

MANUEL DE JESUS FALCÃO PESTANA DE VASCONCELOS

**CONTRIBUIÇÃO PARA O
ESTUDO DO SISTEMA
DOPAMINÉRGICO RENAL**

Porto • 1994

MANUEL DE JESUS FALCÃO PESTANA DE VASCONCELOS

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL

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

Porto • 1994

Título: Contribuição para o estudo do sistema dopaminérgico renal
Autor: Manuel de Jesus Falcão Pestana de Vasconcelos
Composição: Medisa
Impressão: Litomédica Aefmup
Cidade: Porto
Ano: 1994

Artº 48º, § 3º

«A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na
dissertação»

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de
1931, Decreto nº 1937).

*O trabalho experimental e a execução gráfica foram
parcialmente subsidiados pelos Instituto Nacional de
Investigação Científica.*

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores efectivos

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Celso Renato Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Henrique José F. G. Lecour de Meneses
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto Barros
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego C. S. M. Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Teixeira Amarante Junior
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria

PROFESSORES JUBILADOS

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

À Minha Mulher
Às Minhas Filhas

Aos Professores

Levi Eugénio Ribeiro Guerra

Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva

Posso dizer que este trabalho começou verdadeiramente quando, ainda durante o curso de Medicina, aprofundi os meus conhecimentos sobre os aspectos ligados à fisiologia renal. Pude então aperceber-me da complexidade e interdependência dos múltiplos processos fisiológicos desenvolvidos pelo rim e das inúmeras questões ainda sem resposta, que aguçavam a curiosidade e desafiavam o engenho de pesquisa, dirigida à sua interpretação. Mais tarde, ao preparar-me para o concurso de acesso ao internato complementar, nasceu a vontade de me dedicar à investigação experimental nessa área, desejo que determinou, inclusivamente, a opção oportuna pela especialidade de Nefrologia. Acreditava então, como hoje, que a investigação experimental assume na formação nefrológica um papel do maior relevo e que, no âmbito da fisiologia renal, o seu lugar é insubstituível.

No meu desejo em desenvolver um trabalho de nefrologia experimental, pude em boa hora beneficiar do apoio de duas pessoas cujo papel foi determinante para a sua realização, o Prof. Doutor Levi Guerra e o Prof. Doutor Patrício Soares da Silva. Dificilmente poderia agradecer-lhes convenientemente nestas linhas. Ao tentar fazê-lo, devo no entanto exprimir o desejo de, acima de tudo, saber honrar a amizade e o apreço com que me distinguiram e manifestar a vontade de que me seja possível por essa via, mais do que por qualquer palavra de circunstância, testemunhar o meu reconhecimento.

Quando se me colocou a questão de elaborar a dissertação de doutoramento e manifestei essa intenção ao Prof. Doutor Levi Guerra, deparei com o seu total apoio e compreensão. Apesar de no momento se encontrar particularmente ocupado na Direcção Hospitalar, dispensou-me sempre algum do seu precioso tempo. A confiança que em mim depositou e o crédito que concedeu ao projecto que me propus realizar, aliados à sua experiência de investigador, representaram para mim, que ensaiava os primeiros passos nessa área, um estímulo que jamais poderei esquecer. Ao longo destes quatro anos foi-se inteirando sempre interessadamente pela evolução do meu trabalho, partilhando comigo algumas alegrias de percurso. Ao Prof. Doutor Levi Guerra devo ainda a sugestão para a minha prova complementar que com entusiasmo e oportunidade me propôs. Nas suas palavras sinto a demonstração do apreço que me esforcei por merecer e que desejo continuar a saber honrar.

Ao Prof. Doutor Patrício Soares da Silva, com quem tenho tido o privilégio de trabalhar ao longo dos últimos quatro anos, torna-se-me difícil traduzir nestas linhas o agradecimento pelos ensinamentos que me dispensou, a orientação

paciente, os conselhos oportunos, as sugestões inteligentes, enfim, a amizade e o empenho sempre colocados no bom sucesso do meu trabalho. No desejo de desenvolver um projecto de investigação experimental pude beneficiar do seu interesse pelo esclarecimento dos processos que regulam a actividade do sistema dopaminérgico renal e da sua disposição para comigo partilhar o tema de estudo. O entusiasmo vivido nas curtas tardes de conversa animada em que se analisaram resultados e se especulou àcerca de modelos de interpretação, para partir para novos protocolos de estudo, representaram momentos inesquecíveis que transformaram o meu trabalho diário em algo que se faz com verdadeiro prazer, como se de uma actividade de lazer se tratasse. Reconhecidamente lhe agradeço a amizade e a disponibilidade com que sempre me acompanhou.

Desenvolvi a quase totalidade dos trabalhos que constam desta dissertação no Instituto de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto. Não o digo sem um certo orgulho, já que me habituara a olhar desde os meus tempos de estudante para o Laboratório (hoje Instituto) de Farmacologia, e para o seu corpo de investigadores, como um símbolo do que de melhor pode ser atingido ao nível das nossas instituições académicas. Aos objectivos alcançados não são naturalmente alheias a vontade, a determinação e o saber dos seus impulsionadores. Por me terem franqueado as portas e permitido usufruir dos benefícios da sua obra, deixo aqui o testemunho do meu mais sincero agradecimento ao Prof. Doutor Walter Osswald e ao Prof. Doutor Serafim Guimarães.

Ao Prof. Doutor Cerqueira Magro, a convite de quem iniciei a minha actividade docente, agradeço a amizade com que me honrou bem como os conselhos e as palavras de encorajamento que sempre me dispensou.

À Prof. Doutora M. Helena Fernandes, agradeço a paciência com que seguiu os meus primeiros passos no trabalho de laboratório, a preciosa colaboração na realização de alguns dos estudos incluídos nesta dissertação, bem como as frutuosas conversas sobre o tema de estudo.

Ao Prof. Doutor António Sarmento, amigo de sempre, agradeço as palavras de confiança e estímulo com que sempre acompanhou o meu trabalho.

À Dr^a Maria Augusta Vieira Coelho, agradeço a disponibilidade e a colaboração amiga e inestimável na realização de alguns dos estudos incluídos nesta dissertação.

Ao relembrar os primeiros tempos no Instituto de Farmacologia, sinto a impressão de que poucos meses passaram. Contudo, já lá vão uns bons pares de anos de actividade intensa, mas vividos agradavelmente no quotidiano de um ambiente estimulante, onde nunca faltaram os condimentos de uma palavra amiga

e de uma sã camaradagem. A esse ambiente não são naturalmente alheias as qualidades dos Prof. Doutores António Albino Teixeira, Daniel Moura, Eduardo Rodrigues Pereira, Fernando Brandão, Isabel Azevedo, Jorge Polónia, Maria Quitéria Paiva, e dos Drs. Alberto Mota, Alexandra Matias, Fátima Martel, Manuel Vaz da Silva, Nuno Borges, Pedro Nunes, Perpétua do O, Rosa Begonha e Tiago Guimarães.

À Sr^a Eng^a Paula Serrão à Sr^a D. Manuela Moura agradeço reconhecidamente pela ajuda que me dispensaram no trabalho de laboratório.

À Sr^a D. Maria Luíza Vasques agradeço a ajuda técnica e a boa vontade que sempre manifestou para colaborar na execução gráfica dos trabalhos que fazem parte desta dissertação.

Agradeço ainda às Sr^{as} D. Aida Camarinha e Fernanda Adrião e aos Srs José Martins, Aldovino Sousa e Abílio Nunes a ajuda competente que sempre me dispensaram ao longo destes anos.

Aos colegas médicos do S. de Nefrologia do H.S.João, agradeço pelo estímulo que em todos encontrei para levar este trabalho a bom termo.

Às Sr^{as} D. Isaura Oliveira e D. Graciete Oliveira agradeço reconhecidamente a disponibilidade e a dedicação com que sempre se dispuseram a efectuar alguns dos doseamentos laboratoriais necessários à realização deste trabalho.

A todos os restantes companheiros dos S. de Nefrologia do H. S. João, enfermeiros, pessoal administrativo e auxiliar, agradeço o interesse e a ajuda prestada na realização deste trabalho.

Ao laboratório Squibb agradeço o auxílio concedido na feitura desta publicação.

Termino por testemunhar a minha gratidão àquelas a quem este trabalho mais pedi: à minha mulher e às minhas filhas. A elas, pelo seu estímulo, pela sua ajuda e compreensão a toda a prova, dedico esta dissertação.

ÍNDICE

I.	Introdução geral	1
II.	Síntese e desaminação renal da dopamina.	9
	A - Estudo comparativo da síntese e desaminação da dopamina em tecidos renais humanos, de Cão e de Rato.	9
	1 - Introdução	9
	2 - Material e métodos	10
	3 - Resultados	14
	4 - Comentários	17
	B - Estudos sobre a influência da MAO-A e da MAO-B na desaminação da dopamina no rim de Rato.	19
	1 - Introdução	19
	2 - Material e métodos	20
	3 - Resultados	22
	4 - Comentários	28
	C - Influência do sódio na síntese e desaminação da dopamina no rim humano e de Rato.	31
	1 - Introdução	31
	2 - Material e métodos	32
	3 - Resultados	36
	4 - Comentários	47
	D - Efeito da desnervação simpática renal sobre as actividades da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos e da monaminoxidase.	52
	1 - Introdução	53
	2 - Material e métodos	57
	3 - Resultados	62
	4 - Comentários	
III.	Transporte da dopamina de síntese renal.	67
	A - Estudo comparativo do efluxo da dopamina formada no rim de rato a partir de L-DOPA e de Gama-glutamil-L-DOPA.	67
	1 - Introdução	67
	2 - Material e métodos	69
	3 - Resultados	72
	4 - Comentários	78

B - Estudo comparativo do efluxo da dopamina e noradrenalina formadas no rim de Rato a partir de L-DOPA e L- <i>threo</i> -DOPS.	82
1 - Introdução	82
2 - Material e métodos	83
3 - Resultados	84
4 - Comentários	90
C - Estudos sobre a influência da MAO-A e da MAO-B no efluxo da dopamina formada no rim humano e de Rato.	93
1 - Introdução	93
2 - Material e métodos	94
3 - Resultados	96
4 - Comentários	102
IV. Sistema dopaminérgico renal e modulação da reabsorção de sódio durante a carga salina.	107
1 - Introdução	107
2 - Material e métodos	108
3 - Resultados	111
4 - Comentários	117
V. Estudo do sistema dopaminérgico renal durante a inibição crónica da síntese do óxido nítrico.	123
1 - Introdução	123
2 - Material e métodos	125
3 - Resultados	129
4 - Comentários	137
VI. Sistema dopaminérgico renal e nefrotoxicidade pela ciclosporina A.	142
1 - Introdução	143
2 - Material e métodos	146
3 - Resultados	153
4 - Comentários	168
VII. Sistema dopaminérgico renal e transplante renal. Estudo do perfil de excreção urinária de dopamina no período pós-transplante renal imediato.	175
1 - Introdução	175
2 - Material e métodos	176
3 - Resultados	178
4 - Comentários	183
VIII. Conclusões e discussão geral	187
IX. Resumo.	213
X. Summary.	221
XI. Bibliografia.	229

Os resultados apresentados nos Capítulos II, III, IV, V, VI e VII fazem parte das seguintes publicações.

- Deamination of newly-formed dopamine in rat renal tissues. M. Helena Fernandes, M. Pestana & P. Soares-da-Silva. *British Journal of Pharmacology* (1991) 102:778-782.
- Brief transient ischemia induces long-term depletion of norepinephrine without affecting the aromatic amino acid decarboxylase and monoamine oxidase activities in the rat kidney. P. Soares-da-Silva, M. H. Fernandes, A. Albino Teixeira, I. Azevedo & M. Pestana. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1992) 260:902-908.
- Influence of type A and B monoamine oxidase in the outflow of newly-formed dopamine in the rat kidney. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. *Nephrology Dialysis and Transplantation* (1992) 7:P660.
- Cell outward transport of renal dopamine and the involvement of type A and B monoamine oxidase. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. *Journal of the American Society of Nephrology* (1992) 3:P833.
- Renal dopamine production in the nitric oxide deprived hypertensive rat. P. Soares-da-Silva, M. H. Fernandes, M. Pestana, M. A. Vieira-Coelho & A. Albino-Teixeira. *Journal of the American Society of Nephrology* (1992) 3:P553.
- Studies on the role of sodium on the synthesis of dopamine in the rat kidney. P. Soares-da-Silva, M. H. Fernandes & M. Pestana. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (1993) 264:406-414.
- Involvement of tubular sodium in the formation of dopamine in the human renal cortex. P. Soares-da-Silva, M. Pestana & M. H. Fernandes. *Journal of the American Society of Nephrology* (1993) 3:1591-1599.
- A comparative study on the synthesis of dopamine in the human, dog and rat kidney. P. Soares-da-Silva, M. H. Fernandes & M. Pestana. *Acta Physiologica Scandinavica* (1993) 148:347-351.

- Studies on the tubular cell outward dopamine transporter in the rat kidney. P. Soares-da-Silva & M. Pestana. In: Cardiovascular and renal actions of dopamine. P. Soares-da-Silva (ed.) Advances in Biosciences. Pergamon press, Oxford (1993) vol. 8, 41-50.
- Renal outflow of dopamine: A comparative study in human and rat renal tissues. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. In: Cardiovascular and renal actions of dopamine. Soares-da-Silva P. (ed.). Advances in Biosciences. Pergamon Press, Oxford (1993) vol. 8, P226.
- Urinary excretion of dopamine and amine metabolites during chronic administration of cyclosporine A. M. Pestana, M. H. Fernandes & P. Soares-da-Silva. Journal of the American Society of Nephrology (1993) 3:P458.
- Reduction in urinary dopamine excretion in an experimental model of cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity. M. Pestana, M.H. Fernandes & P. Soares-da-Silva. Kidney International (1994) 45:P290.
- Renal handling of newly-formed dopamine in a rat model of cyclosporine A induced nephrotoxicity. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. Journal of Autonomic Pharmacology (1994) 14:25.
- Endogenous dopamine and the recovery of renal function in kidney transplant recipients. M. Pestana, M. Sameiro, J. Baldaia, L. Guerra & P. Soares-da-Silva. British Journal of Clinical Pharmacology. (1994) 37(5):P479.
- The renal handling of dopamine originating from L-DOPA and Gama Glutamyl-L-DOPA. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. British Journal of Pharmacology (1994) 112:417-422.
- Enhanced renal dopaminergic activity during long-term nitric oxide synthase inhibition in the rat. P. Soares-da-Silva, M. Pestana, M. A. Vieira-Coelho, M. H. Fernandes & A. Albino-Teixeira. British Journal of Pharmacology. (1994) 112:P544.

- Outflow of dopamine and noradrenaline originating from L-DOPA and L-threo-DOPS in renal tissues. M. Pestana & P. Soares-da-Silva. *General Pharmacology* (1994) (em publicação).
- Renal aromatic L-amino acid decarboxylase, type A and B monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities in a rat model of cyclosporine A (CsA) induced nephrotoxicity. M. Pestana, M. H. Fernandes, M. A. Vieira-Coelho & P. Soares-da-Silva. *Nephrology Dialysis and Transplantation* (1994) (em publicação).
- Effect of type A and B monoamine oxidase selective inhibition by Ro 41-1049 and Ro 19-6327 on dopamine outflow in the rat kidney. M. Pestana & P. Soares da Silva. *British Journal of Pharmacology* (em publicação).

No puede probarse que ninguna teoría sea verdadera. Lo más que puede decirse en favor de una teoría es que está más de acuerdo con los datos y es más coherente y de más extenso alcance que las teorías alternativas disponibles por el momento. Bien puede ser que existan otras teorías que en el futuro se encuentren con esos criterios también o con otros mejores todavía. Todas las formulaciones son tanteadoras y están sujetas a revisión; la certeza no se alcanza nunca.

Ian G. Barbour

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS

3-MT - 3-metoxitiramina
5-HT - 5-hidroxitriptamina
5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético
[³H]5-HT - [³H]5-hidroxitriptamina
[¹⁴C]b-FEA - [¹⁴C]b-feniletilamina
6-OHDA - 6-hidroxidopamina
All - angiotensina II
AD - adrenalina
ANP - peptídeo auricular natriurético
ARP - actividade plasmática da renina
CAP - concentração plasmática da aldosterona
COMT - catecol-O-metiltransferase
CsA - ciclosporina A
DA - dopamina
DAAA - descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos
DHBA - dióxido benzilamina
DOPAC - ácido 3,4-diidroxifenilacético
DOPEG - 3,4-diidroxifenilglicol
EDRF - factor de relaxamento derivado do endotélio
EDTA - sal dissódico do ácido diaminotetracético
EIPA - etilisopropilamilorido
EPM - erro padrão da média
γ-GT - γ-glutamyl transpeptidase
GluDOPA - γ-glutamyl-L-DOPA
HPLC-ECD - cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica
HS - hipersalina
HVA - ácido homovanílico
IRA - insuficiência renal aguda
IRC - insuficiência renal crónica
L-5-HTP - L-5-hidroxitriptofano
L-DOPA - L-3,4-diidroxifenilalanina
L-DOPS - (L)-*threo*-diidroxifenilserina
L-NAME - N^G - nitro arginina metil ester
M - mol/l
MAO - monaminoxidase
MOPET - 3-metoxi-4-hidroxifeniletanol
NA - noradrenalina
NS - normosalina
ON - óxido nítrico
RAA - renina-angiotensina-aldosterona
RIA - radioimunoaferição
RPM - rotações por minuto
SHR - rato espontaneamente hipertenso
SOD - dismutase do superóxido

I - INTRODUÇÃO GERAL

A sequência do processo de síntese das catecolaminas nas células nervosas, tal com hoje é conhecida, envolve uma série de reacções em que intervêm, sucessivamente, vários substratos e produtos de reacção (figura 1). O passo inicial desta cadeia consta da hidroxilação de um aminoácido presente na dieta, a tirosina, em diidroxifenilalanina (DOPA), pela hidroxilase da tirosina presente no citoplasma. A descarboxilação da DOPA em dopamina (DA) é o passo seguinte e ocorre igualmente no citoplasma por acção da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA); este é o passo mais rápido de todo o processo e completa a cadeia de síntese nos neurónios em que a DA é o mediador. Nas células nervosas em que a noradrenalina (NA) é o mediador, a DA é depois transportada para o interior de vesículas neuroniais, onde a cadeia se completa através da sua hidroxilação em NA, por acção da hidroxilase em β da DA. Nos tecidos como a supra-renal, em que a sequência se prolonga até à adrenalina (AD), esta surge pela metilação intravesicular da NA por acção da N-metiltransferase das feniletanolaminas.

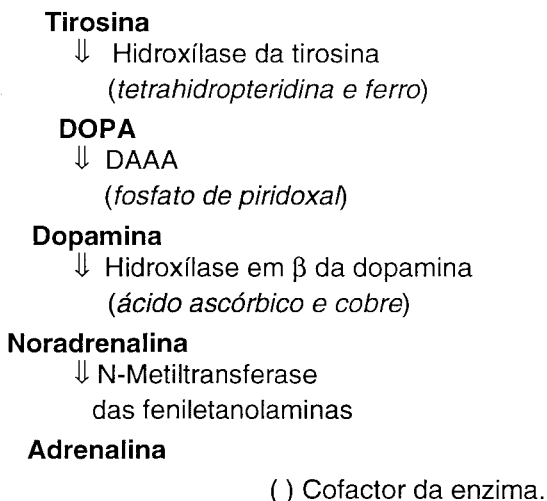


Figura 1

Enquanto que a nível do SNC é, desde há muito tempo, conhecida a importância da DA como mediador independente, a nível periférico subsistiu até há bem pouco tempo o conceito de que à DA apenas cabia o papel de preceder a NA e a AD na cadeia de síntese dos mediadores adrenérgicos. Contudo, nos últimos anos, têm-se descrito numerosas acções próprias, i.e. efeitos mediados pela própria amina, não só sobre adreno-receptores alfa e beta, mas também actuando sobre receptores específicos, os receptores da DA. A primeira suspeita da existência de receptores da DA à periferia surgiu em 1942 com os trabalhos de Holtz, que verificou um efeito hipotensor e vasodilatador da DA na Cobaia e no Coelho (Holtz e col., 1942). Mais tarde, Goldberg (1972) mostrou que este efeito da DA não era anulado pelos antagonistas clássicos dos receptores adrenérgicos, achado este que abriu o caminho para o estudo dos receptores da DA a nível periférico, cuja presença está hoje bem demonstrada em numerosos tecidos, em particular nos leitos vasculares, no rim e nas supra-renais.

À semelhança do sistema nervoso central, estão hoje identificados à periferia dois tipos distintos de receptores da DA, os tipos D_1 e D_2 . As diferenças entre os dois tipos de receptores dizem respeito não só a distintas características farmacológicas, mas também a diferenças quanto à respectiva localização tecidual. Os receptores D_2 estão principalmente localizados nos terminais neuronais simpáticos (pré-juncionais) onde a sua activação exerce um efeito inibitório sobre a libertação da NA (Lokhandwala e Barret, 1982); a presença de receptores D_2 foi também evidenciada nos túbulos renais, onde concorrem com a activação dos receptores D_1 para reduzir a reabsorção tubular de sódio (Bertorello e Aperia, 1988) e na suprarenal, onde exercem efeitos inibitórios recíprocos dos da angiotensina II (All) sobre a libertação da aldosterona (Missale e col., 1990). Os receptores D_1 , por outro lado, localizam-se em estruturas pós-juncionais e da sua activação resultam diversos efeitos consoante a estrutura em causa (Felder e col., 1989). Assim, a activação de receptores D_1 localizados em estruturas vasculares produz relaxamento directo do músculo liso, com consequente vasodilatação e elevação regional do fluxo sanguíneo; este efeito, hoje bem caracterizado, predomina nos sectores vasculares mesentérico, renal, esplénico e coronário. A activação dos receptores D_1 presentes nos túbulos renais, por outro lado, condiciona uma estimulação da diurese e da natriurese.

Os dois tipos de receptores da DA diferem ainda um do outro nas vias de transdução do sinal intracelular que utilizam para produzir os seus efeitos; assim, os efeitos da activação dos receptores D_1 são classicamente mediados pela

adenilciclase com aumento do AMPc, embora a activação de receptores D_1 , a nível renal, tenha sido também associada com a estimulação da fosfolípase C (Felder e col., 1989). A activação dos receptores D_2 , pelo contrário, tem sido associada com a inibição da adenilciclase.

Sabe-se que a nível renal a DA exerce efeitos diuréticos e natriuréticos, os quais foram durante largo período atribuídos às suas acções hemodinâmicas. Contudo, não só o sector vascular, mas também os túbulos renais e as células justaglomerulares possuem receptores da DA. De facto, a natriurese que surge pela acção renal da DA pode ser resultante de um efeito triplo, por activação de diferentes mecanismos: (1) acção vasodilatadora, com elevação do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular; (2) redução na secreção de aldosterona e (3) activação de receptores tubulares, com diminuição da reabsorção de sódio.

Apesar do conhecimento das suas importantes acções renais, só recentemente se deu atenção ao facto de que o rim dispõe de capacidade significativa para sintetizar DA. A origem da DA de síntese renal foi alvo de aceso debate. Enquanto alguns autores sugeriram uma origem importante em neurónios dopaminérgicos independentes (Dinerstein e col., 1979) e outros especularam sobre a possibilidade de que a DA sulfatada em circulação pudesse ser desconjugada no rim (Kuchel e col., 1986), tem-se sugerido, mais recentemente, que a DA de síntese renal provém, sobretudo, da descarboxilação da L-DOPA circulante em estruturas renais extraneuronais (Jeffrey e col., 1988a; Soares-da-Silva e Fernandes, 1990b). De facto, as células tubulares renais, nomeadamente as dos túbulos contornados proximais, dispõem de uma elevada actividade de DAAA (Hagege e Richet, 1985; Baines e Chan, 1980; Hayashi e col., 1990) e a L-DOPA, presente no filtrado tubular ou nos capilares peritubulares, pode ser convertida em DA após ter sido captada para o interior destas células (Chan, 1976). Ao longo dos últimos anos tem-se evidenciado que a DA eliminada diariamente na urina provém fundamentalmente do rim (para revisão, ver Lee, 1993). Por outro lado, demonstrou-se recentemente um controle da reabsorção tubular de sódio pela DA, ao nível dos túbulos contornados proximais, o qual parece corresponder a um efeito paracrínico ou autocrínico, em que a amina regula localmente a reabsorção de sódio por activação de receptores próprios localizados nas células onde se processa a sua síntese, ou em células próximas (Siragy e col., 1989; Carey e col., 1990).

A nível tubular, foram identificados receptores da DA dos tipos D_1 e D_2 , quer na membrana apical quer na membrana basolateral das células dos túbulos contornados proximais (Felder e col., 1989); a presença de receptores D_1 foi ainda

sugerida em outros sectores do nefrónio, nomeadamente ao nível do ramo ascendente da ansa de Henle (Aperia e col., 1990) e no túbulo colector cortical (Satoh e col., 1993). Os mecanismos pelos quais a activação dos receptores tubulares da DA pode condicionar efeitos natriuréticos directos são a inibição da actividade do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (Felder e col., 1989) e da ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Bertorello e col., 1988; Seri e col., 1990) nas células dos túbulos contornados proximais. Mais recentemente, têm-se evidenciado também efeitos inibitórios da DA sobre o transporte tubular de sódio ao nível do túbulo colector, envolvendo a mediação concomitante de prostaglandinas sintetizadas no local, a partir das vias da ciclooxigenase e do sistema P-450 (Healy e col., 1993; Satoh e col., 1993).

A ingestão de sódio funciona como um estímulo importante para a síntese renal da DA. Esse facto foi inicialmente sugerido pela observação de uma relação íntima entre a excreção de sódio e DA, na urina (Cuche e col., 1972). Mais tarde, vários autores verificaram que a carga salina condicionava um aumento simultâneo na excreção urinária de sódio e DA (Ball e col., 1978; Alexander e col., 1974) e, inversamente, que a restrição de sódio se acompanhava de uma redução concomitante na excreção urinária de sódio e DA (Carey e col., 1981; Hayashi e col., 1990). Conhecidos os efeitos diurético e natriurético da DA, estas evidências sugeriram a possibilidade de a DA de síntese renal assumir importância como factor natriurético de síntese local, com efeitos relevantes na modulação da reabsorção tubular de sódio, em resposta à carga salina. Essa sugestão tem vindo a ser sustentada, em trabalhos no Homem e no animal de experiência, ao verificar-se uma atenuação significativa da resposta natriurética apropriada à carga salina, quando concomitantemente se inibe a DAAA (Ball e Lee, 1977; Jeffrey e col., 1988a), ou são administrados antagonistas selectivos dos receptores da DA (Siragy e col., 1989). A relevância destes achados tem sido ainda estendida a formas de hipertensão arterial, sobretudo a formas de hipertensão sensível à carga salina, nas quais se têm descrito alterações na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal, quer no Homem (Harvey e col., 1984; Kuchel e col., 1982; Shikuma e col., 1986; Saito e col., 1986; Imura e col., 1990; Lee e col., 1990; Critchley e col., 1986; Luft e col., 1977; Sowers e col., 1988; Gill e col., 1988) quer no animal de experiência (Yoshimura e col., 1990; De Feo e col., 1987; Racz e col., 1987; Kinoshita e col., 1989; Felder e col., 1990; Kaneko e col., 1990).

A possibilidade de que ao sistema dopaminérgico renal possa caber um papel fisiológico de relevo na modulação do transporte tubular sódio e da volemia leva a especular sobre a natureza dos factores que, em resposta a estímulos apropri-

ados, regulam a síntese renal da DA. Como a amina pode ser formada nas células tubulares renais, a partir da L-DOPA presente no filtrado tubular ou no fluido que perfunde os capilares peritubulares (Chan, 1976), é legítimo admitir que a regulação da sua síntese possa estar dependente de modulações, a três níveis fundamentais: (1) aporte do precursor, L-DOPA, às células tubulares renais; (2) transporte da L-DOPA para o interior destas células e (3) actividade da DAAA, a enzima responsável pela sua formação. Como os receptores da DA estão localizados na superfície externa das células tubulares renais, a quantidade de DA que tem acesso ao lúmen tubular, ou ao fluido peritubular, poderá ser ainda influenciada pelos processos que intervêm no transporte da amina para o exterior das células tubulares renais. Por último, os mecanismos envolvidos na inactivação renal da DA poderão, também eles, modular a quantidade de amina disponível para actuar sobre os receptores próprios.

A formação de DA nas células tubulares renais é um processo complexo e nada semelhante ao conhecido em estruturas neuronais simpáticas, onde a amina se comporta como o precursor directo da NA (Soares-da-Silva, 1988b). Neste contexto, é interessante referir que a análise imunoquímica de células cerebrais evidenciou a presença de sistemas neuronais dispondo de DAAA, mas não de hidroxilase em β da DA, à semelhança do que se passa nas células dos túbulos proximais do rim (Jaeger e col., 1983).

Em trabalhos recentes, Goldstein e col. (1989a) evidenciaram que a carga salina condiciona um aumento na excreção urinária de DA e que esta resposta se correlaciona directamente com um aumento na excreção urinária de L-DOPA, tendo concluído que as variações no aporte da L-DOPA ao rim poderiam estar directamente envolvidas na modulação da actividade do sistema dopaminérgico renal. Apesar de se saber que a L-DOPA circulante tem, sobretudo, proveniência neuronal (Grossman e col., 1992) e de ter sido igualmente aventada uma possível libertação da L-DOPA a partir de células cromafins extraneuronais, dispondo de sensibilidade ao aporte de sódio (Ben-Jonatham e col., 1983), desconhecem-se ainda quais os locais de origem da L-DOPA com acesso ao rim, bem como a natureza dos mecanismos envolvidos na sua libertação.

Chan (1976) e Suzuki e col. (1984) mostraram que o transporte da L-DOPA ao nível das células dos túbulos contornados proximais se processa através do bordo luminal e do basolateral, através de um processo estereo-selectivo e dependente de energia, tendo ainda sugerido que o transporte da L-DOPA, a este nível, poderia representar um passo limitante na síntese renal da DA. Contudo,

desconhecem-se ainda os mecanismos que regulam a actividade do transporte da L-DOPA nas células tubulares renais, bem como a sua disponibilidade para serem moduláveis em função das necessidades fisiológicas.

Tem-se sugerido que a actividade da DAAA renal pode ser modificada durante as variações da ingestão de sódio, na dieta (Seri e col., 1990; Soares-da-Silva, 1993a). Contudo, o relevo fisiológico das modulações na actividade das enzimas depende da relação existente entre os seus parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) e a concentração do substrato presente em condições fisiológicas. Neste contexto, os estudos que avaliaram os parâmetros cinéticos da DAAA renal forneceram resultados algo discrepantes, em consequência de variações nas metodologias de estudo utilizadas pelos vários autores, escasseando elementos que permitam fazer comparações entre espécies.

Em trabalhos realizados durante a década de sessenta, Rennick estudou o transporte das catecolaminas nos túbulos renais e concluiu que a DA, presente no sector vascular, era segregada no lúmen tubular através do sistema de transporte para as bases orgânicas (Rennick, 1968; Quebbemann e Rennick, 1970); desde então, as catecolaminas estão identificadas como substratos para este sistema de transporte, ao nível das células dos túbulos contornados proximais. Os processos envolvidos na manipulação celular da DA sintetizada nas células tubulares renais não foram, contudo, avaliados. Neste contexto, é sabido que a DA formada nas células tubulares renais pode abandonar o compartimento de síntese através quer do bordo luminal quer do basolateral (Chan, 1976; Suzuki e col., 1984), desconhecendo-se ainda, no entanto, a importância relativa destas duas vias de transporte, bem como a natureza dos factores intervenientes na sua regulação.

Os tecidos renais dispõem de elevadas actividades, quer de monoaminooxidase (MAO) quer de catecol-O-metiltransferase (COMT), as quais podem converter a DA formada nas células tubulares renais numa série de metabolitos, cuja quantificação pode ser utilizada para avaliar a actividade das respectivas enzimas metabolizadoras. A MAO é uma enzima mitocondrial e existe sob duas formas, MAO-A e MAO-B, sendo responsável pela desaminação da DA em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC). A COMT, por seu lado, existe também sob duas formas, uma, solúvel, citoplasmática e outra ligada à membrana citoplasmática, podendo ser responsável pela metilação da DA em 3-metoxitiramina (3-MT) ou 3-metoxi-4-hidroxifeniletanol (MOPET). A MAO e a COMT podem estar ainda envolvidas na conversão, respectivamente, da 3-MT e do DOPAC em ácido homovanílico (HVA). A desaminação parece desempenhar um papel mais impor-

tante do que a metilação, na metabolização da DA de síntese renal (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993); no entanto, desconhece-se ainda a importância relativa das duas formas de MAO na metabolização da DA formada nos tecidos renais, bem como os locais onde actuam.

O objectivo do presente trabalho é o de contribuir para o estudo do sistema dopaminérgico renal através da avaliação dos processos envolvidos na síntese, transporte e metabolização da DA formada nas células tubulares renais. Para o efeito, procedemos à realização de estudos *in vitro* e *in vivo* em que avaliámos:

- 1 - a formação da DA nas estruturas renais;
- 2 - a contribuição dos elementos neuronais na síntese e metabolização renal da DA;
- 3 - a influência do transporte de sódio na síntese e metabolização renal da DA;
- 4 - os processos que caracterizam o transporte da DA para o exterior do compartimento celular e
- 5 - os fenómenos envolvidos na sua metabolização desaminativa, no Homem e no animal de experiência.

Dispondo dos conhecimentos adquiridos nos estudos anteriores, procedemos ainda à avaliação da actividade do sistema dopaminérgico renal:

- 6 - durante a variação da ingestão de sódio na dieta;
- 7 - durante o estabelecimento de formas de hipertensão produzidas em modelos experimentais, pela inibição continuada da síntese do óxido nítrico (ON),
- 8 - num modelo experimental de nefrotoxicidade pela ciclosporina A (CsA) e
- 9 - na recuperação funcional deste sistema dopaminérgico em doentes insuficientes renais crónicos, submetidos a transplante renal.

II - SÍNTESE E DESAMINAÇÃO RENAL DA DOPAMINA

A - Estudo comparativo da síntese e desaminação da dopamina em tecidos renais humanos, de Cão e de Rato

1. Introdução

No capítulo I enumeraram-se os factores potencialmente envolvidos na regulação da síntese da DA nos tecidos renais. De entre estes, referiu-se a enzima responsável pela formação da DA no citoplasma das células tubulares, a DAAA. A DAAA existente nos tecidos renais é composta por duas subunidades idênticas, cada uma com um peso molecular de 48.000; as suas características electroforéticas e cromatográficas não permitem distingui-la da enzima presente no estriado, na medula supra-renal, no fígado e na glândula pineal (Shirota e Fushisawa, 1988); no entanto, as características cinéticas da DAAA renal têm evidenciado diferenças em comparação com outros tecidos, nomeadamente ao nível dos valores de K_m .

O estudo do papel da DAAA renal na modulação do sistema dopaminérgico renal obriga, antes de mais, a conhecer os seus parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m). Através da determinação destes parâmetros será possível: (1) conhecer a dimensão potencial do processo de síntese renal da DA a partir do seu precursor; (2) retirar ilações acerca do envolvimento da DAAA na modulação da síntese renal da DA e (3) estabelecer comparações em situações fisiológicas e fisiopatológicas.

Trabalhos recentes de vários autores (Hayashi e col., 1990; Seri e col., 1990) ajudaram a caracterizar os parâmetros cinéticos da DAAA renal no animal de experiência e evidenciaram aumentos na actividade da enzima em resposta a incrementos na ingestão de sódio, na dieta. Contudo, os resultados destes estudos revelaram discrepâncias nos parâmetros encontrados, o que poderá ser justificado, por um lado, pelas diferentes metodologias de estudo utilizadas e, por outro, pelas diferentes espécies animais que foram utilizadas nas investigações. Acresce que estes estudos, cujo objectivo último é o da extrapolação dos resultados para

o ser humano, vêem o seu significado muitas vezes diminuído pela falta de dados comparáveis entre as várias espécies.

Por estas razões, no presente capítulo apresentam-se os resultados de estudos que tiveram por objectivo avaliar a descarboxilação da L-DOPA em DA e determinar os parâmetros cinéticos da descarboxilase ($V_{\max}$ e K_m) em tecidos renais humanos; para comparação e fazendo uso da mesma metodologia laboratorial, efectuámos estudos em tecidos renais de Cão e de Rato.

Considerando que o rim dispõe de uma elevada actividade de MAO e que a desaminação da DA de síntese renal parece representar um processo importante envolvido na sua inactivação (Kopin, 1985), os trabalhos que constam deste capítulo foram complementados com a avaliação comparativa do processo de desaminação da DA recém-formada nos tecidos renais das três espécies.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

2.1.1. Os tecidos renais humanos foram obtidos a partir de rins de doentes submetidos a nefrectomia, por tumores do urotélio. Os doentes ($n=6$) eram todos do sexo masculino e tinham uma média etária de 56 ± 6 anos à data da nefrectomia. Em nenhum dos casos existia evidência, presente ou passada, de patologia renal ou cardiovascular, nomeadamente hipertensão arterial. Nenhum dos doentes fora submetido a terapêutica quimioterápica ou radioterápica a preceder a nefrectomia. Um dos rins evidenciava uma ligeira hidronefrose e obstrução ureteral parcial.

2.1.2. Os tecidos renais de Rato foram obtidos a partir de ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 200 a 280 gramas de peso.

2.1.3. Os tecidos renais de Cão foram obtidos a partir de cães machos, de raça e idade indeterminadas, com 18 a 25 kg de peso.

2.2. Colheita dos tecidos

2.2.1. Os tecidos renais humanos foram colhidos imediatamente a seguir à

nefrectomia. Uma fatia de parênquima normal, incluindo córtex e medula, foi dissecada e introduzida em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C. O tempo médio que decorreu entre a pinçagem da artéria renal e a introdução dos tecidos em soro foi de 90 a 120 segundos. O córtex foi separado da medula ao nível da junção corticomedular; de seguida, prepararam-se fatias de córtex com cerca de 25 mg de peso e 1,0 mm de espessura.

2.2.2. O Rato e o Cão foram anestesiados com pentobarbital sódico, por injeção intraperitoneal (i.p.) no Rato (60 mg/kg) e intravenosa (i.v.) no Cão (30 mg/kg). Os rins foram removidos através de uma incisão abdominal na linha média e imediatamente introduzidos em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C. De seguida, os rins foram colocados numa placa sobre gelo e o córtex dissecado e separado da medula. Subsequentemente, prepararam-se fatias de córtex com 1,0 mm de espessura e cerca de 25 mg de peso.

2.3. Determinação da actividade da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA)

A actividade da DAAA nos tecidos renais foi estudada em experiências nas quais se procedeu à determinação da conversão da L-DOPA exógena em DA, em fatias e homogeneizados de tecidos renais provenientes das três espécies.

2.3.1. Estudos em fatias de córtex

As fatias foram pré-incubadas durante 30 minutos em 2 ml de uma solução de Krebs aquecida (37°C) e gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂). A solução de Krebs tinha a seguinte composição (em mM): NaCl 120; KCl 4,7; CaCl₂ 2,4; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1,2; EDTA 0,4; ácido ascórbico 0,57 e glucose 11; adicionou-se 1- α -metil-p-tirosina (50 μ M), tropolona (50 μ M) e sulfato de cobre (10 μ M) à solução de Krebs, com o objectivo de inibir, respectivamente, a formação de catecolaminas a partir da tirosina, a COMT e os inibidores endógenos da hidroxilase em β da DA. Após a pré-incubação, as fatias foram incubadas durante 15 minutos em 2 ml de solução de Krebs, à qual se adicionou a L-DOPA (10 a 5000 μ M). A pré-incubação e a incubação decorreram sob agitação constante, em tubos de vidro aquecidos (37°C) e gaseificados (95% O₂ e 5% de CO₂). No final da incubação, as fatias foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) arrefecida a

4°C, secas com papel de filtro e colocadas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M); os recipientes foram arrefecidos a 4°C até à quantificação da DA e do DOPAC, geralmente dentro de 24 horas.

