, em relação aos efeitos exercidos sobre os receptores de membrana. Conforme referimos na Introdução, a potenciação dos efeitos das catecolaminas em algumas preparações, pelo bloqueio da captação extraneuronal e/ou da catecol-O-metiltransférase, levou facilmente à aceitação daquela interpretação, na falta de outra, para a captação extraneuronal (Bevan et al, 1980). Ele não resiste, no entanto, a uma análise mais cuidadosa como a de Trendelenburg (1980), que chama a atenção para o facto de que, em condições experimentais que se aproximem das fisiológicas (Luchelli-Fortis e Langer, 1975, Brandão, 1977), apenas uma pequena parte do mediador libertado pelos terminais adrenérgicos é manipulada pelo sistema extraneuronal. No caso da membrana nictitante (Luchelli-Fortis e Langer, 1975) o bloqueio da captação extraneuronal não modificou a amplitude da resposta à noradrenalina libertada por estimulação eléctrica.

Note-se que consideramos indiscutível que a captação

extraneuronal das catecolaminas comparticipa na inactivação daquelas substâncias. O que nos parece é que tal objectivo é manifestamente insuficiente para justificar o sistema, que nem sequer se apresenta como um mecanismo de inactivação importante em relação ao mediador libertado pelos nervos. Em contrapartida,ele parece ter um papel mais importante na inactivação de catecolaminas circulantes (Paiva e Guimarães, 1978).

A descrição, recente, de receptores intracelulares,no coração (Ebner, 1979, 1981), abriu novas perspectivas neste campo.

De resto, a apreciação dos actuais resultados, com a definição de mais do que um sistema de captação extraneuronal de catecolaminas, cria espaço para a possibilidade de haver mais do que uma função para os referidos sistemas de captação.

Ao longo de gratas horas passadas ao microscópio electrónico, encontrámos duas ordens de dados que vão precisamente ao encontro das duas vertentes fundamentais da captação extraneuronal das catecolaminas. A primeira, bastante geral, diz respeito às alterações da morfologia nuclear induzidas pela isoprenalina; a segunda centra-se sobre os fibrócitos, a sua grande eficácia em captar a isoprenalina, e a disposição anatómica, ultrastrutural, peculiar, que assumem.

Em relação ao primeiro aspecto, e conforme referimos no texto, a intensa marcação nuclear com grãos de prata induzi

da pelas catecolaminas, confirmando, aliás, resultados referidos na literatura (Gillespie et al, 1970, Burnstock et al, 1971, Gillespie, 1976) sensibilizou-nos quanto à possibilidade das catecolaminas exercerem efeitos sobre o núcleo celular. Assim não estranhámos, e depressa nos apercebemos da importância das alterações da morfologia nuclear observadas em tecidos tratados com a isoprenalina. Uma série de experiências adicionais confirmou que os efeitos sobre o núcleo eram exercidos pela isoprenalina intracelularmente, processando-se a captação da amina pelo sistema de captação sensível aos corticosteróides. Na realidade, a metanefrina impediu as alterações nucleares pela isoprenalina nos fibroblastos e células musculares lisas, no nosso modelo experimental.

Independentemente da necessidade e vantagem de se estender este tipo de investigação às outras catecolaminas e a outros tecidos, o que constituirá o objecto de investigações futuras, parece-nos que os resultados actuais podem e merecem ser discutidos desde já.

Curiosamente, as primeiras experiências com substâncias frenadoras da actividade nuclear - designadas chalonas(ver Houck e Attallah, 1975), foram processadas na presença de catecolaminas, sem o que não se conseguia efectivamente inibir a proliferação celular do modelo em estudo (Bullough e Laurence, 1960, Bullough, 1962). Tal facto não teve, aparentemente, grande repercussão, aparecendo desde então as catecolaminas referidas na literatura relativa ao crescimen

to celular apenas na medida em que são agentes capazes de aumentar os níveis de AMPcíclico intracelular. Este sim, é um agente que tem despertado interesse crescente como candidato a regulador/modulador da actividade nuclear. Há resultados sobre a inibição ou frenação do crescimento celular por parte do AMPcíclico em culturas de fibroblastos (Ryan e Heidrick, 1968, Otten et al, 1971, Burger et al, 1972, Froehlich e Rachmeler, 1972, Rudland et al, 1974 a e b), culturas de células epiteliais pigmentares da retina (Newsome et al, 1974), culturas de células musculares lisas arteriais (Stout et al, 1975), e culturas de células hematopoiéticas geradoras de granulócitos e macrófagos (Kurland et al, 1977, Taetle e Koessler, 1980). Por outro lado, surgiram resultados relativos à existência de níveis de AMPcíclico inferiores ao normal na epiderme com lesões de psoríase, quer em condições basais (Voorhees et al, 1972), quer após estimulação por catecolaminas (Yoshikawa et al, 1975), o mesmo se verificando em modelos de proliferação excessiva da epiderme (Grimm e Marks, 1974, Lowe et al, 1979). Também em células neoplásicas se têm encontrado valores de AMPcíclico inferiores ao normal (Pastan et al, 1975, De Rubertis et al, 1976), referindo-se, por vezes, alterações de receptores adrenérgicos (Sheppard, 1977, Sheppard et al, 1977). Finalmente, está referido que o AMPcíclico atinge os seus níveis mínimos durante a mitose, quando a análise incide sobre o ciclo celular (Millis et al, 1974, Seifert e Rudland, 1974, Zeilig et al, 1976,

Howard e Sheppard, 1981), sem que haja, aparentemente, qualquer modificação dos receptores adrenérgicos beta (Howard e Sheppard, 1981).

Apesar das provas já acumuladas sobre o papel do AMPcíclico como frenador da actividade nuclear, a verdade é que os conhecimentos sobre esse tema são ainda muito rudimentares (veja-se a superficialidade das observaçõs sobre os efeitos das catecolaminas na maior parte dos trabalhos referidos no parágrafo anterior) e por vezes contraditórios (ver Halprin, 1976). Na glândulas salivares, o aumento do AMPcíclico que se segue à estimulação pelas catecolaminas não impede o aumento da actividade nuclear (Takahama e Barka, 1967, Malamud, 1969, Durhan et al, 1974, Muir et al, 1975). Nos carcinomas tireoideus o AMPcíclico não está diminuido mas até está aumentado em relação aos valores normais (Field et al, 1978, Arcangeli et al, 1981).

O controle do crescimento celular continua, na verdade, a apresentar-se como um problema extremamente complexo, perfeitamente aberto à entrada de mais um interveniente, entre tantos outros - as catecolaminas. Aliás, este aspecto da frenação da actividade nuclear pelas catecolaminas, que nos é directamente sugerido pelos nossos resultados morfológicos e que encontra apoio num ou noutro dado de observação, como o síndrome muco-oculo-cutâneo causado pelo practolol (Bowman e Rand, 1980) ou o espessamento da parede das artérias após simpaticectomia (Fronek,1980), não nos parece constituir a única hipótese de efeitos das catecolaminas so-

bre o núcleo celular. Na realidade,há outros efeitos das catecolaminas, como os efeitos "tróficos" sobre as células musculares (Ljung et al, 1979, Campbell et al, 1980, Hermsmeyer e Aprigliano, 1980, Bevan e Tsuru, 1980, Branco et al, 1980, 1981), a influência sobre o tipo e densidade de receptores nas células efectoras (Arnett e Davis, 1979, de Peusner et al, 1979 a e b, Baker e Potter, 1980, Bobik et al, 1980, Wolfe, 1980), a indução específica de síntese proteica no coração (Naftchi et al, 1979), que dependem, obviamente, da chegada de informação ao núcleo celular.

Propomos, portanto, que a captação saturável, extraneuronal, de catecolaminas, que dá acesso preferencial à catecol-O-metiltransférase e que é bloqueável pelos corticosteróides e metabolitos O-metilados das próprias catecolaminas, faz parte do trajecto que leva as catecolaminas ao núcleo. Assim se compreende que seja um sistema geral e que seja um sistema de transporte dotado de um controle, neste caso de tipo"feed-back", a cargo do metabolito O-metilado.

Os fibrócitos revelaram-se como células particularmente eficientes na remoção e metabolização da isoprenalina, por um processo resistente ao bloqueio pelos corticosteróides. Tal característica funcional acrescenta significado à disposição anatómica bem estruturada dos fibrócitos, definindo barreiras celulares à volta dos microvasos, como tivemos oportunidade de observar no coração de Rato, por exemplo. A extensão dessas barreiras era máxima em volta dos microvasos não inervados, em que qualquer plano que pas

sasse pelo lume do vaso seccionava vários fibrócitos entre a camada muscular e o espaço perivascular.