2.3.2. Estudos em homogeneizados de rim

Preparou-se uma solução de Krebs com composição semelhante à descrita anteriormente, para as experiências com as fatias, excepto no que se refere à concentração de sódio, que foi reduzida para 50 mM; a osmolaridade do meio foi mantida idêntica através da adição de cloreto de colina (68 mM). Prepararam-se homogeneizados de córtex renal com a solução de Krebs modificada a pH 7,2 e a 4°C, utilizando homogeneizadores de vidro (Duall-Kontes), arrefecidos em gelo. Incubaram-se alíquotas de 1,0 ml de homogeneizado com 1,0 ml da solução de Krebs durante 30 minutos; de seguida, adicionou-se a L-DOPA (10 a 5000 µM) ao meio de incubação, durante 15 minutos. A incubação teve lugar sob agitação constante, em tubos de vidro aquecidos (37°C) e gaseificados (95% O₂ e 5% CO₂). No final da incubação, a reacção foi suspensa através da adição de 250 µl de ácido perclórico (2 M) a cada tubo e as preparações foram arrefecidas a 4°C durante 60 minutos. Subsequentemente, centrifugaram-se os homogeneizados (a 2000 r.p.m. e a 4°C, durante 2 minutos) e retiraram-se alíquotas de 1,5 ml do sobrenadante para a quantificação da DA e do DOPAC.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, DA e DOPAC nos tecidos renais e nos homogeneizados foi efectuada por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica (HPLC-ECD). Alíquotas de 1,5 ml do ácido perclórico onde os tecidos estiveram introduzidos, ou do sobrenadante dos homogeneizados, foram colocadas em frascos cónicos de vidro contendo 50 mg de alumina e ajustou-se imediatamente o pH a 8,6, através da adição de tampão Tris. As amostras colhidas foram agitadas mecanicamente durante 10 minutos; após centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante. As catecolaminas foram eluídas da alumina com 200 µl de ácido perclórico (0,2 M), utilizando microfiltros Millipore (MF1); 50 µl do eluído foram injectados num cromatógrafo líquido de alta pressão com detecção electroquímica. O sistema consistia numa bomba (Gilson modelo 302; Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, França), ligada a um detector de

pressão (Gilson modelo 802 C) e a uma coluna Biophase ODS (Bioanalytical Systems, Inc.) de 25 cm de comprimento, contendo partículas de gel de sílica com diâmetro médio de 5 μm . As amostras foram injectadas na coluna por intermédio de um injector automático (Gilson modelo 231), ligado a um diluidor Gilson (modelo 401). A detecção foi levada a cabo electroquimicamente por meio de um detector de carvão vitrificado sujeito a um potencial de 0,75 V, um eléctrodo de referência Ag/AgCl e um detector amperométrico (modelo 304 LC-4A; Bioanalytical Systems). A corrente produzida foi monitorizada através de um integrador Spectra-Physics (modelo SP4270; Spectra-Physics, Darmstadt-Kranichstein, R.F.A.). A fase móvel era uma solução desgaseificada de ácido cítrico (0,1 mM), acetato de sódio (0,1 M), octilsulfato de sódio (0,5 mM), EDTA (0,17 mM), dibutilamina (1 mM) e metanol (8% vol/vol), bombeada a um fluxo contínuo de 1 ml/minuto. O pH da fase móvel foi ajustado a 3,5 através da adição de ácido perclórico. A diidroxibenzilamina (DHBA) foi utilizada como padrão interno e a L-DOPA, DA, DOPAC e DHBA foram injectadas em concentrações crescentes. As percentagens de recuperação da L-DOPA, DA e DOPAC extraídos pela alumina foram de, respectivamente, 85 ± 2 , 87 ± 4 e $67 \pm 8\%$ ($n=12$). O coeficiente de variação foi inferior a 5%. Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA e DOPAC variaram entre 250 e 650 fmol/50 μl .

2.5. Determinação das proteínas

O conteúdo em proteínas dos homogeneizados (mg de proteína/g de tecido) foi determinado pelo método descrito por Lowry e col. (1951), utilizando albumina humana como padrão.

2.6. Análise estatística

Os resultados são apresentados em médias $\pm$ erro padrão da média (EPM), relativas a um número n de experiências. A diferença entre as médias foi avaliada pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

Os valores dos parâmetros cinéticos da DAAA, K_m e $V_{\max}$, foram calculados por análise de regressão linear; o inverso da quantidade de substrato descarboxilado (soma algébrica da quantidade de DA e de DOPAC formados) por mg de proteína e por hora de incubação, foi correlacionado com o inverso da concentração de substrato (concentração de L-DOPA) no meio de incubação.

2.7. Fármacos utilizados

Os fármacos utilizados foram: ácido ascórbico (May e Baker, Lda, Dagenham, Inglaterra); sal dissódico do ácido diaminotetracético (EDTA), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), L-diidroxifenilalanina (L-DOPA), cloridrato de DA, cloridrato de tropolona e 1- α -metil-p-tirosina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.).

3. Resultados

3.1. Estudos com fatias de córtex renal

Nas experiências realizadas com fatias de córtex renal humano, de Cão e de Rato, verificámos que a acumulação tecidual da DA foi dependente da concentração do precursor (L-DOPA) adicionada ao meio de incubação (figura 1).

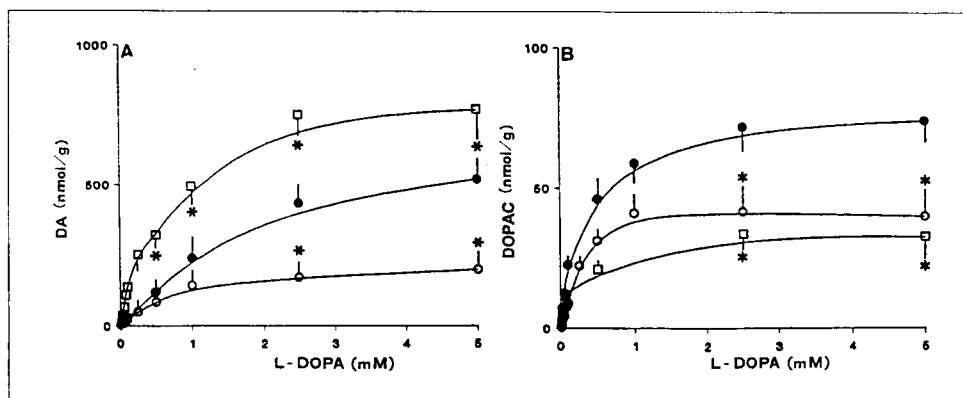


Figura 1. Níveis (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC nas fatias de córtex renal humano (●), de Cão (○) e de Rato (□), após incubação com concentrações crescentes de L-DOPA (10 a 5000 μ M). Cada ponto representa a média de 5 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores para o rim humano (*P<0,02).

A acumulação de DA foi mais elevada nos tecidos renais de Rato, seguida da observada nos tecidos humanos. Os tecidos renais de Cão evidenciaram uma capacidade menor para sintetizar DA, sendo a acumulação tecidual da amina, nesta espécie animal, cerca de três vezes inferior à verificada com tecidos renais de Rato. A acumulação tecidual do DOPAC foi mais elevada nos tecidos provenientes de rim humano, seguida pela verificada nos de Rato e de Cão; evidenciou-se, assim, uma desaminação mais intensa da DA formada no rim humano, em comparação com a observada nos tecidos renais das outras duas espécies animais (figura 1).

3.2. Estudos com homogeneizados de rim

Nos estudos em que se procedeu à avaliação da síntese e da desaminação da DA em homogeneizados provenientes de rim humano, de Cão e de Rato, verificou-se, tal como acontecera com os estudos em fatias, que a formação de DA foi dependente da concentração do precursor (L-DOPA) adicionada ao meio de incubação (figura 2).

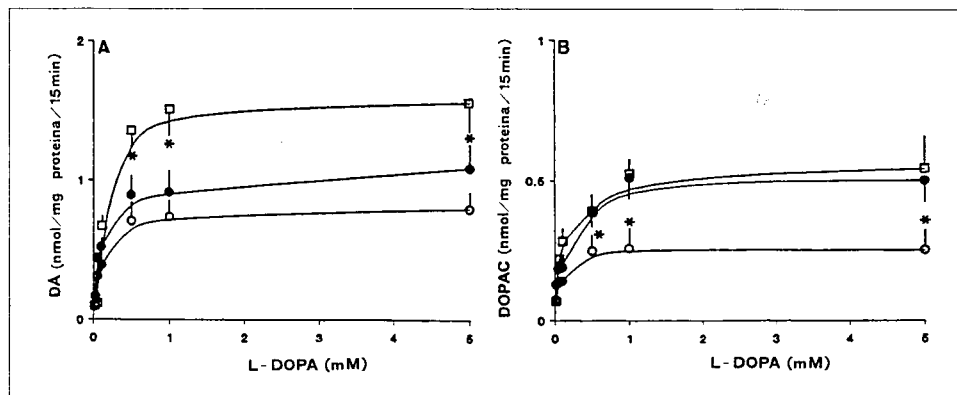


Figura 2. Níveis (em nmol/mg de proteína/15 minutos) da (A) DA e do (B) DOPAC, nos homogeneizados de córtex renal humano (●), de Cão (○) e de Rato (◻), após incubação com concentrações crescentes de L-DOPA (10 a 5000 μ M). Cada ponto representa a média de 5 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores para o rim humano (* $P < 0,02$).

L-DOPA

(μM)	Humano	Cão	Rato
10	1,37 $\pm$ 0,04*	0,75 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,06
50	0,91 $\pm$ 0,07*	0,42 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,06
100	0,76 $\pm$ 0,07	0,35 $\pm$ 0,06	0,72 $\pm$ 0,12
500	0,44 $\pm$ 0,04*	0,35 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,03
1000	0,56 $\pm$ 0,04*	0,35 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03
5000	0,46 $\pm$ 0,04*	0,32 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,04

Tabela 1. Relação DOPAC/DA em homogeneizados de tecidos renais humanos, de Cão e de Rato, após incubação com concentrações crescentes de L-DOPA (10 a 5000 μM). Os valores são médias $\pm$ EPM relativas a um número de 5 a 6 determinações por grupo. Significativamente diferente em comparação com os valores correspondentes observados com tecidos renais de Cão e de Rato (* $P < 0,05$).

Nestas condições experimentais, a acumulação da DA foi mais elevada nos homogeneizados de rim de Rato, seguida pela observada no rim humano e de Cão. Nas três espécies, evidenciou-se saturação para a descarboxilação quando se adicionaram 1000 μM de L-DOPA ao meio de incubação. Tal como se observara nos estudos com as fatias, verificou-se uma desaminação importante da DA recém-sintetizada nos homogeneizados, a qual foi mais intensa nas preparações obtidas a partir de rim humano e de Rato do que nas preparações de rim de Cão (figura 2). Estes resultados condicionaram relações DOPAC/DA significativamente mais elevadas nos homogeneizados de rim humano do que as verificadas quer com rim de Rato quer com rim de Cão (tabela 1).

A actividade máxima da descarboxilase (V_{max}) mostrou ser significativamente diferente ($P < 0,02$) no rim humano, em comparação com a verificada, quer no rim de Rato quer no de Cão (tabela 2); a actividade mais elevada foi observada no rim de Rato, seguida do rim humano e do de Cão. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de K_m para a DAAA com os tecidos renais provenientes das três espécies estudadas (tabela 2).

	Humano	Cão	Rato
$V_{\max}$	5,6 $\pm$ 0,6*	3,9 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,8
K_m	62 $\pm$ 8	54 $\pm$ 6	82 $\pm$ 12

Tabela 2. Parâmetros cinéticos ($V_{\max}$, em nmol/mg proteína/h; K_m , em μ M) da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA) em homogeneizados de córtex renal humano, de Cão e de Rato. Os valores são médias $\pm$ EPM relativas a 5 experiências por grupo. Significativamente diferente dos valores correspondentes para o rim de Cão e de Rato (* $P < 0,02$).

4. Comentários

Os resultados destes estudos mostram que os tecidos renais humanos, de Rato e de Cão dispõem de uma elevada capacidade para sintetizar DA a partir do seu precursor e evidenciam também que uma fracção importante da DA recém-formada é, nas três espécies, rapidamente desaminada em DOPAC. Os resultados apresentados revelam, no entanto, diferenças potencialmente importantes entre as três espécies, quer ao nível da dimensão do processo de síntese renal da DA quer da sua desaminação, as quais passamos a comentar.

Evidenciou-se uma menor capacidade dos tecidos renais de Cão para descarboxilar a L-DOPA. A análise dos parâmetros cinéticos da DAAA revelou que esta menor capacidade descarboxilásica dos tecidos renais de Cão resulta directamente de uma menor actividade da enzima ($V_{\max}$), nesta espécie animal. Por outro lado, a afinidade entre a descarboxilase e o seu substrato não parece estar implicada nas diferenças verificadas entre as três espécies, quanto à dimensão do processo de formação renal da DA. De facto, os valores de K_m para a DAAA foram idênticos nos estudos efectuados com os tecidos renais provenientes das três espécies.

Os resultados destes estudos sugerem que as modulações ao nível da actividade da DAAA renal podem não ser as mais importantes influências envolvidas na regulação da síntese renal da DA. De facto, estes resultados evidenciam que a concentração plasmática do precursor da DA, a qual foi referida como estando incluída na gama do nanomolar (Cuche, 1988), se situa muito abaixo da necessária para conseguir a saturação da descarboxilase, como foi evidenciado

pelos valores de K_m que mostraram estar incluídos na gama do micromolar. De acordo com esta interpretação, os factores que regulam o aporte da L-DOPA aos tecidos renais e o seu transporte pelas células tubulares renais, ao modularem a concentração atingida pela L-DOPA no citoplasma destas células, poderão condicionar o papel desempenhado pela DAAA na regulação da síntese renal da DA.

Observou-se uma maior capacidade dos tecidos renais humanos para desaminar a DA recém-sintetizada. Este facto foi evidenciado pela maior acumulação de DOPAC nos tecidos e nos homogeneizados de rim humano e pelo facto de a relação DOPAC/DA nos homogeneizados de rim humano ter sido significativamente mais elevada do que a observada nos homogeneizados das outras duas espécies animais. Estes resultados estão de acordo com a existência de uma actividade da MAO 2 a 6 vezes mais elevada no rim humano do que no rim de Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992). A importância da MAO na inactivação da DA de síntese renal, em particular no Homem, permite especular sobre a hipótese de ser possível obter uma potenciação dos efeitos natriuréticos da DA endógena, através da inibição de um processo de inactivação com esta dimensão. Para esse efeito, a avaliação da importância relativa das duas formas de MAO, na metabolização da DA de síntese renal, permitirá sugerir a utilização de inibidores selectivos da MAO-A, ou da MAO-B, no caso de se verificar que uma das formas da enzima está particularmente envolvida na inactivação da DA.

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que o rim de Rato tem maior capacidade do que o rim humano ou o de Cão para sintetizar DA a partir da L-DOPA exógena e revelam que este facto resulta da existência de uma actividade (V_{max}) da DAAA mais elevada no rim de Rato, em comparação com a existente nos tecidos renais das outras duas espécies. Estes estudos evidenciam também que a afinidade da DAAA para o seu substrato (K_m) é idêntica nos tecidos provenientes de rim humano, de Cão e de Rato, sendo os valores encontrados significativamente superiores aos descritos para os níveis circulantes da L-DOPA. Por último, estes resultados revelam que a desaminação da DA é um processo de inactivação quantitativamente importante em todos os tecidos renais estudados, mas com maior dimensão no rim humano.

B - Estudos sobre a influência da MAO-A e da MAO-B na desaminação da dopamina no rim de Rato

1. Introdução

Duas vias fundamentais concorrem para a degradação metabólica da DA de síntese renal: metilação em 3-MT, por acção da COMT, e desaminação em DOPAC, por acção da MAO. Uma via final comum envolve a conversão posterior, quer da 3-MT quer do DOPAC, em HVA, por acção da MAO e da COMT, respectivamente (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993).

A desaminação da DA de síntese renal é uma questão de importância considerável, por várias ordens de razão: em primeiro lugar, o rim dispõe de uma actividade de MAO que é das mais elevadas de todo o organismo; em segundo lugar, a desaminação da DA formada nos tecidos renais, em condições experimentais *in vitro*, constitui o processo mais importante envolvido na sua inactivação (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993); por último, a DA é formada na íntima proximidade das células que dispõem de receptores da DA (Felder e col., 1989) e, a nível renal, a MAO parece estar localizada, fundamentalmente, em compartimentos extraneuronais (Caramona e Soares-da-Silva, 1990). Pelos motivos expostos, é legítimo especular sobre a hipótese de ser possível obter uma potenciação dos efeitos da DA, diurético e natriurético, através da inibição da sua metabolização desaminativa. Essa possibilidade, a ser confirmada, pode revestir-se de uma maior relevância no Homem na medida em que, como foi evidenciado no capítulo IIA, o rim humano dispõe de uma actividade desaminativa significativamente mais elevada do que a existente quer no rim de Cão quer no de Rato.

A MAO existe sob duas formas, tipos A e B, as quais foram identificadas fazendo uso de inibidores selectivos e substratos específicos. Embora a DA seja substrato para as duas formas de MAO, no sistema nervoso central a MAO-B está particularmente envolvida na desaminação da DA, enquanto que a MAO-A está predominantemente implicada na metabolização desaminativa da 5-hidroxi-triptamina (5-HT). Sabe-se que a actividade renal das duas formas de MAO difere entre as várias espécies animais (Caramona e Soares-da-Silva, 1990; Fernandes e Soares-da-Silva, 1992). Por outro lado, estudos auto-radiográficos com marcadores específicos para as duas formas de MAO evidenciaram que, no rim de Rato, o padrão de distribuição da MAO-A é diferente do da MAO-B (Saura e col.,

1992). Desconhecem-se ainda, no entanto, quer os locais onde se verifica no rim a metabolização desaminativa da DA quer a importância relativa da MAO-A e da MAO-B nesse processo.

Pelos motivos descritos, nos estudos apresentados neste capítulo avaliámos a influência da MAO sobre a acumulação e metabolização da DA em tecidos renais de Rato incubados com L-DOPA exógena e estudámos a importância relativa das duas formas da enzima nesse processo.

2. Material e Métodos

2.1. Espécies animais

Nas experiências descritas neste capítulo foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 220 a 280 gramas de peso. Os animais foram mantidos em número de dois por gaiola, à temperatura de 24°C e em meio ambiente controlado (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão). A água e a comida foram fornecidas sem restrições e as experiências foram todas efectuadas durante o dia.

2.2. Colheita dos tecidos

Os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação. Os rins foram rapidamente removidos através de uma incisão abdominal na linha média e introduzidos em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C.

2.3. Formação e desaminação da DA no córtex e na medula renal de Rato

Em algumas experiências estudámos a formação e a desaminação da DA no córtex e na medula renal; para o efeito, procedemos à incubação de fatias de córtex ou de medula renal com concentrações crescentes de L-DOPA exógena.

Dissecaram-se fatias de córtex e de medula renal com cerca de 1,5 mm de espessura e 70 a 80 mg de peso. De seguida, as fatias foram pré-incubadas individualmente durante 60 minutos em tubos de vidro, contendo 10 ml de uma solução de Krebs; após a pré-incubação, as fatias foram incubadas durante 15

minutos com 10 ml da solução de Krebs à qual foi adicionada L-DOPA (10 a 2500 μ M). O pH do meio de incubação era de 7,4 e não variou quando se adicionou a L-DOPA, até à concentração de 2500 μ M.

2.4. Estudos de inibição da MAO

Nos estudos em que testámos o efeito da inibição da MAO sobre a acumulação tecidual da DA e do DOPAC, as fatias de rim, contendo córtex e medula, foram pré-incubadas durante 60 minutos na presença de concentrações crescentes de pargilina (0,1 a 10 mM), um inibidor da MAO não selectivo. Após a pré-incubação, as fatias foram incubadas durante 15 minutos na presença de L-DOPA (1 mM) e de pargilina (nas mesmas concentrações utilizadas durante a pré-incubação).

Em algumas experiências incubámos fatias de rim com L-DOPA (5 e 10 μ M) durante 5, 10, 20, ou 30 minutos, na presença e na ausência de pargilina (0,1 mM).

Numa série de estudos testámos a influência da inibição selectiva da MAO sobre a acumulação da DA e do DOPAC; pré-incubámos as fatias durante 60 minutos na presença de diferentes concentrações de inibidores selectivos, para a MAO-A (Ro 41-1049; 50, 100 e 250 nM) ou para a MAO-B (Ro 19-6327; 50, 100 e 250 nM) (Da Prada e col., 1990); de seguida, os tecidos foram incubados durante 15 minutos com 10 μ M de L-DOPA e na presença dos inibidores selectivos da MAO (nas mesmas concentrações utilizadas durante a pré-incubação).

A solução de Krebs utilizada nas experiências apresentadas neste capítulo tinha uma composição em tudo idêntica à descrita no capítulo IIA, para os estudos com fatias de rim. A pré-incubação e a incubação dos tecidos decorreram num banho de agitação aquecido (37°C) e numa atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂. No final da incubação, as fatias foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) arrefecida a 4°C, secas com papel de filtro e colocadas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M). Os recipientes foram arrefecidos a 4°C até à quantificação das catecolaminas, geralmente dentro de 48 horas.

2.5. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, DA, NA e DOPAC nos tecidos renais foi efectuada por intermédio de HPLC-ECD, como descrito no capítulo IIA. Os limites

inferiores de detecção da L-DOPA, DA, NA e DOPAC variaram entre 250 e 650 fmol/50 μ l.

2.6. Análise estatística

Apresentam-se os valores das médias $\pm$ EPM relativas a um número n de experiências. As diferenças entre duas médias foram avaliadas pelo teste t de Student para valores não emparelhados; a avaliação do significado da diferença entre os valores do controlo e vários grupos de experiências foi efectuada pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.7. Fármacos utilizados

O cloridrato de pargilina foi adquirido na Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.). O RO 41-1049 e o RO 19-6327 foram gentilmente oferecidos pelo Prof. Mosé da Prada (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito no capítulo anterior.

3. Resultados

3.1. Formação e desaminação da DA no córtex e na medula renal de Rato

A figura 1 ilustra a acumulação da L-DOPA, DA e DOPAC nas fatias de córtex e de medula renal após incubação com concentrações crescentes de L-DOPA (de 10 a 2500 μ M). Verificou-se que a acumulação da L-DOPA nos tecidos foi dependente da concentração do precursor da DA adicionada ao meio de incubação, tendo atingido níveis mais elevados no córtex do que na medula. Verificou-se uma tendência para a saturação na acumulação da L-DOPA nos tecidos medulares, facto que não se observou nos tecidos corticais.

A acumulação da DA nas fatias de córtex renal incubadas com concentrações crescentes de L-DOPA foi também dependente da concentração do precursor da DA adicionada ao meio e atingiu valores da ordem dos 480 nmol/g quando os tecidos foram incubados na presença de 2500 μ M de L-DOPA. Nestas condições

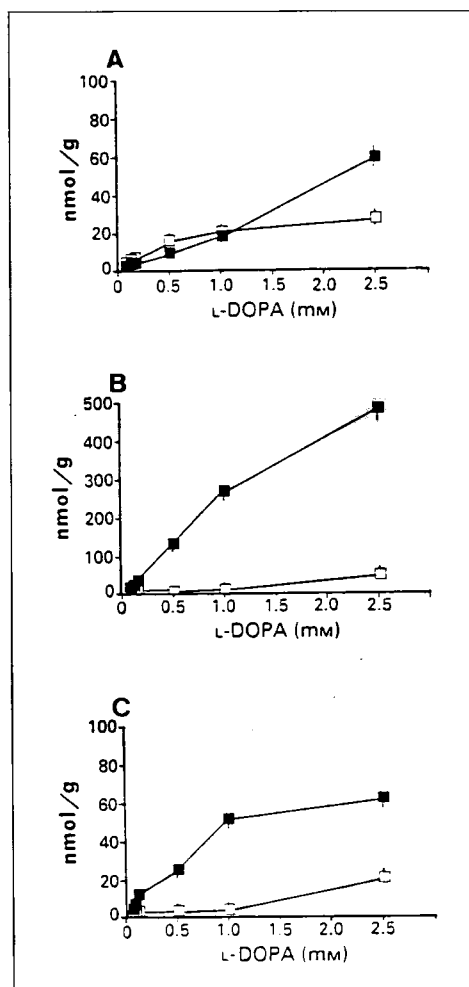


Figura 1. Níveis (em nmol/g) da (A) L-DOPA, (B) DA e (C) DOPAC em fatias de córtex (■) e de medula (□) renal de Rato, após incubação com concentrações crescentes de L-DOPA (de 10 a 2500 μ M). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais representam o EPM.

experimentais, a acumulação de DA nas fatias de medula foi cerca de 6-8% da verificada nos tecidos corticais.

A acumulação do DOPAC nos tecidos corticais foi também dependente da concentração de L-DOPA adicionada ao meio de incubação e atingiu valores da

ordem dos 62 nmol/g quando os tecidos foram incubados com 2500 μ M de L-DOPA. Tal como se verificou para a DA, a acumulação do DOPAC nos tecidos medulares incubados com 2500 μ M de L-DOPA foi cerca de 8% da observada nos tecidos corticais. Assistiu-se a uma tendência para a saturação na acumulação do DOPAC nos tecidos corticais, facto que não se evidenciou na medula.

Nas fatias de rim incubadas sem adição de L-DOPA, os teores teciduais de NA no córtex e na medula foram de, respectivamente, $1,3 \pm 0,14$ e $0,4 \pm 0,06$ nmol/g. Nestas condições experimentais, não foram detectados teores de DOPAC nos tecidos renais. O conteúdo tecidual de NA, no final das experiências efectuadas sem a adição de L-DOPA, não foi significativamente diferente do observado nos tecidos renais incubados com concentrações crescentes do precursor da DA (de 10 a 2500 μ M).

3.2. Estudos de inibição da MAO

Como se pode observar na figura 2, a incubação das fatias de rim com 1 mM de L-DOPA condicionou uma acumulação tecidual importante de DA e de DOPAC. Nas experiências em que a pargilina (0,1 mM), um inibidor da MAO não selectivo, foi adicionada ao meio de incubação, assistiu-se a uma redução de 84% na acumulação do DOPAC; este efeito foi acompanhado de um aumento de 17% na acumulação tecidual da DA, o qual não atingiu, no entanto, significado estatístico (figura 2).

Nas experiências em que se adicionaram concentrações crescentes de pargilina (de 0,5 a 10 mM) ao meio de incubação, o efeito observado sobre a acumulação do DOPAC (redução de 85 a 95%) não foi significativamente diferente do verificado nos estudos efectuados com a concentração mais baixa do inibidor da MAO (0,1 mM) (figura 2). Por outro lado, nos estudos em que os tecidos foram incubados na presença de 5 e 10 mM de pargilina, os níveis teciduais da DA foram reduzidos para, respectivamente, 54% e 22% dos observados na situação de controlo.

Como a análise do efeito da pargilina sobre a acumulação tecidual da DA sugeria uma capacidade limitada do compartimento onde a síntese da DA se verifica, decidimos efectuar um grupo de estudos com diferentes tempos de incubação e na presença de uma concentração de L-DOPA mais reduzida (10 μ M). Nestas condições experimentais, as modificações condicionadas pela pargilina sobre a acumulação tecidual da DA e do DOPAC mostraram ser dependentes do

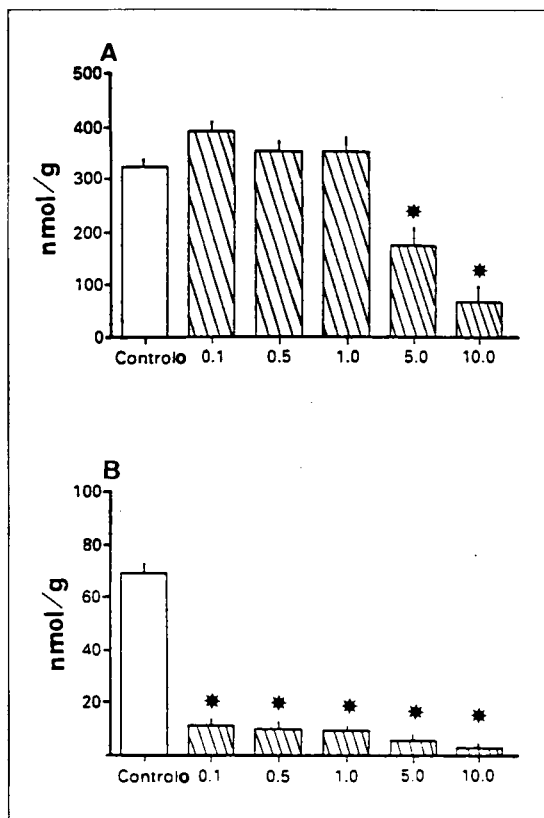


Figura 2. Níveis teciduais (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de rim incubadas com 1,0 mM de L-DOPA durante 15 minutos. Os resultados dizem respeito a estudos efectuados na situação controlo (□) e na presença de concentrações crescentes (0,1 a 10 mM) de pargilina (▨). Cada coluna representa a média de três experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente do valor verificado no controlo correspondente, utilizando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0,01$).

tempo de incubação (figura 3).

Quando a incubação teve a duração de 5 minutos, a adição de 0,1 mM de pargilina condicionou um aumento na acumulação tecidual de DA (de 20 a 32%), o qual foi menos acentuado do que a redução, verificada concomitantemente, na acumulação tecidual do DOPAC (de 54 a 55%). No entanto, quando os tecidos foram incubados durante 30 minutos, o efeito da pargilina sobre a acumulação do

DOPAC (redução de 62%) foi semelhante ao observado sobre a acumulação da DA (aumento de 56%) (figura 3).

Numa outra série de experiências estudámos o efeito da pargilina (0,1 mM) sobre a acumulação da DA, na presença de uma concentração de L-DOPA mais reduzida (5 μ M). Nestas condições, o aumento na acumulação da DA foi semelhante à redução observada na acumulação do DOPAC.

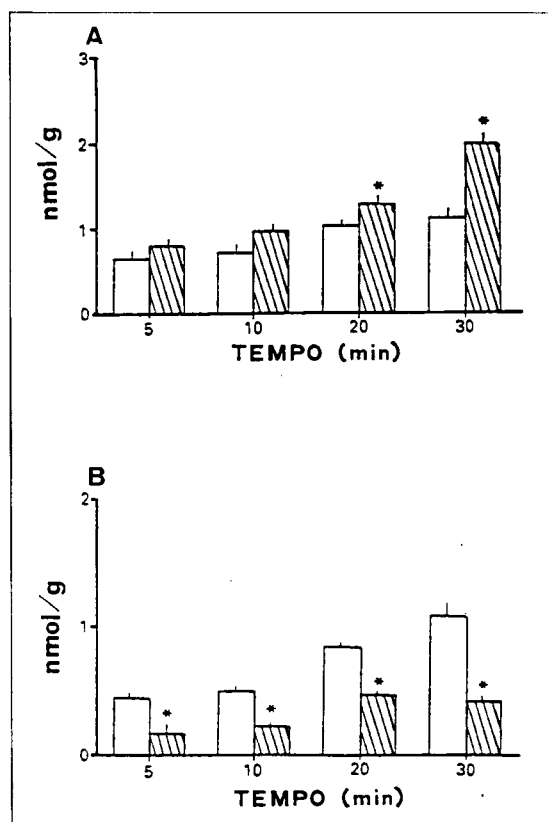


Figura 3. Níveis teciduais (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPA C em fatias de rim incubadas com 10 μ M de L-DOPA. Os resultados dizem respeito a estudos efectuados com tempos de incubação de 5, 10, 20 e 30 minutos na situação de controlo (□) e na presença de 0,1 mM de pargilina (▨). Cada coluna representa a média de quatro experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente do valor verificado no controlo correspondente, utilizando o teste t de Student (* $P < 0,01$).

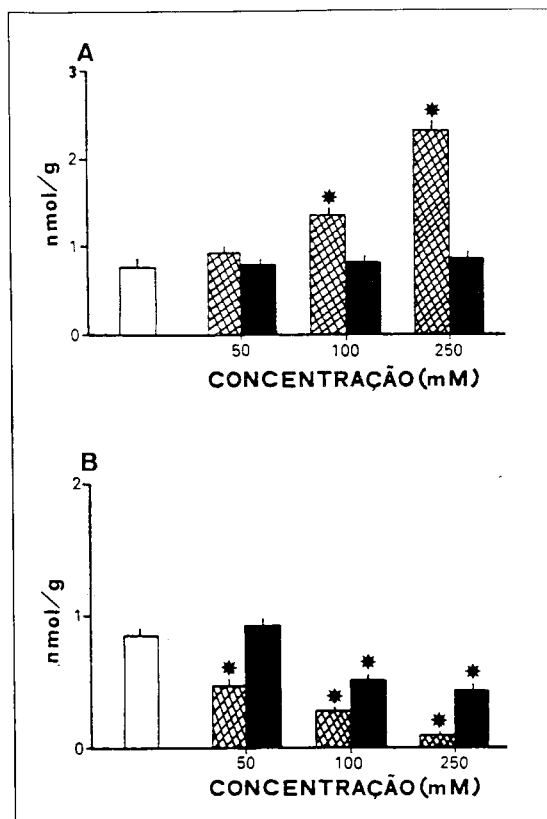


Figura 4. Níveis (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de rim incubadas com 10 μ M de L-DOPA durante 15 minutos. Os resultados dizem respeito a estudos efectuados na situação controlo (□) e na presença de concentrações crescentes (50, 100 e 250 nM) do RO 41-1049 (▨) ou do RO 19-6327 (■). Cada coluna representa a média de 5 a 6 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente do valor verificado no controlo correspondente, utilizando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0,01$).

Nos estudos em que os tecidos foram incubados com 10 μ M de L-DOPA na presença do inibidor selectivo da MAO-A (RO 41-1049; 50, 100 e 250 nM), verificámos um aumento dependente da concentração na acumulação tecidual da DA (de 16 a 66%) (figura 4); este efeito inibitório selectivo da MAO-A acompanhou-se de uma redução, também dependente da concentração, nos níveis teciduais do DOPAC (de 44 a 89%).

A adição do inibidor selectivo da MAO-B (RO 19-6327; 50, 100 e 250 nM) ao meio de incubação não condicionou modificações na acumulação tecidual da DA, mas produziu uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual do DOPAC (figura 4); de facto, enquanto que na presença de 50 nM do RO 19-6327 não se verificaram modificações na acumulação tecidual do DOPAC, na presença de 100 e de 250 nM assistiu-se a uma redução na acumulação tecidual do metabolito desaminado da DA de, respectivamente, 40 e 49%.

Os teores teciduais de NA e de L-DOPA não foram modificados pela presença dos inibidores selectivos da MAO, em qualquer das concentrações utilizadas.

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que a síntese renal da DA ocorre fundamentalmente na zona cortical e estão de acordo com anteriores observações, em que se evidenciou que a actividade renal da DAAA está sobretudo localizada no córtex (Adam e col., 1986; Seri e col., 1990). Os resultados destes trabalhos vêm também reforçar a importância atribuída ao papel da MAO na inactivação da DA de síntese renal (Stöcker e Hempel, 1976; Kopin, 1985), ao evidenciar que a DA recém-sintetizada é significativamente desaminada em DOPAC.

Verificou-se que a proporção de DA desaminada foi idêntica no córtex e na medula. Contudo, enquanto no córtex se assistiu a uma tendência para a saturação na desaminação, o mesmo não se verificou na medula. Poderia supor-se que a ausência de saturação da desaminação na zona medular tivesse resultado da presença de uma actividade de MAO mais elevada na medula; contudo, ao contrário do que se verifica no Gato (Caramona e Soares-da-Silva, 1990), a actividade específica da MAO no rim de Rato não mostrou ser mais elevada nos tecidos medulares do que nos corticais (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992). Por esse motivo, o fenómeno observado deverá estar provavelmente relacionado com a menor produção de DA, na zona medular do rim.

Os estudos apresentados neste capítulo evidenciaram uma capacidade limitada da MAO para desaminar a DA recém-formada nos tecidos renais; esse facto traduziu-se por uma relação DOPAC/DA significativamente mais elevada nos tecidos incubados com 5 e 10 μ M de L-DOPA, do que nos tecidos incubados com 1,0 e 2,5 mM do precursor da DA. A relevância fisiológica deste achado deve ser

analisada, no entanto, tomando em consideração que a concentração plasmática da L-DOPA está, em condições fisiológicas, próxima das concentrações mais baixas utilizadas nestes estudos.

Verificou-se que a acumulação tecidual da NA não foi modificada quando os tecidos renais foram incubados com concentrações de L-DOPA crescentes, até 2,5 mM. Estes resultados estão de acordo com a noção de que a L-DOPA não é significativamente descarboxilada em neurónios noradrenérgicos (Baines e Chan, 1980) e revelam também que a DA recém-sintetizada no rim não é significativamente captada e metabolizada pelas terminações neuronais simpáticas.

O efeito da pargilina (0,1 mM) sobre a acumulação da DA, nas fatias de rim incubadas com 10 μ M de L-DOPA, foi menos acentuado (aumento de 20 a 32%) do que o verificado sobre a acumulação tecidual do DOPAC (redução de 54 a 55%). Como a pargilina é um inibidor da MAO não-selectivo, os seus efeitos sobre a acumulação da DA e do DOPAC podem traduzir a acção do inibidor sobre as duas formas de MAO, tipos A e B. Decidimos, por isso, testar o efeito de inibidores selectivos, para a MAO-A e para a MAO-B, sobre a desaminação da DA recém-formada nos tecidos renais.

O inibidor selectivo da MAO-A condicionou um aumento dependente da concentração na acumulação tecidual da DA, o qual foi acompanhado por uma redução paralela na acumulação tecidual do DOPAC. O inibidor selectivo da MAO-B, por outro lado, não afectou a acumulação tecidual da DA mas, nas duas concentrações mais elevadas, reduziu significativamente a acumulação do DOPAC. Estes resultados sugerem que ambas as formas de MAO estão envolvidas na metabolização desaminativa da DA formada nos tecidos renais; no entanto, a sua acção parece desenvolver-se em compartimentos distintos. De acordo com os resultados destes estudos, a MAO-A poderá estar localizada no compartimento onde a síntese da DA se processa, desempenhando um papel mais relevante na inactivação da amina recém-formada, enquanto que a MAO do tipo B poderá estar localizada fora desse compartimento, sendo responsável pela desaminação da DA no exterior do local onde a sua síntese se verifica.

Ao abordar a questão da inibição da MAO, tendo como objectivo conseguir uma potenciação dos efeitos diurético e natriurético da DA de síntese renal, pode concluir-se que a pargilina, atendendo aos seus efeitos não-selectivos e à distribuição aparentemente heterogénea das duas formas de MAO nos tecidos renais, não deverá corresponder ao fármaco ideal para esse efeito. Por outro lado, os resultados destes estudos sugerem que um inibidor selectivo da MAO-A poderá

ser o fármaco a preferir, caso se confirme que a MAO do tipo A predomina no compartimento onde a síntese da DA se processa.

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo revelam que a desaminação da DA de síntese renal:

- 1 - constitui um processo importante envolvido na sua inactivação;
- 2 - assume uma maior dimensão nos tecidos corticais e
- 3 - ocorre sobretudo em compartimentos extraneuronais, que dispõem de elevada actividade de MAO.

Os resultados destas experiências evidenciam também que ambas as formas de MAO, tipos A e B, estão envolvidas no processo de inactivação desaminativa da DA de síntese renal, embora actuando em compartimentos distintos.

C - Influência do sódio na síntese e desaminação da dopamina no rim humano e de Rato

1. Introdução

No capítulo IIA evidenciou-se que a afinidade da DAAA renal para L-DOPA é semelhante nas três espécies animais estudadas (Homem, Cão e Rato), variando os valores de K_m entre 55 e 80 μM . Como comentário a estes resultados referiu-se que os valores de K_m para a DAAA se situam muito acima da concentração plasmática da L-DOPA e sugeriu-se que, nestas condições, o aporte do substrato à descarboxilase poderá constituir o passo mais importante na regulação da síntese renal da DA. O aporte da L-DOPA à DAAA intracelular depende, em última análise, de um balanço entre a concentração do precursor presente à célula e o seu transporte tubular. Por esse motivo, os mecanismos que regulam o transporte tubular da L-DOPA podem assumir, neste contexto, uma importância fisiológica particular.

De há muito se sabe que o transporte tubular de alguns ácidos aminados aromáticos é um processo dependente do transporte de sódio, ao nível das células dos túbulos contornados proximais (Ulrich e col., 1974). Chan (1976) foi, no entanto, o primeiro investigador a evidenciar, no rim de Rato, que o transporte tubular da L-DOPA se processa através das membranas luminal e basolateral, por meio de um processo estereoselectivo e dependente da energia. Os mecanismos envolvidos na regulação do transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares renais, com particular relevo para a sua sensibilidade ao transporte de sódio, não foram, contudo, estudados.

Soares-da-Silva e Fernandes (1990a, 1991a) evidenciaram que quer o peptídeo auricular natriurético- α (α -ANP) quer o GMPc, ambos com reconhecidos efeitos inibitórios sobre o transporte tubular de sódio (Harris e col., 1987; Garvin, 1989), condicionam uma redução significativa no transporte tubular da L-DOPA e na formação renal da DA, em fatias de rim de Rato. Estes resultados sugerem que a síntese renal da DA pode depender de um co-transporte celular envolvendo o sódio e a L-DOPA, o qual será, por sua vez, passível de inibição pelo α -ANP e pelo GMPc. Outras evidências que favorecem uma relação estreita entre o transporte tubular de sódio e o da L-DOPA são os resultados de estudos *in vitro*, em que se evidenciou que a síntese renal da DA é sensível à concentração de sódio presente

no meio extracelular (Hagege e Richet, 1985) e dependente da integridade do citoesqueleto actínico das células tubulares renais (Soares-da-Silva, 1992a).

Nas células dos túbulos contornados proximais, onde está concentrada a actividade renal da DAAA, o transporte do sódio ocorre através de uma série de transportadores presentes ao nível da membrana celular e depende, em última análise, da manutenção de um gradiente de concentração favorável à entrada do sódio nas células tubulares. Este gradiente de concentração resulta, por sua vez, da acção concertada entre a actividade da ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$, que cria o gradiente e as características de permeabilidade da membrana celular que impedem a sua dissipação.

No presente capítulo, investigámos o papel do transporte tubular de sódio no transporte tubular da L-DOPA em condições experimentais *in vitro*, com tecidos renais humanos e de Rato. Para o efeito, os tecidos foram incubados com L-DOPA exógena e a síntese da DA foi avaliada em condições de atenuação, ou anulação, do gradiente de concentração de sódio necessário ao seu transporte vectorial transtubular.

Considerando que o rim dispõe de uma elevada actividade de MAO e que a desaminação da DA representa um processo importante na sua inactivação (ver cap. IIA e IIB), os trabalhos que constam deste capítulo foram complementados com a avaliação da influência do transporte tubular de sódio sobre o processo de desaminação renal da DA.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

2.1.1. Os tecidos renais humanos foram obtidos como descrito no capítulo IIA.

2.1.2. Os tecidos renais de Rato foram obtidos como descrito no capítulo IIA.

2.2. Estudos com fatias de córtex renal humano

As fatias de córtex renal humano foram pré-incubadas durante 60 minutos em 2 ml de uma solução de Krebs. A solução de Krebs utilizada nestas experiências tinha uma composição em tudo idêntica à descrita no capítulo IIA, para os estudos

com fatias de rim. Depois de pré-incubação, as fatias de rim foram incubadas durante 15 minutos em 2 ml de solução de Krebs, com seis concentrações de sódio (0, 20, 40, 80, 120 e 160 mM) e na presença de duas concentrações de L-DOPA (50 e 100 μ M). A osmolaridade e a concentração de cloro no meio de incubação foram mantidas idênticas, através da adição de cloreto de colina. A pré-incubação e a incubação das fatias decorreram sob agitação constante, em tubos de vidro aquecidos (37°C) e gaseificados (95% O₂ e 5% de CO₂).

Em algumas experiências testámos a influência da ubaína, um inibidor da ATPase Na⁺/K⁺, sobre a síntese renal de DA a partir da L-DOPA. A ubaína (100, 500 e 1000 μ M) foi adicionada ao Krebs durante a pré-incubação e a incubação dos tecidos; nesta série de estudos, a incubação das fatias foi efectuada na presença de 50 μ M de L-DOPA e de três diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 μ M).

No final da incubação, as fatias foram sucessivamente introduzidas por breves instantes em solução salina (NaCl 0,9%) arrefecida a 4°C, secas com papel de filtro e colocadas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M). Os recipientes foram arrefecidos a 4°C, até à quantificação da L-DOPA, DA e DOPAC.

2.3. Estudos em fatias de córtex renal de Rato

O protocolo experimental dos estudos destinados a testar a influência das variações na concentração extracelular de sódio sobre a síntese renal da DA, reproduziu globalmente o descrito anteriormente para o rim humano; contudo, neste caso as fatias foram incubadas com doze concentrações de sódio (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mM) e na presença de quatro diferentes concentrações de L-DOPA (10, 25, 50 e 100 μ M).

O efeito da ubaína foi estudado fazendo uso de um protocolo experimental em tudo idêntico ao utilizado nos estudos com fatias de rim humano.

Efectuámos ainda experiências destinadas a testar o efeito da anfotericina B (um antifúngico que aumenta a permeabilidade da membrana extracelular ao sódio) e do amilorido (um inibidor do trocador Na⁺-H⁺) sobre a síntese renal da DA a partir da L-DOPA. Nestas séries de estudos, o protocolo utilizado reproduziu o das experiências em que se avaliou o efeito da ubaína, estando neste caso a anfotericina B (5, 10 e 50 μ g/ml) ou o amilorido (5, 10, 50 e 100 μ M) presentes durante a pré-incubação e a incubação dos tecidos. Tal como nas experiências em que testámos o efeito da ubaína, nestas séries de estudos os tecidos renais foram

incubados na presença de 50 μM de L-DOPA e de três diferentes concentrações de sódio (20, 120, e 160 mM). A osmolaridade e a concentração de cloro do meio de incubação foram mantidas idênticas através da adição de cloreto de colina.

Numa série de experiências avaliámos o efeito do amilorido (10 e 50 μM) e do etilisopropilamilorido (EIPA) (1, 5 e 10 μM) na acumulação tecidual e na fracção de saída da DA, em fatias de rim incubadas com L-DOPA (10, 25, 50 e 100 μM), sob condições de inibição da MAO (na presença de 0,1 mM de pargilina). Nessas experiências, o inibidor da MAO esteve presente durante a pré-incubação e a incubação dos tecidos. Para avaliar a quantidade de DA que passou para o meio de incubação, adicionaram-se 250 μl de ácido perclórico (2 M) ao meio, depois de terem sido retirados os tecidos, no final das experiências. As amostras dos líquidos de incubação foram mantidas a 4°C durante 24 horas, até à quantificação das catecolaminas. A fracção de saída da DA foi calculada dividindo os valores respeitantes à quantidade de DA presente no meio de incubação, no final das experiências, pela quantidade total de DA formada (acumulação no tecido+acumulação no meio de incubação).

2.4. Estudos com homogeneizados de rim de Rato

Prepararam-se homogeneizados de rim de Rato como descrito no capítulo IIA. Incubaram-se alíquotas de 1,0 ml de homogeneizado de rim com 1,0 ml de uma solução de Krebs, durante 60 minutos; de seguida, adicionou-se a L-DOPA ao meio de incubação, em seis diferentes concentrações (0,1 a 10 μM), durante 15 minutos. A solução de Krebs utilizada nestes estudos tinha uma composição idêntica à descrita no capítulo IIA, para os estudos com homogeneizados de rim. Em algumas experiências, avaliámos a descarboxilação da L-DOPA em DA nos homogeneizados, fazendo uso de uma solução de Krebs com 120 mM de sódio (em substituição da concentração de 50 mM utilizada nos restantes estudos).

Noutra série de experiências, avaliámos a influência do amilorido, do EIPA e da ubaína sobre a desaminação da DA; os homogeneizados foram pré-incubados durante 60 minutos com amilorido (10 e 50 μM), EIPA (5, 10 e 50 μM) ou ubaína (100 e 500 μM) e, de seguida, adicionou-se a DA (0,5, 2,5 e 5,0 μM) ao meio de incubação, durante 15 minutos.

As incubações decorreram sob agitação constante, em tubos de vidro aquecidos (37°C) e gaseificados (95% O_2 e 5% CO_2). No final da incubação, a reacção foi suspensa através da adição de 250 μl de ácido perclórico (2 M) a cada

tubo e as preparações foram arrefecidas a 4°C durante 60 minutos. De seguida, centrifugaram-se os homogeneizados (a 2000 rpm e a 4°C, durante 2 minutos) e retiraram-se alíquotas de 1,5 ml do sobrenadante do filtrado para a quantificação da L-DOPA, DA e DOPAC.

2.5. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, DA e DOPAC nos tecidos renais e nos homogeneizados foi efectuada por HPLC-ECD, como descrito no capítulo IIA. Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA e DOPAC variaram entre 250 e 650 fmol/50 µl.

2.6. Determinação das proteínas

O conteúdo em proteínas dos homogeneizados (mg de proteína/g de tecido) foi determinado pelo método descrito por Lowry e col. (1951), utilizando albumina humana como padrão.

2.7. Análise estatística

A análise da influência do sódio na acumulação tecidual da L-DOPA, da DA e do DOPAC foi efectuada através da correlação entre os valores referentes à concentração de sódio presente no meio de incubação e os logaritmos dos valores relativos aos níveis teciduais da L-DOPA, da DA e do DOPAC. A inclinação das rectas de acumulação foi calculada por análise de regressão linear. As constantes de acumulação (k) da L-DOPA, da DA e do DOPAC foram obtidas através da expressão descrita por Brodie e col. (1966) (k =inclinação da recta/0,434). Determinou-se ainda a taxa de renovação da L-DOPA, da DA e do DOPAC em função da concentração de sódio presente no meio de incubação; para o efeito, calculou-se o produto entre o valor relativo à acumulação tecidual da L-DOPA, da DA ou do DOPAC na presença de 0 mM de sódio e a respectiva constante de acumulação (k).

Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM relativas a um número n de experiências em cada grupo. As diferenças entre os valores das médias foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.8. Fármacos utilizados

O amilorido, a anfotericina B e a ubaína foram adquiridos na Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.). O EIPA foi gentilmente oferecido pelo Dr. E. Schömig (Institut für Pharmacologie und Toxicologie, Würzburg Universität, Alemanha). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

3.1. Estudos com tecidos renais humanos

A figura 1 ilustra a correlação entre a concentração de sódio (0 a 160 mM) presente no meio de incubação e a acumulação da DA e do DOPAC nas fatias de córtex renal incubadas com 50 e 100 μ M de L-DOPA. Como pode ser observado,

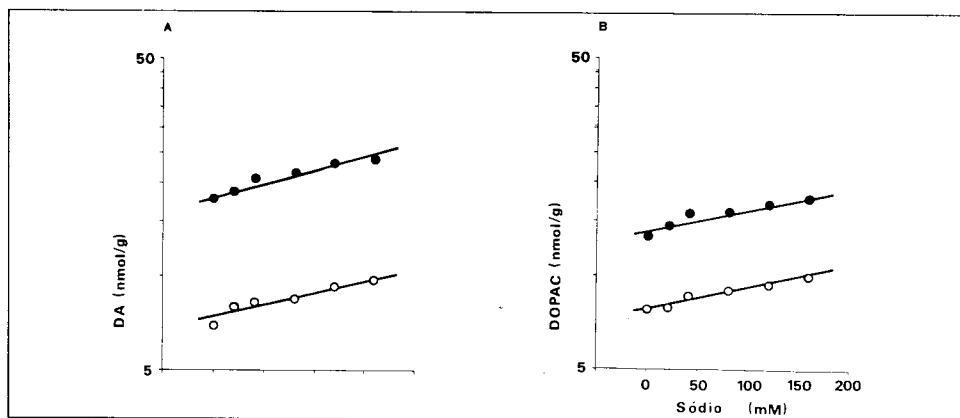


Figura 1. Correlação entre a de concentração de sódio presente no meio de incubação (0, 20, 40, 80, 120 e 160 mM) e os níveis (em nmol/g; escala logarítmica) da (A) DA e do (B) DOPAC nas fatias de córtex renal humano incubadas com L-DOPA (50 μ M, $\circ$; 100 μ M, $\bullet$). Cada ponto representa a média de 5 a 6 determinações por grupo; os valores de EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da correlação entre os pontos, nas experiências efectuadas com 50 μ M de L-DOPA, foram de: DA, $r=0,7420$, $n=36$; DOPAC, $r=0,9091$, $n=36$; nas experiências efectuadas com 100 μ M de L-DOPA, foram de: DA, $r=0,7938$, $n=30$; DOPAC, $r=0,9435$, $n=30$.

a acumulação da DA e do DOPAC foi dependente da concentração de sódio presente no meio. A acumulação da amina foi mais elevada nas fatias de rim incubadas com 100 μM de L-DOPA; contudo, a constante de acumulação (k) da DA foi semelhante quando os tecidos foram incubados com 50 e 100 μM do precursor (tabela 1). O mesmo se verificou para o DOPAC, ou seja, a acumulação do metabolito desaminado da DA foi mais elevada nos tecidos incubados com 100 μM de L-DOPA, embora as constantes de acumulação do DOPAC fossem semelhantes na presença de 50 e de 100 μM do precursor da DA (tabela 1).

	Constante de acumulação (k)	Taxa de renovação
	/mmol Na^+	(nmol/g/15 min/nmol Na^+)
Dopamina		
50 μM de L-DOPA	0,0016 $\pm$ 0,0002	0,0116 $\pm$ 0,0016
100 μM de L-DOPA	0,0016 $\pm$ 0,0005	0,0279 $\pm$ 0,0041*
DOPAC		
50 μM de L-DOPA	0,0018 $\pm$ 0,0002	0,0134 $\pm$ 0,0018
100 μM de L-DOPA	0,0021 $\pm$ 0,0005	0,0216 $\pm$ 0,0037*

Tabela 1. Constantes de acumulação (k) e taxas de renovação em função da concentração de sódio para a DA e para o DOPAC, em fatias de córtex renal humano incubadas com L-DOPA (50 e 100 μM) e na presença de concentrações crescentes de sódio (0 a 160 mM). Os resultados foram calculados a partir da acumulação tecidual da DA e do DOPAC no final da incubação. Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM relativas a um número de 5 a 6 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor correspondente verificado nos estudos realizados com 50 μM de L-DOPA (* $P < 0.02$).

É interessante verificar que as constantes de acumulação da DA foram semelhantes às do DOPAC nas experiências efectuadas com as duas concentrações de L-DOPA. Por outro lado, não se verificaram modificações nas constantes de acumulação, quer da DA quer do DOPAC, entre os estudos efectuados na presença de 50 e de 100 μM de L-DOPA.

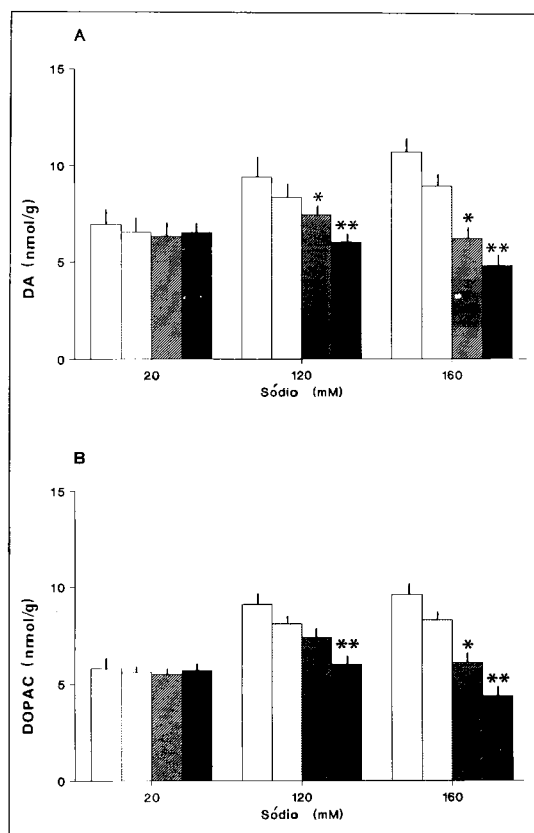


Figura 2. Efeito da ubaína sobre a acumulação (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de córtex renal humano incubadas com 50 μ M de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Controlo (□); ubaína 100 μ M (▨); ubaína 500 μ M (▧) e ubaína 1000 μ M (■). As barras representam médias de 5 a 6 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Valores significativamente diferentes dos verificados no respectivo controlo, utilizando o teste de Tukey-Kramer (* P <0.05; ** P <0.02).

Na figura 2 ilustram-se os resultados das experiências em que foi testado o efeito da inibição da ATPase Na^+/K^+ por intermédio da ubaína (100, 500 e 1000 μ M) na acumulação da DA e do DOPAC em tecidos renais humanos; os tecidos foram incubados com 50 μ M de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Como pode ser observado, a ubaína condicionou uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual da DA; este efeito

foi mais acentuado na presença da concentração de sódio mais elevada (160 mM). A percentagem de redução na acumulação da DA foi de 12 a 36 %, na presença de 120 mM de sódio, e de 17 a 55%, na presença de 160 mM. O efeito da ubaína na acumulação tecidual do DOPAC foi semelhante ao verificado sobre a acumulação da DA (efeito dependente da concentração do inibidor da ATPase Na^+/K^+ e mais acentuado na presença da concentração de sódio mais elevada); nestas condições, a percentagem de redução verificada na acumulação do DOPAC foi de 10 a 34% e de 15 a 54% na presença de, respectivamente, 120 e 160 mM de sódio.

3.2. Estudos com tecidos renais de Rato

Na figura 3 pode observar-se a correlação entre a concentração de sódio presente no meio de incubação e a acumulação da L-DOPA (que não foi convertida em DA), da DA e do DOPAC nas fatias de córtex renal de Rato incubadas com L-DOPA (10, 25, 50 e 100 μM). Tal como se observara nas experiências efectuadas com tecidos renais humanos, verificou-se que a acumulação da L-DOPA, da DA e do DOPAC foi dependente da concentração sódio presente no meio de incubação. A acumulação tecidual de L-DOPA foi maior nos tecidos incubados com a concentração mais elevada do precursor da DA (100 μM); contudo, a constante de acumulação da L-DOPA em função do sódio não variou entre os estudos efectuados com as quatro concentrações do precursor da DA (tabela 2).

A acumulação tecidual, quer da DA quer do DOPAC, mostrou ser também dependente da concentração de L-DOPA adicionada ao meio de incubação. Tal como se verificara nos estudos com rim humano, as constantes de acumulação da amina e do metabolito desaminado, em função da concentração de sódio, não variaram significativamente quando se variou a concentração de L-DOPA no meio de incubação (10, 25, 50 e 100 μM) (tabela 2). Deve ainda salientar-se que, independentemente da concentração de L-DOPA utilizada, as constantes de acumulação da DA em função da concentração de sódio foram semelhantes às verificadas para o precursor da DA; contudo, as constantes de acumulação da DA foram significativamente inferiores às do DOPAC, com qualquer das concentrações de L-DOPA utilizadas (tabela 2). Estes resultados diferem dos observados nos estudos com tecidos renais humanos, nos quais as constantes de acumulação da DA foram semelhantes às do DOPAC na presença das duas concentrações de L-DOPA utilizadas (tabela 1).

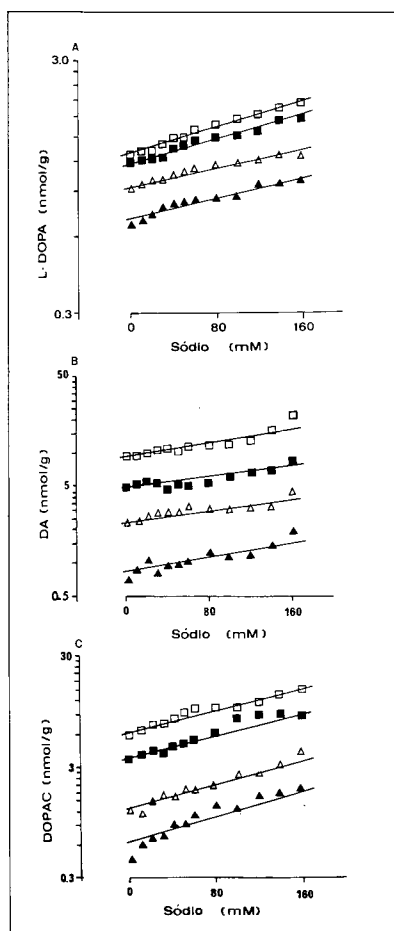


Figura 3. Correlação entre a concentração de sódio (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mM) presente no meio de incubação e a acumulação (em nmol/g; escala logarítmica) da (A) L-DOPA, da (B) DA e do (C) DOPAC em fatias de córtex renal de Rato incubadas com L-DOPA. Os resultados dizem respeito à acumulação verificada após a incubação com quatro diferentes concentrações de L-DOPA: 10 μ M ($\blacktriangle$), 25 μ M ($\triangle$), 50 μ M ($\blacksquare$) e 100 μ M ($\square$). Cada ponto representa a média relativa a 5 determinações por grupo; o EPM foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da correlação entre os pontos foram os seguintes: nas experiências efectuadas com 10 μ M de L-DOPA (L-DOPA, $r=0,9926$, $n=58$; DA, $r=0,8753$, $n=58$; DOPAC, $r=0,7456$, $n=58$); com 25 μ M de L-DOPA (L-DOPA, $r=0,9859$, $n=60$; DA, $r=0,9475$, $n=60$; DOPAC, $r=0,8436$, $n=60$); com 50 μ M de L-DOPA (L-DOPA, $r=0,9673$, $n=60$; DA, $r=0,8851$, $n=60$; DOPAC, $r=0,7632$, $n=60$) e com 100 μ M de L-DOPA (L-DOPA, $r=0,9634$, $n=60$; DA, $r=0,9643$, $n=60$; DOPAC, $r=0,8445$, $n=60$).

	Constante de acumulação (k)	Taxa de renovação
	/mmol Na ⁺	(nmol/g/15 min/nmol Na ⁺)
L-DOPA		
10 µM de L-DOPA	0,0024±0,0003	0,0016±0,0004
25 µM de L-DOPA	0,0019±0,0005	0,0018±0,0002
50 µM de L-DOPA	0,0026±0,0003	0,0031±0,0003*, †
100 µM de L-DOPA	0,0030±0,0004	0,0038±0,0004*, †
Dopamina		
10 µM de L-DOPA	0,0040±0,0004	0,0029±0,0005
25 µM de L-DOPA	0,0030±0,0008	0,0057±0,0002*
50 µM de L-DOPA	0,0030±0,0004	0,0141±0,0014*, †
100 mM de L-DOPA	0,0016±0,0005	0,0279±0,0041*, ♦
DOPAC		
10 µM de L-DOPA	0,0079±0,0009+	0,0036±0,0009
25 µM de L-DOPA	0,0063±0,0005+	0,0044±0,0007
50 µM de L-DOPA	0,0069±0,0006+	0,0156±0,0018*, †
100 µM de L-DOPA	0,0064±0,0007+	0,0261±0,0027*, ♦

Tabela 2. Constantes de acumulação (k) e taxas de renovação em função da concentração de sódio (em nmol/g/15 min/mmol de Na⁺), para a L-DOPA, para a DA e para o DOPAC, nas fatias de córtex renal de Rato incubadas com L-DOPA (10, 25, 50 e 100 µM) e na presença de concentrações crescentes de sódio (0 a 160 mM). Os resultados foram calculados a partir da acumulação tecidual da DA e do DOPAC no final da incubação. Os valores apresentados são médias ± EPM relativas a 5 experiências por grupo. *Significativamente diferente do valor correspondente observado nos estudos efectuados com 10 µM de L-DOPA (P<0.01); †Significativamente diferente do valor correspondente observado nos estudos efectuados com 25 µM de L-DOPA (P<0.01); ♦Significativamente diferente do valor correspondente observado nos estudos efectuados com 50 µM de L-DOPA (P<0.02); +Significativamente diferente do valor correspondente para a L-DOPA e para a DA (P<0.01).

Na figura 4 estão ilustrados os resultados das experiências em que foi estudada a influência do sódio na síntese da DA em homogeneizados de rim de Rato incubados com L-DOPA. Verificou-se que a formação de DA nos

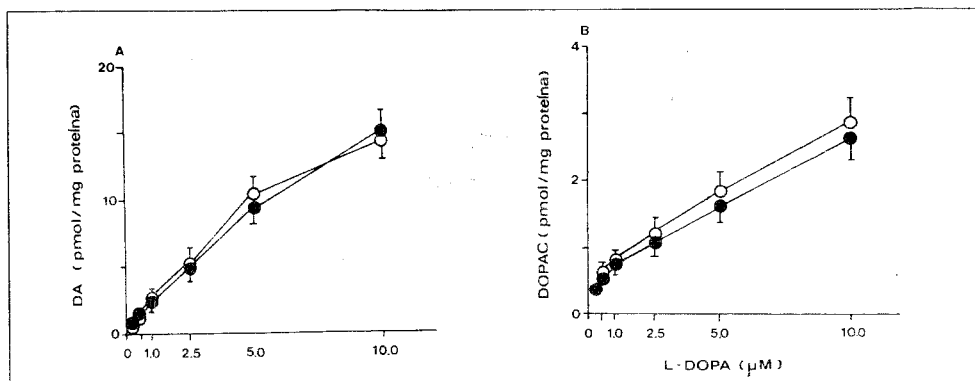


Figura 4. Correlação entre os níveis (em pmol/mg proteína) da (A) DA e do (B) DOPAC nos homogeneizados de rim e a concentração de L-DOPA adicionada ao meio de incubação (de 0,1 a 10 μ M), na presença de 50 (○) e de 120 (●) mM de sódio. Cada ponto representa a média de 5 determinações por grupo; as linhas verticais representam o EPM.

homogeneizados foi dependente da concentração do precursor (de 0,1 a 10 μ M) adicionada ao meio de incubação; contudo, ao contrário do que se observou nos estudos com as fatias, a acumulação da DA nos homogeneizados não foi modificada pela presença de diferentes concentrações de sódio. O processo de desaminação da DA recém-formada nos homogeneizados não foi também modificado pela variação da concentração de sódio no meio.

A figura 5 ilustra os resultados das experiências em que foi testada a influência da ubaína (100, 500 e 1000 μ M) sobre a acumulação da DA e do DOPAC em fatias de rim de Rato incubadas com 50 μ M de L-DOPA e na presença de três diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Tal como se observara nos estudos com tecidos renais humanos, a ubaína condicionou uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual de DA; ainda em analogia com o que se verificou nos estudos com rim humano, este efeito foi mais acentuado na presença da concentração de sódio mais elevada (160 mM). A ubaína condicionou uma redução percentual na acumulação da DA que variou entre 6 e 13%, na presença de 120 mM de sódio e entre 13 e 21%, na presença de 160 mM de sódio. A ubaína condicionou também uma redução na acumulação tecidual do DOPAC. Contudo, ao contrário do que se observou nos estudos com tecidos humanos, o efeito da ubaína sobre a acumulação do DOPAC, no rim de Rato, foi mais acentuado do que o efeito verificado sobre a acumulação da DA; para o DOPAC,

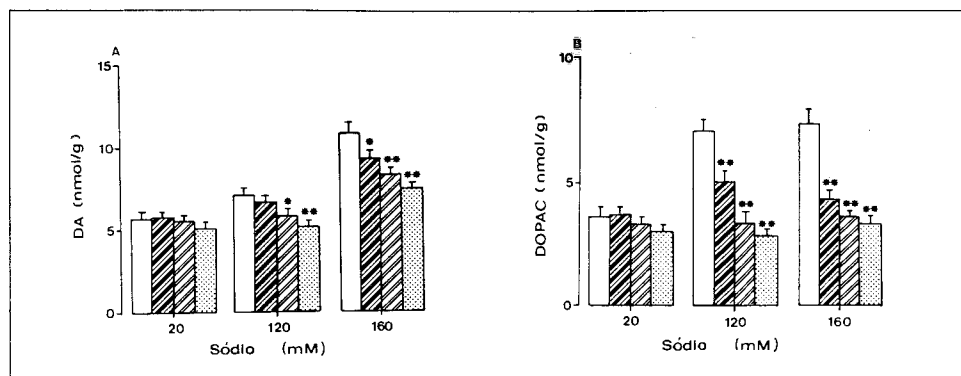


Figura 5. Níveis teciduais (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de córtex renal de Rato incubadas com $50\mu\text{M}$ de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Os resultados referem-se a determinações efectuadas na situação controlo e na presença de ubaína (100, 500 e 1000 μM). As colunas representam médias de 5 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Controlo (□); 100 μM de ubaína (▨); 500 μM de ubaína (▩); 1000 μM de ubaína (▤). Significativamente diferente do valor controlo correspondente usando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

a redução variou entre 29 e 60% e entre 42 e 56% na presença de, respectivamente, 120 e 160 mM de sódio.

A figura 6 ilustra o efeito de concentrações crescentes de anfotericina B (5, 10 e 50 $\mu\text{g/ml}$) sobre a acumulação da DA e do DOPAC em fatias de córtex renal de Rato incubadas com $50\mu\text{M}$ de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Como é possível verificar, a anfotericina B condicionou uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual da DA (5 a 44% de redução) e do DOPAC (16 a 34% de redução). Contudo, este efeito da anfotericina B foi evidenciado apenas na presença da concentração de sódio mais elevada (160 mM).

A possibilidade de que a L-DOPA pudesse ser transportada através do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ foi testada em experiências cujos resultados são ilustrados na figura 7. Nesses estudos, avaliámos o efeito do amilorido (5, 10, 50 e 100 μM) na acumulação da DA e do DOPAC, em fatias de córtex renal incubadas com $50\mu\text{M}$ de L-DOPA e na presença de três diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Algo inesperadamente, verificámos um aumento na acumulação da DA nas fatias de córtex. Este efeito do amilorido foi, contudo, acompanhado por uma

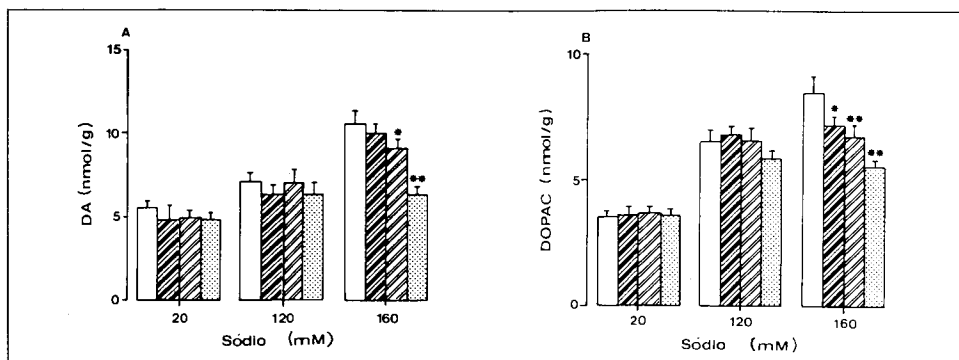


Figura 6. Níveis teciduais (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de córtex renal de Rato incubadas com $50\mu\text{M}$ de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Os resultados referem-se a determinações efectuadas na situação controlo e na presença de anfotericina B (5, 10 e $50\mu\text{g/ml}$). As colunas representam médias de cinco experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Controlo (□); $5\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B (▨); $10\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B (▩); $50\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B (▤). Significativamente diferente do valor de controlo correspondente, usando o teste de Tukey-Kramer (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

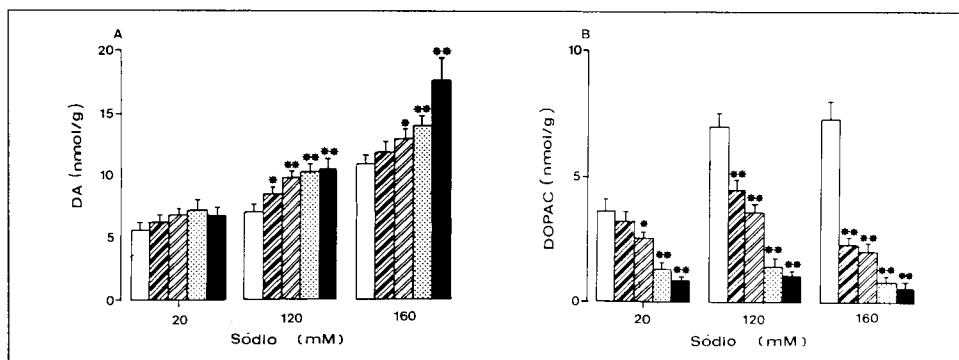


Figura 7. Níveis teciduais (em nmol/g) da (A) DA e do (B) DOPAC em fatias de córtex renal de Rato incubadas com $50\mu\text{M}$ de L-DOPA e na presença de diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Os resultados referem-se a determinações efectuadas em condições de controlo e na presença de amilorido (5, 10, 50 e $100\mu\text{M}$). Cada coluna representa a média de cinco experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Controlo (□); $5\mu\text{M}$ de amilorido (▨); $10\mu\text{M}$ de amilorido (▩); $50\mu\text{M}$ de amilorido (▤); $100\mu\text{M}$ de amilorido (■). Significativamente diferente do valor controlo correspondente, usando o teste de Tukey-Kramer (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

redução, dependente da concentração, na acumulação do DOPAC. Uma explicação possível para este fenómeno assenta na possibilidade de o amilorido ter inibido a desaminação da DA em DOPAC; de facto, efeitos semelhantes aos observados com o amilorido foram obtidos quando estudámos a influência dos inibidores da MAO na acumulação da DA e do DOPAC em fatias de córtex renal de Rato (cap. IIB). Para procurar esclarecer este fenómeno, procedemos à realização de uma série de experiências, nas quais foi avaliada a influência da ubaína, do amilorido e do EIPA (um inibidor do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ mais selectivo do que o amilorido) sobre a desaminação da DA exógena (0,5; 2,5 e 5 μM) adicionada a homogeneizados de rim (figura 8).

Como se pode verificar, a ubaína (100 e 500 μM) não afectou a desaminação da DA; pelo contrário, o amilorido (10 e 50 μM) e o EIPA (5, 10 e 50 μM) reduziram significativamente a formação de DOPAC, nos homogeneizados de rim.

Para caracterizar melhor os efeitos do amilorido e do EIPA sobre a acumulação da DA nos tecidos renais, procedemos a uma série de estudos com fatias de rim, em condições de inibição da MAO (Figura 9). Os tecidos foram incubados com quatro diferentes concentrações de L-DOPA (10, 25, 50 e 100 μM), na presença de 100 μM de pargilina e de 120 mM de sódio. Nestas condições experimentais, a pargilina aboliu completamente a formação de DOPAC. O amilorido (10 e 50 μM) ou o EIPA (1, 5 e 10 μM) estiveram presentes durante a pré-incubação e a incubação dos tecidos. Como se pode verificar, nestas condições o amilorido não

L-DOPA	Amilorido				EIPA	
	Controlo	10 μM	50 μM	1mM	5 μM	10 μM
10 μM	60 $\pm$ 4	58 $\pm$ 6	57 $\pm$ 3	61 $\pm$ 5	59 $\pm$ 3	45 $\pm$ 5*
25 μM	58 $\pm$ 3	58 $\pm$ 4	57 $\pm$ 5	58 $\pm$ 5	55 $\pm$ 4	42 $\pm$ 3*
50 μM	54 $\pm$ 5	57 $\pm$ 3	54 $\pm$ 3	52 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2	36 $\pm$ 3*
100 μM	51 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4	52 $\pm$ 3	51 $\pm$ 2	41 $\pm$ 3	29 $\pm$ 2*

Tabela 3. Efeito do amilorido (10 e 50 μM) e do EIPA (1, 5 e 10 μM) na fracção de saída (%) da DA em fatias de córtex renal de Rato incubadas durante 15 minutos com L-DOPA (10, 25, 50 e 100 μM) e na presença de 120 mM de sódio. Os valores são médias $\pm$ EPM relativas a 5 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor controlo correspondente usando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0.05$).

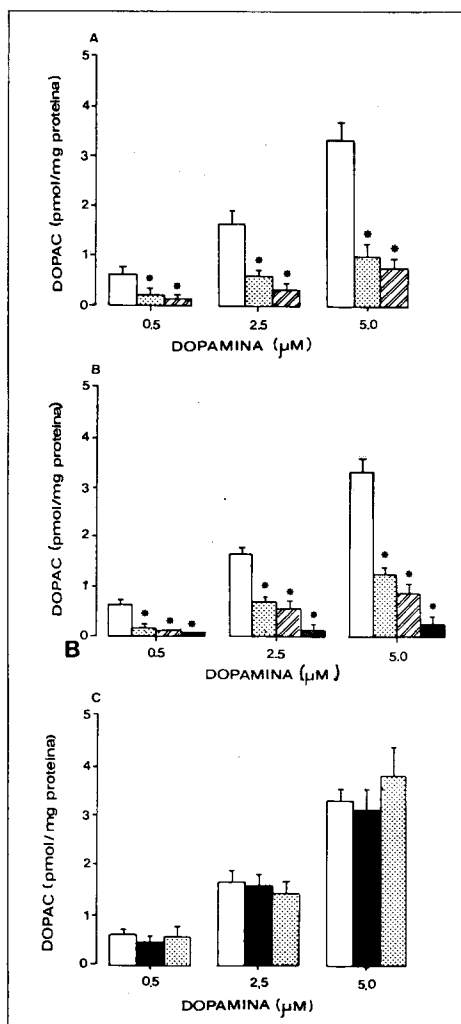


Figura 8. Níveis de DOPAC (em pmol/mg proteína) em homogeneizados de rim de Rato incubados durante 15 minutos com concentrações crescentes de DA (0,5 a 5 μM), em condições controlo e na presença de (A) amilorido (10 e 50 μM), (B) EIPA (5, 10 e 50 μM) ou (C) ubaína (100 e 500 μM). As colunas representam médias de cinco experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente do valor de controlo correspondente usando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0.01$). Controlo (□); 10 μM de amilorido (▤); 50 μM de amilorido (▨); 5 μM de EIPA (▤); 10 μM de EIPA (▨); 50 μM de EIPA (■); 100 μM de ubaína (■); 500 μM de ubaína (□).

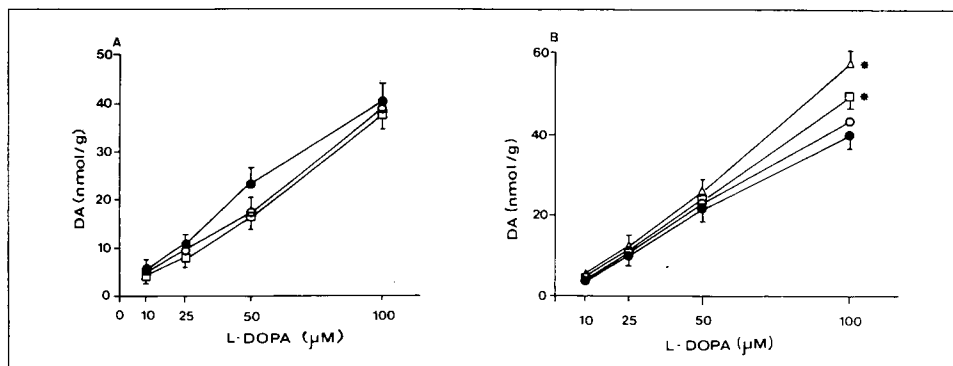


Figura 9. Níveis teciduais (em nmol/g) de DA em fatias de córtex renal de Rato incubadas com L-DOPA (10 a 100 μ M), na presença de 0,1 mM de pargilina e de 120 mM de sódio. Os resultados dizem respeito a observações em condições controle e na presença de (A) amilorido (10 e 50 μ M) ou (B) EIPA (1, 5 e 10 μ M). Cada ponto representa a média de cinco experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Controlo (●); 10 μ M de amilorido (○); 50 μ M de amilorido (□); 1 μ M de EIPA (○); 5 μ M de EIPA (□); 10 μ M de EIPA (△). Significativamente diferente do valor controlo correspondente, usando o teste de Tukey-Kramer (* $P < 0.01$).

condicionou modificações na acumulação da DA. Pelo contrário, o EIPA produziu um aumento na acumulação da DA, o qual foi acompanhado de uma redução na quantidade da amina transportada para o meio de incubação (tabela 3); contudo, este efeito foi observado apenas na presença da concentração de L-DOPA mais elevada (100 μ M).

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que a acumulação da L-DOPA nos tecidos renais e a respectiva descarboxilação em DA são dependentes da concentração de sódio presente no meio de incubação e sensível a manobras que interferem com o transporte de sódio pelas células tubulares renais.

Os resultados dos estudos em que as fatias de rim humano e de Rato foram incubadas na presença de concentrações crescentes de sódio sugerem fortemente que o transporte tubular da L-DOPA é parcialmente dependente do gradiente de

concentração de sódio existente entre o meio extra e intracelular. Esta dependência está relacionada, provavelmente, com a activação de um mecanismo de transporte de membrana, em que o sódio desempenha um papel fundamental. A acumulação monoexponencial da amina em função da concentração de sódio foi semelhante quando os tecidos foram incubados na presença de diferentes concentrações de L-DOPA; este fenómeno foi observado quando se utilizaram tecidos renais humanos e de Rato e sugere que o processo em causa envolve a activação de um co-transporte tubular de sódio e L-DOPA. Quando as fatias de rim foram incubadas na ausência de sódio, verificou-se ainda uma acumulação tecidual importante de DA; esta acumulação foi, para todas as concentrações de L-DOPA utilizadas, cerca de 50% da observada quando os tecidos foram incubados na presença da concentração de sódio mais elevada (160 mM). Estes resultados sugerem que o co-transporte de sódio e L-DOPA poderá não ser o único mecanismo envolvido no transporte do precursor da DA, a nível tubular renal.