Como dizíamos, as características de captação e metabolização de catecolaminas pelos fibrócitos animam de significado dinâmico aquelas barreias anatómicas.

Tal interpretação não é inteiramente original, embora nova para as estruturas referidas, pois foi anteriormente proposta em função da disposição anatómica especial das células de Schwann nos ilhéus endócrinos do pâncreas (Smith, 1975), e da localização preferencial das enzimas metabolizadoras das catecolaminas nas células gliais do sistema nervoso central (Kaplan et al, 1979), bem como nas células ependimais dos ventrículos cerebrais do plexo coroideu (Kaplan et al, 1979, Lindvall et al, 1980).

Propomos, portanto, que o sistema de captação de catecolaminas não bloqueável pelos corticosteróides, que existe com particular desenvolvimento nos fibrócitos, se destina primordialmente à inactivação das catecolaminas existentes no espaço extracelular. Tal característica conferirá um carácter de "célula diferenciada" ao fibrócito, sobrepondo-se ao conceito anterior de "célula velha, ultrapassada".

Com estas duas propostas julgamo-nos ainda longe de esgotar a descoberta do significado fisiológico da captação extraneuronal das catecolaminas.

Na sequência do que acabamos de expôr, e com base nos nossos resultados e no seu confronto com os exarados na li

teratura, poderíamos sintetizar a nossa hipótese interpretativa dos fenómenos em discussão do seguinte modo:

1) A captação extraneuronal de catecolaminas não é um mecanismo único; a maior parte dos tecidos remove e metaboliza as catecolaminas por mais do que um processo.

2) A captação extraneuronal de catecolaminas parece ser um processo geral das células dos mamíferos. Todos os tecidos estudados com técnicas de análise cinética revelaram um sistema O-metilante de grande afinidade (baixo Km), sensível ao bloqueio pelos corticosteróides. Todas as células observadas se revelaram capazes de fixar as catecolaminas.

3) Há grande variabilidade de tecido para tecido na capacidade de remover e metabolizar catecolaminas por processos não saturáveis, resistentes aos corticosteróides.

4) Os fibrócitos revelaram-se como células especialmente desenvolvidas na capacidade de remover e metilar catecolaminas por um mecanismo resistente aos corticosteróides.

5) As catecolaminas exercem efeitos moduladores da actividade do núcleo celular. Tais efeitos são exercidos intracelularmente, após entrada das catecolaminas na célula pelo sistema de captação sensível aos corticosteróides.

6) O sistema de captação extraneuronal de catecolaminas saturável, sensível aos corticosteróides, não deve ser interpretado como sendo primordialmente um sistema de inactivação de catecolaminas, mas como um sistema de transporte das catecolaminas para locais de actuação intracelula-

res. E evidente, no entanto, que esta captação comparticipa na inactivação das aminas face aos efeitos sobre os receptores de membrana.

7) O sistema de remoção de catecolaminas não saturável, não sensível aos corticosteróides, que está particularmente desenvolvido nos fibrócitos, parece fundamentalmente destinado à remoção e inactivação das catecolaminas existentes no espaço extracelular. Tal interpretação é sugerida pelas características do sistema de inactivação, por um lado, e pela disposição anatómica especial que os fibrócitos assumem nos tecidos, por outro.

RESUMO

Estudámos a captação e metabolização de catecolaminas (mais frequentemente da isoprenalina) por vários tecidos, integrando, tanto quanto possível, os resultados obtidos por doseamento radioquímico das aminas e respectivos metabolitos nos tecidos e líquidos de incubação ou perfusão, com os resultados morfológicos, simples ou autorradiográficos, obtidos a partir das mesmas preparações. Apresentamos os resultados obtidos para cada tipo de tecido estudado, discutindo as conclusões a que nos levaram, (a) quer em relação às particularidades dos vários tecidos, (b) quer na perspectiva dum significado mais geral da captação extraneuronal das catecolaminas.

a) Na veia safena de Cão evidenciou-se a existência dum sistema de transporte de catecolaminas no endotélio. As células musculares lisas revelaram-se como o elemento estrutural de mais peso para a acumulação e metilação da isoprenalina neste vaso, em condições de controle. Os efeitos da cortexona e do U0521 fizeram-se sentir, também, fundamentalmente, através daqueles elementos celulares. No entanto, em termos de economia celular individual, todos os tipos de células observados captaram a isoprenalina. Por ou

tro lado, o efeito da cortexona foi parcial, mesmo em relação à captação pelas células musculares. O tratamento simultâneo com cortexona+U0521 levou a uma marcada acumulação de isoprenalina nos terminais adrenérgicos, efeito bloqueável pela cocaína.

Na artéria aorta de Coelho também se verificou que as células musculares lisas constituem o elemento mais importante para a metabolização da isoprenalina, em condições de controle, apesar das densidades de grãos de prata serem maiores sobre as varicosidades adrenérgicas, reduzindo-se progressivamente nos adipócitos, fibroblastos, vasa vasorum e células musculares. A elastina e o colagéneo constituem substractos para a acumulação de quantidades apreciáveis de isoprenalina. A separação mecânica entre a média e a adventícia introduziu notável perturbação nos processos de captação/metabolização da isoprenalina pelas referidas estruturas. Entretanto foi possível confirmar a importância das células musculares lisas na remoção da isoprenalina pela média isolada e na sensibilidade parcial dos respectivos sistemas de captação à cortexona, por um lado, e a existência, na adventícia, de importantes mecanismos extraneuronais, de reduzida sensibilidade à cortexona, por outro.

As artérias umbilicais humanas, vasos desprovidos de inervação, exibiram um comportamento peculiar e variável. Evidenciaram-se dois sistemas para a captação de catecolaminas, sensíveis a bloqueio pela cortexona ou pela cocaína,

parecendo dar acesso preferencial, respectivamente, à COMT e à MAO. A importância relativa dos dois sistemas foi bastante variável de cordão para cordão, discutindo-se como possíveis factores de variação a idade da gravidez, as concentrações de estrogéneos/progesterona no sangue do feto, e a quantidade de catecolaminas libertada para o sangue do nascituro durante o trabalho de parto.

A perfusão do coração de Rato com solução de Tyrode levou à instalação dum volumoso edema, com dilatação acentuada dos capilares linfáticos. A isoprenalina (0,95 /umol/l) facilitou a perfusão do interstício, por comparação com os corações controle ou perfundidos com uma concentração 10 vezes menor de amina. Tal facto sugere que os efeitos farmacodinâmicos da catecolamina interferem com a cinética da mesma, no coração perfundido. Os pequenos vasos coronários revelaram-se como as estruturas mais eficazes na captação e O-metilação da isoprenalina. O miocárdio propriamente dito tem a maior capacidade de acumulação. A corticosterona afectou a acumulação de isoprenalina, quer nos vasos coronários, quer no miocárdio. As células de Purkinje apresentaram características de acumulação de isoprenalina idênticas às das estruturas neuronais adrenérgicas. Não existe uma relação simples entre compartimentos cinéticos e morfológicos. O coração possui arteríolas não inervadas, muito eficazes na captação de isoprenalina, que se encontram envolvidas por múltiplas camadas de fibroblastos/fibrócitos.

O canal torácico de Cão mostrou maior capacidade de remover e metilar isoprenalina do que os vasos sanguíneos que estudámos, sendo estes mecanismos extraneuronais resistentes aos efeitos da cortexona e do U0521. As autorradiografias revelaram que os fibroblastos/fibrócitos, células muito abundantes neste vaso, são os elementos responsáveis pelas referidas características de captação/metilação extraneuronais do canal torácico.