Nos estudos efectuados com tecidos renais de Rato verificámos que as constantes de acumulação da DA, em função da concentração de sódio, foram cerca de 2,5 vezes mais elevadas do que as observadas nos estudos efectuados com tecidos renais humanos ($K=0,0040$ vs $k=0,0016$). Estes resultados sugerem que, nestas condições experimentais, a formação da DA no rim humano é menos sensível às variações da concentração de sódio no meio extracelular do que a formação da DA no rim de Rato.

Outro resultado interessante diz respeito à influência do sódio na acumulação do metabolito desaminado da DA, o DOPAC. Verificámos que a acumulação tecidual do DOPAC foi também dependente da concentração de sódio presente no meio de incubação, quer nos tecidos renais humanos quer nos de Rato. Contudo, enquanto no rim humano as constantes de acumulação do DOPAC foram idênticas às da DA (0,0018 vs 0,0016), no rim de Rato as constantes de acumulação do DOPAC foram cerca de duas vezes superiores às da DA (0,0069 vs 0,0030). Estes resultados sugerem que o processo de desaminação da DA pode ser também, pelo menos no Rato, dependente da concentração de sódio presente no meio de incubação.

Os resultados das experiências em que avaliámos a influência da ubaína e da anfotericina B sobre a síntese da DA nas fatias de córtex renal, vieram reforçar a noção de que o transporte da L-DOPA nas células tubulares renais é dependente do transporte de sódio. Nesses estudos, quer a ubaína quer a anfotericina B reduziram a acumulação da DA de uma forma dependente da concentração; por

outro lado, os seus efeitos foram evidenciados apenas quando os tecidos foram incubados na presença das duas concentrações de sódio mais elevadas (120 e 160 mM). Estes resultados mostram que as interferências sobre o transporte tubular de sódio, através da inibição da ATPase Na^+/K^+ (por intermédio da ubaína), ou do aumento da permeabilidade da membrana celular (por intermédio da anfotericina B), se repercutem negativamente sobre a síntese renal da DA apenas quando o gradiente de concentração de sódio favorece o transporte no sentido extra para o intracelular (Lang e col., 1986). Quando os tecidos renais foram incubados na presença de 160 mM de sódio e sob condições de inibição máxima da ATPase Na^+/K^+ (através da adição de 1000 μM de ubaína ao meio de incubação; Katz, 1987), a redução verificada na acumulação da DA foi de, aproximadamente, 63%. Estes resultados estão de acordo com os dos estudos em que verificámos uma redução de cerca de 50% na acumulação tecidual da DA quando a concentração de sódio no meio de incubação foi reduzida para 0 mM e vêm reforçar a noção de que o acesso da L-DOPA ao citoplasma das células tubulares renais é apenas parcialmente sensível às manobras que interferem com o transporte tubular de sódio.

Com o objectivo de excluir a possibilidade de os efeitos da ubaína e os da variação na concentração de sódio extracelular poderem resultar de acções directas destes factores sobre a síntese ou sobre a metabolização desaminativa da DA, procedemos a uma série de estudos com homogeneizados de rim de Rato; nessas condições experimentais seria quebrada a integridade das membranas celulares e anuladas as influências ao nível do transporte de membrana, sem interferir com a actividade das enzimas envolvidas, quer na descarboxilação quer na desaminação renal da DA. Nesses estudos, a formação da DA a partir da L-DOPA não foi modificada pela ubaína nem pelas variações da concentração de sódio no meio extracelular, o que permite reforçar a conclusão de que os efeitos do sódio e da ubaína sobre a síntese renal da DA resultaram de interferências sobre o transporte de membrana para a L-DOPA.

Nas experiências em que avalíamos o efeito da ubaína sobre a síntese da DA em fatias de rim humano e de Rato evidenciou-se também uma redução, dependente da concentração, na acumulação tecidual do DOPAC. Ao contrário do que se observou para o rim humano, o efeito inibitório da ubaína sobre a acumulação do DOPAC foi, no rim de Rato, mais intenso do que o observado sobre a acumulação da DA. Estes resultados estão de acordo com os dos estudos em que se evidenciou que, no rim de Rato, a sensibilidade da acumulação do DOPAC às

variações na concentração de sódio extracelular foi cerca de duas vezes superior à da DA e vêm reforçar a sugestão de que a desaminação da DA em DOPAC poderá ser também dependente do transporte de sódio ao nível das células tubulares renais. Como a DA de síntese renal é rapidamente desaminada em DOPAC, o envolvimento do sódio no processo de desaminação renal da DA poderia ser explicado pela formação mais acelerada do substrato para a desaminação, na presença de concentrações de sódio mais elevadas. No entanto, o rim humano não evidenciou este fenómeno, apesar de dispor de uma actividade de MAO significativamente mais elevada do que o de Rato (ver cap IIA). Em alternativa, os efeitos do sódio e da ubaína sobre a acumulação do DOPAC no rim de Rato permitem sugerir a presença de um processo de transporte (recirculação/recaptação) da DA recém-sintetizada, sensível ao transporte de sódio, a preceder a sua desaminação. Como a MAO do tipo A é a forma da enzima predominante no rim de Rato e esta isoenzima parece estar localizada no compartimento onde a síntese da DA se verifica (ver cap. IIB), é possível admitir que o transporte em causa possa envolver o mesmo compartimento celular onde a síntese da DA se processa, ou seja, as células tubulares renais. O facto de a acumulação do DOPAC nos homogeneizados não ter sido modificada pela ubaína nem pela variação da concentração de sódio no meio de incubação permite reforçar esta sugestão.

Os resultados destes trabalhos não evidenciaram a mesma sensibilidade ao sódio para a desaminação da DA, no rim humano. Esse facto poderá ser explicado pela presença de uma actividade de MAO consideravelmente mais elevada no rim humano, em comparação com a existente no de Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992). Por outro lado, como a MAO do tipo B parece estar localizada fora do compartimento onde a síntese da DA se verifica (ver cap. IIB) e a actividade da MAO-B no rim humano é significativamente mais elevada do que a existente no Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992), estes resultados permitem sugerir um maior envolvimento da MAO-B na desaminação da DA recém-formada no rim humano, sobretudo quando é reduzido o acesso da DA à MAO-A, através de manobras que interferem com o transporte de sódio, nas células tubulares renais.

Os estudos em que foi testado o efeito do amilorido sobre a acumulação da DA e do DOPAC nos tecidos renais tinham por objectivo avaliar a possibilidade de o transporte tubular da L-DOPA estar directa ou indirectamente dependente da actividade do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$. Os resultados dessas experiências não evidenciaram qualquer efeito inibitório do amilorido sobre o transporte tubular da L-DOPA; contudo, o amilorido condicionou uma redução significativa e dependente da

concentração na acumulação do DOPAC. O análogo do amilorido, o EIPA, evidenciou também um efeito inibitório sobre a acumulação do metabolito desaminado da DA. Estas acções estão de acordo com as descrições de Palaty (1985) e Zubieta e col. (1988), que referiram efeitos inibitórios destes compostos sobre a actividade da MAO em diversos tecidos de diferentes espécies animais. Ao contrário do amilorido, o EIPA aumentou a acumulação da DA nas fatias de rim incubadas com L-DOPA, sob condições de inibição da MAO; este efeito foi dependente da concentração e foi observado apenas na presença da concentração de L-DOPA mais elevada (100 μ M). Este fenómeno poderia estar relacionado com interferências sobre os mecanismos que regulam o transporte da DA formada nas células tubulares renais, nomeadamente ao nível do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, já que o efeito do EIPA foi acompanhado de uma redução concomitante na fracção de saída da DA e a potência inibitória do EIPA sobre o trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ mostrou ser cerca de 10 vezes superior à do amilorido (Frelin e col., 1987). Contudo, deve salientar-se que Frelin verificou também uma inibição máxima do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ quando utilizou, em estudos de incubação, concentrações de amilorido sobreponíveis às utilizadas nestas experiências (50 e 100 μ M).

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que a formação da DA em fatias de córtex renal humano e de Rato é parcialmente dependente da concentração de sódio presente no meio extracelular e sensível às manobras que interferem com o transporte de sódio nas células epiteliais tubulares renais. Os resultados destes estudos sugerem também que a desaminação renal da DA é, pelo menos no Rato, sensível à concentração de sódio presente no meio extracelular e à inibição do transporte de sódio pelas células tubulares renais.

D - Efeito da desnervação simpática renal sobre as actividades da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos e da monoaminoxidase.

1. Introdução

Os trabalhos apresentados nos capítulos anteriores evidenciaram que os tecidos renais têm uma elevada capacidade para sintetizar DA a partir da L-DOPA exógena. Outros resultados mostraram que a síntese renal da DA é dependente da concentração de sódio presente no meio e modulável por manobras que interferem com o transporte de sódio, ao nível das células do epitélio tubular renal; tal sugere que a DA de síntese renal tem origem, sobretudo, em células tubulares renais, que dispõem de uma elevada actividade de DAAA. Por outro lado, os trabalhos em que se avaliou a influência da MAO na metabolização renal da DA recém-sintetizada evidenciaram o envolvimento das duas formas da enzima nesse processo e revelaram que a DA de síntese renal não é significativamente captada, ou metabolizada, em compartimentos neuroniais. Embora os resultados destes estudos tenham sugerido um papel menor das estruturas neuroniais, quer na síntese quer na metabolização renal da DA, as evidências apresentadas não obstam, no entanto, a que esses processos possam ser quantitativa ou qualitativamente modificados por influências neuroniais. Por esse motivo, decidimos estudar qual o envolvimento das estruturas neuroniais na síntese e na metabolização renal da DA.

Uma forma de proceder ao estudo da contribuição dos elementos neuroniais nos processos fisiológicos consiste em avaliar a influência que a desnervação condiciona nesses mecanismos. Vários métodos de desnervação têm sido utilizados: (1) métodos cirúrgicos, que permitem autolimitar a certas áreas o efeito da destruição das células neuroniais; (2) métodos químicos e (3) imunológicos, cuja utilização permite destruir ou impedir o desenvolvimento e a diferenciação das células neuroniais, em áreas alargadas do sistema nervoso central ou periférico. No que diz respeito à desnervação renal, têm sido utilizados com sucesso quer métodos cirúrgicos quer químicos. Como os nervos renais estão incluídos no pedículo, a desnervação cirúrgica é de fácil execução; o processo mais frequentemente empregue consiste no desbridamento da artéria renal, isolamento e secção dos nervos renais (quando tal é exequível) e aplicação de fenol ao

pedículo, por forma a assegurar que os nervos que cursam na parede da artéria sejam lesados (Bello-Reuss e col., 1977; Baines, 1982; Hagege e Richet, 1985; Petrovic e col., 1986). A desnervação química com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), por seu lado, permite obter uma desnervação simpática do rim em tudo semelhante à obtida com os métodos cirúrgicos (Bell e col., 1978; McGrath e col., 1983; Caramona e Soares-da-Silva, 1985; Soares-da-Silva, 1988c).

Após a pinçagem de segmentos vasculares durante cinco minutos verificou-se uma degenerescência nervosa simpática acompanhada de uma redução superior a 90% no conteúdo de catecolaminas do segmento vascular pinçado (Branco e col., 1984). Na sequência destes achados, Soares-da-Silva verificou que a pinçagem transitória do pedículo renal do Rato condicionava uma desnervação do rim traduzida por uma depleção significativa dos teores teciduais de NA, quer no córtex quer na medula. Este método de desnervação renal foi utilizado nos estudos descritos neste capítulo, para avaliar o efeito produzido pela desnervação simpática do rim sobre: (1) a acumulação da DA e da NA nos tecidos renais e (2) a actividade das enzimas responsáveis, quer pela síntese (DAAA) quer pela metabolização desaminativa (MAO-A e B) da DA de síntese renal.

A produção de radicais livres de oxigénio durante o período de reperfusão tem sido referida como responsável por efeitos lesivos da isquemia prolongada sobre os tecidos renais e é apontada como uma das vias implicadas na fisiopatologia da necrose tubular aguda de causa isquémica. Por esse motivo, decidimos avaliar o envolvimento dos radicais livres de oxigénio nos processos responsáveis pela desnervação renal condicionada pela isquemia transitória por pinçagem do pedículo. Para esse efeito, testámos o efeito protector antioxidante da dismutase do superóxido (SOD), neste modelo.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

Nas experiências descritas neste capítulo foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 220 a 280 gramas de peso.

2.2. Estudos de desnervação

2.2.1. Pinçamento da artéria renal e da aorta

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.) e o rim esquerdo exposto através de uma incisão abdominal na linha média. De seguida, isolou-se o pedículo renal e foi aplicada uma pinça à artéria renal durante 30, 60 ou 90 segundos. O rim direito foi manipulado de forma semelhante, com excepção da pinçamento do pedículo, servindo esta operação como controlo. Após a intervenção, fecharam-se os planos musculares e superficiais da parede abdominal e os animais foram colocados nas gaiolas com livre acesso a água e comida.

2.2.2. Pinçamento da aorta

Num outro grupo de estudos, a aorta foi exposta através de uma incisão abdominal na linha média e pinçada durante 90 segundos, em localização imediatamente proximal à emergência das artérias renais. Nesta série de experiências, os animais de controlo foram submetidos às mesmas manipulações descritas para este grupo, com excepção da pinçamento da aorta.

2.2.2. Efeito da administração da dismutase do superóxido

Num grupo de experiências (n=4), em que foi provocada isquemia por pinçamento da artéria renal durante 90 segundos, procedeu-se à administração da SOD (40 mg/kg), ou do veículo (0,3 ml de soro fisiológico), no período imediato que antecedeu a pinçamento do pedículo. A administração foi efectuada por injeção intravenosa, em *bolus*, através de uma cânula introduzida na veia da cauda do animal.

2.3. Colheita dos tecidos

Cinco dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação. Os rins foram rapidamente removidos através de uma incisão abdominal na linha média e introduzidos em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C. De seguida, o córtex e a medula foram separados por

dissecção. As amostras de tecido utilizadas para quantificação de catecolaminas foram secas com papel de filtro, pesadas, introduzidas em frascos contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M) e congeladas a -20°C até serem analisadas, usualmente dentro de uma semana.

2.4. Determinação da actividade da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA).

A actividade da DAAA nos tecidos renais foi estudada em experiências nas quais se procedeu à determinação da conversão da L-DOPA exógena em DA. Dissecaram-se fatias de córtex renal com cerca de 1,5 mm de espessura e 50 mg de peso. De seguida, as fatias foram pré-incubadas durante 60 minutos; após a pré-incubação, as fatias foram incubadas durante 15 minutos com 50 μM de L-DOPA. Os tecidos foram pré-incubados individualmente, em tubos de vidro contendo 2 ml de uma solução de Krebs aquecida (37°C) e gaseificada (95% O_2 e 5% CO_2), fazendo uso de um banho de agitação. A solução de Krebs utilizada nestas experiências tinha uma composição em tudo idêntica à descrita no capítulo IIA, para os estudos com fatias de rim.

Como a conversão renal da L-DOPA em DA, sob condições experimentais *in vitro*, mostrou ser um processo dependente da concentração de sódio presente no meio de incubação (cap. IIC), a influência da desnervação sobre a síntese renal da DA foi estudada em tecidos incubados na presença de três diferentes concentrações de Na^+ (20, 120 e 160 mM). Nesta série de experiências, a osmolaridade do meio de incubação foi mantida constante pela adição de cloreto de colina.

No final da incubação, as fatias foram sucessivamente lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) arrefecida a 4°C , secas com papel de filtro e introduzidas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M), os quais foram conservados a 4°C até à quantificação da DA e do DOPAC.

Para determinar as quantidades de DA e de DOPAC que passaram para o meio de incubação no decurso das experiências, procedeu-se à adição de 250 μl de ácido perclórico (2 M) ao meio de incubação, depois da colheita dos tecidos, no final das experiências; os meios de incubação foram depois conservados a 4°C até à quantificação das catecolaminas.

2.5. Determinação da actividade da monoaminoxidase (MAO)

Prepararam-se homogeneizados de córtex e de medula renal com tampão fosfato (67 mM), a pH 7,2 e a 4°C, utilizando homogeneizadores de vidro (Duell-Kontes). As actividades das isoenzimas da MAO foram determinadas com substratos específicos para a MAO-A e para a MAO-B, respectivamente, a [^3H]5-hidroxitriptamina ([^3H]5-HT) e a [^{14}C] β -feniletilamina ([^{14}C] β -FEA). A reacção foi produzida através da adição de 50 μl de homogeneizado a 50 μl de tampão fosfato (67 mM; pH 7,2) e 1250 μM de [^3H]5-HT ou 150 μM de [^{14}C] β -FEA. Após vinte minutos de incubação a 37°C sob agitação constante, os tubos foram transferidos para um banho gelado e a reacção suspensa pela adição de 10 μl de HCl (3 M). Os produtos desaminados foram então extraídos e quantificados num contador de cintilação líquida, segundo técnica descrita por Jarrot (1971). O conteúdo em proteínas dos homogeneizados (em mg de proteína/g de tecido) foi determinado pelo método de Lowry e col. (1951), utilizando albumina humana como padrão.

2.6. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, DA, NA e DOPAC foi determinada por HPLC-ECD. Alíquotas com 1,5 ml do ácido perclórico onde os tecidos estiveram introduzidos, do sobrenadante dos homogeneizados ou do meio de incubação foram colocadas em frascos cónicos de vidro e as catecolaminas extraídas pela alumina, conforme descrito no cap. IIA. Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA, NA e DOPAC variaram entre 250 e 650 fmol/50 μl .

2.7. Estudos morfológicos

Fixaram-se amostras de córtex renal em glutaraldeído, desidrataram-se com etanol e óxido propileno e embeberam-se em Epon. A partir de blocos provenientes de rins inervados e de rins desnervados, procedeu-se á obtenção de cortes com 1 μm de espessura, fazendo uso de um micrótomo Ultratome III (LKB, Bromma, Suécia); os cortes foram depois corados com azul de toluidina (1%) e observados em microscopia de luz.

2.8. Análise estatística

As diferenças entre duas médias foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer ou pelo teste t de Student para valores não emparelhados; um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa entre duas médias.

3. Resultados

3.1. Estudos de deservaçãoção

Conforme é possível observar na figura 1, a pinçagem da artéria renal durante 30, 60 e 90 segundos condicionou uma depleção dependente do tempo nos teores teciduais de NA, quer no córtex quer na medula. Quando a pinçagem teve a duração de 30 segundos não se verificaram modificações nos teores da DA, nem da NA; quando a pinçagem do pedículo teve a duração de 60 segundos, os teores teciduais de NA foram reduzidos em 56% e 65%, respectivamente, no córtex e na medula; finalmente, quando a pinçagem da artéria renal teve a duração de 90

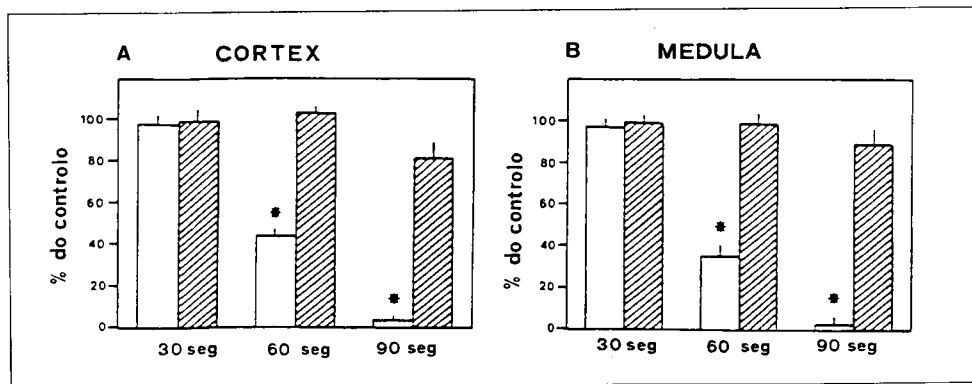


Figura 1. Efeitos da isquemia transitória induzida pela pinçagem do pedículo renal durante 30, 60 e 90 segundos, sobre o conteúdo tecidual de NA (□) e DA (▨), no córtex e na medula renal. Os resultados são apresentados em percentagens de variação $\pm$ EPM em relação ao controle, relativas a um número de 5 a 6 experiências por grupo. Os teores teciduais da NA e da DA na situação de controle são apresentados na tabela 1. Significativamente diferente em comparação com o valor de controle correspondente através do teste t de Student para valores não emparelhados (* $P < 0,01$).

segundos, a acumulação da NA foi reduzida em 97% e 92%, respectivamente, no córtex e na medula.

Apenas se verificou uma redução ligeira nos níveis teciduais de DA quando se procedeu à pinçagem do pedículo renal durante 90 segundos; essa redução (19% no córtex e 11% na medula) não atingiu, no entanto, significado estatístico.

A pinçagem da aorta proximal às artérias renais durante 90 segundos condicionou uma redução marcada nos teores de NA, nos tecidos renais. Esta redução atingiu valores semelhantes nos dois rins, sendo de 82% e 75%, respectivamente, no córtex e na medula (figura 2). Nestas condições experimentais, os teores teciduais de DA não foram modificados significativamente, em relação aos verificados no controlo.

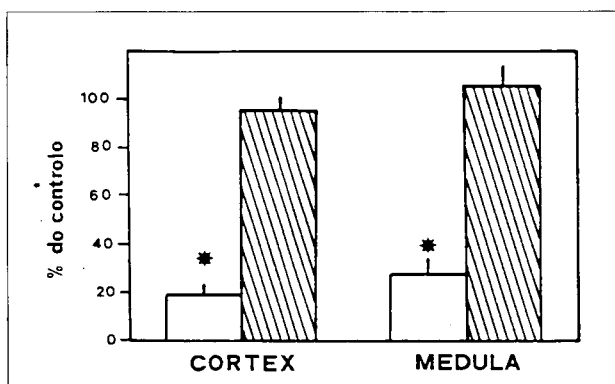


Figura 2. Efeito da isquemia transitória induzida pela pinçagem da aorta proximal às artérias renais durante 90 segundos sobre os teores teciduais de DA (▨) e NA (□), no córtex e na medula renal. Os resultados são apresentados em percentagens de variação $\pm$ EPM em relação ao controlo, relativas a um número de 4 experiências por grupo. Os teores teciduais da NA e da DA na situação de controlo são apresentados na tabela 1. Significativamente diferente em comparação com o valor de controlo correspondente através do teste t de Student para valores não emparelhados (* $P < 0,01$).

Quando a administração de 40 mg/kg da SOD precedeu a pinçagem do pedículo renal durante 90 segundos, verificou-se uma atenuação significativa da redução nos níveis teciduais de NA, quer no córtex quer na medula; nestas condições, a redução observada na acumulação da NA foi de apenas 23% e 38%, respectivamente, no córtex e na medula (figura 3). Nos rins dos animais tratados

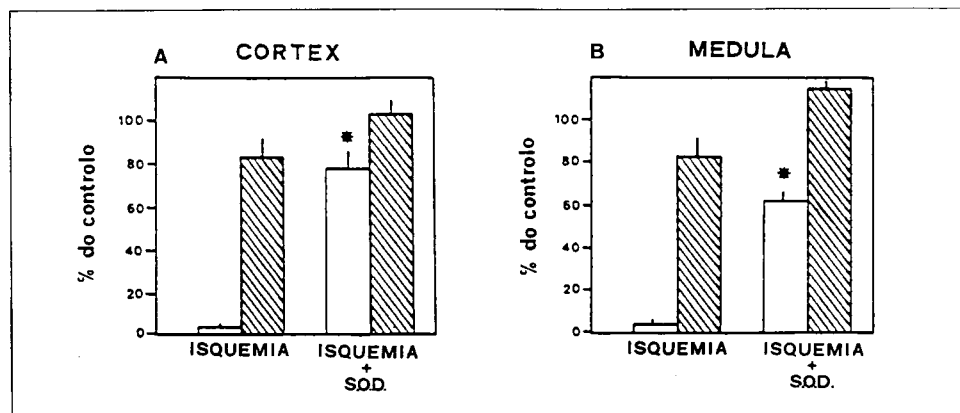


Figura 3. Efeito protector da dismutase do superóxido (SOD; 40 mg/kg) sobre a depleção induzida pela isquemia transitória por pinçamento do pedículo renal durante 90 segundos sobre os teores teciduais de NA (□) e DA (▨), no córtex e na medula renal. Os resultados são apresentados em percentagens de variação $\pm$ EPM em relação ao controlo, relativas a um número de 4 experiências por grupo. Os teores teciduais da NA e da DA na situação de controlo são apresentados na tabela 1. Significativamente diferente em comparação com o valor de controlo correspondente através do teste t de Student para valores não emparelhados (* $P < 0,01$).

Noradrenalina		Dopamina	
Córtex	Medula	Córtex	Medula
<i>Controlo da pinçamento do pedículo durante 60 seg.</i>			
1,44 $\pm$ 0,17	0,14 $\pm$ 0,01	0,064 $\pm$ 0,003	0,061 $\pm$ 0,001
<i>Controlo da pinçamento do pedículo durante 90 seg.</i>			
1,76 $\pm$ 0,15	0,12 $\pm$ 0,01	0,061 $\pm$ 0,005	0,064 $\pm$ 0,006
<i>Controlo da pinçamento da aorta durante 90 seg.</i>			
1,87 $\pm$ 0,14	0,15 $\pm$ 0,01	0,063 $\pm$ 0,004	0,085 $\pm$ 0,007

Tabela 1. Níveis teciduais (em nmol/g) da NA e da DA, no córtex e na medula de rins controlo dos desnervados por pinçamento do pedículo renal ou da aorta.

com a SOD e posteriormente submetidos a isquemia transitória durante 90 segundos, não se verificaram modificações na acumulação da DA nos tecidos renais.

3.2. Actividade da DAAA

À semelhança dos resultados dos estudos apresentados no capítulo IIC, verificámos, nestas experiências, que a formação de DA nas fatias de córtex renal incubadas com 50 μ M de L-DOPA foi claramente dependente da concentração de sódio presente no meio de incubação (figura 4).

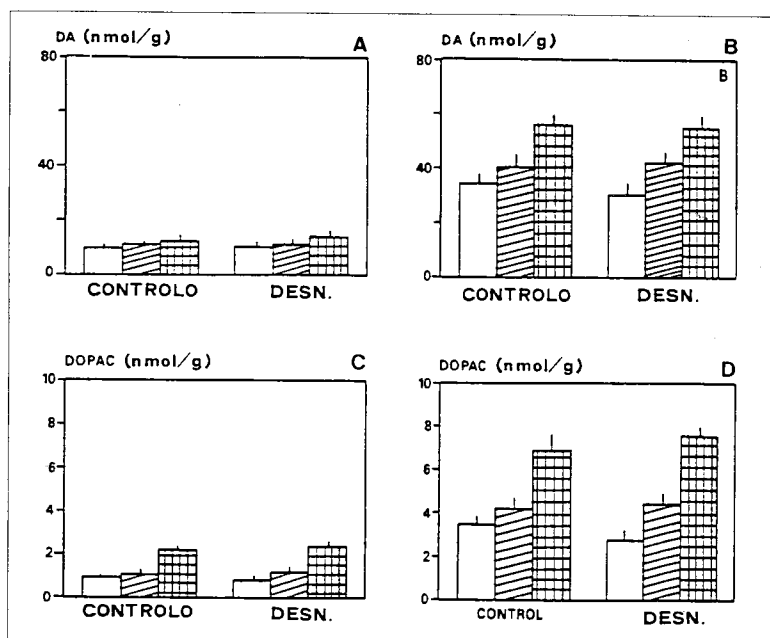


Figura 4. Níveis (em nmol/g) da (A) DA e do (C) DOPAC em fatias de rim incubadas durante 15 minutos com 50 μ M de L-DOPA na presença de três diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM); as fatias de córtex foram obtidas a partir de rins controlo e de rins desnervados por pinçamento do pedículo renal durante 90 segundos. Nos gráficos B e D estão representadas as quantidades totais formadas de, respectivamente, DA e DOPAC, expressas pela soma algébrica dos níveis acumulados com os presentes no meio de incubação, no final das experiências. Cada coluna representa a média de 5 experiências por grupo; as linhas verticais representam o EPM. NaCl=20 mM (□); NaCl=120 mM (▨); NaCl=160 mM (▩).

Tal como nos estudos descritos no capítulo IIC, verificámos que a quantidade de DOPAC formado foi directamente proporcional à quantidade total de DA sintetizada (figura 4); assim, os níveis mais elevados do metabolito desaminado foram observados quando os tecidos foram incubados na presença de 160 mM de NaCl. Os teores de DA e de DOPAC que passaram para o meio de incubação durante estas experiências atingiram valores que oscilaram entre 67 e 74% do total da DA formada e entre 68 e 72% da quantidade total do DOPAC sintetizado. A desnervação renal pelos métodos utilizados nestes estudos não condicionou quaisquer modificações na formação, acumulação, ou transferência para o meio de incubação, quer da DA quer do DOPAC formados na presença de 20, 120 ou 160 mM de sódio.

3.3. Actividade da MAO-A e da MAO-B

Nestes estudos, verificámos que a actividade da MAO-A foi significativamente mais elevada do que a da MAO-B, quer no córtex quer na medula renal (tabela 2). Por outro lado, a proporção relativa entre as duas isoenzimas mostrou ser semelhante no córtex e na medula. A desnervação renal condicionada pela pinçamento do pedículo renal durante 90 segundos não condicionou qualquer modificação na actividade específica da MAO-A ou da MAO-B, quer no córtex quer na medula.

	MAO-A		MAO-B	
	Córtex	Medula	Córtex	Medula
Controlo	51,5±1,5	51,0±2,5	19,9±1,1	15,7±1,4
Desnervado	51,9±1,6	51,5±2,5	18,7±1,0	15,3±1,1

Tabela 2. Actividades específicas (em nmol de substrato metabolizado/mg de proteína/hora de incubação) da MAO-A e da MAO-B, determinadas pela desaminação de, respectivamente, [^{3} H]5-HT (1250 μ M) e [^{14} C] β -FEA (150 μ M), no córtex e na medula de rins controlo e de rins desnervados por pinçamento do pedículo renal durante 90 segundos. Os valores são médias $\pm$ EPM relativas a 5 determinações por grupo.

3.4. Estudos morfológicos

Os tecidos renais provenientes de rins submetidos a desnervação por pinçamento da artéria renal durante 90 segundos e os que serviram como controlo foram estudados histologicamente. Não se verificaram alterações glomerulares em qualquer dos grupos. Nos cortes dos tecidos provenientes de rins desnervados verificou-se uma discreta vacuolização tubular, numa pequena percentagem (cerca de 10%) das células tubulares observadas.

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo evidenciam que a isquemia transitória do rim, provocada pela pinçamento do pedículo renal, condiciona uma depleção dependente do tempo nos teores teciduais de NA. Este efeito foi observado quer no córtex quer na medula, mas não foi acompanhado de redução dos teores teciduais de DA. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Baines, 1982; Petrovic e col., 1986) em que se evidenciou que, a nível renal, a NA está sobretudo localizada em estruturas neuroniais simpáticas, as quais terão sido selectivamente lesadas pela isquemia transitória, ao passo que a DA está localizada, sobretudo, em estruturas extraneuronais, as quais terão sido poupadas pela agressão isquémica.

Os resultados das experiências apresentadas neste capítulo evidenciam também que a desnervação simpática, induzida pela isquemia transitória, não foi acompanhada de modificações nas actividades das enzimas responsáveis, quer pela formação da DA nos tecidos renais (DAAA) quer pela sua metabolização desaminativa (MAO). Estas evidências vêm ao encontro de referências anteriores (Caramona e Soares-da-Silva, 1990; Soares-da-Silva e Fernandes, 1990a; cap. IIB), em que se sugeriu que as actividades descarboxilásica e desaminativa do rim estão localizadas, sobretudo, em estruturas extraneuronais.

A pinçamento da aorta durante 90 segundos condicionou um padrão de depleção nos teores teciduais de NA semelhante ao observado nos estudos em que o pedículo renal foi pinçado durante o mesmo período de tempo. Esta evidência sugere que a desnervação renal, observada nestes estudos, não deve ter envolvido na sua origem a lesão física dos nervos que cursam na parede da artéria renal (os quais terão sido poupados durante a pinçamento da aorta). Em favor

deste ponto de vista, pode avançar-se também o facto de o pré-tratamento com a SOD ter impedido, quase completamente, a depleção tecidual de NA nos estudos em que se procedeu à pinçagem do pedículo renal durante 90 segundos. De acordo com estes resultados é legítimo sugerir que a lesão responsável pela desnervação simpática, neste modelo, possa ter envolvido na sua génese o efeito lesivo de radicais livres de oxigénio, produzidos durante o período de reperfusão.

A produção de radicais livres de oxigénio durante o período de reperfusão tem sido apontada como responsável pelo desenvolvimento de lesões tubulares e foi implicada na fisiopatologia da necrose tubular aguda de causa isquémica. O processo através do qual a produção destes radicais livres se verifica tem sido explicado da seguinte forma: durante a isquemia, a privação de oxigénio conduz a um aumento na degradação celular do ATP, o qual condiciona um aumento na acumulação tecidual de hipoxantina; simultaneamente, a desidrogenase da xantina é convertida em oxídase da xantina, por intermédio de uma protease intracelular dependente do cálcio; durante a reperfusão, o aporte aumentado de oxigénio aos tecidos renais favorece a oxidação da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico, por intermédio da oxídase da xantina; este processo é acompanhado pela produção de anião superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2); este último, por via da reacção de Haber-Weiss, pode, por sua vez, ser convertido em anião hidroxilo (OH^-). A produção de radicais livres de oxigénio foi implicada no desenvolvimento de lesões em vários componentes celulares, em particular nas proteínas e lipídeos da membrana, com peroxidação dos lipídeos e lesão das membranas celulares. Vários estudos demonstraram que a administração de substâncias antioxidantes (SOD, oxipurinol, alopurinol, catalase, etc.) conferiam protecção contra o desenvolvimento de lesões tubulares, após a reperfusão de rins submetidos a isquemia prolongada (30 a 45 minutos de pinçagem do pedículo, Bratell e col., 1990; Shah e Walker, 1988), enquanto outros trabalhos não evidenciaram este efeito protector (Gamelin e Zager, 1988). Nos estudos apresentados no presente capítulo verificámos uma depleção quase completa dos teores teciduais de NA após um período de isquemia com a duração de 90 segundos, o qual não foi suficiente para condicionar lesões no parênquima. Este efeito foi significativamente atenuado pela SOD, o que sugere a responsabilidade dos radicais livres de oxigénio no desenvolvimento da lesão.

O facto de os teores de DA nos tecidos renais não terem sido modificados pela isquemia transitória sugere que as estruturas renais extraneuronais, onde a DA se localiza, não foram afectadas pela desnervação. A observação morfológica dos

rins inervados e desnervados não evidenciou lesões estruturais nos cortes observados, o que concorre também para essa conclusão. Por outro lado, os resultados das experiências em que se avaliou a síntese da DA em rins desnervados, revelaram que a formação da DA a partir da L-DOPA não foi modificada pela desnervação e sugerem que os processos envolvidos na conversão renal da L-DOPA em DA, nomeadamente o processo de transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares renais e a actividade da DAAA, não foram modificados pela desnervação simpática, por este método.

A síntese renal da DA mostrou ser dependente da concentração de sódio presente no meio extracelular (ver cap. IIC). Na presente série de estudos, os tecidos provenientes de rins inervados e desnervados foram incubados com L-DOPA, na presença de três diferentes concentrações de sódio (20, 120 e 160 mM). Nestas condições, a síntese renal da DA mostrou ser dependente da concentração de sódio presente no meio, não se tendo evidenciado diferenças na formação da DA entre os rins desnervados e inervados. Estes resultados mostram que a desnervação renal, condicionada pela isquemia transitória, não interferiu com o transporte da L-DOPA nas células tubulares renais, nomeadamente com a sua sensibilidade ao sódio. O facto de a fracção de DA que passou para o meio de incubação durante as experiências efectuadas com tecidos de rins desnervados não ter sido diferente da observada nos de controlo, reforça a noção de que a isquemia transitória do rim não foi acompanhada de efeitos lesivos sobre os mecanismos de transporte de membrana nas células tubulares renais, onde a síntese da DA se processa.

A acumulação do DOPAC nas experiências em que se estudou a formação e metabolização da DA em rins desnervados foi idêntica à observada no controlo. Como ambas as formas de MAO (tipos A e B) estão envolvidas na desaminação renal da DA formada nestas condições (ver cap. IIB), estes resultados sugerem que as actividades específicas das duas formas de MAO não foram significativamente afectadas pela desnervação. Os resultados dos estudos efectuados com substratos específicos para a MAO-A e para a MAO-B vieram confirmar essa suposição, ao evidenciar que a desnervação não modificou as actividades específicas, quer da MAO-A quer da MAO-B, nem a proporção relativa das duas formas da enzima, quer no córtex quer na medula. Globalmente, estes resultados estão de acordo com evidências anteriores em que se sugeriu que a DA recém-formada no rim não é significativamente captada, ou metabolizada, por compartimentos neuronais (ver cap. IIB) e com outros em que se evidenciou que, a nível renal, a

MAO está sobretudo localizada em compartimentos extraneuronais (Caramona e Soares-da-Silva, 1990).

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que:

- 1 - a isquemia transitória do rim, condicionada pela pinçagem do pedículo renal, provoca uma depleção marcada dos teores teciduais de NA, quer no córtex quer na medula, sem modificar, concomitantemente, os níveis teciduais de DA;
- 2 - o efeito produzido pela pinçagem do pedículo renal é selectivo para a inervação simpática, não sendo acompanhado de modificações na actividade específica de enzimas responsáveis, quer pela síntese (DAAA) quer pela metabolização desaminativa (MAO) da DA.

Simultaneamente, os resultados destes estudos sugerem que a desnervação simpática do rim, condicionada pela isquemia transitória por pinçagem do pedículo renal, poderá envolver na sua génese o efeito lesivo de radicais livres de oxigénio, produzidos durante o período de reperfusão.

III - TRANSPORTE DA DOPAMINA DE SÍNTESE RENAL

A - Estudo comparativo do efluxo da DA formada no rim de Rato a partir de L-DOPA e de γ -glutamil-L-DOPA.

1. Introdução

As interferências na actividade do sistema dopaminérgico renal poderão traduzir-se por modificações ao nível dos teores de DA disponível para actuar sobre os seus receptores. Como foi referido nos capítulos anteriores, diversos factores poderão estar potencialmente envolvidos nessas modificações. Em primeiro lugar, os que regulam a síntese renal da DA ao nível das células dos túbulos contornados proximais. Em segundo lugar, os que regulam o processo de metabolização a que a DA é submetida antes de actuar sobre os receptores. Por último, como os receptores da DA estão localizados na superfície exterior das células tubulares renais (Jose e col., 1992), os processos que regulam o transporte celular da amina podem também revestir-se, neste contexto, de importância potencial.

Estudos realizados durante as décadas de cinquenta e de sessenta evidenciaram que a secreção das catecolaminas nos túbulos renais se processa através do sistema de transporte para as bases orgânicas (Rennick, 1968; Quebbeman e Rennick, 1970); desde então, a DA está identificada como substrato para este sistema de transporte, ao nível das células dos túbulos contornados proximais. Os processos que regulam o transporte da DA formada nas células tubulares renais não foram, contudo, estudados. Na medida em que a DA formada nas células tubulares renais pode ser transportada quer pelo bordo luminal quer pelo basolateral (Chan, 1976), é legítimo admitir que os processos envolvidos no seu transporte, a partir do compartimento de síntese, se distingam dos que regulam a secreção tubular da amina, a partir do compartimento vascular. Por outro lado, como a DA formada nos tecidos renais é significativamente desaminada em DOPAC, num processo que mostrou envolver mais do que um compartimento (ver cap. IIB), é

legítimo supor uma relação entre os mecanismos que regulam o efluxo da amina e os que determinam a sua metabolização desaminativa.

Uma das formas de estudar os processos envolvidos no transporte de membrana dos compostos catecólicos consiste em avaliar os seus parâmetros cinéticos de efluxo, em experiências de perfusão de tecidos ou órgãos; a determinação desses parâmetros poderá depois permitir a análise da acção de influências moduladoras sobre o sistema de transporte em causa. Na presente série de estudos, servimo-nos desta metodologia experimental para avaliar as características cinéticas de efluxo da DA e do DOPAC formados nos tecidos renais.

Tem-se sugerido recentemente que os precursores da DA poderão ser úteis para controlar algumas formas de hipertensão arterial. Contudo, nem a DA nem o seu precursor (L-DOPA) parecem, pelas suas características farmacocinéticas, particularmente bem colocadas para suprir a correcção de um potencial défice ao nível do sistema dopaminérgico renal. A γ -glutamil-L-DOPA (GluDOPA) é um dipeptídeo de síntese que funciona como pró-fármaco para a DA. O grande interesse da GluDOPA assenta no facto de ser desprovida de acções farmacológicas próprias, sendo convertida em L-DOPA e subsequentemente em DA, pela acção sequencial da γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) e da DAAA presentes, respectivamente, no bordo em escova e no citoplasma das células dos túbulos contornados proximais (Wilk e col., 1978; Worth e col., 1985a; Boateng e col., 1990). Como o rim dispõe da maior actividade de γ -GT de todo o organismo (Wilk e col., 1978), a dinâmica dos processos necessários à formação da DA a partir da GluDOPA confere-lhe a particularidade interessante de ser preferencialmente metabolizada nos tecidos renais.

No Homem, a infusão de GluDOPA (25 μ g/kg/min) durante 10 horas mostrou condicionar um aumento na excreção urinária de L-DOPA, DA e DOPAC (MacDonald e col., 1989), o que sugere que alguma da L-DOPA com origem em GluDOPA escapa à descarboxilação em DA, enquanto que, simultaneamente, a DA formada a partir da GluDOPA é significativamente inactivada por desaminação. A administração da GluDOPA ao animal de experiência mostrou condicionar um aumento do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, bem como um aumento da excreção urinária de sódio e água, ao que se associou uma redução na secreção renal de renina; estes efeitos foram antagonizados pela carbidopa (um inibidor da DAAA) e pelo (+)-sulpiride (um antagonista específico dos receptores D_1 da DA) (Jeffrey e col., 1988a; MacDonald e col., 1988), mas divergem parcialmente dos

descritos para a DA formada nos tecidos renais a partir da L-DOPA, nomeadamente no que diz respeito aos efeitos sobre o fluxo sanguíneo renal e sobre a actividade plasmática de renina (ARP). Outras evidências que sugerem que a DA formada a partir da L-DOPA pode ser manipulada pelas células tubulares renais de forma distinta da observada quando o precursor utilizado é a GluDOPA, são os resultados de experiências *in vitro* em que se avaliou a síntese e a metabolização desaminativa da DA formada em tecidos renais humanos, a partir dos dois precursores (Soares-da-Silva e col., 1992a).

Atendendo ao interesse farmacológico da GluDOPA e às divergências apontadas, revelava-se de interesse comparar as características de efluxo da DA e do DOPAC formados, nos tecidos renais, com origem em L-DOPA e GluDOPA. Por esse motivo, decidimos incluir também a GluDOPA na presente série de estudos.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

Nas experiências descritas neste capítulo foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 200 a 250 gramas de peso. Os animais foram mantidos em número de três por gaiola, à temperatura de 24°C e em meio ambiente controlado (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão). A água e a comida foram fornecidas sem restrições e as experiências foram todas efectuadas durante o dia.

2.2. Colheita dos tecidos

2.2.1. Estudos *in vitro* ex vivo

Em algumas experiências, os animais foram injectados por via intraperitoneal com L-DOPA (10 e 30 mg/kg), com uma dose equimolar de GluDOPA (16,7 mg/kg) ou com o veículo (soro fisiológico a 0,9%; 5 ml/Kg). Os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação 15 minutos após a administração do precursor. Os rins foram rapidamente removidos através de uma incisão

abdominal na linha média e introduzidos em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C. Subsequentemente, os rins foram colocados numa placa sobre gelo, removeram-se os pólos renais e dissecaram-se fatias de córtex com cerca de 2 mm de espessura e 60 mg de peso. De seguida, as fatias foram colocadas em câmaras individuais de perfusão. O processo de preparação, pesagem e colocação dos fragmentos nas câmaras de perfusão teve a duração de cerca de 15 minutos.

2.2.2. Estudos *in vitro*

Numa outra série de experiências, os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação. Os rins foram rapidamente removidos e prepararam-se fatias de córtex renal, com metodologia semelhante à descrita para os estudos *in vitro ex vivo*. De seguida, os fragmentos de córtex renal foram pré-incubados durante 30 minutos, em tubos de vidro contendo 2 ml de uma solução de Krebs. Subsequentemente, as fatias de córtex renal foram incubadas durante 15 minutos, em tubos de vidro contendo 2 ml de solução de Krebs, na ausência de qualquer substrato e na presença de L-DOPA (50 e 100 μ M) ou GluDOPA (50 e 100 μ M). A pré-incubação e a incubação tiveram lugar sob agitação constante e em ambiente aquecido (37°C) e gaseificado (95% O₂ e 5% CO₂). Após a incubação, os tecidos foram transferidos para câmaras individuais de perfusão.

2.3. Perfusão dos tecidos

Em ambas as séries de experiências, as preparações foram perfundidas a um fluxo de 350 μ l/min, com uma solução de Krebs aquecida (37°C) e gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂). Após um período de estabilização de 30 minutos foram efectuadas cinco colheitas consecutivas do líquido de perfusão, com duração de 10 minutos cada, em tubos de vidro colocados em gelo e contendo 500 μ l de ácido perclórico (2 M). A solução de Krebs utilizada durante a pré-incubação, a incubação e a perfusão dos tecidos tinha uma composição em tudo idêntica à descrita no capítulo IIA, para os estudos com fatias de rim. No final da perfusão, os tecidos foram retirados das câmaras, secos em papel de filtro e introduzidos em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M).

Efectuámos várias tentativas no sentido de procurar reproduzir nas experiências de incubação *in vitro*, as condições obtidas nas experiências *in vitro ex vivo*.

Em alguns estudos, o período de estabilização foi prolongado até aos 50 minutos, enquanto que, noutras experiências, efectuámos duas colheitas adicionais de 10 minutos, do líquido de perfusão. Concluímos que o período de estabilização de 30 minutos e o prolongamento das colheitas até aos 50 minutos constituíam o melhor compromisso para conseguir, simultaneamente, uma estabilização suficiente dos tecidos e a obtenção de quantidades detectáveis de DA e de DOPAC, ao longo de todo o período de colheitas. Em ambas as séries de experiências (*in vitro ex vivo* e *in vitro*), as amostras do líquido de perfusão e as fatias de córtex renal foram mantidas a 4°C até à quantificação da DA e do DOPAC, em geral dentro de 48 horas.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da DA e do DOPAC nos tecidos renais e nas amostras do líquido de perfusão foi efectuada HPLC-ECD, como descrito nos capítulos anteriores. Os limites inferiores de detecção da DA e do DOPAC variaram entre 250 e 650 fmol/50µl.

2.5. Análise estatística

No grupo de experiências *in vitro ex vivo*, os níveis da DA e do DOPAC no líquido de perfusão (em nmol/g/10 min) foram transformados logaritmicamente, correlacionados com o tempo de perfusão e a inclinação das rectas de queda da DA e do DOPAC foi calculada por análise de regressão linear. As constantes de efluxo (k) da DA e do DOPAC foram determinadas, dividindo os níveis (em nmol/g/min) da amina ou do metabolito desaminado na última colheita do líquido de perfusão, pela respectiva acumulação tecidual (em nmol/g), no final da perfusão (k =velocidade de efluxo/conteúdo no tecido; Trendelenburg e col., 1979). Apresentam-se os valores relativos às médias $\pm$ EPM para um número n de experiências por grupo. Os valores das constantes de efluxo (k) e os relativos à inclinação das rectas de queda são médias geométricas, com limites de confiança para 95%. A avaliação do significado da diferença entre vários grupos de experiências foi efectuada pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

Ao contrário do que se observou nos estudos *in vitro ex vivo*, nas experiências de incubação *in vitro* o efluxo da DA e do DOPAC não evidenciou um padrão

monofásico. Por essa razão, não se procedeu à análise cinética do efluxo da DA e do DOPAC, nesse grupo de estudos.

2.6. Fármacos utilizados

A GluDOPA foi gentilmente oferecida pelo Prof. M. Lee (Edimburgo, Escócia). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

3.1. Estudos *in vitro ex vivo*

Como se pode observar na tabela 1, a acumulação da DA e do DOPAC nos tecidos renais foi dependente da dose de L-DOPA administrada. Os níveis teciduais da DA nos animais tratados com o veículo (o DOPAC não foi detectado nestas condições experimentais) foram substancialmente mais baixos do que os observados nos ratos tratados com a dose mais reduzida de L-DOPA. Após a administração i.p. de 30 mg/kg de L-DOPA, os níveis teciduais da DA e do DOPAC foram cerca de três vezes superiores aos verificados nos animais tratados com a dose inferior de L-DOPA (10 mg/kg). A relação DOPAC/DA foi, contudo, semelhante nos tecidos dos animais tratados com 10 e com 30 mg/kg de L-DOPA. A administração de GluDOPA (16,7 mg/kg) condicionou também uma acumulação substancial de DA e DOPAC nos tecidos renais. Nos animais tratados com GluDOPA, a acumulação da DA foi cerca de duas vezes superior à verificada com a dose equimolar de L-DOPA (10 mg/kg); contudo, a acumulação tecidual do DOPAC, nos tecidos renais dos animais tratados com GluDOPA, foi cerca de 30% mais baixa do que a verificada com a dose equimolar de L-DOPA. Estes resultados condicionaram uma relação DOPAC/DA significativamente mais baixa ($P < 0,01$) nos tecidos renais dos animais tratados com GluDOPA do que no grupo tratado com L-DOPA.

Os níveis da DA e do DOPAC no líquido que perfundiu os tecidos renais dos animais tratados com L-DOPA (10 e 30 mg/kg) ou com GluDOPA (16,7 mg/kg) baixaram progressivamente e de forma monoexponencial ao longo da perfusão, reflectindo a acumulação tecidual respectiva, da amina e do metabolito desaminado

(figura 1). As inclinações das rectas de queda para a DA foram semelhantes às para o DOPAC nos três grupos de experiências. Por outro lado, não se observaram diferenças nas inclinações das rectas de queda, quer para a DA quer para o DOPAC, entre os estudos efectuados com a L-DOPA e a GluDOPA (tabela 2).

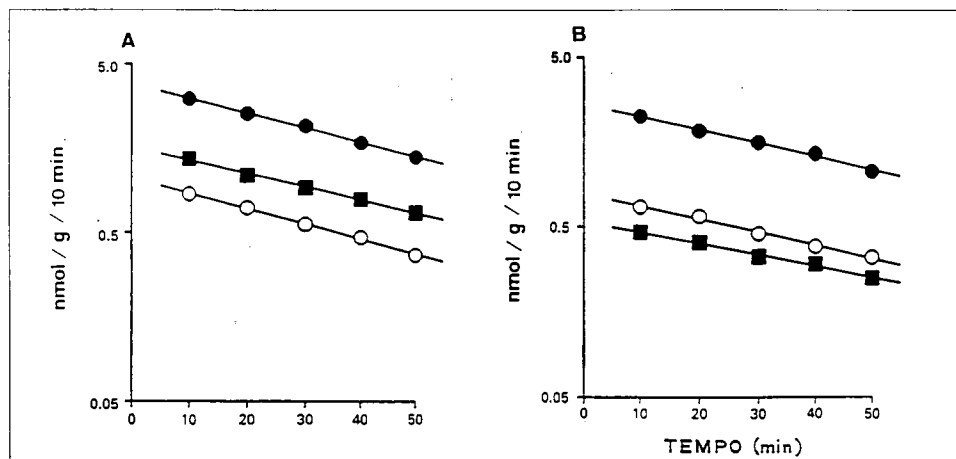


Figura 1. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) DA e do (B) DOPAC, nas colheitas de 10 minutos do líquido de perfusão das fatias de córtex renal de ratos tratados com L-DOPA (10 e 30 mg/kg) ou GluDOPA (16,7 mg/kg). Cada ponto representa a média de 8 a 12 experiências por grupo; o EPM foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da relação entre os pontos foram, nos ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPA: DA, $r=0,9991$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9968$, $n=40$; nos ratos tratados com 30 mg/kg de L-DOPA: DA, $r=0,9988$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9964$, $n=60$; nos ratos tratados com 16,7 mg/kg de GluDOPA: DA, $r=0,9975$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9970$, $n=40$. 10 mg/kg de L-DOPA (○), 30 mg/kg de L-DOPA (●) e 16,7 mg/kg de GluDOPA (■).

Nos estudos efectuados com L-DOPA (10 e 30 mg/kg) ou com GluDOPA (16,7 mg/kg), as constantes de efluxo (k) do DOPAC foram cerca de duas vezes mais elevadas do que as verificadas para a DA (tabela 3). Contudo, não se observaram diferenças nos valores de k , quer para a DA quer para o DOPAC, entre os estudos efectuados com a L-DOPA e a GluDOPA. Com ambos os precursores da DA, a proporção DOPAC/DA no líquido de perfusão permaneceu constante ao longo do período de colheitas e foi cerca de duas vezes superior à observada nos tecidos, no final das experiências. A proporção DOPAC/DA no efluente dos tecidos

	DA	DOPAC	DOPAC/DA
	nmol/g	nmol/g	
Controlo	0,032±0,003*	<0,014	
L-DOPA 10 mg/kg	13,6±2,7	4,0±1,2	0,35±0,05
L-DOPA 30 mg/kg	40,9±5,4*	15,4±1,2*	0,40±0,08
GluDOPA 16,7 mg/kg	22,4±3,4*	2,7±0,8	0,14±0,01*

Tabela 1. *Acumulação tecidual (em nmol/g) da DA e do DOPAC e proporção DOPAC/DA, no final das experiências efectuadas com fatias de córtex renal de ratos tratados com L-DOPA (10, e 30 mg/kg), GluDOPA (16,7 mg/kg) e em animais injectados com o veículo. Os resultados são médias ± EPM relativas a um número de 8 a 12 experiências por grupo. Significativamente diferente dos valores correspondentes, verificados após a administração de 10 mg/kg de L-DOPA (*P<0.01).*

	DA	DOPAC
	/10 min	/10 min
L-DOPA 10 mg/kg	0,0206 (0,0176; 0,0242)	0,0171 (0,0146; 0,0201)
L-DOPA 30 mg/kg	0,0193 (0,0171; 0,0218)	0,0189 (0,0149; 0,0241)
GluDOPA 16,7 mg/kg	0,0172 (0,0149; 0,0198)	0,0153 (0,0129; 0,0182)

Tabela 2. *Inclinação das rectas de queda (/10 min) para a DA e para o DOPAC nas experiências efectuadas com fatias de córtex renal de ratos tratados com L-DOPA (10 e 30 mg/kg) ou com GluDOPA (16,7 mg/kg). Os resultados são médias geométricas com intervalos de confiança para 95%, relativas a um número de 8 a 12 experiências por grupo.*

renais dos animais tratados com 10 e 30 mg/kg de L-DOPA (0,79±0,09 e 0,73±0,1, respectivamente) foi cerca de duas vezes mais elevada do que a observada no grupo de ratos tratados com 16,7 mg/kg de GluDOPA (0,34±0,02) (figura 2).

3.2. Estudos de incubação *in vitro*

A acumulação da DA e do DOPAC nos tecidos renais incubados com L-DOPA (50 e 100 µM) ou GluDOPA (50 e 100 µM), mostrou ser dependente da concen-

	DA	DOPAC
	k (/min)	k (/min)
L-DOPA 10 mg/kg	0,0027 (0,0034;0,0022)	0,0070 (0,0085; 0,0061)*
L-DOPA 30 mg/kg	0,0034 (0,0042; 0,0027)	0,0087 (0,0099; 0,0075)*
GluDOPA 16,7 mg/kg	0,0030 (0,0040; 0,0023)	0,0080 (0,0112; 0,0057)*

Tabela 3. Constantes de efluxo (k) da DA e do DOPAC no efluente de fatias de córtex renal de ratos previamente tratados com L-DOPA (10 e 30 mg/kg) ou GluDOPA (16,7 mg/kg). Os resultados apresentados são médias geométricas com limites de confiança para 95%, relativas a um número de 8 a 12 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor correspondente para a DA (* $P < 0.05$).

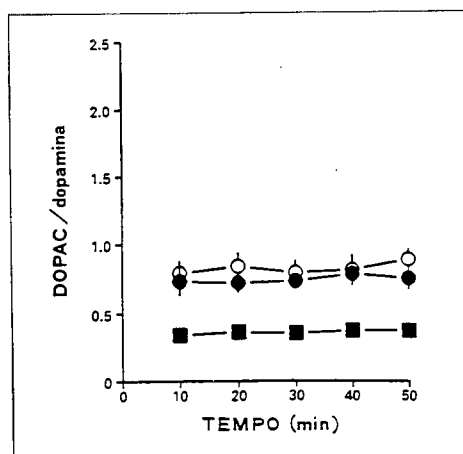


Figura 2. Proporção DOPAC/DA nas colheitas de 10 minutos do líquido de perfusão dos tecidos de córtex renal de ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPA (○), com 30 mg/kg de L-DOPA (●) e com 16,7 mg/kg de GluDOPA (■). Cada ponto representa a média de 4 a 5 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Todos os valores para a GluDOPA são significativamente diferentes dos para a L-DOPA ($P < 0.01$).

tração do precursor adicionada ao meio de incubação (tabela 4); os teores teciduais da DA nos tecidos incubados sem a adição de qualquer dos precursores (o DOPAC não foi detectado nestas condições) foram cerca de cem vezes inferiores aos verificados nos tecidos incubados com a concentração mais baixa

	DA nmol/g	DOPAC nmol/g	DOPAC/DA
Controlo	0,024±0,006	<0,014	
L-DOPA 50 µM	2,4±0,3	0,7±0,2	0,31±0,07
L-DOPA 100 µM	3,4±0,4	1,1±0,2	0,31±0,02
GluDOPA 50 µM	3,2±0,6	0,5±0,1	0,15±0,02*
GluDOPA 100 µM	8,4±0,9*, †	1,6±0,3†	0,19±0,01*

Tabela 4. Acumulação tecidual (em nmol/g) da DA e do DOPAC e proporção DOPAC/DA no final das experiências efectuadas com fatias de córtex renal de Rato incubadas na presença de L-DOPA (50 e 100 µM) ou GluDOPA (50 e 100 µM) e na ausência de qualquer substrato. Os resultados são médias ± EPM relativas a um número de 4 a 8 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor correspondente verificado nos tecidos incubados com 50 e 100 µM de L-DOPA (* $P < 0.01$) ou 50 µM de GluDOPA († $P < 0.05$).

de L-DOPA. Nos tecidos incubados com L-DOPA, a acumulação tecidual da DA foi inferior à verificada nas fatias de córtex renal incubadas com as concentrações equimolares de GluDOPA; este fenómeno foi particularmente evidente nos tecidos incubados com as concentrações mais elevadas dos dois precursores (100 µM de L-DOPA e de GluDOPA). Pelo contrário, a acumulação tecidual do DOPAC nos tecidos previamente incubados com L-DOPA não foi significativamente diferente da observada nos tecidos incubados com GluDOPA. Em consequência destes achados, a relação DOPAC/DA nos tecidos incubados com as duas concentrações de L-DOPA foi significativamente mais elevada ($P < 0,01$) do que a observada nas fatias de rim incubadas com as concentrações equimolares de GluDOPA. (tabela 4).

Como é possível observar na figura 3, os teores da DA e do DOPAC no efluente dos tecidos renais incubados com L-DOPA (50 e 100 µM) ou GluDOPA (50 e 100 µM), baixaram progressivamente ao longo do período de perfusão mas, como pode ser verificado pela concavidade superior das curvas de efluxo, o seu declínio não evidenciou um padrão do tipo monofásico. Nas experiências em que o período das colheitas foi prolongado até aos 70 minutos, os níveis da DA no líquido de perfusão foram demasiado baixos (em especial nos tecidos incubados com 50 µM de L-DOPA) para permitir uma análise cinética do efluxo. Os níveis da DA no efluente dos tecidos renais incubados com GluDOPA (50 e 100 µM) foram

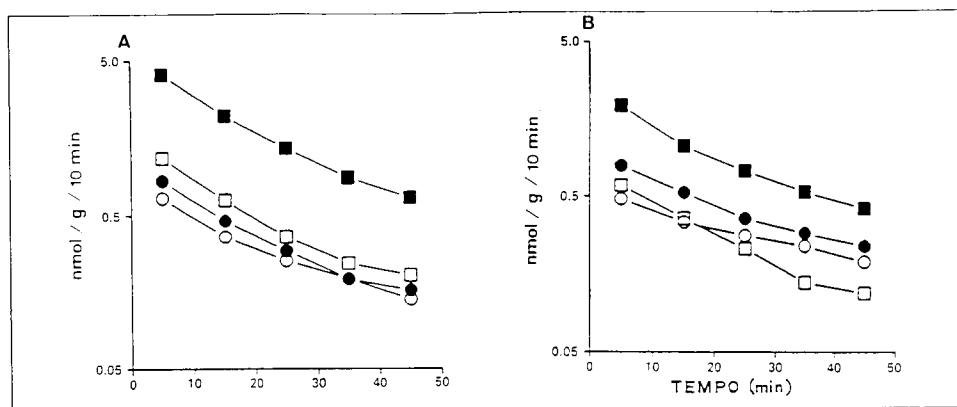


Figura 3. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) DA e do (B) DOPAC, no líquido de perfusão dos tecidos renais incubados com 50 μ M de L-DOPA (○), 100 μ M de L-DOPA (●), 50 μ M de GluDOPA (◻) e 100 μ M de GluDOPA (■). Cada ponto representa a média de 4 a 8 experiências por grupo; o EPM foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes.

mais elevados do que os observados após a incubação com concentrações equimolares de L-DOPA (figura 3). Este fenómeno foi particularmente evidente ($P < 0,01$) quando os tecidos foram incubados com a concentração mais elevada dos dois precursores (100 μ M); nestas condições, os níveis da DA no efluente dos tecidos incubados com a GluDOPA foram cerca de quatro vezes mais elevados do que os verificados após a incubação com L-DOPA. Pelo contrário, os níveis do DOPAC no efluente dos tecidos incubados com GluDOPA foram semelhantes (com 50 μ M) e duas vezes superiores (com 100 μ M), aos observados com as concentrações equimolares de L-DOPA.

Verificou-se, com ambos os precursores, que a proporção DOPAC/DA no líquido de perfusão foi significativamente mais elevada ($P < 0,01$) do que a observada nos tecidos; este fenómeno foi particularmente evidente nos estudos efectuados com a L-DOPA. Por outro lado, a relação DOPAC/DA ao longo da perfusão nos estudos em que os tecidos renais foram incubados com L-DOPA (50 e 100 μ M) foi significativamente mais elevada ($P < 0,01$) do que a observada nas experiências em que os tecidos foram incubados com as concentrações equimolares de GluDOPA (figura 4).

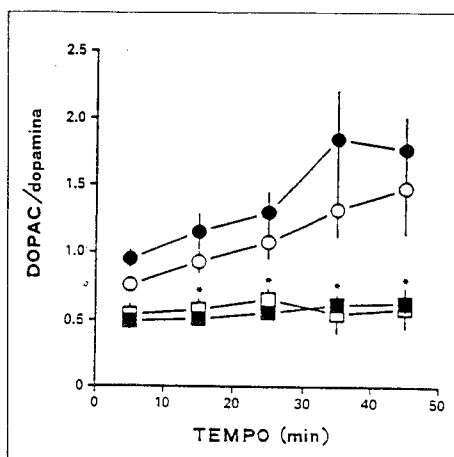


Figura 4. Relação DOPAC/DA nas amostras do líquido de perfusão dos tecidos de córtex renal incubados com 50 μ M de L-DOPA (○), 100 μ M de L-DOPA (●), 50 μ M de GluDOPA (□) e 100 μ M de GluDOPA (■). Cada ponto representa a média de 4 a 5 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente dos valores correspondentes para a L-DOPA (* $P < 0,01$).

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que quer a L-DOPA quer a GluDOPA se comportam como substratos para a formação renal de DA e que a amina recém-sintetizada é, em ambos os casos, significativamente desaminada em DOPAC. A análise do efluxo da DA e do DOPAC, na série de estudos realizados em condições *in vitro ex vivo*, revelou a presença de um modelo monocompartimental, dispondo de actividade de MAO e em estabilidade de efluxo. Nestas condições, a constante de efluxo para o DOPAC mostrou ser significativamente mais elevada do que a para a DA, o que revela que o metabolito desaminado abandona o compartimento celular onde é formado mais facilmente do que a amina que lhe dá origem. Quando se utilizou a GluDOPA, os valores das constantes de efluxo para DA e para o DOPAC não diferiram significativamente dos valores respectivos observados com a L-DOPA, o que sugere que os factores que regulam o efluxo celular, quer da amina quer do metabolito desaminado, são semelhantes com qualquer dos dois precursores. Verificou-se também com os dois precursores que uma fracção importante da DA formada nos tecidos renais é significativamente

metabolizada por desaminação, no decurso do processo de efluxo do compartimento onde a sua síntese se processa. Os resultados das experiências efectuadas com a GluDOPA evidenciaram, no entanto, diferenças importantes em relação aos dos estudos em que se utilizou a L-DOPA, nomeadamente nos aspectos ligados à dimensão do processo de metabolização desaminativa da DA.

Nos estudos em que os dois precursores foram administrados por via intraperitoneal (estudos *in vitro ex vivo*), assistiu-se à formação renal de quantidades significativas de DA. No entanto, no grupo de experiências em que se utilizou a GluDOPA, os níveis da DA foram significativamente mais elevados do que os observados com a dose equimolar de L-DOPA, quer nos tecidos quer no líquido de perfusão. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Wilk e col., 1978) e são consistentes com a selectividade da GluDOPA para os tecidos renais (Albert e col., 1961). Nas experiências realizadas em condições *in vitro* é anulada a selectividade da GluDOPA para o rim; contudo, nestas condições verificaram-se também níveis de DA comparativamente mais elevados, quer nos tecidos quer no efluente, quando as fatias foram incubadas com as concentrações equimolares de GluDOPA. A concordância verificada entre as duas séries de estudos, quanto à observação de níveis mais elevados de DA com as doses equimolares de GluDOPA, permite sugerir que o fenómeno observado possa encontrar explicação, não apenas numa metabolização preferencial da GluDOPA a nível renal, mas também em diferenças ao nível da manipulação celular da DA formada a partir dos dois precursores. Esta conclusão vem reforçada ao constatar-se que, nos dois grupos de experiências (*in vitro ex vivo* e *in vitro*), a GluDOPA se associou a teores de DOPAC mais reduzidos, quer nos tecidos quer no efluente, comparativamente aos observados nos estudos em que se utilizaram as doses equimolares de L-DOPA.

Uma hipótese de explicação para este fenómeno assenta na presença de vias diferentes, envolvidas no acesso e metabolização intracelular dos dois precursores da DA. Após a administração por via sistémica (estudos *in vitro ex vivo*), quer a L-DOPA quer a GluDOPA podem ser transportadas ao nível das células tubulares utilizando as vias fisiologicamente disponíveis: o precursor presente no filtrado tubular pode ser transportado pelo bordo luminal e o que perfunde os capilares peritubulares pode ser transportado pelo basolateral. Apesar de se saber que a L-DOPA é transportada através dos dois bordos da célula (Baines e Chan, 1980; Barthelmebs e col., 1990), está ainda mal esclarecida a importância relativa de cada um deles, nesse processo. Em relação à GluDOPA,

por outro lado, o facto de a γ -GT estar predominantemente localizada ao nível do bordo luminal das células tubulares proximais (Wilk e col., 1978) obriga a que este precursor se comporte como tendo acesso à célula, preferencialmente, através do bordo luminal. Neste contexto, é possível admitir que a manipulação preferencial da GluDOPA na proximidade do bordo luminal possa acarretar uma menor disponibilidade da DA recém-formada para ser desaminada, ao passo que a manipulação celular da DA na proximidade do bordo basolateral poderá associar-se a uma maior disponibilidade da amina recém-formada para ser desaminada. Dois argumentos concorrem para esta interpretação: (1) a MAO é uma enzima mitocondrial e estes organelos estão localizados, predominantemente, na zona basal das células tubulares renais, ou seja, no polo oposto àquele em que a GluDOPA tem acesso às células tubulares; (2) nas experiências em que os tecidos renais foram incubados com os dois precursores (estudos *in vitro*), uma situação em que os túbulos estão colapsados e o bordo luminal perde relevância funcional em favor do basolateral (Rennick, 1981; Weeden e Weiner, 1973), verificou-se um padrão de efluxo da DA e do DOPAC que traduziu uma desaminação mais intensa da amina formada, nessas condições.

A análise dos resultados obtidos no grupo de estudos *in vitro ex vivo* evidenciou um sistema monocompartimental, dispondo de actividade de MAO, em estabilidade de efluxo. Este modelo permitiu calcular a constante de efluxo do metabolito desaminado (^{4} DOPAC), que se caracterizou por ser 2 a 3 vezes superior à da amina (^{4} DA). A maior facilidade do DOPAC para abandonar os tecidos, evidenciada pelo seu valor de k mais elevado, está de acordo com a importância atribuída às características lipofílicas dos compostos catecólicos, como factor determinante da facilidade relativa com que permeiam as membranas celulares (Trendelenburg e col., 1979).

Verificou-se que a DA formada a partir quer da L-DOPA quer da GluDOPA é substancialmente desaminada no decurso dos processos que antecedem o seu acesso ao meio de perfusão. Este fenómeno foi evidenciado por (1) uma relação DOPAC/DA no meio de perfusão duas a três vezes mais elevada do que a observada nos tecidos e por (2) um paralelismo entre as rectas de queda da DA e do DOPAC, apesar de a ^{4} DOPAC ser significativamente mais elevada do que a ^{4} DA. Duas hipóteses alternativas podem ser avançadas como tentativa de interpretação para este fenómeno. A primeira, favorece a possibilidade de a DA produzida nas células tubulares renais ser submetida a uma desaminação mais intensa durante o processo de efluxo do compartimento celular onde a sua síntese se

processa; esta hipótese só será sustentável, no entanto, se se admitir a existência de uma compartimentalização da DA a nível intracelular, protegendo-a da acção da MAO no local de síntese, e implica que a amina seja fortemente inactivada antes de actuar sobre os seus receptores. A segunda, favorece a possibilidade de a DA ser captada, ou recirculada, num compartimento celular rico em MAO, depois de abandonar o local de síntese e actuar sobre os receptores; as estruturas celulares melhor colocadas para desempenhar esta função são as próprias células tubulares onde a síntese da DA se verifica, até porque a desaminação da DA formada nos tecidos renais não parece processar-se em compartimentos neuronais (ver Cap. IIB e IID). Em favor desta segunda possibilidade, pode avançar-se o argumento de que o processo de desaminação da DA, no rim de Rato, mostrou ser sensível à concentração de sódio no meio extracelular e passível de modulação através de manobras que interferem com o transporte de sódio nas células tubulares renais (ver Cap. IIC).

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo mostram que a cinética do efluxo da DA e do DOPAC formados nos tecidos renais é governada pelas características lipofílicas dos dois compostos.

Estes estudos mostram, também, que a DA de síntese renal é significativamente metabolizada por desaminação no decurso dos processos que intervêm no efluxo celular e revelam que a amina formada nas células tubulares renais a partir da GluDOPA é menos desaminada do que a que resulta da descarboxilação da L-DOPA.

Estes resultados sugerem ainda que o processo de desaminação da DA que se verifica durante o efluxo celular envolve, sobretudo, os teores da amina que abandonam as células tubulares renais através do bordo basolateral.

B - Estudo comparativo do efluxo da dopamina e noradrenalina formadas no rim de Rato a partir de L-DOPA e L-*threo*-DOPS

1. Introdução

No capítulo anterior estudou-se o efluxo da DA e do DOPAC formados em tecidos renais de Rato. A análise cinética dos resultados revelou que o DOPAC tem uma maior facilidade para abandonar o compartimento de síntese do que a amina que lhe dá origem. Por outro lado, verificou-se que a DA é fortemente inactivada por desaminação durante os processos que intervêm no seu efluxo, a partir das células tubulares renais.

Perante a necessidade de avançar na interpretação destes resultados, parecia de particular interesse o estudo das características de efluxo nos tecidos renais de outra catecolamina, cuja síntese tivesse lugar nas mesmas células tubulares renais e em cujo processo de metabolização interviessem as enzimas envolvidas na inactivação da DA de síntese renal.

A diidroxifenilserina (DOPS) é um ácido aminado de síntese, o qual sofre conversão directa em NA por acção da DAAA (Bartholini e col., 1975). Tem sido recentemente sugerido o interesse deste pró-fármaco, como precursor da NA a nível periférico, nomeadamente em situações clínicas de acinésia e de congelamento que se verificam em formas de parkinsonismo avançado (Narabayashi e col., 1981), bem como em formas graves de hipotensão ortostática que complicam o curso de situações de polineuropatia amilóide familiar (Suzuki e col., 1980; Suzuki e col., 1981; Falcão de Freitas, 1986). Verificou-se que o estereoisómero (L)-*threo* deste ácido aminado era descarboxilado em NA por acção da DAAA extraneuronal, num processo que mostrou ser particularmente intenso nos tecidos renais (Soares-da-Silva, 1993b). Nestas condições, verificou-se ainda que uma quantidade substancial da NA recém-formada era rapidamente desaminada em DOPEG. Ao comportar-se como um substrato para a DAAA renal, o L-DOPS funciona como um precursor para a síntese de NA no mesmo compartimento celular extraneuronal em que a DA endógena de síntese renal é fisiologicamente produzida.

No presente capítulo, procedemos a um estudo comparativo da cinética do efluxo da DA e da NA formadas nas células tubulares renais a partir, respectivamente, da L-DOPA e do L-DOPS. Avaliámos também o padrão de efluxo dos

metabolitos desaminados da DA e da NA, respectivamente, o DOPAC e o DOPEG.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

Nas experiências descritas neste capítulo foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 200 a 250 gramas de peso. Os animais foram mantidos em número de três por gaiola, à temperatura de 24°C e em meio ambiente controlado (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão). A água e a comida foram fornecidas sem restrições e as experiências foram todas efectuadas durante o dia.

2.2. Colheita dos tecidos

Os animais foram injectados por via i.p. com L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA; 10, 30 e 100 mg/kg), L-*treo*-3,4-diidroxifenilserina (L-DOPS; 10, 30 e 100 mg/kg) ou com o veículo (soro fisiológico 0,9%; 5 ml/kg); 15 minutos após a injeção, os ratos foram anestesiados com éter e sacrificados por decapitação. Os rins foram rapidamente removidos através de uma incisão abdominal na linha média e introduzidos em solução salina (NaCl 0,9% refecida a 4°C. De seguida, prepararam-se fatias de córtex renal como descrito no capítulo IIIA, as quais foram colocadas em câmaras individuais de perfusão. O processo de preparação, pesagem e colocação dos fragmentos nas câmaras de perfusão teve a duração de cerca de 15 minutos.

2.3. Perfusão dos tecidos

Em ambas as séries de experiências as preparações foram perfundidas a um fluxo de 350 µl/min, com uma solução de Krebs aquecida (37°C) e gaseificada (95% O₂ e 5% CO₂), fazendo uso de um protocolo experimental em tudo idêntico ao descrito no capítulo IIIA (estudos *in vitro ex vivo*). No final da perfusão, os tecidos foram retirados das câmaras, secos com papel de filtro e introduzidos em

recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M). As amostras do líquido de perfusão e as fatias de córtex renal foram mantidas a 4°C até à quantificação das catecolaminas, em geral dentro de 48 horas.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da DA, NA, DOPAC e DOPEG nos tecidos renais e nas amostras do líquido de perfusão foi efectuada por meio de HPLC-ECD, como descrito nos capítulos anteriores. Os limites inferiores de detecção da DA, NA, DOPAC e DOPEG variaram entre 250 e 650 fmol/50µl.

2.5. Análise estatística

Os níveis da DA, NA, DOPAC e DOPEG no líquido de perfusão foram transformados logaritmicamente e correlacionados com o tempo de perfusão; as inclinações das rectas de queda e as constantes de efluxo (k) da DA, NA, DOPAC e DOPEG foram determinadas como descrito no capítulo IIIA (estudos *in vitro ex vivo*). Apresentam-se os valores relativos às médias $\pm$ EPM correspondentes a um número n de experiências por grupo. Os valores relativos às inclinações das rectas e às constantes de efluxo (k) são médias geométricas, com intervalos de confiança para 95%. A avaliação do significado da diferença entre os grupos foi efectuada pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.6. Fármacos utilizados

A L-*treo*-3,4-diidroxifenilserina (L-DOPS) foi gentilmente oferecida por Sumitomo (Japão). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

Como se pode observar na tabela 1, a acumulação da DA e do DOPAC nos tecidos renais foi dependente da dose de L-DOPA administrada; os níveis da DA e do DOPAC observados nos tecidos após a administração de 30 e de 100 mg/kg

	DA	DOPAC	DOPAC/DA
	nmol/g	nmol/g	
Não tratados	0,11±0,001*	<0,014	
L-DOPA 10 mg/kg	15,0±1,2	5,9±0,2	0,41±0,05
L-DOPA 30 mg/kg	37,6±2,6*	12,5±1,7*	0,34±0,05
L-DOPA 100 mg/kg	218,6±14,7*	72,6±3,3*	0,33±0,02

Tabela 1. Acumulação tecidual (em nmol/g) da DA e do DOPAC e proporção DOPAC/DA no final das experiências efectuadas com fatias de córtex renal de ratos previamente tratados com L-DOPA (10, 30 e 100 mg/kg) e em animais não tratados. Os resultados são médias $\pm$ EPM relativas a 8 experiências por grupo. Significativamente diferente dos valores correspondentes verificados após a administração de 10 mg/kg de L-DOPA (* $P < 0,01$).

de L-DOPA foram 3 e 20 vezes superiores, respectivamente, em comparação com os observados após a administração da dose de L-DOPA mais baixa (10 mg/kg). A proporção DOPAC/DA nos tecidos renais foi, contudo, semelhante após a administração das três doses de L-DOPA.

Os níveis da DA e do DOPAC no líquido de perfusão dos tecidos renais provenientes dos animais tratados com L-DOPA (10, 30 e 100 mg/kg) baixaram progressivamente ao longo do período de perfusão e reflectiram as respectivas acumulações teciduais, da amina e do metabolito desaminado (figura 1). As inclinações das rectas de queda para a DA foram semelhantes às verificadas para o DOPAC nos três grupos de experiências e não se observaram diferenças significativas nas inclinações das rectas de queda para a DA com qualquer das doses de L-DOPA utilizadas. Por outro lado, a constante de efluxo para o DOPAC foi significativamente mais elevada do que a observada para a DA ($P < 0,01$) e não diferiu também entre os estudos efectuados com tecidos provenientes de animais tratados com qualquer das três doses de L-DOPA (tabela 2). Como pode ser observado na figura 2 e na tabela 1, a relação DOPAC/DA no líquido de perfusão das experiências efectuadas com tecidos renais de ratos injectados com 10, 30 e 100 mg/kg de L-DOPA foi cerca de duas vezes mais elevada do que a verificada nos tecidos e manteve-se constante ao longo do período de colheitas.

A acumulação de NA recém-formada nos tecidos renais foi dependente da dose de L-DOPS administrada. Os níveis de NA observados nos tecidos dos animais tratados com 30 e 100 mg/kg de L-DOPS foram três e seis vezes mais

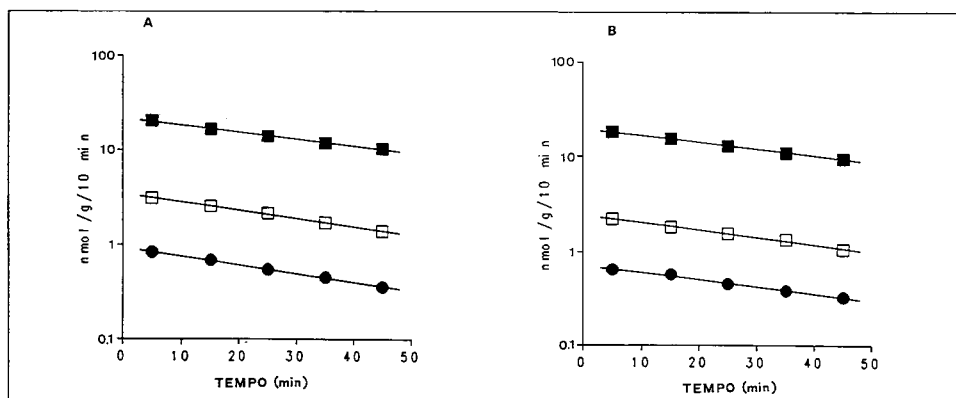


Figura 1. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) DA e do (B) DOPAC, no líquido de perfusão de fatias de córtex renal obtidas de ratos tratados com L-DOPA (10, 30 e 100 mg/kg). Cada ponto representa a média de 8 a 10 experiências por grupo; o EPM foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da relação entre os pontos foram, nos ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPA: DA, $r=0,9991$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9968$, $n=40$; nos ratos tratados com 30 mg/kg de L-DOPA: DA, $r=0,9988$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9964$, $n=40$; nos ratos tratados com 100 mg/kg de L-DOPA: DA, $r=0,9979$, $n=40$; DOPAC, $r=0,9993$, $n=40$. 10 mg/kg de L-DOPA (●), 30 mg/kg de L-DOPA (□) e 100 mg/kg de L-DOPA (■).