O estudo de retalhos de pele de Rato com tecido de cicatrização levou à conclusão de que a pele capta e metila isoprenalina com razoável eficácia, e que os fibroblastos jovens têm características de captação/metilação aparentemente diferentes das dos fibrócitos, nomeadamente quanto à eficácia do sistema e sensibilidade aos bloqueadores.

b) No seu conjunto, os nossos resultados levam-nos a concluir que: 1) a captação extraneuronal das catecolaminas não é um mecanismo único; 2) todas as células parecem ser capazes de captar catecolaminas; 3) os fibrócitos são células especialmente dotadas de capacidade de captar isoprenalina por um mecanismo resistente aos corticosteroides; 4) a isoprenalina induziu alterações da morfologia do núcleo celular, sugestivas de frenação de actividade, nas células de preparações tratadas com aquela amina durante 30 minutos.(Uma série adicional de experiências, com aortas de ratos jovens, confirmou aquele tipo de efeitos da isoprenalina, verificando-se que a metanefrina, bloqueador da ca

ptação extraneuronal, os impedia.)5) O sistema de captação extraneuronal de catecolaminas, saturável e sensível aos corticosteroides, aparece-nos como fundamentalmente ligado a efeitos intracelulares das mesmas catecolaminas, nomeadamente a efeitos moduladores da actividade nuclear. 6) O sistema de captação não saturável, resistente aos corticosteróides, que encontrámos com desenvolvimento máximo nos fibrócitos, aparece-nos fundamentalmente como um sistema de inactivação das catecolaminas.

SUMMARY

Uptake and metabolism of catecholamines (mostly isoprenaline) were studied in a series of tissues, through both radiochemical and morphological approaches. The results obtained are presented and discussed as much as possible in an integrated form, referring to the particular tissue under study (a). A more general interpretation of the meaning of extraneuronal uptake of catecholamines is also proposed (b).

a) Dog saphenous vein - Data suggesting an active uptake of isoprenaline through the endothelium were obtained. Smooth muscle appeared as most relevant for the accumulation and O-methylation of isoprenaline, under control conditions. Cortexone and U0521 acted mainly on the smooth muscle cells. Nevertheless, all cell types observed took up the amine, in a quantitatively similar way under individual terms. Cortexone had only a partial effect, even on smooth muscle cells. Adrenergic nerve terminals exhibited a striking accumulation of isoprenaline in cortexone+U0521 treated preparations. Cocaine blocked that accumulation.

Rabbit aorta - Smooth muscle cells again were shown to be the most important structure for isoprenaline methyla-

tion, although silver grain densities, under control conditions, were higher over adrenergic varicosities, fat cells, fibroblasts and vasa vasorum. Elastin and collagen also accumulated a certain amount of isoprenaline. Mechanical stripping of adventitia markedly impaired uptake/metabolism mechanisms in both the isolated media and adventitia. Cortexone non-sensitive methylation in smooth muscle was clearly confirmed in the isolated media. On the other hand, important extraneuronal mechanisms, mostly resistant to blockade by cortexone, were found in the adventitia.

Human umbilical arteries - Two different uptake systems were detected. One of them, cortexone-sensitive, appeared mainly connected to the catechol-O-methyltransferase activity, while the other, cocaine-sensitive, seemed to be related to monoaminoxidase. Predominance of each system was highly variable. Gestation age, foetal estrogen/progesteron concentrations, and the amounts of catecholamines released into the blood of the new-born during labour were discussed as possible factors of variability.

Rat heart - Perfusion with Tyrode solution led to a voluminous oedema, with dilatation of lymphatic cappillaries. Isoprenaline (0.95 µmol/l) increased perfusion of myocardial extracellular space, as compared to control hearts or those perfused with a 10 times lower concentration of amine. Thus, pharmacodynamic effects of isoprenaline interfere with its kinetics, in the perfused heart. Small coronary

vessels exhibited the highest capacity to take up and O-methylate isoprenaline. On the other hand, myocardium proper has the highest accumulating capacity. Corticosterone impaired isoprenaline accumulation in both blood vessels and myocardium. Purkinje cells behave in a way reminiscent of adrenergic neuronal structures. No linear correlation was found between kinetic and morphological compartments. Non-innervated arterioles, encircled by multiple layers of fibroblasts/fibrocytes, are highly endowed with uptake capacity.

Dog thoracic duct - This lymphatic vessel took up and metabolized isoprenaline very efficiently, through cortexone and U0521 resistant mechanisms. Fibroblasts/fibrocytes exist with a high relative frequency in this vessel and contributed to most of the extraneuronal mechanisms, as indicated by autorradiography.

Rat skin/Wound healing tissue - These preparations took up and O-methylated isoprenaline in a way not very different from the blood vessels referred to above. Catecholamine uptake mechanisms of young fibroblasts appear to differ from those of fibrocytes, beeing of lower magnitude and much more sensitive to the usual uptake and methylation blockers.

b) On the whole, the results lead us to conclude that: 1) extraneuronal uptake of catecholamines involves more than one mechanism ; 2) a catecholamine uptake system appears to exist in all mammalian cells; 3) the corticoste

roid-resistant uptake is particularly proeminent in fibrocytes; 4) nuclear morphological alterations were induced by isoprenaline in cells exposed to the amine for 30 minutes. (An additional series of experiments was done to confirm these nuclear effects of isoprenaline. Metanephrine prevented the nuclear effects of isoprenaline.) 5) the saturable, corticosteroid-sensitive extraneuronal uptake system of catecholamines appears as mainly related to the intracellular effects of the amines, particularly to a nuclear modulating activity. 6) Non-saturable, corticosteroid-resistant uptake of catecholamines, most important in fibrocytes, appears mainly as an inactivating system.

BIBLIOGRAFIA

AALKJAER, C., MULVANY, M.J.: Functional and morphological evidence that small resistance vessels in human omentum have little adrenergic innervation. Acta Physiol. Scand. 109: 9A (C11) (1980)

AGARWAL, K.N., GARBY, L.: Inhibition by corticosteroids of red cell lysis in vitro. Acta Endocrinol. 93 (suppl): 3-27 (1964)*

ALMGREN, O., JONASON, J.: The effect of corticosterone on extraneuronal amine uptake and effector response in rat salivary glands. J.Pharm.Pharmacol. 25: 537-543 (1973)

ALMGREN, O., JONASON, J.: Functional significance of neuronal and extraneuronal transmitter uptake in rat salivary glands. The effect of protriptyline and normetanephrine. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 283: 1-20 (1974)

ARCANGELI, P., TOCCAFONDI, R., ROTELLA, C.M., ATERINI, S., TANINI, A., BORELLI, D., LODDI, L.: Dissociation in the response of the adenylate cyclase system to thyrotropin and prostaglandin E_2 in human thyroid carcinoma tissue. Cancer 48: 757-761 (1981)

ARNETT, C.D., DAVIS, J.N.: Denervation-induced changes in alpha and beta adrenergic receptors of the rat submandibular gland. J.Pharmacol.Exp.Ther. 211: 394-400 (1979)

ARTAL, R., LAM, R.W., ELIOT, J., HOBEL, C.J., FISHER, D.A.: Circulating catecholamines prior to and after delivery. Em Usdin, E., Kopin, I.J., Barchas, J.: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Pergamon Press, New

York (1979) pp 951-953

AVAKIAN, O.V., GILLESPIE, J.S.: Uptake of noradrenaline by adrenergic nerves, smooth muscle and connective tissue in isolated perfused arteries and its correlation with the vasoconstrictor response. Brit.J.Pharmacol. 32: 168-184 (1968)

AXELROD, J., WEIL-MALHERBE, H., TOMCHICK, R.: The physiological disposition of ^{3}H-epinephrine and its metabolite metanephrine. J.Pharmacol.Exp.Ther.: 127: 251-256(1959)

BAKER, S.P., POTTER, L.T.: Biochemical studies cardiac β-adrenoceptors, and their clinical significance. Circulation Res. Part II. 46: I 38-42 (1980)

BARSOTTI, P., MARINOZZI, V.: A morphological study on the early changes in hepatocyte nuclei induced by low doses of α-amanitin. J.Submicr. Cytol. 11: 13-23 (1979)

BAUSHER, L.P., SEARS, M.L.: Potentiation of the effects of topical epinephrine on the pupil and intraocular pressure in the sympathetically denervated rabbit eye by a catechol-O-methyl transferase inhibitor. Invest. Ophtalmol. 15: 854-857 (1976)

BELFRAGE, E., FREDHOLM, B.B., ROSELL, S.: Effect of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on the vascular and metabolic responses to noradrenaline, isoprenaline and sympathetic nerve stimulation in canine subcutaneous adipose tissue. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 300: 11-17 (1977)

BELL, C., GRABSCH, B.: Involvement of uptake 2 in the termination of activity of neurogenic noradrenaline in the rat isolated atrium. J.Physiol. 254: 203-212 (1976)