	DA	DOPAC
	k (/min)	k (/min)
L-DOPA 10 mg/kg	0,0031 (0,0041; 0,0024)	0,0070 (0,0085; 0,0059)*
L-DOPA 30 mg/kg	0,0036 (0,0043; 0,0030)	0,0083 (0,0097; 0,0071)*
L-DOPA 100 mg/kg	0,0033 (0,0039; 0,0029)	0,0097 (0,0116; 0,0081)*

Tabela 2. Constantes de efluxo (k) para a DA e para o DOPAC, no efluente de fatias de córtex renal de ratos tratados com 10, 30 e 100 mg/kg de L-DOPA. Os resultados são médias geométricas com limites de confiança para 95%, relativas 8 experiências por grupo. Significativamente diferente em comparação com o valor correspondente para a DA (* $P<0,01$).

elevados, respectivamente, do que os verificados nos animais tratados com a dose inferior de 10 mg/kg (Tabela 3).

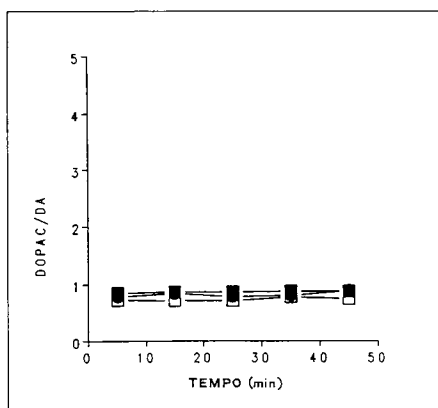


Figura 2. Relação DOPAC/DA no líquido de perfusão dos tecidos de córtex renal provenientes de ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPA (●), com 30 mg/kg de L-DOPA (○) e com 100 mg/kg de L-DOPA (■). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

	NA	DOPEG	DOPEG/NA
	nmol/g	nmol/g	
Não tratados	0,8±0,1*	<0,08	
L-DOPS 10 mg/kg	6,5±0,6	1,0±0,1	0,15±0,01
L-DOPS 30 mg/kg	21,8±0,6*	0,8±0,1	0,04±0,01*
L-DOPS 100 mg/kg	36,2±6,0*	1,0±0,2	0,03±0,01*

Tabela 3. Acumulação tecidual de NA e DOPEG (em nmol/g) e proporção DOPEG/NA, no final das experiências efectuadas com fatias de córtex renal de ratos tratados com L-DOPS (10, 30 e 100 mg/kg) e em animais não tratados. Os resultados são médias ± EPM relativas a 8 experiências por grupo. Significativamente diferente dos valores correspondentes verificados após a administração de 10 mg/kg de L-DOPS (* $P < 0,01$).

A administração de L-DOPS condicionou também um aumento na acumulação nos tecidos renais do metabolito desaminado da NA, o DOPEG; contudo, os teores teciduais do DOPEG não mostraram ser dependentes da dose de L-DOPS previamente administrada. Estes resultados condicionaram uma proporção DOPEG/NA nos tecidos renais dos animais tratados com 10 mg/kg de L-DOPS, significa-

tivamente mais elevada ($P < 0.01$) do que a observada nos tecidos dos animais tratados com as duas doses superiores do precursor da NA (30 e 100 mg/kg).

Tal como se observou para a DA, os níveis da NA no líquido de perfusão dos tecidos renais dos animais tratados com as três doses de L-DOPS baixaram progressivamente ao longo do período da perfusão e reflectiram a acumulação tecidual da amina (figura 3); nestas condições, as inclinações das rectas de queda para a NA foram semelhantes nos três grupos de experiências. Pelo contrário, o

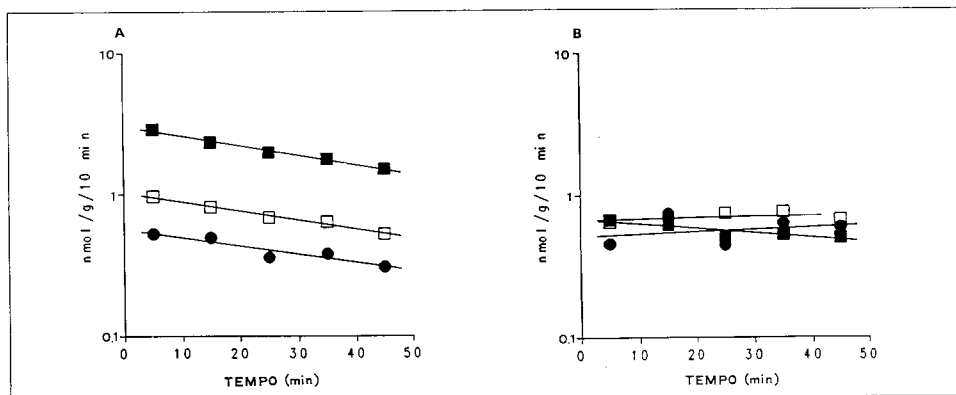


Figura 3. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) NA e do (B) DOPEG, no líquido de perfusão de fatias de córtex renal obtidas de ratos tratados com L-DOPS (10, 30 e 100 mg/kg). Cada ponto representa a média de 8 a 12 experiências por grupo; o EPM foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da relação entre os pontos foram, nos ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPS: NA, $r=0,9401$, $n=40$; DOPEG, $r=0,2649$, $n=40$; nos ratos tratados com 30 mg/kg de L-DOPS: NA, $r=0,9921$, $n=40$; DOPEG, $r=0,4162$, $n=40$; nos ratos tratados com 100 mg/kg de L-DOPS: NA, $r=0,9936$, $n=40$; DOPEG, $r=0,9104$, $n=40$. 10 mg/kg de L-DOPS (●), 30 mg/kg de L-DOPS (○) e 100 mg/kg de L-DOPS (■).

efluxo do DOPEG foi semelhante em todas as amostras colhidas ao longo da perfusão e não se evidenciaram diferenças significativas no efluxo do DOPEG entre os estudos efectuados com tecidos de animais tratados com as três doses de L-DOPS. As taxas constantes de efluxo para a NA foram semelhantes às verificadas para a DA (Tabela 4), mas significativamente inferiores às verificadas para o DOPEG ($p < 0,01$). A proporção DOPEG/NA no líquido de perfusão dos tecidos renais provenientes dos animais tratados com 10 e 30 mg/kg de L-DOPS aumentou progressivamente ao longo do tempo e foi significativamente mais

	NA	DOPEG
	k (/min)	k (/min)
L-DOPS 10 mg/kg	0,0043 (0,0068; 0,0027)	0,0438 (0,0843; 0,0228)*
L-DOPS 30 mg/kg	0,0024 (0,0027; 0,0021)	0,0798 (0,1221; 0,0522)*
L-DOPS 100 mg/kg	0,0038 (0,0046; 0,0032)	0,0483 (0,0680; 0,0344)*

Tabela 4. Constantes de efluxo (k) para a NA e para o DOPEG, no efluente de fatias de córtex renal de ratos tratados com 10, 30 e 100 mg/kg de L-DOPS. Os resultados apresentados são médias geométricas com limites de confiança para 95%, relativas a 8 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor correspondente para a NA (*P<0,01).

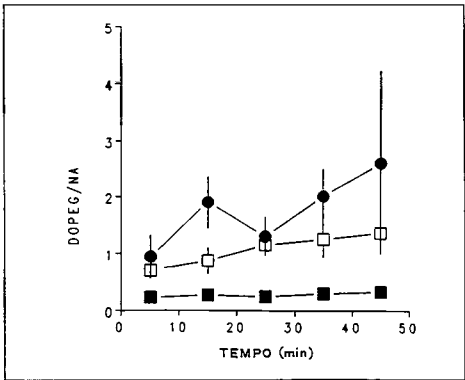


Figura 4. Relação DOPEG/NA no líquido de perfusão dos tecidos de córtex renal obtidos de ratos tratados com 10 mg/kg de L-DOPS (●), 30 mg/kg de L-DOPS (□) e 100 mg/kg de L-DOPS (■). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente do valor correspondente para 10 e 30 mg/kg de L-DOPS (*P<0,01).

elevada (P<0,01) do que a observada nos estudos efectuados com tecidos de animais tratados com a dose mais elevada do precursor da NA (100 mg/kg). Tal como se observou para a DA, a proporção DOPEG/NA nos tecidos renais foi, nos três grupos, inferior à observada no efluente (P<0,01).

4. Comentários

O presente estudo mostra que após a administração de L-DOPA e L-DOPS se assistiu à formação renal de quantidades substanciais de, respectivamente, DA e NA e que ambas as aminas foram significativamente desaminadas nos metabolitos respectivos, o DOPAC e o DOPEG. Verificámos que a acumulação nos tecidos renais e os níveis no efluente da DA e da NA se correlacionaram com a dose do precursor administrado. Contudo, o aumento na acumulação tecidual de NA, dependente da dose de L-DOPS, foi menos acentuado do que o aumento dependente da dose de L-DOPA, na acumulação tecidual de DA. Estes resultados sugerem que a L-DOPA e o L-DOPS poderão ser manipulados de forma diferente pelas células tubulares renais, nomeadamente no que respeita aos mecanismos envolvidos no seu acesso à DAAA, ou à sua disponibilidade relativa para serem descarboxilados. Nos animais tratados com a L-DOPA, os níveis do DOPAC nos tecidos e no efluente acompanharam paralelamente os teores de DA. Pelo contrário, nem a acumulação do DOPEG nos tecidos nem os níveis do DOPEG no efluente acompanharam paralelamente os parâmetros para a NA. Estes resultados sugerem a presença de diferenças nos processos envolvidos na metabolização desaminativa das duas aminas e/ou na manipulação do DOPAC e do DOPEG pelos tecidos renais. A análise cinética do efluxo da DA, NA, DOPAC e DOPEG permitiu calcular as constantes de efluxo respectivas, as quais revelaram a seguinte ordem de grandeza: $k_{DOPEG} > k_{DOPAC} > k_{DA} = k_{NA}$. Estes resultados mostram que o padrão de efluxo das aminas e dos seus metabolitos, nas células tubulares renais, é regulado pelas características lipofílicas dos compostos e estão de acordo com a importância atribuída à lipofilia das catecolaminas e dos seus derivados como factor determinante dos parâmetros de efluxo de cada composto, em diferentes tecidos e órgãos (Macke & Bönish, 1979; Trendelenburg e col., 1979).

Tal como se verificara nas experiências *in vitro ex vivo* do capítulo anterior, nos estudos em que se utilizou a L-DOPA o efluxo da DA revelou ter origem num sistema monocompartimental, com actividade de MAO. O padrão monofásico das rectas de efluxo da DA e do DOPAC e o seu paralelismo, apesar de um $k_{DOPAC} > k_{DA}$, revela que o efluxo da DA atingiu a estabilidade num sistema em que a amina é sujeita a um processo intenso de desaminação, a preceder o seu acesso ao meio de perfusão (Trendelenburg e col., 1979). O facto de a relação DOPAC/DA não ter variado nos tecidos, nem no efluente, nos estudos efectuados com diferentes doses de L-DOPA, vem reforçar essa conclusão; nestas condições,

a actividade da MAO no compartimento que a amina cruza durante o processo de efluxo, determina a diferença entre a relação DOPAC/DA nos tecidos e a verificada no meio de perfusão, independentemente dos teores da amina presentes no local de síntese.

A análise cinética do efluxo da NA revelou um declínio monofásico, semelhante ao observado para a DA. Contudo, os processos envolvidos no efluxo do DOPEG diferiram dos observados para o DOPAC. De facto, ao contrário do que se verificou com o DOPAC, os níveis do DOPEG não acompanharam paralelamente os da NA nos tecidos, nem no efluente. Estes resultados contrastam com os obtidos em experiências nas quais os tecidos e o plasma foram colhidos imediatamente após o sacrifício de animais de experiência previamente tratados com L-DOPS (Soares-da-Silva, 1993b); nesses estudos, verificou-se um aumento dependente do tempo e da dose de L-DOPS, quer nos níveis da NA quer nos do DOPEG, embora a acumulação da NA fosse, em todos os casos, mais elevada do que a do metabolito desaminado.

O envolvimento de estruturas neuroniais não parece estar implicado nas diferenças observadas neste capítulo, entre os padrões de efluxo do DOPAC e do DOPEG; de facto, a capacidade dos tecidos renais para descarboxilar quer a L-DOPA quer o L-DOPS mostrou não ser afectada, respectivamente, pela desnervação renal secundária à isquemia transitória (ver cap IID) e à desnervação renal pela 6-hidroxidopamina (Soares-da-Silva, 1993b). Por outro lado, a desaminação de ambas as aminas deve processar-se, maioritariamente, em compartimentos celulares extraneuronais, já que a desnervação do rim mostrou não afectar a desaminação renal da DA formada a partir da L-DOPA (ver cap. IID) nem a da NA formada a partir do L-DOPS (Soares-da-Silva, 1993b). É também improvável que as diferenças observadas em relação ao padrão de desaminação das duas aminas possam resultar de diferentes afinidades entre os substratos e a enzima metabolizadora, já que a MAO do tipo A predomina no rim de Rato e ambas as aminas estudadas, DA e NA, são bons substratos para esta forma da enzima (Kopin, 1985).

Uma hipótese de explicação para as diferenças verificadas poderá assentar na grande capacidade do DOPEG para permear as membranas celulares, como é traduzido pelo valor da sua constante de efluxo, cerca de dez vezes mais elevada do que a da NA. Muito possivelmente, a alta lipofilia do DOPEG permite-lhe difundir rapidamente, para atingir o equilíbrio com o meio de perfusão durante os 30 minutos de estabilização que precedem a primeira colheita do efluente, indepen-

dentemente dos teores do metabolito presentes no tecido. Contudo, apesar de dispor de uma maior facilidade para permear as membranas celulares, o DOPAC acompanhou paralelamente o efluxo da DA. Como foi comentado, o paralelismo entre as rectas de queda da DA e do DOPAC traduz a existência de um processo de desaminação da DA, num compartimento rico em MAO, que funciona como barreira metabólica que a amina cruza antes de atingir o meio de perfusão. Neste contexto, a ausência de paralelismo entre o efluxo da NA e o do DOPEG, apesar do declínio da NA ter evidenciado um padrão monofásico, permite sugerir que os teores do DOPEG no efluente possam ter resultado de um processo de desaminação anterior no tempo, eventualmente associado à formação da NA nas células tubulares renais.

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo evidenciam uma ordem de grandeza para as constantes de efluxo (k) da DA, NA, DOPAC e DOPEG: $k_{\text{DOPEG}} > k_{\text{DOPAC}} > k_{\text{DA}} = k_{\text{NA}}$, sugerindo que as características de efluxo dos compostos catecólicos sintetizados nas células tubulares renais são reguladas pela sua lipofilia relativa. Para além disso, os resultados destes estudos sugerem que os processos envolvidos na metabolização desaminativa da NA formada nas células tubulares renais se distinguem dos que respondem pela metabolização desaminativa da DA da síntese renal.

C - Estudos sobre a influência da MAO-A e da MAO-B no efluxo da DA formada no rim humano e de Rato

1. Introdução

Qualquer intervenção sobre a desaminação da DA deverá fundamentar-se na importância relativa das duas formas de MAO, tipos A e B, nesse processo, bem como no conhecimento dos locais onde actuam. Os trabalhos apresentados no capítulo IIB evidenciaram que a DA sintetizada no rim de Rato é significativamente desaminada em DOPAC e que ambas as formas de MAO estão envolvidas na sua inactivação. Os resultados desses estudos sugeriram ainda uma compartimentalização na acção das duas formas de MAO; de acordo com os resultados dessas experiências, a MAO do tipo A estaria localizada no compartimento onde a síntese da DA se verifica, desempenhando um papel mais importante na inactivação da amina, enquanto que a MAO do tipo B estaria localizada num outro compartimento, assumindo um papel de menor relevo na metabolização renal da DA. Os resultados dos estudos descritos nos capítulos IIIA e IIIB evidenciaram, por outro lado, que a DA é significativamente desaminada durante o processo de efluxo do compartimento onde a sua síntese se verifica, tendo-se sugerido que este fenómeno pode traduzir o transporte da DA, ou a sua recirculação, num compartimento rico em MAO, que funciona como barreira metabólica que a amina cruza antes de atingir o meio de perfusão.

Os resultados das experiências em que se estudou o processo de desaminação da DA nos tecidos renais de Rato não são, no entanto, facilmente extrapoláveis para o rim humano. De facto, a actividade de MAO é significativamente mais elevada no rim humano do que no de Rato (cap. IIA). Por outro lado, a proporção relativa entre as duas formas da enzima, tipos A e B, é diferente nas duas espécies; assim, enquanto a MAO do tipo A é a forma quantitativamente mais importante no rim de Rato, a actividade da MAO-B assume, no rim humano, uma dimensão equiparável à da MAO-A (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992).

Pelos motivos referidos acima, no presente capítulo procedemos ao estudo da influência da inibição da MAO, selectiva e não selectiva, sobre o efluxo da DA e do DOPAC recém-formados, em fatias de córtex renal humano e de Rato.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais e colheita dos tecidos

2.1.1. Rim humano

Os tecidos renais humanos foram obtidos como descrito no capítulo IIA.

2.1.2. Rim de Rato

Os tecidos renais de Rato foram obtidos como descrito no capítulo IIIA (estudos *in vitro*).

2.2. Incubação dos tecidos

As fatias de córtex renal humano e de Rato foram pré-incubadas durante 30 minutos, em tubos de vidro contendo 2 ml de uma solução de Krebs. Subsequentemente, os tecidos renais foram incubados durante 15 minutos em 2 ml de solução de Krebs, à qual se adicionou previamente L-DOPA (100 μ M). A pré-incubação e a incubação dos tecidos foram efectuadas em ambiente aquecido (37°C) e gaseificado (95% O₂ e 5% CO₂), sob agitação constante. Após a incubação, os tecidos foram transferidos para câmaras de perfusão individuais.

2.3. Perfusão dos tecidos

O protocolo experimental utilizado na perfusão dos tecidos reproduziu globalmente o descrito no capítulo IIIA, para os estudos *in vitro*.

A solução de Krebs utilizada na pré-incubação, na incubação e na perfusão dos tecidos tinha uma composição idêntica à utilizada nos estudos de perfusão descritos nos capítulos anteriores.

Nas experiências em que foi testado o efeito da inibição da MAO sobre o efluxo da DA formada nos tecidos renais humanos e de Rato, adicionou-se um inibidor da MAO não selectivo (pargilina; 100 μ M), um inibidor selectivo da MAO-A (RO 41-1049; 250 nM) ou um inibidor selectivo da MAO-B (RO 19-6327; 250 nM) à solução de Krebs, durante a perfusão dos tecidos.

Numa série de experiências, os tecidos renais de Rato foram perfundidos na

presença de um inibidor da DAAA (benserazida; 50 μM), com o objectivo de impedir a síntese da DA durante o período de perfusão. Nessa série de estudos, foi também avaliado o efeito da pargilina, do RO 41-1049 e do RO 19-6327, nas mesmas concentrações referidas anteriormente.

No final das perfusões, as fatias de córtex renal foram retiradas das câmaras, secas em papel de filtro e introduzidas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M). As amostras dos líquidos de perfusão e as fatias de córtex renal foram mantidas a 4°C até à quantificação da DA e do DOPAC, geralmente dentro de 48 horas.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da DA e do DOPAC nos tecidos renais e nas amostras do líquido de perfusão foi efectuada por meio de HPLC-ECD, como descrito nos capítulos anteriores. Os limites inferiores de detecção da DA e do DOPAC oscilaram entre 250 e 650 fmol/50 μl .

2.5. Análise estatística

Nos estudos descritos neste capítulo, o efluxo da DA e do DOPAC não evidenciou um declínio monofásico. Por essa razão, não se procedeu à análise cinética do efluxo da DA e do DOPAC. Apresentam-se os valores relativos às médias $\pm$ EPM relativas a um número n de experiências por grupo. As diferenças entre duas médias foram avaliadas pelo teste t de Student para valores não emparelhados; a avaliação do significado da diferença entre um valor de controlo e vários grupos de experiências foi efectuada pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.6. Fármacos utilizados

A benserazida foi gentilmente oferecida pelo Prof. Mosé da Prada (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça). Os restantes fármacos utilizados neste capítulo foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

3.1. Rim humano

Como se pode verificar na tabela 1, os teores da DA e do DOPAC nos tecidos de córtex renal humano incubados com 100 μ M de L-DOPA e perfundidos na presença de pargilina, do RO 41-1049 e do RO 19-6327, não foram significativamente diferentes dos observados na situação de controlo. A relação DOPAC/DA nos tecidos, no final das perfusões efectuadas sob condições de inibição selectiva e não selectiva da MAO, não foi também diferente da observada no controlo (tabela 1).

	DA (nmol/g)	DOPAC (nmol/g)	DOPAC/DA	n
Controlo	1,33 $\pm$ 0,42	2,12 $\pm$ 0,64	2,07 $\pm$ 0,70	6
Pargilina	2,67 $\pm$ 0,61	3,30 $\pm$ 1,32	1,50 $\pm$ 0,80	4
Ro 41-1049	1,74 $\pm$ 0,39	2,65 $\pm$ 1,13	1,43 $\pm$ 0,64	4
Ro 19-6327	1,53 $\pm$ 0,29	2,89 $\pm$ 1,00	1,73 $\pm$ 0,52	4

Tabela 1. Acumulação (em nmol/g) da DA e do DOPAC e relação DOPAC/DA nos tecidos de córtex renal humano, no final das perfusões efectuadas em condições de controlo e na presença de 100 μ M de pargilina, 250 nM de RO 41-1049 e 250 nM de RO 19-6327. Cada valor representa a média $\pm$ EPM relativa a um número n de experiências.

Os níveis da DA e do DOPAC no efluente dos tecidos renais humanos baixaram progressivamente ao longo da perfusão (figura 1). Em condições de controlo, o efluxo da DA baixou de 0,37 $\pm$ 0,09 nmol/g/10 minutos, no primeiro período de colheita, para 0,1 $\pm$ 0,03 nmol/g/10 minutos, no último, e o efluxo do DOPAC baixou de 3,21 $\pm$ 0,55 nmol/g/10 minutos, no primeiro período de colheita, para 0,72 $\pm$ 0,25 nmol/g/10 minutos, no último. Nestas condições, a relação DOPAC/DA manteve-se estável ao longo da perfusão (de 14,78 $\pm$ 4,14, no primeiro período, para 10,64 $\pm$ 3,40, no último), em valores cerca de seis vezes mais elevados do que os verificados nos tecidos (figura 2). A perfusão dos tecidos renais na presença

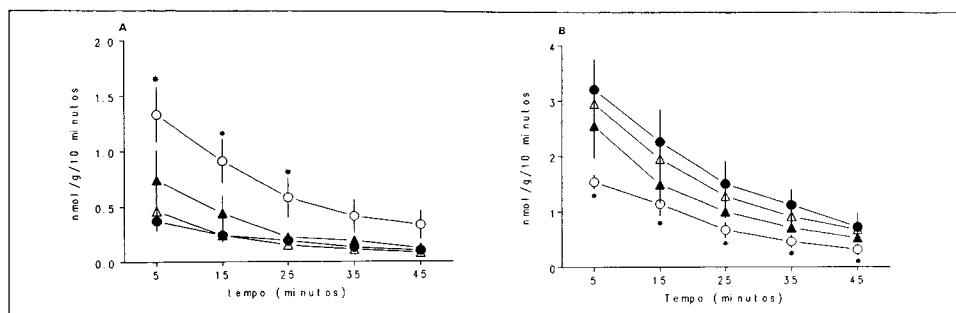


Figura 1. Níveis (em nmol/g/10 min) de (A) DA e (B) DOPAC no efluente das fatias de córtex renal humano durante as perfusões efectuadas em condições de controlo (●), na presença de 100 µM de pargilina (○), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (▲) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (△). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

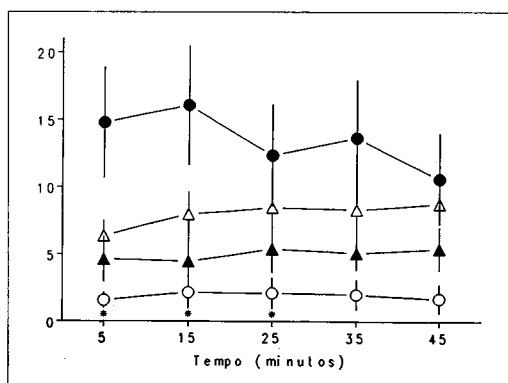


Figura 2. Relação DOPAC/DA no efluente de fatias de córtex renal humano incubadas com 100 µM de L-DOPA e perfundidas em condições de controlo (●), na presença de 100 µM de pargilina (○), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (▲) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (△). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

de 100 µM de pargilina condicionou uma redução de 80 a 100% no efluxo do DOPAC e um incremento de 300% no efluxo da DA. Nestas condições, a relação DOPAC/DA no efluente dos tecidos foi significativamente reduzida em relação à

situação de controlo, mas permaneceu estável ao longo da perfusão (de $1,58 \pm 0,59$ para $1,70 \pm 1,07$); é interessante verificar que os valores da relação DOPAC/DA no efluente dos tecidos perfundidos na presença da pargilina foram semelhantes aos observados nos tecidos, no final da perfusão (figura 2 e tabela 1).

O inibidor selectivo da MAO-A (RO 41-1049) reduziu o efluxo do DOPAC (20 a 35%) e aumentou o efluxo da DA em 50 a 100%; nestas condições, a proporção DOPAC/DA ao longo da perfusão (de $4,62 \pm 1,69$ para $5,42 \pm 1,61$) foi inferior à verificada no grupo de controlo, mas superior à observada no efluente dos tecidos perfundidos na presença da pargilina (figura 2).

A perfusão dos tecidos renais com o inibidor selectivo da MAO-B reduziu em 10 a 20% o efluxo do DOPAC, mas não modificou o efluxo da DA (figura 1); nestas condições, a relação DOPAC/DA no líquido de perfusão foi inferior à verificada no grupo de controlo, mas mais elevada do que a observada quer com a pargilina quer com o RO 41-1049 (figura 2); estas diferenças não atingiram, no entanto, significado estatístico.

3.2. Rim de Rato

Como se pode verificar na tabela 2, os níveis de DA e DOPAC nos tecidos de córtex renal de Rato perfundidos na presença de pargilina, RO 41-1049 e RO 19-6327 não foram significativamente diferentes dos observados no controlo; contudo, a relação DOPAC/DA nos tecidos perfundidos com o RO 41-1049 foi inferior à do controlo.

Os teores da DA e do DOPAC no efluente dos tecidos renais baixaram progressivamente ao longo da perfusão (figura 3). Em condições de controlo, o efluxo da DA baixou de $0,84 \pm 0,10$ nmol/g/10 minutos, no primeiro período de colheita, para $0,16 \pm 0,03$ nmol/g/10 minutos, no último, e o efluxo do DOPAC baixou de $0,80 \pm 0,10$ nmol/g/10 minutos, no primeiro período de colheita, para $0,24 \pm 0,02$ nmol/g/10 minutos, no último. Nestas condições experimentais, o declínio do DOPAC ao longo da perfusão não foi paralelo ao da DA; este fenómeno traduziu-se por um aumento progressivo da relação DOPAC/DA ao longo da perfusão (de $0,95 \pm 0,07$ para $1,77 \pm 0,25$) (figura 4). Nestas condições, a relação DOPAC/DA no líquido de perfusão foi 3 a 5 vezes mais elevada do que a observada nos tecidos.

A perfusão dos tecidos renais na presença de $100 \mu\text{M}$ de pargilina condicionou uma redução de 45 a 54% no efluxo do DOPAC e um aumento de 102 a 158% no efluxo da DA. A relação DOPAC/DA no efluente dos tecidos perfundidos na

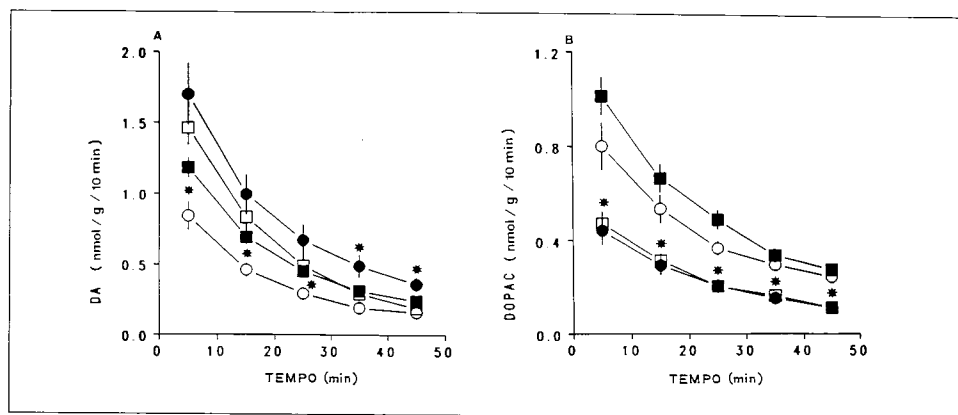


Figura 3. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) DA e do (B) DOPAC no efluente das fatias de córtex renal de Rato perfundidas em condições de controlo (○), na presença de 100 μ M de pargilina (●), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (◻) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (■). Cada ponto representa a média de 7 a 8 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

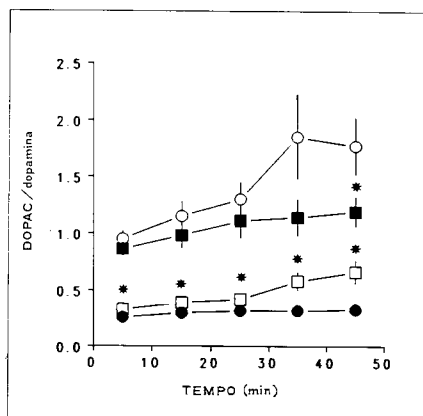


Figura 4. Relação DOPAC/DA no efluente das fatias de córtex renal de Rato perfundidas em condições de controlo (○), na presença de 100 μ M de pargilina (●), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (◻) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (■). Cada ponto representa a média de 7 a 8 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

	DA	DOPAC	DOPAC/DA	n
	(nmol/g)	(nmol/g)		
Controlo	3,39±0,39	1,05±0,15	0,31±0,02	8
Pargilina	3,85±0,43	1,12±0,23	0,27±0,03	7
RO 41-1049	3,67±0,53	0,71±0,10	0,20±0,02**	8
RO 19-6327	4,07±0,38	1,37±0,17	0,33±0,02	7

Tabela 2. Acumulação (em nmol/g) da DA e do DOPAC e relação DOPAC/DA nos tecidos de córtex renal de Rato, no final das perfusões efectuadas em condições de controlo e na presença de 100 μ M de pargilina, 250 nM de RO 41-1049 e 250 nM de RO 19-6327. Cada valor representa a média $\pm$ EPM relativa a um número n de experiências. Significativamente diferente em comparação com o valor correspondente observado no controlo (** $P < 0,01$).

presença da pargilina permaneceu estável ao longo da perfusão e, à semelhança do que se observou com tecidos renais humanos, baixou para valores sobreponíveis aos verificados nos tecidos (tabela 2).

O inibidor selectivo da MAO-A (RO 41-1049) condicionou uma redução significativa no efluxo do DOPAC (41 a 54%) e um aumento no efluxo da DA (19 a 80%) (figura 3). Nestas condições, a proporção DOPAC/DA ao longo da perfusão foi inferior à observada no grupo de controlo ($P < 0,01$) mas, ao contrário do que se verificou com a pargilina, aumentou de $0,33 \pm 0,04$ para $0,66 \pm 0,10$ ($P < 0,01$) (figura 4).

A perfusão dos tecidos renais com o inibidor selectivo da MAO-B (RO 19-6327) não modificou o efluxo do DOPAC, mas aumentou o efluxo da DA (40 a 60%) (figura 3); nestas condições, a relação DOPAC/DA no líquido de perfusão foi semelhante à observada no grupo de controlo (figura 4). O incremento verificado na relação DOPAC/DA durante os estudos efectuados na presença do RO 19-6327 (de $0,86 \pm 0,06$ para $1,19 \pm 0,13$) foi inferior, no entanto, ao observado na situação de controlo.

A figura 5 ilustra o efluxo da DA e do DOPAC na série de experiências em que os tecidos renais de Rato foram perfundidos na presença de benserazida. Em condições de controlo, os níveis de DA e DOPAC no efluente não foram modificados pela presença do inibidor da DAAA. Contudo, a proporção DOPAC/DA no

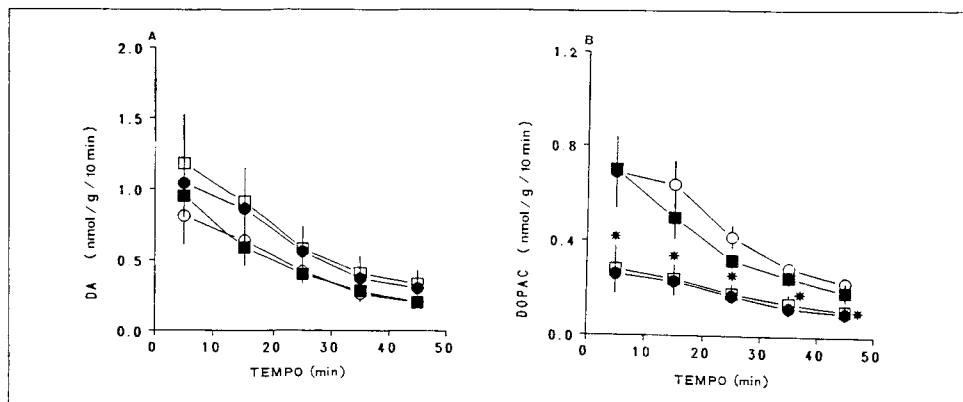


Figura 5. Níveis (em nmol/g/10 min) da (A) DA e do (B) DOPAC, no efluente das fatias de córtex renal perifundidas na presença de 50 μ M de benserazida. Os resultados dizem respeito a observações em condições de controlo (○), na presença de 100 μ M de pargilina (●), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (◻) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (■). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

efluente dos tecidos perifundidos na presença de benserazida ($0,77 \pm 0,12$ para $1,01 \pm 0,11$) não evidenciou a mesma tendência para aumentar ao longo do período de colheitas (figura 6). Nestas condições experimentais, a pargilina reduziu em 60% o efluxo do DOPAC, aumentou ligeiramente o efluxo da DA (20 a 30%; figura 5) e reduziu a relação DOPAC/DA no líquido de perfusão para valores sobreponíveis aos observados nos estudos efectuados sem benserazida (figura 6).

Na presença do inibidor da DAAA, as modificações no efluxo da DA e do DOPAC durante a inibição selectiva da MAO-A foram semelhantes às verificadas com a pargilina (figura 5); nestas condições, não se verificou o incremento da proporção DOPAC/DA ao longo da perfusão que se observava nos estudos efectuados sem a presença do inibidor da DAAA (figura 6). Como se pode observar na figura 5, a inibição selectiva da MAO-B na presença de benserazida não foi acompanhada de modificações no efluxo da DA ou do DOPAC; nestas condições, a relação DOPAC/DA no efluente dos tecidos foi em tudo semelhante à observada no grupo de controlo (figura 6).

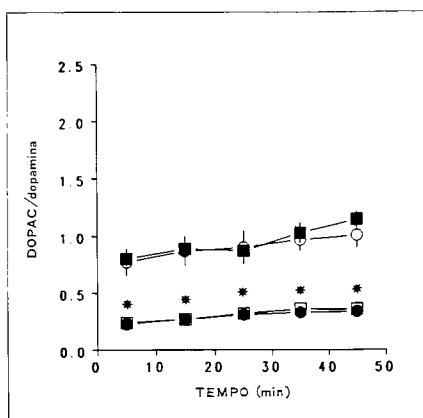


Figura 6. Relação DOPAC/DA no efluente de fatias de córtex renal de Rato perfundidas na presença de 50 µM de benserazida. Os resultados dizem respeito a observações em condições de controlo (○), na presença de 100 µM de pargilina (●), na presença de 250 nM de RO 41-1049 (△) e na presença de 250 nM de RO 19-6327 (■). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes (* $P < 0,05$).

4. Comentários

Os resultados destes estudos estão de acordo com os dos capítulos anteriores e com as observações de outros autores (Stöker e Hempel, 1976; Kopin, 1985; Fernandes e col., 1991) ao evidenciar que os tecidos renais humanos e de Rato têm uma grande capacidade para sintetizar DA a partir da L-DOPA e que a MAO desempenha, nas duas espécies, um papel importante na inactivação da amina recém-formada. De harmonia com os resultados dos capítulos anteriores verificámos que a DA é intensamente desaminada durante o processo de efluxo; este fenómeno foi observado nas duas séries de experiências, mas mostrou ser mais intenso nos estudos com rim humano, o que está de acordo com a presença de uma actividade desaminativa mais elevada no rim humano, em comparação com a existente no rim de Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992; cap. IIA). Os resultados das experiências efectuadas com rim de Rato revelaram que a MAO-A é a forma mais importante da enzima envolvida na inactivação desaminativa da DA durante o processo de efluxo. No rim humano, por outro lado, a MAO-B parece assumir uma importância maior do que no Rato na desaminação renal da DA. Os

resultados observados sugerem ainda que as duas formas da enzima actuam em compartimentos distintos.

Verificou-se que a relação DOPAC/DA no meio de perfusão foi significativamente mais elevada do que a observada nos tecidos, quer nos estudos com rim humano (14,8 vs 2,1) quer nos com rim de Rato (0,95 vs 0,30).

A inibição não selectiva da MAO, pela pargilina, condicionou um aumento no efluxo da DA e uma redução no efluxo do DOPAC, quer no rim humano quer no de Rato. Contudo, a pargilina não modificou a acumulação da DA ou do DOPAC nos tecidos. Estes resultados sugerem que, nestas condições experimentais, a pargilina inibiu sobretudo a desaminação da DA no compartimento que a amina atravessa e onde é inactivada durante o processo de efluxo. O facto de se ter verificado na presença da pargilina uma redução na relação DOPAC/DA, no meio de perfusão, para valores idênticos aos observados nos tecidos, vem reforçar esta conclusão.

Nos estudos com rim de Rato, as modificações produzidas pelo inibidor selectivo da MAO-A no efluxo da DA e do DOPAC foram semelhantes às observadas com a pargilina (redução sobreponível no efluxo do DOPAC e incremento, embora menos acentuado, no efluxo da DA). O efeito do RO 41-1049 na relação DOPAC/DA no líquido de perfusão foi também semelhante ao verificado com a pargilina; estes resultados sugerem que, no Rato, a MAO-A é a forma da enzima responsável pela desaminação da DA no compartimento celular que a amina cruza antes de atingir o meio de perfusão. O facto de se ter verificado que a inibição selectiva da MAO-B não condicionou, no Rato, quaisquer modificações no efluxo do DOPAC, apesar de ter produzido um incremento ligeiro no efluxo da DA, está de acordo com esta conclusão.

Ao contrário da pargilina, o RO 41-1049 não aboliu o aumento progressivo da relação DOPAC/DA ao longo da perfusão; este achado sugere a possibilidade de a MAO-B ter sido a responsável pelo incremento na desaminação verificado durante os últimos períodos de colheita no controlo e em condições de inibição selectiva da MAO-A. Essa sugestão foi reforçada ao verificar-se que a inibição selectiva da MAO-B produziu uma atenuação no incremento da relação DOPAC/DA ao longo da perfusão.

Nos estudos com rim humano os efeitos da inibição selectiva da MAO-A sobre o efluxo da DA e do DOPAC e sobre a relação DOPAC/DA no meio de perfusão foram menos acentuados do que os observados com a pargilina. Embora não seja possível, pela análise dos resultados destes estudos, retirar conclusões definitivas acerca da importância relativa das duas formas de MAO na metabolização da DA

no rim humano, é interessante termos verificado que as modificações condicionadas pela inibição selectiva da MAO-B, sobre o efluxo da DA e do DOPAC e sobre a relação DOPAC/DA no meio de perfusão, foram mais acentuadas no Homem do que no Rato, enquanto que, inversamente, as modificações respectivas condicionadas pela inibição selectiva da MAO-A foram mais acentuadas no Rato do que no Homem. Estes resultados poderiam ser justificados pelo facto de as concentrações utilizadas dos inibidores selectivos da MAO terem sido insuficientes para inibir as actividades das isoenzimas que, no rim humano, são mais elevadas do que no Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992); esta hipótese é improvável, no entanto, atendendo a que as concentrações utilizadas dos inibidores selectivos da MAO mostraram impedir completamente a formação de DOPAC em experiências de incubação com fatias de rim. Outra hipótese alternativa de explicação para este fenómeno favorece a possibilidade de, no rim humano, as duas formas de MAO contribuírem de forma importante para o processo de inactivação desaminativa da DA recém-formada, de tal forma que a inibição selectiva de uma delas permite evidenciar uma potenciação dos efeitos da outra. Esta análise, que atribui às duas formas de MAO um papel de relevo na desaminação da DA no rim humano, está de acordo com a interpretação dos resultados dos estudos que avaliaram a influência do sódio na desaminação da DA, no rim humano e de Rato (ver cap. IIC).

Nos estudos apresentados neste capítulo verificámos que quer o efluxo da DA quer o do DOPAC tiveram origem num sistema multicompartimental. Colocou-se então a hipótese de os níveis da DA no efluente terem duas proveniências distintas: (1) na DA formada durante a incubação dos tecidos e (2) na DA formada ao longo da perfusão, a partir da descarboxilação da L-DOPA ainda presente no tecido. De acordo com essa hipótese, especulámos acerca de efeitos preferenciais de uma ou outra forma de MAO na desaminação da fracção de DA de síntese mais antiga (formada durante a incubação) e de síntese mais recente (formada durante a perfusão). Para procurar responder a estas questões, realizámos estudos em que procedemos à perfusão de tecidos renais de Rato sob condições de inibição da DAAA, para impedir a formação da DA durante a perfusão. Nesses estudos verificaram-se, como mais relevantes, os seguintes achados: (1) uma anulação do aumento progressivo da relação DOPAC/DA ao longo da perfusão; (2) uma redução no efluxo da DA durante a inibição da MAO, selectiva e não selectiva. Estes resultados revelam que a quase totalidade do efluxo da DA nos tecidos de rim de Rato provém da amina formada durante a incubação das fatias e mostram também que a MAO-A é a forma da enzima responsável pela sua

desaminação. Estes resultados sugerem ainda que, nestas condições experimentais, a DA formada durante a perfusão dos tecidos tem um acesso mais facilitado a ambas as formas de MAO, nomeadamente à MAO-B.

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo reforçam as conclusões dos capítulos anteriores ao evidenciar que uma fracção importante da DA recém-formada, no rim humano e de Rato, é fonte constante para desaminação em DOPAC durante o processo de efluxo do compartimento onde a sua síntese se verifica. Os resultados destes trabalhos mostram também que, no Rato, a MAO do tipo A é a forma mais importante da enzima envolvida nesse processo, embora a amina possa ter um acesso limitado à MAO-B. Por outro lado, a MAO-B parece assumir, no rim humano, uma importância maior na desaminação da DA do que no Rato.

Finalmente, os resultados destes estudos apoiam a noção de que as duas formas de MAO actuam em compartimentos distintos.

IV - SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL E MODULAÇÃO DA REABSORÇÃO DE SÓDIO DURANTE A CARGA SALINA

1. Introdução

Admite-se que o aumento na excreção urinária de DA que acompanha a carga salina resulta de dois factores fundamentais: (1) de um aumento na libertação da L-DOPA circulante a partir dos nervos simpáticos (Grossman e col., 1990), com um aumento subsequente no aporte do precursor da DA às células tubulares renais (Goldstein e col., 1989a; Grossman e col., 1991) e (2) de um aumento na actividade da DAAA presente no citoplasma dessas células (Hayashi e col, 1990; Seri e col., 1990; Soares-da-Silva, 1993a). Contudo, desconhece-se ainda a natureza dos sinais que durante a carga salina são responsáveis quer pela libertação da L-DOPA em circulação quer pelo aumento na actividade da DAAA renal.

Apesar dos elementos disponíveis favorecerem um papel da DA de síntese renal na regulação da reabsorção tubular de sódio, essa opinião não é partilhada por todos os autores. De facto, foi descrita a ausência de modificações na excreção urinária de DA durante a carga salina e foi igualmente negada uma resposta antinatriurética subsequente à inibição da DAAA, durante a carga salina (Mülhbauer e Osswald, 1992; 1993). É possível que algumas das discrepâncias em relação a este assunto possam resultar de diferenças ao nível da espécie animal utilizada, do grau de sobrecarga salina condicionado, do período de tempo permitido para o seu estabelecimento ou do tipo de alimentação a que os animais são sujeitos (Mülhbauer e Osswald, 1992). Por outro lado, a avaliação da excreção urinária de DA pode não reproduzir com fidelidade a dimensão do processo de formação renal da amina. De facto, como se verificou nos capítulos anteriores, a DA de síntese renal é significativamente metabolizada, sobretudo por desaminação, mas também por metilação, desconhecendo-se ainda, contudo, em que medida os metabolitos da DA eliminados na urina resultam da metabolização da amina formada nos tecidos renais.

O papel da DA endógena na regulação do transporte tubular de sódio não deve ser dissociado do de outros mediadores envolvidos na modulação da

natriurese. Neste contexto, assume particular interesse o estudo da forma como se articula a acção da 5-HT de síntese renal com a da DA endógena. De facto, a 5-HT é formada a partir do L-5-hidroxitriptofano (L-5-HTP) e partilha com a DA o mesmo compartimento de síntese (células dos túbulos contornados proximais), a mesma enzima responsável pela sua formação (DAAA) e a mesma enzima responsável pela metabolização desaminativa (MAO); contudo, a 5-HT exerce efeitos antagónicos dos da DA, quer sobre a hemodinâmica renal quer sobre a reabsorção tubular de sódio (Itskovitz e col., 1988).

Para procurar dar resposta a algumas destas questões, no presente capítulo procedemos à avaliação da excreção urinária diária de DA e dos seus metabolitos desaminado (DOPAC), metilado (3-MT) e desaminado+metilado (HVA), durante um período de quatro dias de dieta normosalina (NS), ao que se seguiu um período de nove dias de dieta hipersalina (HS); avaliou-se ainda a relação existente entre a excreção urinária destes compostos e a excreção urinária de sódio. Para estudar a actividade do sistema 5-hidroxitriptaminérgico renal, determinou-se concomitantemente a excreção urinária de 5-HT e do seu metabolito desaminado, o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Finalmente, para avaliar a actividade do sistema nervoso simpático e da medula supra-renal, determinou-se a excreção urinária diária de, respectivamente, NA e AD.

2. Material e métodos

2.1. Espécies animais

Nestes trabalhos foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 dias de idade e 180 a 220 gramas de peso. Os animais eram normotensos e foram seleccionados depois de um período de estabilização de 7 dias, em que se procedeu à sua adaptação às condições de determinação da pressão arterial.

2.2. Colheitas de urina e determinação da pressão arterial

Depois do período de aclimatização, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas sob condições ambientais controladas (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão, à temperatura de 24°C) e avaliou-se diariamente o consumo de líquidos e de comida.

Os animais receberam água simples durante um período inicial de quatro dias (dieta normosalina, NS); nos 9 dias subsequentes adicionou-se cloreto de sódio (1%) à água de beber (dieta hipersalina, HS). Durante o estudo, a comida (contendo sódio, potássio e proteínas na proporção de, respectivamente, 0,1%, 0,75% e 17%) foi fornecida aos animais, sem restrições. A ingestão diária de sódio durante a dieta NS e HS foi de, respectivamente, 0,5 e 5 mmol/100g de peso corporal.

Efectuaram-se colheitas de urina de 24 horas em recipientes contendo 1 ml de HCl (6 M), para impedir a decomposição espontânea das monoaminas e dos seus metabolitos.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas diariamente na artéria da cauda, por intermédio de um detector fotoeléctrico (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha); cada medição resultou da média de três determinações.

2.3. Colheita de sangue e de tecidos

No final do estudo, os ratos foram anestesiados com 60 mg/kg de pentobarbital sódico por via i.p., os rins foram expostos através de uma incisão abdominal na linha média e colheu-se o sangue da veia renal. Subsequentemente, removeram-se os rins e prepararam-se fatias de córtex renal, as quais foram pesadas e colocadas em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M), sendo depois congeladas até à determinação das catecolaminas. A colheita do sangue foi efectuada em tubos introduzidos em gelo e contendo heparina, para a determinação da concentração plasmática das catecolaminas, sódio, potássio, creatinina, osmolalidade e ureia, ou contendo EDTA, para a determinação da actividade plasmática da renina (ARP) e da concentração plasmática da aldosterona (CAP).

O sangue e os tecidos renais dos ratos em dieta NS foram obtidos a partir de outro grupo de animais, depois de um período de quatro dias em regime NS, como acima descrito.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, das monoaminas (DA, NA, AD, e 5-HT) e dos metabolitos das aminas (3,4-diidroxifenilglicol[DOPEG], DOPAC, 3-MT, HVA e 5-HIAA) na urina, no plasma e nos tecidos renais foi efectuada por HPLC-ECD. Alíquotas de 0,5 ml da urina acidificada ou do plasma e alíquotas com 1,5 ml do

ácido perclórico onde os tecidos estiveram introduzidos, foram colocadas em frascos cónicos de vidro contendo 50 mg de alumina e o pH imediatamente ajustado a 8,6 através da adição de tampão Tris. As catecolaminas adsorvidas foram depois extraídas da alumina, como descrito no cap. IIA.

Para a quantificação da excreção urinária da 3-MT, HVA, 5-HT e 5-HIAA diluíram-se 50 µl de urina com ácido perclórico (0,2 M) até perfazer 500 µl, filtraram-se as amostras com microfiltros Millipore (MF1) e injectaram-se 50 µl do filtrado directamente no cromatógrafo. Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA, AD, NA, 5-HT, DOPEG, DOPAC, 3-MT, HVA e 5-HIAA oscilaram entre 350 e 1000 fmol/50 µl.

As determinações do Na⁺ e do K⁺ na urina e no plasma foram efectuadas através de um fotómetro de chama (modelo FML3), ligado a diluidor (modelo A 6241) (Radiometer, Copenhaga, Dinamarca) e a osmolalidade na urina e no plasma foi determinada por intermédio de um osmómetro (Advanced Instruments, Inc., MA, USA, modelo 3MO). A determinação dos teores plasmáticos e urinários de creatinina foi efectuada por fotometria (Beckman analyser II). As determinações da ARP e da CAP foram efectuadas por radioimunoaferição (RIA) com *kits* RENTCK e ALDOCTK-2 (Sorin Biomedica, Saluggia, Itália), respectivamente.

2.5. Análise estatística

Os resultados são apresentados em médias $\pm$ EPM para o número indicado de determinações. A análise dos resultados dentro de cada grupo foi efectuada através do teste de Friedman, por comparação entre a totalidade dos valores obtidos com os correspondentes à situação basal, ou por comparação entre valores de interesse com os correspondentes do controlo. A diferença entre duas médias foi avaliada pelo teste *t* de Student para valores não emparelhados. Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.6. Fármacos utilizados

O cloridrato de AD, ácido homovanílico (HVA), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), sulfato de 5-hidroxitriptamina (5-HT) e 3-MT foram adquiridos na Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A.). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

Na tabela 1 apresentam-se os valores relativos ao peso corporal, à osmolalidade plasmática e às concentrações da L-DOPA, NA, AD, DOPEG, sódio, potássio, ureia, creatinina, ARP e CAP no sangue colhido da veia renal dos ratos tratados com dieta NS e HS. Não se verificaram diferenças significativas entre o peso corporal dos animais em regime NS e HS. As concentrações plasmáticas da L-DOPA, NA, AD, DOPEG, sódio, creatinina e ureia nos ratos em dieta HS, não eram também diferentes das observadas nos animais em dieta NS. A osmolalidade plasmática mostrou ser também semelhante nos dois grupos de animais. A

	Dieta NS	Dieta HS
Peso corporal (g)	304±10	290±7
L-DOPA (pmol/ml)	3,9±0,2	3,7±0,2
NA (pmol/ml)	2,4±0,3	2,2±0,2
AD (pmol/ml)	1,3±0,1	1,3±0,2
DOPEG (pmol/ml)	5,0±0,3	5,6±0,7
Na ⁺ (mM)	140±4	140±1
K ⁺ (mM)	4,7±0,1	3,6±0,2**
Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O)	301±2	304±3
Ureia (mg/dl)	20,6±1,9	18,4±3
Creatinina (mg/dl)	0,30±0,04	0,26±0,03
ARP (ng/ml/h)	28±2	14±1**
CAP (pg/ml)	290±40	132±18*

Tabela 1. *Peso corporal, osmolalidade plasmática, teores plasmáticos de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), noradrenalina (NA), adrenalina (AD), 3,4-diidroxifenilglicol (DOPEG), Na⁺, K⁺, ureia, creatinina, actividade de renina plasmática (ARP) e concentração de aldosterona plasmática (CAP) de ratos, no final de um período de dieta normosalina (NS) e no final de um período de 9 dias de dieta hipersalina (HS). Os valores apresentados são médias ± EPM correspondentes a um número de 5 determinações por grupo. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes, utilizando o teste t de Student para valores não emparelhados (*P<0,05; **P<0,01).*

concentração plasmática de potássio, a ARP e a CAP eram, contudo, significativamente mais reduzidas nos ratos em dieta HS do que nos animais em regime NS.

Os valores da pressão arterial e da frequência cardíaca ao longo do período de regime HS foram semelhantes aos observados durante o período de regime NS (figura 1).

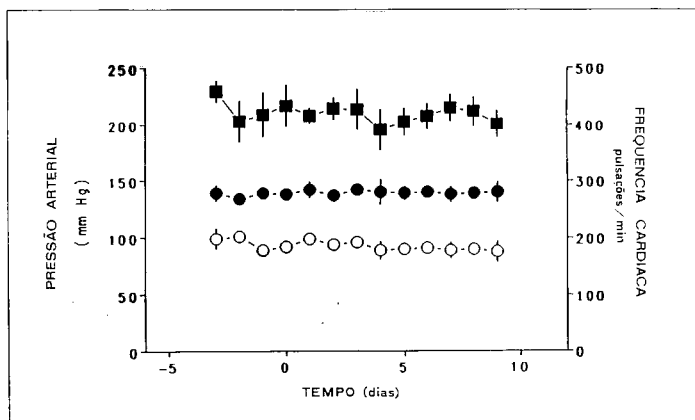


Figura 1. Evolução da pressão arterial sistólica (●), diastólica (○) e da frequência cardíaca (■) durante o período basal (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; as linhas verticais mostram o EPM.

A excreção urinária diária de sódio, potássio e creatinina durante o período de dieta NS foi em média de, respectivamente, $5,9 \pm 0,3$, $12,1 \pm 0,5$ mmol/kg/dia e $29,6 \pm 1,3$ mg/kg/dia e não variou ao longo desse período (figura 2). A excreção urinária de potássio e creatinina não variou significativamente durante o período de dieta HS; pelo contrário, a excreção urinária diária de sódio aumentou cerca de seis vezes durante o período de dieta HS; a excreção de sódio, potássio e creatinina durante o período de 9 dias de dieta HS foi em média de, respectivamente, $39,3 \pm 1,6$, $11,6 \pm 0,3$ mmol/kg/dia e $32,3 \pm 1,4$ mg/kg/dia.

Como se pode verificar na figura 2, a osmolalidade urinária, que durante o período de dieta NS foi de 1112 ± 112 mOsm/kg H_2O , não se alterou durante o período de dieta HS (985 ± 33 mOsm/kg H_2O). Contudo, o volume médio de urina durante o período de 4 dias de dieta NS foi de 85 ± 9 ml/kg/dia, aumentou significativamente (80 a 120%; $P < 0,01$) durante o período de 9 dias de dieta HS (158 ± 9 ml/kg/dia) (figura 3). A ingestão diária de líquidos foi em média de 145 ± 9

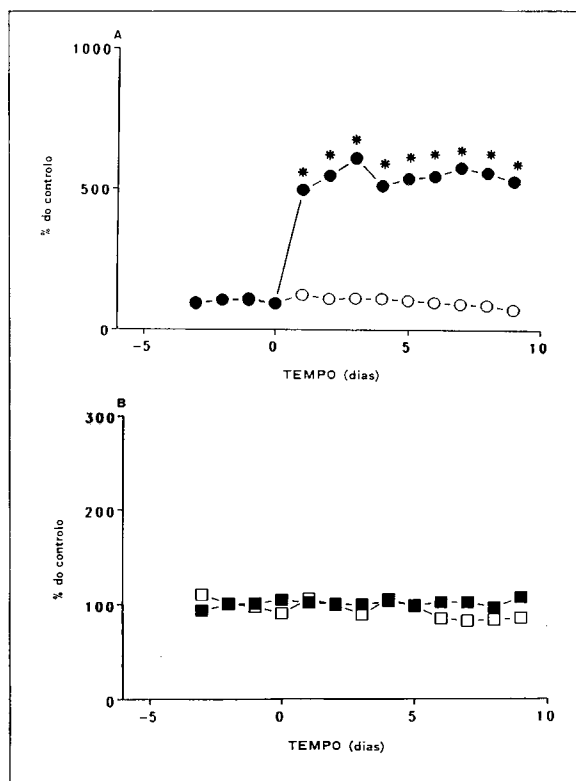


Figura 2. Evolução da: (A) excreção urinária de sódio (●) e potássio (○); (B) excreção urinária de creatinina (■) e osmolalidade urinária (□), durante o período de ingestão NS (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Os resultados são apresentados como percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; os valores de EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,01$).

ml/kg/dia durante o período de 4 dias de dieta NS; durante o período de 9 dias de dieta HS a ingestão diária de líquidos aumentou para 223 ± 5 ml/kg/dia (figura 3). O consumo médio diário de comida durante o período de dieta NS (105 ± 2 g/kg/dia) foi mais elevado ($P < 0,02$) do que o observado durante o período de dieta HS (78 ± 2 g/kg/dia); como se pode observar na figura 3, o declínio verificado no consumo de comida durante o período de dieta HS desenvolveu-se lentamente, mas atingiu

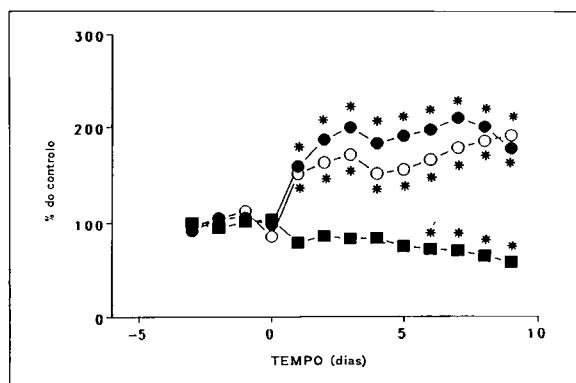


Figura 3. Evolução do volume de urina (●), ingestão de líquidos (○) e consumo de comida (■) durante o período de ingestão NS (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Os resultados são apresentados como percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; os valores do EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,01$).

uma redução de 42% ($P < 0,02$) ao 9º dia do período de tratamento com dieta HS.

Durante os quatro dias de dieta NS a excreção urinária diária de L-DOPA, DA, DOPAC, 3-MT e HVA permaneceu estável com valores médios de, respectivamente, $7,6 \pm 0,4$, 71 ± 5 , 217 ± 22 , 570 ± 90 e 1217 ± 110 nmol/kg/dia (figura 4). Verificou-se um aumento ligeiro na excreção urinária de DA, DOPAC, 3-MT e HVA durante o período de dieta HS, o qual não atingiu, no entanto, significado estatístico; a excreção urinária diária de DA, DOPAC, 3-MT e HVA durante o período de 9 dias de dieta HS foi em média de, respectivamente, 85 ± 2 , 215 ± 9 , 728 ± 8 e 987 ± 45 nmol/kg/dia, evidenciando tendência para baixar nos últimos dias.

Os níveis urinários da L-DOPA foram, pelo contrário, significativamente mais elevados durante o período de 9 dias de dieta HS (11 ± 1 nmol/kg/dia em média), do que no período de dieta NS. O maior incremento na excreção urinária de L-DOPA (93%) foi observado no primeiro dia de dieta HS, verificando-se depois uma redução progressiva, até ao final do estudo.

Durante o período de 4 dias de dieta NS a excreção urinária diária de 5-HT e 5-HIAA foi em média de, respectivamente, 639 ± 91 e 1211 ± 121 nmol/kg/dia; a

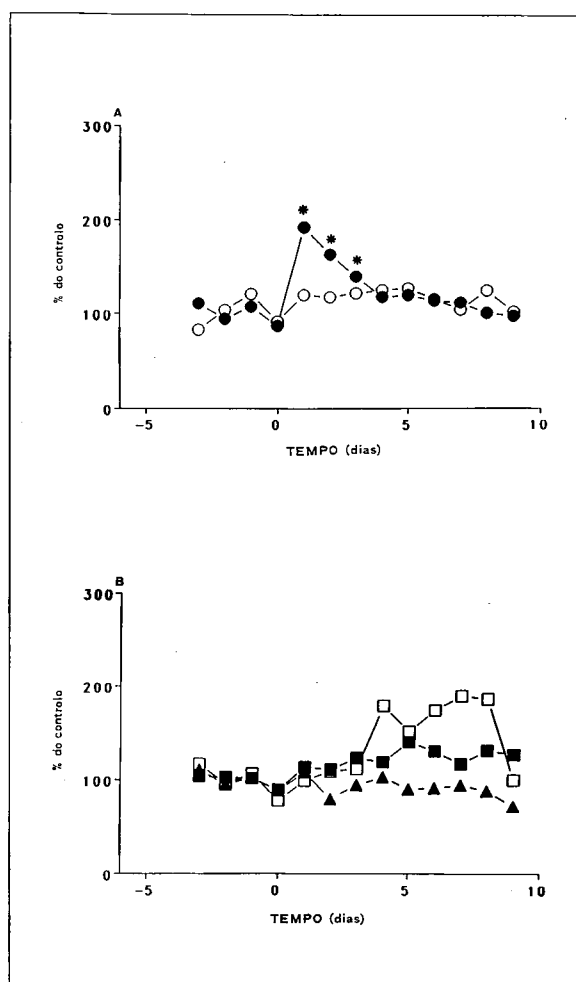


Figura 4. Evolução da excreção urinária de (A) L-DOPA (●) e dopamina (DA; ○); (B) ácido diidroxifenilacético (DOPAC; ■), 3-metoxitiramina (3-MT; □) e ácido homovanílico (HVA; ▲) durante o período de ingestão NS (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Os resultados são apresentados como percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; os valores de EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,01$).

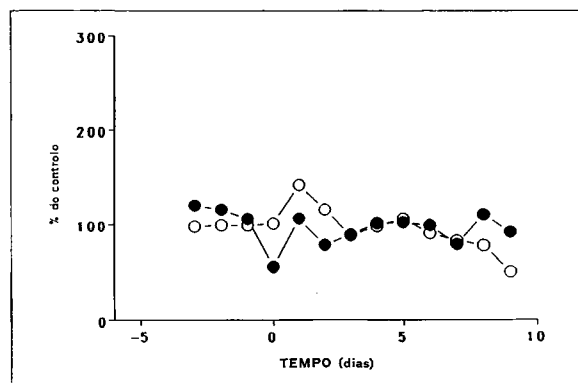


Figura 5. Evolução da excreção urinária de 5-hidroxitriptamina (5-HT; ●) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA; ○) durante o período de ingestão NS (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Os resultados são apresentados como percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; os valores de EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes.

excreção urinária de 5-HT e 5-HIAA durante o período de dieta HS não mostrou ser diferente da observada durante o período de dieta NS (figura 5).

Como se pode observar na figura 6, a excreção urinária de NA durante o período de dieta NS permaneceu estável em valores médios diários de 13 ± 1 nmol/kg/dia; durante os primeiros 5 dias de dieta HS a excreção urinária de NA aumentou (27 a 83%), para baixar depois progressivamente. A excreção urinária diária de AD durante o período de dieta NS permaneceu estável em valores médios de $2,5 \pm 0,4$ nmol/kg/dia; durante o período de dieta HS a excreção urinária da AD aumentou (72 a 146%) para valores médios diários de $5,0 \pm 0,4$ nmol/kg/dia.

O conteúdo em NA dos tecidos renais dos ratos submetidos a um período de tratamento com dieta NS ($0,72 \pm 0,06$ nmol/g) não foi significativamente diferente do observado nos animais tratados com dieta HS ($0,58 \pm 0,05$ nmol/g). Os teores de DA nos tecidos renais dos animais submetidos a uma dieta HS ($0,15 \pm 0,01$ nmol/g) não foram também diferentes dos observados nos ratos submetidos a dieta NS ($0,20 \pm 0,02$ nmol/g).

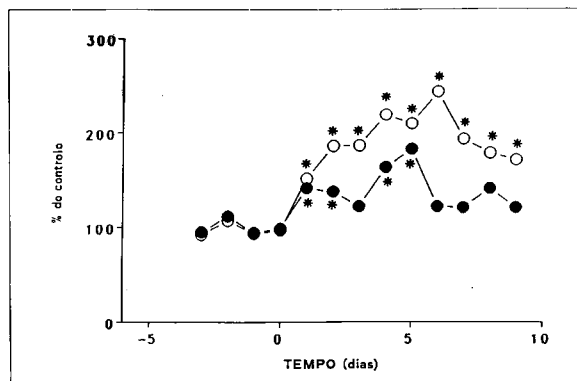


Figura 6. Evolução da excreção urinária de noradrenalina (NA; ●) e adrenalina (AD; ○) durante o período de ingestão NS (do dia -4 até ao dia 0) e durante o período de dieta HS (1% de NaCl na água de beber; do dia 0 até ao dia 9). Os resultados são apresentados como percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações; os valores de EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,01$).

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo revelam que a administração continuada de uma dieta HS não condicionou modificações significativas na excreção urinária de DA ou dos seus metabolitos (DOPAC, 3-MT e HVA) sendo acompanhada, no entanto, por um aumento significativo na excreção urinária de L-DOPA. Por outro lado, a excreção urinária de 5-HT e de 5-HIAA não variou também durante o período de dieta HS. Observou-se um aumento na excreção urinária de NA e de AD durante o período de dieta HS, a traduzir a activação, respectivamente, do sistema nervoso autónomo e da medula supra-renal. Globalmente, os resultados apresentados neste capítulo vêm confirmar os de Mülhbauer e Osswald (1992; 1993), que descreveram a ausência de modificações na excreção urinária de DA em ratos Wistar durante a carga salina e alargam essa observação aos metabolitos da DA, à 5-HT e ao seu metabolito desaminado. A carga salina não foi acompanhada de modificações na pressão arterial ou na frequência cardíaca dos animais. No entanto, verificaram-se reduções signifi-

tivas na ARP e na CAP, em concordância com o que é conhecido da resposta destes mediadores, à carga salina.

Supõe-se que a DA urinária resulta principalmente da descarboxilação da L-DOPA, presente no filtrado tubular ou no sangue que perfunde os capilares peritubulares; fontes adicionais de DA urinária poderão provir dos teores plasmáticos de DA ou da sua libertação a partir de neurónios intra-renais. Contudo, os níveis plasmáticos de DA são demasiado baixos para poderem modificar a excreção urinária da amina (Van Loon, 1983) e a DA com origem em compartimentos neuroniais simpáticos parece não representar mais do que 10 a 15 % da quantidade total da amina eliminada diariamente na urina (Morgunov e Baines, 1981; Hayashi, e col., 1991; cap. IID). Embora a DA formada nas células tubulares renais possa ser transportada pelo bordo basolateral e escapar para a circulação através da veia renal (Vieira-Coelho e col., 1994), supõe-se que os teores da amina eliminada na urina provêm, sobretudo, da que é transportada para o lúmen tubular através do bordo apical. Dois argumentos suportam a noção de que a DA não é significativamente reabsorvida após ser transportada para o lúmen tubular: (1) o bordo apical das células tubulares renais mostrou ser impermeável à DA (Chan, 1976) e (2) a excreção urinária de DA mostrou ser independente do fluxo de urina (Mülhbauer e Osswald, 1992).

Na maioria dos estudos em que foi avaliada a influência do sódio na síntese renal da DA, a excreção urinária da amina foi utilizada como parâmetro para avaliar a resposta do sistema dopaminérgico renal. O aumento na excreção urinária de DA durante a carga salina mostrou resultar, principalmente, de um aumento da sua produção em estruturas celulares não neuroniais, já que a DA com origem neuronal parece representar um componente de menor importância, mesmo quando se verifica um aumento da sua excreção urinária, durante a ingestão HS (Hayashi e col., 1991). Os resultados da literatura divergem, contudo, em relação à dimensão do aumento na excreção urinária de DA, durante a carga salina. No Homem, Alexander e col. (1974) e Oates e col. (1979) verificaram que cargas salinas passíveis de produzir aumentos de, respectivamente, 25 e 10 vezes na excreção urinária de sódio, se acompanharam de aumentos de, respectivamente, 43% e 30% na excreção urinária de DA. Em estudos *in vivo* efectuados com ratos mantidos em gaiolas metabólicas e submetidos a uma carga salina com 1% de NaCl na água de beber, verificaram-se aumentos significativos (de 93%; Vyas e col., 1992) e não significativos (de 19%; Mülhbauer e Osswald, 1992) na excreção urinária de DA. Deve salientar-se, no entanto, que Vyas e col. (1992) utilizaram

ratos Sprague-Dawley, enquanto que Mülhbauer e Osswald (1992) utilizaram ratos Wistar. É possível que as duas estirpes de ratos possam responder de uma forma diferente à carga salina; de facto, o aumento na excreção urinária de DA observado em ratos Sprague-Dawley submetidos a uma carga salina de 1% (Vyas e col., 1992) não foi diferente do observado com uma carga salina de 8% (Grossman e col., 1991); pelo contrário, o aumento na excreção urinária de DA em ratos Wistar submetidos a uma dieta contendo 9% de NaCl foi significativamente mais elevado (Yamazaki e col., 1986) do que o observado em resposta a uma dieta com 1% de NaCl, como nos presentes estudos ou nos de Mülhbauer e Osswald (1992).

Nos estudos descritos neste capítulo o aumento máximo observado na excreção urinária de DA foi de 27% e não atingiu significado estatístico. Estes resultados divergem dos de Hayashi e col. (1991) que estudaram o efeito de uma dieta HS semelhante (0,9% de NaCl durante 7 a 11 dias) em ratos e verificaram um aumento de 300% na excreção urinária de DA, em comparação com o observado em animais submetidos a dieta hiposalina; este constitui o aumento mais acentuado na excreção urinária de DA em resposta à carga salina, descrito na literatura. É possível, contudo, que a anestesia e o protocolo experimental necessários à realização dos estudos de depuração possam ter facilitado a expressão de um aumento tão acentuado na excreção urinária de DA que se observou nesse trabalho.

Ao contrário do que se verificou em relação à DA, a excreção urinária da L-DOPA aumentou significativamente nos ratos submetidos a dieta HS. O aumento observado atingiu o seu valor máximo no primeiro dia do período de dieta HS, baixando depois, progressivamente, até níveis basais. Este perfil da excreção urinária de L-DOPA durante a carga salina, em ratos Wistar, é semelhante ao observado por Grossman e col. (1991) em ratos Sprague-Dawley. Em ambos os casos não se evidenciaram modificações ao nível da concentração plasmática da L-DOPA; deve salientar-se, no entanto, que a colheita de sangue para determinação da L-DOPA não foi efectuada, em qualquer dos casos, no período em que a excreção urinária de L-DOPA atingiu os valores mais elevados. Se se considerar que uma quantidade substancial da L-DOPA circulante (até 77%) é, quer no Homem quer no Rato, removida pelos rins e que cerca de 80% da DA urinária resulta da L-DOPA plasmática (Grossman e col., 1992; Wolfowitz e col., 1993), os resultados apresentados neste capítulo sugerem uma redução na captação tubular da L-DOPA ou na sua descarboxilação, durante o período de dieta HS, em

particular nos primeiros três dias.

É pouco provável que uma redução na descarboxilação da L-DOPA tenha sido a responsável por estes resultados, na medida em que a carga salina tem sido associada a um aumento na actividade da DAAA renal (Hayashi e col., 1990; Seri e col., 1990) e, em estudos anteriores, um regime de dieta HS idêntico ao utilizado nestes estudos mostrou associar-se a um aumento na actividade renal da DAAA (Soares-da-Silva, 1993a). Por esse motivo, é legítimo admitir que a dieta HS possa ter-se acompanhado, neste modelo, de uma redução na captação tubular da L-DOPA.

Supõe-se que os neurónios simpáticos constituem o principal local de origem da L-DOPA plasmática (Grossman e col., 1992) e que a actividade de síntese da NA nas terminações neuronais simpáticas exerce um efeito determinante sobre a libertação da L-DOPA no plasma (Eisenhofer e col., 1989). Assumindo que a excreção urinária de NA e AD reflectem a sua libertação, respectivamente, a partir dos neurónios simpáticos e da medula supra-renal, a constatação de níveis elevados das duas catecolaminas na urina aponta para a presença de um aumento do tono simpático e adrenal nos animais em dieta HS e sugere que este factor possa ter contribuído para justificar a libertação da L-DOPA, no plasma destes animais.

A origem do DOPAC, da 3-MT e do HVA urinários não está ainda esclarecida, embora existam argumentos que levam a supor que a maior parte da 3-MT e do HVA urinário têm uma origem central (Kopin, 1985), enquanto que uma quantidade considerável do DOPAC urinário provém da desaminação da DA de síntese renal (Wolfowitz e col., 1993; Vieira-Coelho e col., 1994). O rim mostrou metabolizar a DA preferencialmente por desaminação, quer em condições *in vitro* quer *in vivo*, apesar da actividade renal da COMT ser tão elevada como a do fígado (Soares-da-Silva e Vieira-Coelho, 1993). No presente capítulo, os níveis urinários do DOPAC aumentaram durante o período de dieta HS, aumento este que não atingiu significado estatístico. No entanto, foi interessante verificar que as variações na excreção urinária do DOPAC acompanharam paralelamente as da DA. A excreção urinária do HVA, pelo contrário, evidenciou uma tendência para baixar durante o período de dieta HS, enquanto que a excreção urinária da 3-MT aumentou ligeiramente, durante o mesmo período.

Assumindo que a excreção urinária de creatinina pode representar uma estimativa grosseira da taxa de filtração glomerular, o facto de não se terem observado diferenças na excreção urinária de creatinina entre os períodos de dieta

NS e HS, permite sugerir que as alterações observadas na excreção urinária de DA e dos seus metabolitos não resultaram de modificações na taxa de filtração glomerular. Outra conclusão que pode ser retirada deste estudo é a de que o aumento na excreção urinária de DA durante a dieta HS não resultou de uma redução na metabolização da amina.

Ao contrário da DA, a 5-HT exerce efeitos renais antidiuréticos e antinatriuréticos, ao que se associa uma redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (Itskowitz e col., 1988; Li Kam Wa e col., 1993). É pois possível que a DA e a 5-HT exerçam a nível renal acções antagónicas sobre o transporte tubular de sódio, estando a sua síntese nas células tubulares renais dependente da disponibilidade das mesmas em, respectivamente, L-DOPA e 5-HTP. Se assumirmos que a excreção urinária de 5-HT reflecte a sua formação renal, os resultados destes trabalhos sugerem que a carga salina modificou a síntese da 5-HT de uma forma paralela à observada em relação à formação da DA.

Em conclusão, os resultados destes estudos revelam que a administração continuada de uma dieta HS a ratos Wistar, não foi acompanhada de um aumento significativo na excreção urinária de DA ou dos seus metabolitos (DOPAC, 3-MT, HVA) assistindo-se, no entanto, a um aumento significativo na excreção urinária de L-DOPA, durante o mesmo período. É possível que este perfil discrepante entre a excreção urinária da DA e da L-DOPA durante a dieta HS, tenha resultado de uma redução na captação tubular do precursor da DA, já que a actividade descarboxilásica do rim mostrou estar aumentada nestas condições. A resposta à dieta HS pode variar com a estirpe animal estudada, com a dimensão da carga salina administrada, bem como com o período de tempo permitido para o seu estabelecimento. Embora sejam necessários estudos complementares para o esclarecimento destes fenómenos, os resultados apresentados neste capítulo sugerem a existência de diferenças na resposta do sistema dopaminérgico renal à carga salina, entre os ratos Wistar e os Sprague-Dawley.

V - ESTUDO DA ACTIVIDADE DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL DURANTE A INIBIÇÃO CRÓNICA DA SÍNTESE DO ÓXIDO NITROSO.

1. Introdução

As células do endotélio vascular têm a capacidade para modular a tonicidade da musculatura lisa dos vasos através da produção de uma substância difusível, denominada factor de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). A libertação do EDRF é estimulada por uma série de substâncias (ADP, ATP, acetilcolina, 5-HT) e condiciona o relaxamento vascular por intermédio da activação da forma solúvel de guanilciclase, com aumento dos níveis de GMPc nas células musculares lisas vasculares. O óxido nítrico (ON) é produzido por oxidação de um dos dois átomos de azoto da molécula da L-arginina, através de uma síntase do ON dependente do Ca^{++} (Palmer e col., 1988; Sakuma e col., 1988; Schmidt e col., 1988) e admite-se que funciona como veículo das acções do EDRF sobre o músculo liso vascular (Palmer e col., 1987; Ignarro e col., 1987). Os análogos da L-arginina, tais como o N^G-nitro-arginina metil ester (L-NAME) e o N^G-nitro-monometil-L-arginina (L-NMMA), produzem inibição competitiva da síntase do ON e anulam os efeitos mediados pelo EDRF. Quando administrados sistemicamente, estes análogos da L-arginina inibem a produção do ON e condicionam uma vasoconstrição dependente da dose em diversos leitos vasculares (incluindo os leitos mesentérico e renal) e o desenvolvimento de hipertensão arterial (Aisaka e col., 1989; Rees e col., 1989).

A avaliação do efeito hipertensor resultante da inibição da síntese do ON revelou o desenvolvimento concomitante de alterações ao nível da função renal tais como reduções do fluxo sanguíneo renal, da taxa de filtração glomerular e da excreção urinária de sódio (Baylis e col., 1990; Salazar e col., 1992). Verificou-se, no entanto, que o efeito da inibição da síntase do ON sobre a excreção urinária de sódio pode depender do fenómeno associado de natriurese por pressão, o qual resulta, por sua vez, do grau de inibição da síntase do ON, por um lado, e da dimensão da resposta hipertensora associada, por outro (Johnson e Freeman, 1992; Nakamura e col., 1993). Na medida em que a inibição da formação do ON

produz uma sequência de fenómenos que se assemelham aos que poderão estar envolvidos no desenvolvimento da hipertensão essencial (vasoconstrição renal/ aumento na reabsorção de sódio; Romero e col., 1992), é possível antecipar que a inibição crónica da formação do ON possa fornecer informações úteis sobre a fisiopatologia desse distúrbio.

Desconhece-se qual a influência do ON sobre a síntese renal de DA. Neste contexto, as evidências que têm sugerido um papel importante do sistema dopaminérgico renal na modulação da reabsorção tubular de sódio e as que têm evidenciado deficiências na produção renal de DA em algumas formas de hipertensão arterial (Lee, 1993), colocam um interesse particular no estudo do sistema dopaminérgico renal, durante a inibição crónica da síntese do ON. A avaliação da influência do ON sobre a formação renal de DA ganha ainda um interesse acrescido pelo facto de ser conhecido o efeito inibitório do GMPc sobre o transporte tubular da L-DOPA e a síntese renal de DA (Soares-da-Silva e Fernandes, 1990a; 1991a).

No presente capítulo, avaliámos a actividade do sistema dopaminérgico renal num modelo experimental de hipertensão arterial, condicionada pela inibição crónica da síntese do ON. Para o efeito, estudámos a excreção urinária de DA e dos seus metabolitos em ratos submetidos à administração continuada de L-NAME por via oral (na água de beber) durante 14 dias (a administração continuada por via oral dos análogos da L-arginina mostrou condicionar uma forma de hipertensão arterial dependente da dose e do tempo de administração; Baylis e col., 1992; Arnal e col., 1992; Ribeiro e col., 1992); a actividade da DAAA nos tecidos renais foi igualmente avaliada.

Para avaliar o comportamento do sistema 5-hidroxitriptaminérgico renal durante a inibição crónica da síntese do ON determinámos, também no presente capítulo, a excreção urinária diária da 5-HT e do seu metabolito desaminado, o 5-HIAA.

Finalmente, para avaliar a actividade do sistema nervoso simpático e da medula supra-renal determinámos a excreção urinária diária da NA e da AD, respectivamente.