BENNETT, H.S.: The concept of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping. J.biophys.biochem.Cytol. 2: nº 4 suppl.pp 99-103 (1956)*

BEVAN, J.A., BEVAN, R.D., DUCKLES, S.P.: Adrenergic regulation of vascular smooth muscle. Em Bohr,D.F., Somlyo, A.P., Sparks, H.V., Geiger, S.R.: Vascular smooth muscle. The Cardiovascular System. Handbook of Physiology. Ameri - can Physiological Society, Bethesda, Maryland (1980) pp. 515-566

BEVAN, R.D., TSURU, H.: Changes in the tunica media of the rabbit ear artery after denervation areage related. Em Bevan, J.A., Godfraind, T., Maxwell, R.A., Vanhoutte, P.M.: Vascular neuroeffector mechanisms. Raven Press, New York (1980) pp 119-123

BLOOM, W., FAWCETT, D.W.: A textbook of histology. W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto. 9th Ed. (1968)

BOBIK, A., KORNER, P., CARSON, V., OLIVER, J.R.: Cardiac B-adrenoceptors and adenyl cyclase activity in rabbit heart during conditions of altered sympathetic activity. Circ.Res. 46 (Suppl I): I 43-44 (1980)

BOWMAN, W.C., RAND, M.J.: Texbook of Pharmacology. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 2th Ed. (1980)

BÖNISCH, H.: Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 303: 121-131, (1978)

BÖNISCH, H., GRAEFE, K.-H., TRENDELENBURG, U.: The determination of the rate constant for the efflux of an amine from efflux curves for amine and metabolite. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 304: 147-155 (1978)

BÖNISCH, H., TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 283: 191-218 (1974)

BÖNISCH, H., UHLIG, W., TRENDELENBURG, U.: Analysis of

the compartments involved in the extraneuronal storage and metabolism of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn--Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 283: 223-244 (1974)

BÖNISCH, H., UHLIG, W., TRENDELENBURG, U.: Temperature sensitivity of the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 306: 229-239 (1979)

BOUTEILLE, M., LAVAL, M., DUPUY-COIN, A.M.: Localization of nuclear functions as revealed by ultrastructural autoradiography and cytochemistry. Em Busch, H.: The Cell Nucleus (I) Academic Press, New York, London (1974) pp 5-71

BRANCO, D., AZEVEDO, I., OSSWALD, W.: Clamping of the canine saphenous vein results in denervation and impairment of extraneuronal mechanisms. Abst. (339) 8th Intern. Congr.Pharmacol.Tokyo (1981)

BRANCO, D., AZEVEDO, I., TEIXEIRA, F., TEIXEIRA, A.A., OSSWALD, W.: Influência da desnervação simpática sobre mecanismos extraneuronais da veia safena. Arq.Inst.Farm.Terap.Exp.Coimbra 18: 14 (1980)

BRANCO, D., OSSWALD, W.: The fate of isoprenaline after inhibition of O-methylation and of extraneuronal uptake. Eur.J.Pharmacol. 67: 247-253 (1980)

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

BRANDÃO, F.: Inactivação do mediador simpático numa estrutura vascular. Tese de doutoramento. Porto. 1979

BULLOUGH, W.S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. Biol.Rev. 37: 307 (1962)*

BULLOUGH, W.S., LAURENCE, E.B.: The control of epidermal mitotic activity in the mouse. Proc.R.Soc.London Sci. B 151: 517 (1960)*

BURGEN, A.S.V., IVERSEN, L.L.: The inhibition of nora-

drenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. Br.J.Pharmacol. 25: 34-49 (1965)

BURGER, M.M., BOMBIK, B.M., BRECKENRIDGE, B.M., SHEPPARD, J.R.: Growth control and cyclic alterations of cyclic AMP in the cell cycle. Nature (New Biol) 239: 161--163 (1972)

BURN, J.H.: The action of tyramine and ephedrine. J. Pharmacol.Exp.Ther. 46: 75-95 (1932)

BURNSTOCK, G.: Structure of smooth muscle and its innervation. Em Bülbring, E., Brading, A., Jones, A., Tomita, T.: Smooth muscle. Edward Arnold,Ltd (1970) pp 1-69

BURNSTOCK, G., COSTA, M.: Adrenergic neurons. Chapman and Hall, London (1975)

BURNSTOCK, G., McCULLOCH, M.W., STORY, D.F., WRIGHT, M.E.: Factors affecting the extraneuronal inactivation of noradrenaline in cardiac and smooth muscle. Br. J.Pharmacol. 46: 243-253 (1972)

BURNSTOCK, G., McLEAN, J.R., WRIGHT, M.: Noradrenaline uptake by non-innervated smooth muscle. Br.J.Pharmacol. 43: 180-189 (1971)

CAESAR, R., EDWARDS, G.A., RUSKA, H.: Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. J.biophy. biochem.Cytol. 3: 867-878 (1957)*

CALLINGHAM, B.A., BURGEN, A.S.V.: The uptake of isoprenaline and noradrenaline by the perfused rat heart. Molec. Pharmacol. 2: 37-42 (1966)

CAMPBELL, G.R., CHAMLEY-CAMPBELL, J., ROBINSON, R., HERMSMEYER, K.: Trophic interactions between nerve and vascular smooth muscle in transplants to the anterior eye chamber. Em Bevan, J.A., Godfraind, T., Maxwell, R.A., Vanhoutte, P.M.: Vascular neuroeffector mechanisms. Raven Press, New York (1980) pp 107-113

CARAMONA, M.M.: Relationship of type of adrenergic innervation and monoamine oxidase activities in some blood vessels. Abst.(335) 8th Intern.Congr.Pharmacol. Tokyo(1981)

CLARK, S.L.: The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. J.biophys.biochem.Cytol.5: 41-49 (1959)*

CLARKE, D.E., JONES, C.J., LINLEY, P.A.: Histochemical fluorescence studies on noradrenaline accumulation by uptake$_2$ in the isolated rat heart. Br.J.Pharmacol. 37: 1-9 (1969).

COIMBRA, A., RIBEIRO-SILVA, A., OSSWALD, W.: Fine structural and autoradiographic study of the adrenergic innervation of the dog lateral saphenous vein. Blood Vessels 11: 128-144 (1974)

COHN, V.H.: Transmembranal movement of drug molecules. Em La Du, B.W., Mandel, H.G., Way, E.L.: Fundamentals of drug metabolism and drug disposition. Williams and Wilkins Comp.Baltimore (1971) pp 3-21

COHN, Z.A.: The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. I. Metabolic requirements as defined by the use of inhibitors. J.Exp.Med. 124: 557-571 (1966)

COHN, Z.A., BENSON, B.: The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, Cytochemistry and Biochemistry. J.Exp.Med. 121: 153-170 (1965)

COHN, Z.A., EHRENREICH, B.A.: The uptake, storage and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages. J.Exp.Med. 129: 201-225 (1969)

COHN, Z.A., FEDORKO, M.E., HIRSCH, J.G.: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes.V.The formation of macrophage lysosomes. J.Exp.Med. 123: 757-766 (1966)

COHN, Z.A., PARKS, E.: The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. III. The induction of vesicle forma

tion by nucleosides and nucleotides. J.Exp.Med. 125: 457--468 (1967).

COX, J.P., KARNOVSKY, M.L.: The depression of phagocytosis by exogenous cyclic nucleotides, prostaglandins, and theophylline. J.Cell Biol. 59: 480-490 (1973)

DAVIES, P., ALLISON, A.C.: The release of hydrolytic enzymes from phagocytic and other cells participating in acute and chronic inflammation. Em Vane, J.R., Ferreira, S. H.: Inflammation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1978) pp 267-294

DERENZINI, M., MOYNE, G.: The nucleolar origin of certain perichromatin-like granules. A study with α-amanitin. J.Ultrastruct. Res. 62: 213-219 (1978)

DRASKÓCZY, P.R., TRENDELENBURG, U.: Intraneuronal and extraneuronal accumulation of sympathomimetic amines in the nictitating membrane of the cat. J.Pharmacol.Exp.Ther. 174: 290-306 (1970)

DURHAN, J.P., BASERGA, R., BUTCHER, F.R.: Lack of correlation between catecholamine analog effects on cyclase AMP levels and adenylate cyclase activity and the stimulation of DNA synthesis in mouse parotid gland. Em Clarkson, B., Baserga, R.: Control of proliferation in animal cells. Cold Spring Harbor, New York (1974) pp 595-607 *

EBNER, F.: On the involvement of intracellular β-adrenoceptors in the inotropic response to catecholamines. Naunyn--Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 308: R10 (1979)

EBNER, F.: The inhibition by (±)-propranolol of the positive inotropic effects of (±)-isoprenaline and (-)-noradrenaline. Competitive antagonism and saturable uptake. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 316: 96-107 (1981)

EHINGER, B., SPORRONG, B.: Neuronal and extraneuronal localization of noradrenaline in the rat heart after perfusion at high concentration. Experientia 24: 265-266 (1968)*

EHRENREICH, B.A., COHN, Z.A.: The uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro. J.Exp.Med. 126: 941-958 (1967)

EHRENREICH, B.A., COHN, Z.A.: The fate of peptides pinocytosed by macrophages in vitro. J.Exp.Med. 129: 227-245 (1969)

EISENFELD, A.J., AXELROD, J., KRAKOFF, L.: Inhibition of the extraneuronal accumulation and metabolism of norepinephrine by adrenergic blocking agents. J.Pharmacol.Exp. Ther. 156: 107-113 (1967a)

EISENFELD, A.J., LANDSBERG, L., AXELROD, J.: Effect of drugs on the accumulation and metabolism of extraneuronal norepinephrine in the rat heart. J.Pharmacol.Exp.Ther. 158: 378-385 (1967b)

VON EULER, U.S.: The catecholamine content of various organs of the cat after injections and infusions of adrenaline and noradrenaline. Circ.Res. 4: 647-652 (1956)

FARNEBO, L.-O.: Histochemical studies on the uptake of noradrenaline in the perfused rat heart. Br.J.Pharmacol.34: 227P-228P (1968)

FARNEBO, L.-O., MALMFORS, T.: Histochemical studies on the uptake of noradrenaline and x-methyl-noradrenaline in the perfused rat heart. Eur.J.Pharmacol. 5: 313-320 (1969)

FERREIRA, S.H., VANE, J.R.: Mode of action of anti-inflammatory agents which are prostaglandin synthetase inhibitors. Em Vane, J.R., Ferreira, S.H.: Anti-inflammatory drugs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979) pp 348-398

FIEBIG, E.R., TRENDELENBURG, U.: The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 303: 21-35 (1978a)

FIEBIG, E.R., TRENDELENBURG, U.: The kinetic constants

for the extraneuronal uptake and metabolism of ^{3}H-(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 303: 37-45 (1978b)

FIELD, J.B., BLOOM, G., CHOU, M.C.Y.: Effects of thyroid-stimulating hormone on human thyroid carcinoma and adjacent normal tissue. J.Clin.Endocrinol.Metab. 47: 1052--1058 (1978)*

VON FIGURA, K., KRESSE, H.: Quantitative aspects of pinocytosis and the intracellular fate of N-acetyl-α-D-glucosaminidase in Sanfilipo B fibroblasts. J.Clin.Invest. 53: 85-90 (1974)

FROEHLICH, J.E., RACHMELER, M.: Effect of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate on cell proliferation. J.Cell Biol. 55: 19-31 (1972)

FRONEK, K.: New view on the sympathectomy of the arterial wall. Abst. (477) 12th World Congress of Angiology. Atenas (1980)

GAJKOWSKA, B., PUVION, E., BERNHARD, W.: Unusual perinucleolar accumulation of ribonucleoprotein granules induced by camptothecin in isolated liver cells. J.Ultrastruct.Res. 60: 335-347 (1977)

GERSHFELD, N.L., PAK, C.Y.C.: Acceleration of structural changes in monolayers by steroid hormones. Nature 219: 495-496 (1968)

GERSHON, M.D., ROSS, L.L.: Radioisotopic studies of the binding, exchange, and distribution of 5-hydroxytryptamine synthesized from its radioactive precursor. J.Physiol. 186: 451-476 (1966a)

GERSHON, M.D., ROSS, L.L.: Location of sites of 5-hidroxytryptamine storage and metabolism by radioautography. J.Physiol. 186: 477-492 (1966b)

GHADIALLY, F.N.: Ultrastructural pathology of the cell. Butterworths, London, Boston (1975)

GILLESPIE, J.S.: Extraneuronal uptake of catecholamines in smooth muscle and connective tissue. Em Paton, D. M.: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines. Raven Press, New York (1976) pp 325-354

GILLESPIE, J.S., HAMILTON, D.N.H.: A possible active transport of noradrenaline into arterial smooth muscle cells. J.Physiol. (Lond.) 192: 30P (1967)

GILLESPIE, J.S., HAMILTON, D.N.H., HOSIE, R.J.A.: The extraneuronal uptake and localization of noradrenaline in the cat spleen and the effect on this of some drugs, of cold and of denervation. J.Physiol. (Lond.) 206: 563-590 (1970)

GILLESPIE, J.S., MUIR, T.C.: Species and tissue variation in extraneuronal and neuronal accumulation of noradrenaline. J.Physiol. (Lond.) 206: 591-604 (1970)

GILLIS, C.N.: Extraneuronal transport of noradrenaline in the lung. Em Paton, D.M.: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines. Raven Press, New York (1976) pp 281-297

GIRARDIER, L., POLLET, M. (1964). Helv.Physiol.Pharmacol.Acta 16: C72, citado por Sommer, J.R., Johnson, E.A.: Cardiac muscle. A comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers. J.Cell Biol. 36: 497-526 (1968)

GOKHALE, S.D., GULATI, O.D., KELKAR, L.V., KELKAR, V. V.: Effect of some drugs on human umbilical artery in vitro. Br.J.Pharmac.Chemother. 27: 332-346 (1966)

GOLDSTEIN, L.: Movement of molecules between nucleus and cytoplasm. Em Busch, H.: The Cell Nucleus (I), Academic Press, Inc., New York, London (1974) pp 387-438

GRAEFE, K.-H.: Methodology of catecholamine transport studies: definition of terms. Em Paton, D.M.: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines.Raven Press, New York (1976) pp 7-35

GRAEFE, K.-H., BÖNISCH, H., FIEBIG, R., TRENDELENBURG, U.: Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines in isolated perfused hearts. Proc.6th Int.Congr.Pharmacol., Helsinki (1975) vol 2, pp 117-130

GRAEFE, K.-H., STEFANO, F.J.E., LANGER, S.Z.: Prefential metabolism of (-)-^{3}H-norepinephrine trough the deaminated glycol in the rat vas deferens. Biochem.Pharmacol. 22: 1147-1160 (1973)

GRAEFE, K.-H., TRENDELENBURG, U.: The effect of hydrocortisone on the sensitivity of the isolated nictitating membrane to catecholamines. Relationship to extraneuronal uptake and metabolism. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 286: 1-48 (1974)

GRIMM, W., MARKS, F.: Effect of tumor-promoting phorbol esters on the normal and the isoproterenol-elevated level of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in mouse epidermis in vivo. Cancer Res. 34: 3128-3134 (1974)

GUIMARÃES, S., AZEVEDO, I., CARDOSO, W., OLIVEIRA, M. C.: Relation between the amount of smooth muscle of venous tissue and the degree of supersensitivity to isoprenaline caused by inhibition of catechol-O-methyltransferase. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 286: 401-412 (1975)

GUIMARÃES, S., PAIVA, M.Q.: The role played by the extraneuronal system in the disposition of noradrenaline and adrenaline in vessels. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 296: 279-287 (1977)

GULATI, O.D., SIVARAMAKRISHNA, N.: Kinetics and some characteristics of uptake of noradrenaline by the human umbilical artery. Br.J.Pharmacol. 53: 152-154 (1975)

HALPRIN, K.M.: Cyclic nucleotides and epidermal cell proliferation. J. Invest.Derm. 66: 339-343 (1976)

HARGENS, A.R., ZWEIFACH, B.W.: Contractile stimuli in collecting lymph vessels. Am.J.Physiol. 233:H57-H65 (1977)

HEAD, R.J., DE LA LANDE, I.S., IRVINE, R.J., JOHNSON, S.M.: Uptake and O-methylation of isoprenaline in the rabbit ear artery. Blood Vessels 17: 229-245 (1980)

HEGAB, E.S., FERRANS, V.J.: A histochemical study of the esterases of the rat heart. Am. J. Anat. 119: 235-262 (1966)

HELENTJARIS, T.G., LOMBARDI, P.S., GLASGOW, L.A.: Effect of cytochalasin B on the adhesion of mouse peritoneal macrophages. J.Cell Biol. 69: 407-414 (1976)

HERMSMEYER, K., APRIGLIANO, O.: Cellular mechanisms of the neurotrophic influence in vascular muscle. Em Bevan,J. A., Godfraind, T., Maxwell, R.A.., Vanhoutte, P.M.: Vascular neuroeffector mechanisms. Raven Press, New York (1980) pp 113-119

HERTTING, G.: The fate of ^{3}H-isoproterenol in the rat. Biochem.Pharmacol. 13: 1119-1128 (1964)

HIBBS, R.G., FERRANS, V.J.: An ultrastructural and histochemical study of rat atrial myocardium. Am. J. Anat. 124: 251-280 (1971)

HIMMS-HAGEN, J.: Effects of catecholamines on metabolism. Em Blaschko, H., Muscholl, E.: Catecholamines. Handbook of Experimental Pharmacology. vol XXXIII. Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1972) pp 363-462

HOFFSTEIN, S., SOBERMAN, R., GOLDSTEIN, I., WEISSMANN, G.: Concanavalin A induces microtubule assembly and specific granule discharge in human polymorphonuclear leukocytes. J.Cell Biol. 68: 781-787 (1976)

HOFFSTEIN, S., WEISSMANN, G.: Microfilaments and microtubules in calcium ionophore-induced secretion of lysosomal enzymes from human polymorphonuclear leukocytes. J.Cell Biol. 78: 769-781 (1978)

HOUCK, J.C., ATTALLAH, A.M.: Chalones (specific and en-

dogenous mitotic inhibitors) and cancer. Em Becker, F.F.: Cancer Biology of tumors: cellular biology and growth. Plenum Press, New York, London (1975) pp 287-326

HOWARD, R.F., SHEPPARD, J.R.: Cell cycle changes in the adenylate cyclase of C6 glioma cells. J.Cell Biol. 90: 169-175 (1981)

HURWITZ, L., McGUFFEE, L.J.: Desensitization phenomena in smooth muscle. Em Kalsner, S.: Trends in autonomic pharmacology. Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich (1979) pp 251-264

IVERSEN, L.L.: The uptake of catecholamines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. Brit.J.Pharmacol. 25: 18--33 (1965)

JACOBOWITZ, D., BRUS, R.: A study of extraneuronal uptake of norepinephrine in the perfused heart of the guinea-pig. Europ.J.Pharmac. 15: 274-284 (1971)

JAMES, T.N., SPENCE, C.A.: Distribution of cholinesterase within the sinus node and AV node of the human heart. Anat.Rec. 155: 151-161 (1966)

JOHNSON, P.C.: The myogenic response. Em Bohr, D. F., Somlyo, A.P., Sparks, H.V., Geiger, S.R.: Vascular smooth muscle. The Cardiovascular System. Handbook of Physiology. American Physiological Society, Bethesda, Maryland (1980) pp 409-442

JOHNSON, S.M., DE LA LANDE, I.S.: Action of deoxycorticosterone acetate on the central artery of the rabbit ear. Blood Vessels 15: 231-246 (1978)

KALSNER, S.: Mechanism of hydrocortisone potentiation of responses to epinephrine and norepinephrine in rabbit aorta. Circ.Res. 24: 383-396 (1969a)

KALSNER, S.: Steroid potentiation of responses to sympathomimetic amines in aortic strips. Br.J.Pharmacol. 36:

582-593 (1969b)

KALSNER, S.: Mechanisms of inactivation of noradrenaline in the iris sphincter, tracheal muscle and facial artery of cattle: Implications for beta-adrenoceptor mediated responses. Br.J.Pharmacol. 64: 545-552 (1978)

KALSNER, S., NICKERSON, M.: Disposition of norepinephrine and epinephrine in vascular tissue , determined by the technique of oil immersion.J.Pharmacol.Exp.Ther. 165: 152-165 (1969a)

KALSNER, S., NICKERSON, M.: Effects of a haloalkylamine on responses to and disposition of sympathomimetic amines. Br. J.Pharmacol. 35: 440-455 (1969b)

KAMEYA, Y.: An electronmicroscope study on the uterine smooth muscle. J.Jap.Obstet. and Gynaec.Soc. 11: 33-47 (1964)*

KAPLAN, G.P., HARTMAN, B.K., CREVELING, C.R.: Non-neuronal localization of catechol-O-methyltransferase in brain. Em Usdin, E., Kopin, I.J., Barchas, J.: Catecholamines: basic and clinical frontiers. Pergamon Press, New York (1979) pp 1354-1356

KARRER, H.E.: An electron microscope study of the aorta in young and in aging mice. J.Ultastruct.Res. 5: 1-27 (1961)

KAUMANN, A.J.: Adrenergic receptors in heart muscle: relations among factors influencing the sensitivity of the cat papillary muscle to catecholamines. J.Pharmacol.Exp. Ther. 173: 383-398 (1970)

KAUMANN, A.J.: Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 273: 134-153 (1972)

KLOPPER, A.: Placental metabolism. Em Hytten, F., Chamberlain, G.: Clinical Physiology in Obstetrics, Blackwell

Scientific Publications, Oxford, London (1980) pp 441-467

KURLAND, J.I., HADDEN, J.W., MOORE, M.A.S.: Role of cyclic nucleotides in the proliferation of committed granulocyte-macrophage progenitor cells. Cancer Res. 37:4534--4538 (1977)

LAGERCRANTZ, H., BISTOLETTI, P., LUNELL, N.O.: Catecholamine release in the human fetus and newborn infant. Em Usdin, E., Kopin, I.J., Barchas, J.: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Pergamon Press, New York (1979) pp 912-914

LAKATTA, E.G.: Age-related alterations in the cardiovascular response to adrenergic mediated stress. Federation Proc. 39: 3173-3177 (1980)

LEVIN, J.A.: 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 (1974)

LEVIN, J.A., WILSON, S.E.: The effect of monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase inhibitors on the accumulation and metabolism of [l-^{3}H] - norepinephrine by the adventitia and media of rabbit aorta. J.Pharmacol. Exp.Ther. 203: 598-609 (1977)

LEVIN, J.A., WILSON, S.E.: The effect of 6-hydroxydopamine on the disposition of norepinephrine in the rabbit aorta. J.Pharmacol.Exp.Ther. 217: 162-169 (1981)

LIGHTMAN, S.L., IVERSEN, L.L.: The role of uptake$_2$ in the extraneuronal metabolism of catecholamines in the isolated rat heart. Br. J.Pharmacol. 37: 638-649 (1969)

LINDMAR, R., MUSCHOLL, E.: Die Wirkung von Pharmaka auf die Elimination von Noradrenalin aus der Perfusionsflüssigkeit und die Noradrenalinaufnahme in das isolierte Herz. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 247: 469--492 (1964)

LINDVALL, M., HARDEBO, J.E., OWMAN, Ch.: Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines in the choroid plexus. Acta Physiol.Scand. 108: 215-221 (1980)

LJUNG, B., LUNDBERG, J.M., DAHLSTROM, A., KJELLSTEDT, A.: Structural and functional ontogenetic development of the rat portal vein after neonatal 6-hydroxydopamine treatment. Acta Physiol. Scand. 106: 271-279 (1979)

LOEWENSTEIN, W.R., PENN, R.D.: Intercellular communication and tissue growth. II. Tissue regeneration. J.Cell Biol. 33: 235-242 (1967)

LOWE, N.J., DUELL, E., VOORHEES, J.J.: Proliferative epidermis of essential fatty acid deficient mice has reduced cyclic AMP content. Br. J.Derm. 101: 33-38 (1979)

LUCHELLI-FORTIS, M.S., LANGER, S.Z.: 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-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 287: 261-275 (1975)

LUNDVALL, J., GUSTAFSSON, D., HILLMAN, J.: Beta-adrenergic dilator interaction with the constrictor response in resistance vessels of skin and skeletal muscle during hemorrhage. Acta Physiol.Scand. 109: 9A (C12) (1980)

LUNDVALL, J., HILLMAN, J.: Noradrenaline evoked beta adrenergic dilatation of precapillary sphincters in skeletal muscle. Acta Physiol.Scand. 102: 126-128 (1978)

LUNDVALL, J., JÄRHULT, J.: Beta-adrenergic dilator component of the sympathetic vascular response in skeletal muscle. Influence on the microcirculation and on transcapillary exchange. Acta Physiol. Scand. 96: 180-192 (1976)

MACK, F., BÖNISCH, H.: Dissociation constants and lipophilicity of catecholamines and related compounds. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 310: 1-9 (1979)

MALAMUD, D.: Adenyl cyclase: relationship to stimulated DNA synthesis in parotid glands. Biochem.Biophys. Res. Commum. 35: 754-764 (1969)*

MALMFORS, T.: Fluorescent histochemical studies on the uptake, storage and release of catecholamines. Circ.Res., Suppl III to Vols.XX and XXI (1967) pp III 25-42

MAXWELL, R.A., ECKHARDT, S.B., WASTILA, W.B.: Concerning the distribution of endogenous norepinephrine in the adventitial and media-intimal layers of the rabbit aorta and the capacity of these layers to bind tritiated norepinephrine. J.Pharmacol.Exp.Ther. 161: 34-39 (1968)

MAZUR, M.T., WILLIAMSON, J.R.: Macrophage deformability and phagocytosis. J.Cell Biol. 75: 185-199 (1977)

MELBY, J.C.: Clinical pharmacology of systemic corticosteroids. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol. 17: 511-527 (1977)

MILLER, M.D., MARSHALL, J.M.: Uterine response to nerve stimulation; relation to hormonal status and catecholamines. Am.J.Physiol. 209: 859-865 (1965)

MILLIS, A.J.T., FORREST, G.A., PIOUS, D.A.: Cyclic AMP dependent regulation of mitosis in human lymphoid cells. Exp.Cell Res. 83: 335-343 (1974)

MONNERON, A., BURGLEN, J., BERNHARD, W.: Action of toyo camycin on nucleolar fine structure and function. J.Ultrastruct.Res. 32: 370-389 (1970)

MUIR, A.R.: Further observations on the cellular structure of cardiac muscle. J.Anat. 99: 27-46 (1965)

MUIR, A.R.: The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. J.Anat. 101: 239--261 (1967)

MUIR, T.C., POLLOCK, D., TURNER, C.J.: The effects of electrical stimulation of the autonomic nerves and of drugs on the size of salivary glands and their rate of cell divi-

sion. J.Pharmacol.Exp.Ther. 195: 372-381 (1975)

NAFTCHI, N.E., TULCHIN, N.W., HELDMAN, J., CIARANELLO, R.D., AXELROD, J.: Relationship between B-adrenergic receptor and specific myocardial protein synthesis. Em Usdin, E., Kopin, I.J., Barchas, J.: Catecholamines: basic and clinical frontiers. Pergamon Press, New York (1979) pp 462--464

NESHEIM, B.: Comparison of alpha and beta-receptor stimulation in the circular and longitudinal muscle of the oestrogen and progesterone dominated rabbit uterus. Acta Pharmacol. St Toxicol. 34: 295-304 (1974)

NEWSOME, D.A., FLETCHER, R.T., ROBISON, W.G. JR., KENYON, K.R., CHADER, G.J.: Effects of cyclic AMP and sephadex fractions of chick embryo extract on cloned retinal pigmented epithelium in tissue culture. J.Cell Biol. 61: 369-382 (1974)

NICKERSON, M., BERGHOUT, J., HAMMERSTROM, R.N.: Mechanism of the lethal effect of epinephrine in rats. Am.J. Physiol. 160: 479-484 (1950)

VAN ORDEN III, L.S.: Application of histochemistry, electron microscopy, autoradiography, and imunocytochemistry to studies of neuronal and extraneuronal transport of noradrenaline. Em Paton, D.M.: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines. Raven Press, New York (1976) pp 37-47

OSSWALD, W., BRANCO, D.: The effects of drugs and denervation on removal and accumulation of noradrenaline in the perfused hind-limb of the dog. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 277: 175-190 (1973)

OSSWALD, W., GARRETT, J., GUIMARÃES, S.: Extraneuronal uptake and metabolism in dog vascular structures. Proc. 6th Int.Congr.Pharmacol.Helsinki (1975) vol.2, pp 149-158

OTTEN, J., JOHNSON, G.S., PASTAN, I.: Cyclic AMP levels

in fibroblasts: Relationship to growth rate and contact inhibition of growth. Biochem.Biophys.Res.Commun. 44: 1192--1198 (1971)*

PAGER, J.: Etude morphometrique du systeme tubulaire transverse du myocarde ventriculaire de rat. J.Cell Biol. 50: 233-237 (1971)

PAIVA, M.Q., GUIMARÃES, S.: A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 303: 221-228 (1978)

PASTAN, I.H., JOHNSON, G.S., ANDERSON, W.B.: Role of cyclic nucleotides in growth control. Ann.Rev.Biochem. 44: 491-522 (1975)

PATON, D.M.: Characteristics of uptake of noradrenaline by adrenergic neurons. Em Paton, D.M.: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines, Raven Press, New York (1976) pp 49-66

DE PEUSNER, I.C.W., STEFANO, F.J.E., PEREC, C.J.: Effects of sympathectomy on the in vivo α and β-responses of the parotid gland. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 308: 211-216 (1979a)

DE PEUSNER, I.C.W., PEREC, C.J., STEFANO, F.J.E.:Effects of sympathectomy on the in vitro α and β-responses of the parotid gland. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 308: 217-221 (1979b)

RAAB, W.: The pathogenic significance of adrenaline and related substances in the heart muscle. Exp.Med.Surg.1: 188-225 (1943)*

RAAB, W., GIGEE, W.: Specific avidity of the heart muscle to absorb and store epinephrine and norepinephrine.Cir. Res. 3: 553-558 (1955)

RECHER, L., BRIGGS, L.G., PARRY, N.T.: A reevaluation of nuclear and nucleolar changes induced *in vitro* by actino-

mycin D. Cancer Res. 31: 140-151 (1971)

RECHER, L., CHAN, H., BRIGGS, L., PARRY, N.: Ultrastructural changes inducible with the plant alkaloid camptothecin. Cancer Res. 32: 2495-2501 (1972)

RECHER, L., SYKES, J.A., CHAN, H.: Further studies on the mammalian cell nucleolus. J.Ultrastruct. Res. 56: 152-163 (1976)

REYNOLDS, R.C., MONTGOMERY, P.O'B., HUGHES, B.: Nucleolar cups produced by actinomycin D. Cancer Res., 24: 1269--1277 (1964)

RHODIN, J.A.G.: The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. J.Ultrastruct . Res. 18: 181-223 (1967)

RHODIN, J.A.G.: Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. J.Ultrastruct. Res. 25: 452-500 (1968)

RINGROSE, P.S., PARR, M.A., McLAREN, M.: Effects of anti-inflammatory and other compounds on the release of lysosomal enzymes from macrophages. Biochem.Pharmacol. 24: 607--614 (1975)

RIPPE, B., FOLKOW, B.: Simultaneous measurements of capillary filtration and diffusion capacities during graded infusions of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine into the rat hindquearter vascular bed. Acta Physiol. Scand. 109: 265-273 (1980)

RIPPE, B., KAMIYA, A., FOLKOW, B.: Transcapillary passage of albumin, effects of tissue cooling and of increases in filtration and plasma colloid osmotic pressure. Acta Physiol.Scand. 105: 171-187 (1979)

ROBERTS, J.M., INSEL, R.A., GOLDFIEN, R., GOLDFIEN, A.: Increased uterine alpha-adrenergic binding sites with estrogen treatment. Clin.Res. 25 (3): 465 A (1977a)

ROBERTS, J.M., INSEL, P.A., GOLDFIEN, R.D., GOLDFIEN, A.: Alpha-adrenoceptors but not beta-adrenoceptors increase in rabbit uterus with oestrogen. Nature 270: 624-625 (1977b)

ROBERTS, J.M., GOLDFIEN, R.D., GOLDFIEN, A., INSEL, P. A.: Regulation of alpha-adrenergic response by estrogen. Em Usdin, E., Kopin, I.J., Barchas, J.: Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Pergamon Press, New York, Oxford (1979) pp 441-443

ROSS, R., KLEBANOFF, S.J.: The smooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins. J. Cell Biol. 50: 159-171 (1971)

DE RUBERTIS, F.R., CHAYOTH, R., FIELD, J.B.: The content and metabolism of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in adenocarcinoma of the human colon. J.Clin.Invest. 57: 641 (1976)

RUDLAND, P.S., GOSPODARD, D., SEIFERT, W.: Activation of guanyl cyclase and intracellular cyclic GMP by fibroblast growth factor. Nature 250: 741-742 (1974a)

RUDLAND, P.S., SEELEY, M., SEIFERT, W.: Cyclic GMP and cyclic AMP levels in normal and transformed fibroblasts. Nature 251: 417-419 (1974b)

RYAN, W.L., HEIDRICK, M.L.: Inhibition of cell growth in vitro by adenosine 3'-5' monophosphate. Science 162: 1484-1485 (1968)

SCHULMAN, J.D., BRADLEY, K.H.: The metabolism of amino acids, peptides, and disulfides in lysosomes of fibroblasts cultured from normalindividuals andthose with cytinosis. J.Exp.Med. 132: 1090-1104 (1970)

SEEMAN, P.: The membrane actions of anesthetics and tranquilizers.Pharmacol.Rev. 24: 583-655 (1972)

SEIFERT, W.E., RUDLAND, P.S.: Possible involvement of cyclic GMP in growth control of cultured mouse cells. Natu

re (Lond.) 248: 138-140 (1974)

SHEPPARD, J.R.: Catecholamine hormone receptor differences identified on normal and transformed cells. Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74: 1091-1097 (1977)

SHEPPARD, J.R., GORMUS, R., MOLDOW, C.F.: Catecholamine hormone receptors are reduced on chronic lymphocytic leukaemic lymphocytes. Nature 269: 693-695 (1977)

SIMARD, R., LANGELIER, Y., MANDEVILLE, R., MAESTRACCI, N., ROYAL, A.: Inhibitors as tools in elucidating the structure and function of the nucleus. Em Busch, H.: The Cell Nucleus (III),Academic Press, Inc. New York, London (1974) pp 447-487

SIMPSON, F.O., RAYNS, D.G., LEDINGHAM, J.M.: The ultrastructure of ventricular and atrial myocardium. Em Challice, C.E., Virágh, S.: Ultrastructure of the mammalian heart. Academic Press, Inc., New York, London (1973) pp 2-41

SMETANA, K., BUSCH, H.: The nucleolus and nucleolar DNA. Em Busch, H.: The Cell Nucleus (I) Academic Press, New York, London (1974) pp 75-147

SMITH, P.H.: Structural modification of Schwann cells in the pancreatic islets of the dog. Am.J.Anat. 144: 513--516 (1975)

SOARES DE MOURA, R.: Responses of beta adrenoceptor agonists on isolated perfused human placenta. Abst. (124) 7th Intern.Cong. Pharmacol. Paris (1978)

SOMLYO, A.V., WOO, C.-Y., SOMLYO, A.P.: Responses of nerve-free vessels to vasoactive amines and polypeptides. Amer.J.Physiol. 208: 748-753 (1965)

SOMMER, J.R., JOHNSON, E.A.: Cardiac muscle. A comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers. J.Cell Biol. 36: 497-526 (1968a)

SOMMER, J.R., JOHNSON, E.A.: Purkinje fibers of the heart examined with the peroxidase reaction. J.Cell Biol. 37: 570-574 (1968b)

STEINMAN, R.M., BRODIE, S.E., COHN, Z.A.: Membrana flow during pinocytosis. A stereologic analysis. J. Cell Biol. 68: 665-687 (1976)

STEINMAN, R.M., COHN, Z.A.: The interaction of soluble horseradish peroxidase with mouse peritoneal macrophages in vitro. J.Cell Biol. 55: 186-204 (1972)

STEINMAN, R.M., SILVER, J.M., COHN, Z.A.: Pinocytosis in fibroblasts. Quantitative studies in vitro. J.Cell Biol. 63: 949-969 (1974)

STOUT, R.W., BIERMAN, E.L., ROSS, R.: Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. Circ.Res. 36: 319-327 (1975)

SU, C., BEVAN, J., BURNSTOCK, G.: [^{3}H]-adenosine triphosphate: Release during stimulation of enteric nerves. Sci.Amer. 173: 337-339 (1971)

TAKAHAMA, M., BARKA, T.: Electron microscopic alterations of submaxillary gland produced by isoproterenol. J. Ultrastruct. Res. 17: 452-474 (1967)

TAETLE, R., KOESSLER, A.: Effects of cyclic nucleotides and prostaglandins on normal and abnormal human myeloid progenitor proliferation. Cancer. Res. 40: 1223-1229 (1980)

THERON, J.J., BIGIO, R., MEYER, A.C., BOEKKOOI, S., SEEGERS, J.C.: The effect of a serotonin inhibitor on the serotonin content and ultrastructure of rat atria and ventricles with special reference to atrial granules. Life Sciences 23: 111-120 (1978)

TRENDELENBURG, U.: A kinetic analysis of the extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Rev.Physiol.

Biochem.Pharmacol. 87: 33-115 (1980)

TRENDELENBURG, U., HENSELING, M.: Factors determining the rate of relaxation of rabbit aortic strips after an exposure to noradrenaline. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 293: 235-244 (1976)

TRENDELENBURG, U., HÖHN, D., GRAEFE, K.-H., PLUCHINO, S.: The influence of block of catechol-O-methyl transferase on the sensitivity of isolated organs to catecholamines. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 271: 59-92 (1971)

UHLIG, W., BÖNISCH, H., TRENDELENBURG, U.: The O-methylation of extraneuronally stored isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 283: 245--261 (1974)

UHLIG, W., FIEBIG, R., TRENDELENBURG, U.: The effect of corticosterone on the fluxes of ^{3}H-normetanephrine into and out of the extraneuronal compartments of the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 295: 45-50 (1976)

VIRAGH, S., CHALLICE, C.E.: The impulse generation and conduction system of the heart. Em Challice, C.E., Virágh, S.: Ultrastructure of the mammalian heart. Academic Press, Inc., New York, London (1973) pp 43-89

VOORHEES, J.J., DUELL, E.A., BASS, L.J., POWELL, J.A., HARRELL, E.R.: Decreased cyclic AMP in the epidermis of lesions of psoriasis. Arch.Derm. 105: 695-701 (1972)

WAGNER, R., ROSENBERG, M., ESTENSEN, R.: Endocytosis in Chang Liver cells. Quantitation by sucrose-^{3}H uptake and inhibition by cytochalasin B. J.Cell Biol. 50: 804-817(1971)

WALKER, D.W., McLEAN, J.R.: Absence of adrenergic nerves in the human placenta. Nature (Lond.) 229: 344-345 (1971)

WEIBEL, E.R.: A stereological method for estimating volume and surface of sarcoplasmic reticulum. J.Microsc.(Oxf.)

95: 229-242 (1972)

WEINER, N., LANGER, S.Z., TRENDELENBURG, U.: Demonstration by the histochemical fluorescence method of the prolonged disappearance of catecholamines from the denervated nictitating membrane of the cat. J.Pharmacol.Exp.Ther. 157: 284-289 (1967)

WILLIAMS, L.T., LEFKOWITZ, R.J.: Regulation of rabbit myometrial alpha adrenergic receptors by estrogen and progesterone. J.Clin.Invest. 60: 815-818 (1977)

WILLIAMS, L.T., LEFKOWITZ, R.J.: Receptor binding studies in adrenergic pharmacology: regulation of adrenergic receptors. Raven Press, New York (1978) pp 127-149

WOLFE, B.B.: In vitro studies of beta-adrenergic receptors. Em Bevan, J.A., Godfraind, T., Maxwell, R.A., Vanhoutte, P.M.: Vascular neuroeffector mechanisms. Raven Press, New York (1980) pp 29-30

WRIGHT, D.G., MALAWISTA, S.E.: The mobilization and extracellular release of granular enzymes from human leukocytes during phagocytosis. J.Cell Biol. 53: 788-797 (1972)

YOSHIKAWA, K., ADACHI, K., HALPRIN, K.M., LEVINE, V.: On the lack of response to catecholamine stimulation by the adenyl cyclase system in psoriatic lesions. Br.J.Derm. 92:619-624 (1975)

YOUNG, D.A.B.: Factors controlling the washout of the interstitial space of the isolated perfused heart. J. Physiol. (Lond.) 196: 747-759 (1968)

ZEILIG, C.E., JOHNSON, R.A., SUTHERLAND, E.W., FRIEDMAN, D.L.: Adenosine 3'5'-monophosphate content and actions in the division cycle of synchronized HeLa cells. J.Cell Biol. 71: 515-534 (1976)

---

* Trabalhos que só conhecemos através de citação