2. Material e métodos

2.1. Estudos *in vivo*.

2.1.1. Espécies animais

Nestas experiências foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 30 a 45 dias de idade e 180 a 200 gramas de peso. Os animais foram seleccionados como descrito no capítulo IV.

2.1.2. Colheitas de urina e determinação da pressão arterial

Os animais (n=4) foram colocados em gaiolas metabólicas sob condições ambientais controladas e efectuaram-se colheitas de urina de 24 horas, como descrito no capítulo IV. Depois de um período de estabilização de sete dias, o L-NAME, na dose de 50 µg/ml, foi adicionado à água de beber durante 14 dias consecutivos. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas diariamente, na artéria da cauda, como descrito no capítulo IV.

2.1.3. Colheita de sangue e tecido

Ao 14º dia, os ratos foram anestesiados com 60 mg/kg de pentobarbital sódico por via i.p. e os rins foram expostos através de uma incisão abdominal na linha média. Subsequentemente, colheu-se o sangue da veia renal e prepararam-se fatias de córtex renal, como descrito no capítulo IV.

2.2. Estudos *in vitro*

2.2.1. Espécies animais

Nestas experiências foram utilizados, como material de estudo, ratos da mesma raça, sexo, idade e peso dos utilizados nos estudos *in vivo*. Os animais foram mantidos em número de dois por gaiola, à temperatura de 24°C e em ambiente controlado (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão). A

água e a comida foram fornecidas sem restrições e as experiências foram todas efectuadas durante o dia.

2.2.2. Colheita dos tecidos

Os tecidos renais utilizados nos estudos *in vitro* foram obtidos a partir de três diferentes grupos de ratos tratados com L-NAME (50 µg/ml de água) : (1) animais tratados com L-NAME durante 7 dias consecutivos (n=4); (2) animais tratados com L-NAME durante 14 dias consecutivos (n=6); (3) animais tratados com L-NAME+L-arginina (1,0 mg/ml) durante 14 dias consecutivos (n=5). Animais da mesma idade e peso e não tratados (n=6) foram utilizados como grupo de controlo.

Em todos os grupos foram efectuadas determinações da pressão arterial e da frequência cardíaca em dias alternados, utilizando a mesma metodologia anteriormente descrita.

No final do período de administração do L-NAME os animais foram anestesiados com éter, sacrificados por decapitação e retiraram-se os rins através de uma incisão abdominal na linha média; subsequentemente, removeram-se as cápsulas renais, os rins foram cortados segundo um plano sagital e introduzidos em soro salino (NaCl 0,9%), arrefecido em gelo. Posteriormente, a medula renal foi cuidadosamente dissecada com uma tesoura.

2.2.3. Estudo da actividade da DAAA

A actividade da DAAA foi avaliada através do estudo da descarboxilação da L-DOPA em homogeneizados de túbulos renais. A preparação dos túbulos renais baseou-se em técnicas anteriormente descritas (Shah e col., 1979; Bloch e col., 1992), com pequenas modificações. Os rins foram introduzidos numa solução de Collins arrefecida em gelo, a qual tem sido utilizada com sucesso na preservação dos tecidos renais para transplante e na preparação de segmentos proximais do nefrónio. A solução utilizada tinha uma composição que se assemelha à do meio intracelular [(em mM): KCl 15, MgSO₄ 60, NaHCO₃ 15, KH₂PO₄ 15, K₂HPO₄ 50, glucose 140 e pH 7,4], não contendo cálcio. Subsequentemente, procedeu-se ao corte do córtex e à sua manipulação com uma espátula, até se conseguir uma pasta fina. Esta pasta foi depois submetida a um processo de filtragem sequenciada através de uma série de redes de nylon Nybolt, com passaduras de 180 µm na primeira série e de 75 µm na seguinte. As estruturas corticais que não foram

isoladas ficaram retidas na rede superior (180 μm), enquanto que na rede inferior ficaram retidos, predominantemente, túbulos renais. Durante o processo, as redes foram continuamente lavadas com solução de Collins arrefecida.

A viabilidade dos túbulos renais foi avaliada pelo método de exclusão pelo azul de tripano (0,2% peso/volume); os segmentos tubulares foram pipetados sobre uma lâmina de vidro e observados com um microscópio Leitz, 90 segundos depois da exposição ao corante. Nestas condições, mais de 90% dos túbulos renais excluíram o corante.

Os túbulos foram de seguida removidos com a solução de Collins arrefecida, centrifugados (a 1098 rpm, durante 2 min e a 4°C) e homogeneizados com homogeneizadores de teflon Thomas, arrefecidos em gelo. Incubaram-se alíquotas de 250 μl do homogeneizado tubular com 250 μl de um meio de incubação em tubos de vidro, durante 30 minutos. Subsequentemente, adicionou-se a L-DOPA (50 a 20000 μM) ao meio de incubação, durante 15 minutos; o volume final da reacção era de 1 ml. A composição do meio de incubação era a seguinte (em M): NaH_2PO_4 - 0,35; Na_2HPO_4 - 0,15 e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - 0,1; adicionaram-se também ao meio 100 μM de pargilina e 1 μM de tolcapone com o objectivo de inibir, respectivamente, a MAO e a COMT. O meio manteve um pH constante de 7,4 e a incubação decorreu a 37°C, sob agitação e gaseificação (95% O_2 e 5% CO_2) contínuas. No final, a reacção foi suspensa através da adição de 500 μl de ácido perclórico (2 M) a cada tubo, após o que as preparações foram arrefecidas a 4°C, durante 60 minutos. Centrifugaram-se depois as amostras (a 1098 rpm, durante 2 minutos, a 4°C), filtraram-se através de microfiltros Millipore (MF1) e utilizaram-se alíquotas de 500 μl do sobrenadante do filtrado para a determinação da DA.

Os valores de K_m e de V_{max} para a DAAA foram calculados por análise de regressão linear; a quantidade do substrato descarboxilado (correspondente à quantidade de DA formada), por mg de proteína e por hora de incubação foi correlacionada com o produto da divisão entre a quantidade total de DA formada e a de substrato adicionado ao meio (V vs V/S).

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação da L-DOPA, das monoaminas (DA, NA, AD, e 5-HT) e dos metabolitos das aminas (3,4-diidroxifenilglicol[DOPEG], DOPAC, 3-MT, HVA e 5-HIAA) na urina, no plasma, nos tecidos renais e nos homogeneizados foi efectuada por HPLC-ECD, como descrito nos capítulos anteriores.

Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA, AD, NA, 5-HT, DOPEG, DOPAC, 3-MT, HVA, e 5-HIAA variaram entre 350 e 1000 fmol/50 μ l.

A determinação do Na⁺, do K⁺, da osmolalidade e da creatinina na urina e no plasma foi efectuada como descrito no capítulo IV.

A determinação da ARP e da CAP foi efectuada por RIA, como descrito no capítulo IV.

A quantificação da excreção urinária de fosfatos foi efectuada por fotometria (Hitashi Automatic Analyser, model 717).

2.5. Determinação das proteínas

O conteúdo em proteínas das suspensões de túbulos renais (em mg de proteína/grama de tecido) foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

2.6. Análise estatística

Os resultados apresentados são médias $\pm$ EPM para um número n de determinações por grupo. A análise dos resultados dentro de cada grupo foi efectuada através do teste de Friedman, por comparação entre a totalidade dos valores obtidos com os correspondentes à situação basal (últimos quatro dias do período de estabilização) ou por comparação entre valores de interesse com os valores correspondentes do controlo. O significado estatístico da diferença entre um grupo controlo e vários grupos de experiências foi avaliado pelo teste de Tukey-Kramer. A diferença entre duas médias foi avaliada pelo test t de Student para valores não emparelhados. Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

2.7. Fármacos utilizados

Os fármacos utilizados: cloridrato de L-arginina e N^G - nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A. Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

3.1. Estudos *in vivo*

A inibição prolongada da síntese do ON pela administração do L-NAME (~10 mg/kg) condicionou o desenvolvimento de hipertensão arterial sustentada, a qual atingiu o seu nível máximo ao 10º dia. Os valores basais médios da pressão sistólica, pressão diastólica e frequência cardíaca foram de, respectivamente, 111 ± 2 mmHg, 84 ± 2 mmHg e 412 ± 1 /min. Vinte e quatro horas depois da exposição ao L-NAME, quer a pressão sistólica quer a diastólica tinham aumentado aproximadamente 20 mmHg para, respectivamente, 134 ± 4 mmHg e 101 ± 3 mmHg; por outro lado, a frequência cardíaca foi reduzida para 404 ± 2 /min ($P < 0,02$).

Como pode ser observado na figura 1, quer a pressão sistólica quer a diastólica aumentaram, respectivamente, 39% e 36% durante a 1ª semana de administração do L-NAME. O aumento verificado no final da segunda semana de tratamento com o L-NAME foi ainda mais acentuado, verificando-se nesse período que a pressão sistólica e a diastólica atingiram valores de, respectivamente, 173 ± 8

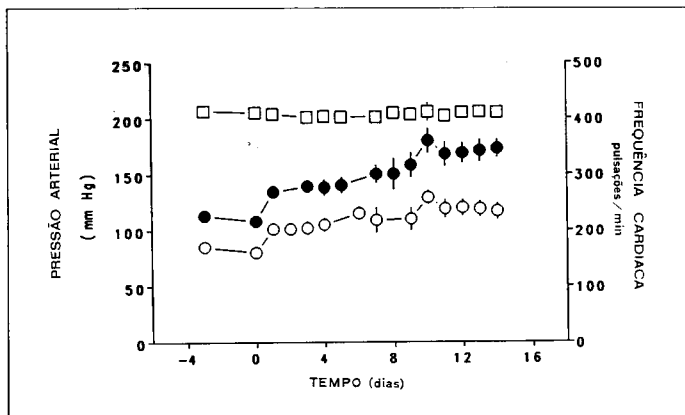


Figura 1. Evolução da pressão arterial sistólica (●), diastólica (○) e da frequência cardíaca (□), durante o período basal (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de N^o-nitro-arginina metil ester (L-NAME, 50 µg/ml; do dia 0 até ao dia 15). Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; as linhas verticais mostram EPM. Todos os valores da pressão sistólica e diastólica correspondentes ao período de administração do L-NAME são significativamente diferentes ($P < 0,01$) em comparação com os valores basais correspondentes.

e 117 ± 7 mmHg. A redução na frequência cardíaca que se observou durante a primeira semana de administração do L-NAME, não se verificou durante a 2ª semana do estudo; durante a 2ª semana de administração do L-NAME a frequência cardíaca média foi de 408 ± 1 ppm.

Como pode ser verificado na tabela 1, durante a 1ª semana de tratamento com o L-NAME assistiu-se a um aumento no peso corporal e na ingestão de líquidos, em comparação com os valores basais. Durante a 2ª semana de tratamento com o L-NAME a ingestão de líquidos e de L-NAME foi significativamente mais elevada do que a observada durante a 1ª semana de administração do análogo da L-arginina; contudo, no final da 2ª semana de tratamento com o L-NAME o peso corporal não era diferente ($P=0,07$) do registado no final da primeira semana.

Em condições basais, a excreção urinária de Na^+ e de K^+ foi de, respectivamente, $1,3 \pm 0,1$ e $4,3 \pm 0,3$ mmol/dia e não variou ao longo do período de duas semanas de administração de L-NAME (figura 2A). A excreção urinária de creatinina durante o período de duas semanas de administração de L-NAME ($8,4 \pm 0,2$ mg/dia) não foi também diferente da observada em condições basais (figura 2B). Em condições basais, a excreção urinária de fosfatos manteve-se estável ($5,3 \pm 0,6$ mg/dia), para durante a administração do L-NAME se tornar muito

	Ingestão de líquidos	Peso corporal	Dose de L-NAME	Pressão arterial média
	(ml/dia)	(gramas)	(mg/kg/dia)	(mmHg)
Basal	$42,9 \pm 2,5$	$212,3 \pm 10,1$		91 ± 1
1ª semana	$52,4 \pm 4,4^*$	$254,6 \pm 14,3^*$	$10,6 \pm 0,9$	$117 \pm 2^*$
2ª semana	$72,8 \pm 4,0^{**}$	$322,3 \pm 23,5^*$	$13,0 \pm 0,7^{**}$	$133 \pm 2^*$

Tabela 1. Variações no consumo de líquidos, peso corporal e pressão arterial média ($n=4$) durante 7 dias de ingestão de água (basal), a que se seguiram duas semanas consecutivas de ingestão de uma solução de N^G -nitro-arginina metil ester (L-NAME; $50 \mu\text{g/ml}$). A dose de L-NAME administrada foi calculada tomando em consideração a ingestão diária de líquidos e o peso corporal. Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM correspondentes ao número indicado de determinações. $P < 0,05$ em relação ao basal (*) ou em relação ao valor observado na primeira semana de administração do L-NAME (**) (teste t de Student).

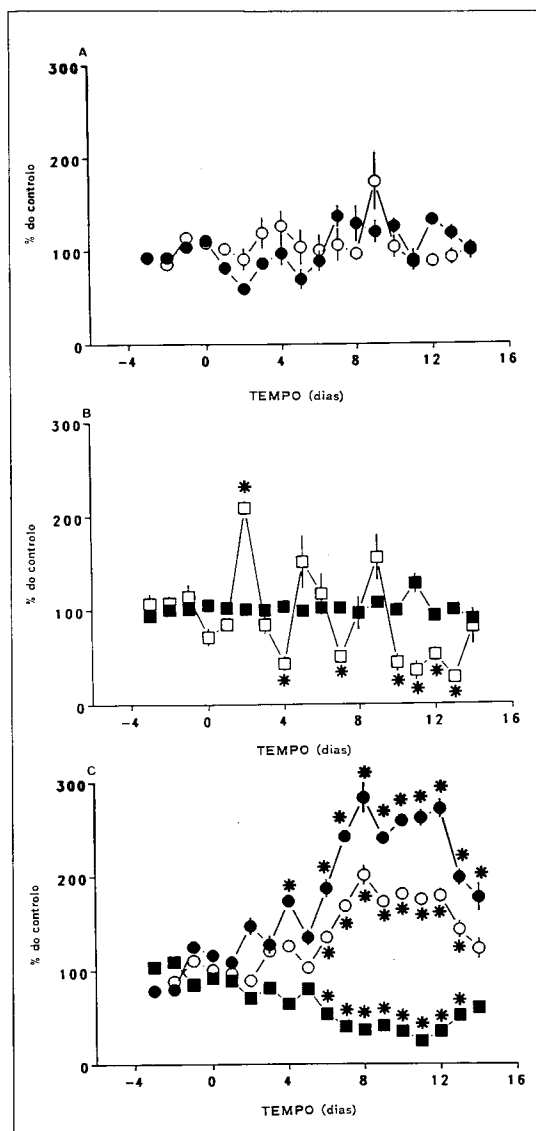


Figura 2. Evolução: (A) da excreção urinária de sódio (●) e potássio (○); (B) da excreção urinária de creatinina (■) e de fosfatos (□) e (C) do volume de urina (●), da ingestão de líquidos (○) e da osmolalidade urinária (■), durante o período basal (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de N^G -nitro-arginina metil ester (L-NAME, 50 μ g/ml; do dia 0 até ao dia 15). Os resultados são percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,01$).

instável, sem que, contudo, fossem observadas diferenças significativas entre os valores basais e os observados durante a primeira ($5,7 \pm 1,7$ mg/dia) ou a segunda ($3,6 \pm 1,0$ mg/dia) semana de administração do análogo da L-arginina (figura 2B). O aumento do volume urinário foi acompanhado por um aumento concomitante no consumo de líquidos e por uma redução na osmolalidade urinária (figura 2C).

Durante os quatro dias do período de estabilização, a excreção urinária diária de L-DOPA, DA, DOPAC, 3-MT e HVA foi de, respectivamente, $4,4 \pm 0,5$, $13,8 \pm 0,3$, $37,4 \pm 0,8$, $180 \pm 2,7$ e $206,1 \pm 6,7$ nmol/dia (figura 3A). Durante a administração do L-NAME verificou-se um aumento na excreção urinária de L-DOPA (93-201%), de DA (14-61%) e de DOPAC (11-66%), mas não na excreção urinária de 3-MT ou de HVA. O aumento observado na excreção urinária de L-DOPA, DA e DOPAC ($P < 0,01$) verificou-se, contudo, apenas a partir do 6^o-8^o dia de administração do L-NAME; durante a segunda semana de administração do L-NAME, a excreção urinária de L-DOPA, DA e DOPAC foi de, respectivamente, $11,3 \pm 0,6$, $20,3 \pm 1,0$ e $55,9 \pm 2,7$ nmol/dia.

Em condições basais, a excreção urinária de 5-HT e 5-HIAA foi de, respectivamente, $73,5 \pm 1,1$ e $241,7 \pm 5,4$ nmol/dia. Durante a primeira semana de administração de L-NAME não se verificaram modificações significativas na excreção urinária de 5-HT ou de 5-HIAA; tal como se observou para a DA, observou-se um aumento na excreção urinária da 5-HT durante a segunda semana de administração de L-NAME (figura 3B). No entanto, ao contrário do que se verificou em relação ao DOPAC, os níveis urinários de 5-HIAA não variaram ao longo do estudo.

Como é possível verificar na figura 3C, a excreção urinária basal de NA ($2,0 \pm 0,1$ nmol/dia) aumentou (de 45 a 65%) durante a primeira semana de administração de L-NAME; durante a segunda semana de tratamento com L-NAME verificou-se um aumento adicional na excreção urinária diária de NA (de 91 a 382%). A excreção urinária basal de AD ($2,2 \pm 0,1$ nmol/dia) não variou durante a primeira semana de administração de L-NAME ($1,9 \pm 0,1$ nmol/dia); contudo, verificou-se um aumento marcado (de 94 a 218%) na excreção urinária de AD durante a segunda semana de tratamento com o análogo da L-arginina (figura 3C).

Na tabela 2 apresentam-se as concentrações plasmáticas de L-DOPA, NA, AD, DOPEG, Na^+ , K^+ , ureia, creatinina, ARP e CAP em ratos tratados com L-NAME e animais não tratados. Como se pode verificar, as concentrações plasmáticas de L-DOPA, NA, AD e DOPEG foram mais elevadas nos ratos tratados com L-NAME do que nos animais não tratados; pelo contrário, a ARP e a CAP foram mais

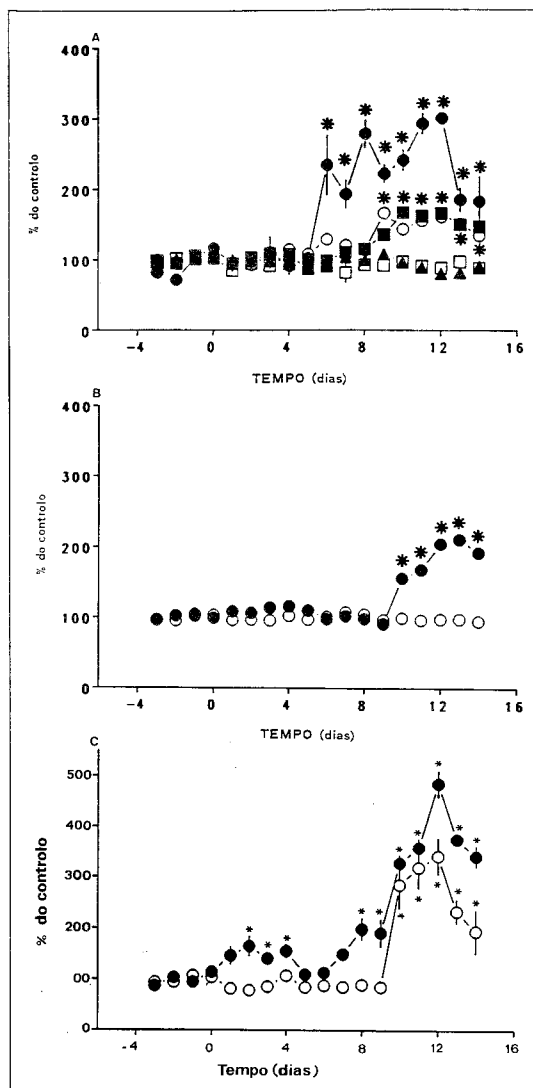


Figura 3. Evolução da: (A) excreção urinária de L-DOPA (●), dopamina (DA; ○), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC; ■), 3-metoxitiramina (3-MT; □) e ácido homovanílico (HVA; ▲); (B) excreção urinária de 5-hidroxitriptamina (5-HT; ●) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA; ○) e (C) excreção urinária de noradrenalina (NA; ●) e adrenalina (AD; ○), durante o período basal (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de N^G -nitro-arginina metil ester (L-NAME, 50 μ g/ml; do dia 0 até ao dia 15). Os resultados são percentagens de variação para cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,05$).

	Controlo	L-NAME
L-DOPA (pmol/ml)	7,9±1,7	16,1±1,8*
NA (pmol/ml)	2,4±0,5	8,4±1,8**
AD (pmol/ml)	1,9±0,4	9,1±0,7
DOPEG (pmol/ml)	3,0±0,3	7,9±1,4*
CAP (pg/ml)	310±33	125±13**
Na ⁺ (mM)	139±2	139±1
K ⁺ (mM)	5,3±0,5	4,6±0,1
Ureia (mg/dl)	18±2	17±2
Creatinina (mg/dl)	0,30±0,04	0,26±0,03
ARP (ng/ml/h)	29±2	17±2
Osmolalidade (mOsm/kg H ₂ O)	289±2	284±1

Tabela 2. Osmolalidade plasmática e níveis plasmáticos de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), noradrenalina (NA), adrenalina (AD), 3,4-diidroxifenilglicol (DOPEG), aldosterona (CAP), Na⁺, K⁺, ureia, creatinina e actividade plasmática de renina (ARP) em animais controlo (n=4) e em ratos tratados com uma solução de N^G-nitro-arginina metil ester (L-NAME; 50 µg/ml) durante 14 dias (n=4). Os valores apresentados são médias ± EPM correspondentes a um número de 4 determinações por grupo. Significativamente diferente do valor controlo correspondente utilizando o teste t de Student (*P<0,05; **P<0,01).

reduzidas nos ratos tratados com L-NAME do que nos do controlo. Não se observaram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de creatinina e de ureia, ou na osmolalidade plasmática, entre os animais tratados com L-NAME e os não tratados.

Os teores de NA e DA no córtex renal dos animais tratados com L-NAME (NA=0,89±0,03 nmol/g; DA=0,16±0,05 nmol/g), não diferiram dos observados no grupo de controlo (NA=0,78±0,06 nmol/g; DA=0,11±0,01 nmol/g).

3.2. Estudos *in vitro*

3.2.1. Evolução da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os valores basais da pressão arterial e da frequência cardíaca dos ratos

(n=21) utilizados nos estudos *in vitro* foram semelhantes aos verificados, em condições basais, nos animais utilizados nos estudos *in vivo* (sistólica=108±2 mmHg; diastólica=80±4 mmHg; freq. card.=411±3 pulsações/min). Na tabela 3 apresentam-se os valores da pressão arterial, frequência cardíaca, peso corporal, consumo de líquidos, dose de L-NAME e dose L-NAME+L-arginina dos animais utilizados nestas experiências: ratos tratados com L-NAME durante 7 dias (n=4) e 14 dias (n=6); ratos tratados com L-NAME+L-arginina durante 14 dias (n=5) e ratos não tratados (n=6).

	Controlo	L-NAME	L-NAME	L-NAME+ L-arginina
		7 dias	14 dias	14 dias
Pressão sistólica	106±1	150±12*	171±9*	111±2 ^f
Pressão diastólica	75±2	109±10*	119±6*	77±5 ^f
Freq. card.	411±4	409±2	411±5	343±2 ^f
Peso corp. (g)	215±21	208±15	225±20	218±14
Ing. líq (ml/dia)	40±3	50±2*	63±5*	41±6 ^f
Dose de L-NAME (mg/kg/dia)	-----	11±1	12±1	10±1

Tabela 3. Valores da pressão arterial sistólica e diastólica (em mmHg), da frequência cardíaca (pulsações/min), do consumo de líquidos e do peso corporal nos animais de controlo (n=6), nos ratos tratados com uma solução de N^G-nitro-arginina metil ester (L-NAME; 50 µg/ml) durante 7 (n=4) e 14 (n=6) dias e nos animais tratados com L-NAME (50 µg/ml) + L-arginina (1 mg/ml) durante 14 dias (n=5). Os valores apresentados são médias± EPM correspondentes a um número de 4 a 6 determinações por grupo. Significativamente diferente do valor de controlo correspondente (*P<0,01) ou do verificado nos ratos tratados durante 14 dias com o L-NAME (^f P<0.01), utilizando o teste de Tukey-Kramer.

Os animais tratados durante 7 ou 14 dias com L-NAME apresentaram valores de pressão arterial sistólica e diastólica mais elevados do que os observados no grupo de controlo. Os animais tratados com L-NAME+L-arginina durante 14 dias, por outro lado, evidenciaram valores de pressão arterial significativamente mais reduzidos do que os observados nos ratos tratados apenas com L-NAME. Não se verificaram diferenças significativas nos valores de pressão arterial entre o grupo de animais tratados com L-NAME+L-arginina e o grupo de controlo (tabela 3).

3.2.2. Avaliação da actividade da DAAA

Nos estudos efectuados com homogeneizados de túbulos renais isolados, a descarboxilação da L-DOPA em DA mostrou ser dependente da concentração de L-DOPA utilizada (10 a 5000 μM) e saturável na presença de 1000 μM do precursor da DA (figura 4). A actividade da DAAA nos homogeneizados de túbulos renais dos ratos tratados com L-NAME durante 14 dias mostrou ser significativamente mais elevada ($P < 0,01$) do que a observada no grupo de controlo, nos animais tratados com L-NAME durante 7 dias ou nos ratos tratados com L-NAME + L-arginina durante 14 dias (tabela 4). Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de K_m entre os quatro grupos de animais.

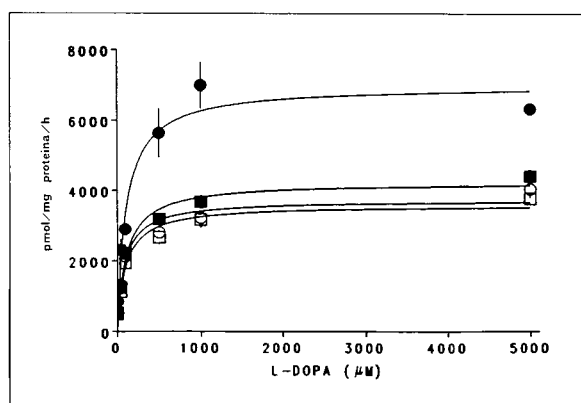


Figura 4. Curvas de saturação da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA) em homogeneizados de túbulos de córtex renal de animais controlo ($\circ$), de ratos tratados com N^G-nitro-arginina metil ester (L-NAME, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 7 dias ($\odot$) e 14 dias ($\bullet$) e de ratos tratados com L-NAME (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + L-arginina (1 mg/ml) durante 14 dias ($\blacksquare$). A actividade da DAAA está representada como a velocidade de formação da DA (em nmol/mg de proteína/15 min) vs a concentração de L-DOPA (μM). Cada ponto representa a média de 4 a 6 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

	Controlo	L-NAME	L-NAME	L-NAME+
		7 dias	14 dias	L-arginina
				14 dias
$V_{\max}$	13,8±0,6	15,2±0,7	25,2±2,4*	12,9±0,9
K_m	62,6±6,8	68,8±5,1	72,0±10,1	60,4±2,5

Tabela 4. Parâmetros cinéticos ($V_{\max}$, em nmol/mg de proteína/hora; K_m , em μM) da actividade da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA) determinada em homogeneizados de túbulos renais de ratos tratados com N^G-nitro-arginina metil ester (L-NAME; 50 $\mu g/ml$) durante 7 e 14 dias, de animais tratados com L-NAME (50 $\mu g/ml$) + L-arginina (1 mg/ml) durante 14 dias e de animais não tratados (controlo). Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM correspondentes a 6 experiências por grupo. Significativamente diferente (* $P < 0.02$) em comparação com os valores correspondentes utilizando o teste de Tukey-Kramer.

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados no presente capítulo revelam que a inibição crónica da síntese do ON condiciona o desenvolvimento de hipertensão arterial sustentada. A resposta hipertensora secundária à administração do L-NAME foi acompanhada de um aumento na actividade da DAAA renal, ao que se associou um aumento na excreção urinária, quer de DA quer de 5-HT. Desconhece-se se esta resposta do rim ocorreu em consequência da redução na síntese do ON ou se correspondeu a um mecanismo de adaptação condicionado pelos valores elevados de pressão arterial. Contudo, é interessante ter-se verificado que quer o fenómeno de hipertensão arterial quer o de aumento na actividade da DAAA foram impedidos pela administração concomitante de L-arginina, aos animais tratados com o L-NAME.

A variação no mesmo sentido verificada na excreção urinária da DA e da 5-HT nos animais tratados com L-NAME sugere que uma quantidade considerável das duas aminas possa ter tido origem no mesmo compartimento celular, ou seja, nas células dos túbulos contornados proximais. A constatação de que os níveis urinários do DOPAC variaram em paralelo com os da DA e da 5-HT sugere, por outro lado, que uma parte importante do DOPAC urinário possa ter tido origem na

desaminação da DA de síntese renal e reforça a importância da desaminação no processo de metabolização da DA de síntese renal. O mesmo não parece poder aplicar-se aos restantes metabolitos das duas aminas; de facto, os níveis da 3-MT, do HVA e do 5-HIAA permaneceram sem alterações ao longo do estudo. Estes resultados sugerem que os níveis urinários de 3-MT, HVA e 5-HIAA poderão resultar, maioritariamente, do metabolismo das respectivas aminas a nível cerebral, ou em outros tecidos extra-renais (Kopin, 1985).

O aumento paralelo na excreção urinária de DA, DOPAC e 5-HT durante a segunda semana de administração do L-NAME pode ter resultado de um aumento na actividade da DAAA nos tecidos renais. Esta sugestão é suportada por dois argumentos: (1) pelos resultados dos estudos *in vitro* em que se verificou um aumento para o dobro na actividade da DAAA nos homogeneizados de túbulos renais de animais tratados durante 14 dias com o L-NAME, em comparação com a observada em animais não tratados e (2) pela verificação de que o aumento na excreção urinária de DA, DOPAC e 5-HT ocorreu em simultâneo com o aumento documentado na actividade da DAAA. O facto de não se terem observado modificações na actividade da DAAA ao sétimo dia de administração do L-NAME, apesar da hipertensão já existente, sugere, por outro lado, que as alterações na actividade da DAAA renal poderão ter ocorrido em consequência de um processo adaptativo de desenvolvimento lento.

A administração da L-arginina impediu completamente o aumento na actividade da DAAA e o desenvolvimento da hipertensão no grupo de ratos tratados com o L-NAME. A constatação deste fenómeno sugere que o processo que conduziu ao aumento da actividade da DAAA renal pode ter tido origem num sinal dependente do desenvolvimento da hipertensão. Em alternativa, a inibição da formação do ON, ao condicionar uma redução sustentada na activação da guanilciclase e uma formação reduzida de GMPc, pode ter gerado um sinal de importância potencial na regulação da actividade da DAAA, nos tecidos renais. A acumulação celular do GMPc mostrou reduzir a formação renal de DA em fatias de rim, mas não em homogeneizados (Soares-da-Silva e Fernandes, 1991; 1992); nos trabalhos descritos neste capítulo, contudo, verificou-se um aumento na formação da DA, quer em fatias quer em homogeneizados, o que aponta para um envolvimento directo da descarboxilase no aumento da produção da DA e não para interferências ao nível dos mecanismos envolvidos no acesso da L-DOPA ao citoplasma celular. Em conclusão, estes resultados sugerem que a actividade da DAAA renal poderá ser modulada pela disponibilidade em ON, GMPc, ou ambas.

O aumento na actividade da DAAA renal dos ratos tratados com L-NAME pode não constituir o único factor implicado no aumento da excreção urinária de DA e DOPAC nestes animais. De facto, as alterações na actividade da DAAA foram acompanhadas por um aumento na excreção urinária de L-DOPA e, no final do estudo, os teores plasmáticos de L-DOPA eram mais elevados nos ratos tratados com L-NAME do que no grupo de controlo. É pois possível que o maior aporte de L-DOPA aos rins dos animais tratados com L-NAME possa ter contribuído para o aumento observado na excreção urinária de DA. De facto, como foi referido no capítulo anterior, evidenciou-se recentemente que uma quantidade substancial da L-DOPA plasmática é removida pelos rins e que cerca de 80% da DA urinária deriva da L-DOPA plasmática, quer no Homem quer no animal de experiência (Grossman e col., 1992; Wolfowitz e col., 1993). Supõe-se que os neurónios simpáticos constituem o principal local de origem da L-DOPA plasmática (Grossman e col., 1992) e que a actividade de síntese da NA nas terminações neuronais simpáticas exerce influência determinante sobre os teores de L-DOPA libertados no plasma (Eisenhofer e col., 1989); admitindo que os níveis plasmáticos da NA e AD refletem a libertação destas catecolaminas a partir, respectivamente, dos neurónios simpáticos e da medula supra-renal, é possível concluir que os animais tratados com o L-NAME evidenciavam um aumento do tono simpático e adrenal, ao qual se terá associado um aumento na libertação de L-DOPA com acesso ao rim.

A hiperactividade simpática evidenciada durante a inibição da síntese do ON está de acordo com os resultados de outros autores (Sakuma e col., 1992; Harada e col., 1993) e poderá estar também envolvida directamente no aumento observado na excreção urinária de DA e DOPAC, neste modelo; de facto, verificou-se que à activação dos adrenoreceptores tubulares, quer α_1 , quer α_2 , se associa um aumento no transporte da DA em fatias de rim de Rato e que o mecanismo subjacente envolve a estimulação do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (Soares-da-Silva, 1993c). Como a NA e a AD parecem particularmente activas, respectivamente, sobre os adrenoreceptores α_1 e α_2 , é legítimo admitir que o aumento na excreção urinária de DA, a que se assistiu durante a segunda semana de administração do L-NAME, possa ter resultado, em parte, de uma facilitação do transporte da amina para o lúmen tubular.

A administração continuada do L-NAME não condicionou modificações significativas ao nível da excreção urinária de Na^+ , K^+ e creatinina, nem nos níveis plasmáticos de creatinina. Estes resultados estão de acordo com as descrições

de outros autores (Dananberg e col., 1993; Jover e col., 1993) e sugerem que a hipertensão que acompanha a inibição crónica da síntese do ON pode não envolver retenção de sódio na sua fisiopatologia. Estes resultados divergem, no entanto, dos de outros estudos em que foram empregues doses de L-NAME mais elevadas (Baylis e col., 1990), bem como de experiências efectuadas sob anestesia (Ribeiro e col., 1992) e de outras em que os animais foram submetidos a uma infusão aguda com inibidores da síntese do ON (Romero e col., 1992). Uma hipótese de interpretação para as discrepâncias observadas poderá assentar em diferentes modificações desencadeadas ao nível da pressão de perfusão renal, com implicações diversas sobre a excreção urinária de sódio, dependendo do grau de inibição da síntese do ON e da resposta hipertensora associada (Johnson e Freeman, 1992; Nakamura e col., 1993).

Embora a DA e a 5-HT possam interferir ambas sobre a reabsorção tubular de sódio, nomeadamente ao nível do nefrónio proximal, foi interessante verificar a ausência de alterações significativas na excreção urinária de sódio, apesar do aumento na excreção urinária das duas aminas a que se assistiu durante a segunda semana de administração do L-NAME. O facto de a DA e a 5-HT exercerem efeitos antagónicos ao nível da reabsorção tubular de sódio, pode ser avançado como tentativa de interpretação para este fenómeno.

Outra observação diz respeito ao aumento no consumo de água que se verificou durante a administração de L-NAME. Embora não possamos avançar com uma explicação definitiva para a origem deste fenómeno, já descrito por outros autores (Pollock e col., 1993), uma interpretação possível poderá assentar em interferências condicionadas pelo L-NAME ao nível da libertação hipofisária da hormona antidiurética ou das suas acções renais, já que a síntese do ON está presente na pituitária posterior e no hipotálamo (Bredt e col., 1990).

De acordo com as descrições de outros autores, verificámos uma redução na ARP e na CAP durante a administração crónica do L-NAME. Aparentemente, esta redução na ARP entra em conflito com as referências que atribuem aos inibidores da enzima de conversão da angiotensina e aos antagonistas dos receptores da AII um papel na prevenção do desenvolvimento da hipertensão induzida pelo L-NAME (Jover e col., 1993; Pollock e col., 1993).

Em conclusão, os estudos apresentados neste capítulo evidenciam que:

- 1 - a hipertensão que resulta da administração continuada de L-NAME acompanha-se de um aumento na excreção urinária de DA e de DOPAC,

aparentemente em consequência de aumentos quer no aporte da L-DOPA aos tecidos renais quer na actividade da DAAA renal;

- 2 - o aumento na excreção urinária de DA durante a inibição da síntese do ON acompanha-se de um aumento simultâneo na excreção urinária de 5-HT, mas não de 5-HIAA.

O facto de a administração conjunta de L-arginina e L-NAME ter impedido o desenvolvimento da hipertensão e o aumento na actividade da DAAA renal sugere que o mecanismo subjacente ao aumento na actividade da DAAA renal que se verificou nos animais tratados com L-NAME pode ter envolvido, na sua génese, uma redução na produção do ON ou um sinal dependente do desenvolvimento da hipertensão arterial.

VI - SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL E NEFROTOXICIDADE PELA CICLOSPORINA A (CSA). ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

1. Introdução

A introdução da terapêutica imunossupressora com ciclosporina A (CsA) permitiu avanços consideráveis na evolução clínica e no prognóstico dos doentes submetidos a transplante de órgãos. A administração de CsA está, contudo, associada a formas significativas de toxicidade renal, as quais constituem limitação importante à sua utilização. Estão descritas três formas de apresentação para a toxicidade renal pela CsA (Remuzzi e Bertani, 1989): (1) diminuição aguda, mas potencialmente reversível, da taxa de filtração glomerular; (2) doença microvascular, com padrão de microangiopatia trombótica e (3) fibrose intersticial crônica irreversível.

A diminuição da taxa de filtração glomerular, um fenómeno reversível, resulta de reduções no fluxo sanguíneo renal e no coeficiente de ultrafiltração capilar glomerular (Kopp e Klotman, 1990). A redução do fluxo sanguíneo renal, condicionada pela terapêutica com CsA, tem sido descrita como resultando de perturbações no metabolismo de certos eicosanóides, nomeadamente pelo aumento da síntese do tromboxano (Petric e col., 1990; Schnabel e col., 1991; Spurney e col., 1990) e de disfunções do endotélio complicadas por vezes pelo desenvolvimento de lesões endoteliais (Kon e col., 1990; Takeda e col., 1993). Os mecanismos responsáveis pela diminuição do coeficiente de ultrafiltração capilar glomerular não se encontram ainda bem definidos, acreditando-se, no entanto, que possam estar relacionados com um aumento na contractilidade das células mesangiais (Wiegmann e col., 1990). Por sua vez, a fibrose renal intersticial, esta irreversível, surge na sequência da terapêutica prolongada com o imunossupressor e põe sérias questões quanto à utilização crônica da CsA em doentes transplantados. A tubulopatia que surge na sequência da administração de CsA é semelhante no Homem e no Rato e caracteriza-se pela presença de corpos de inclusão tubulares, correspondentes a autolisossomas e mitocôndrias gigantes, vacuolização tubular na dependência de dilatação do retículo endoplasmático, lesões de microcalcificação

e regeneração tubular (Mihatsch e col., 1994). Estas alterações desenvolvem-se de uma forma dependente da dose, predominam a nível dos segmentos do nefrónio incluídos na zona interna da medula externa e interessam sobretudo as células dos túbulos contornados proximais (Rosen e col., 1990).

Os mecanismos responsáveis pela toxicidade tubular que acompanha a administração da CsA parecem ser múltiplos e têm sido relacionados com (1) a isquemia tubular secundária ao fenómeno de hipoperfusão renal que acompanha a administração do fármaco (Metz-Kurschel e col., 1990; Rossini e col., 1990); (2) o aumento da formação e facilitação da deposição de proteínas na matriz extracelular por mecanismos não hemodinâmicos (Nast e col., 1991); (3) alterações metabólicas renais e peroxidação dos lipídeos (Walker e col., 1990); (4) o aumento da actividade de enzimas proteolíticas (Olbricht e col., 1990); (5) a inibição da síntese de proteínas microssomiais (Buss e col., 1989); (6) a incorporação da CsA nas membranas celulares com alteração das suas características funcionais (Walker e col., 1989) e dos sistemas de transporte transmembranosos (Mayer e Cockett, 1988) e (7) a alteração das membranas mitocondriais (Strzelecki e col., 1988).

A disfunção tubular condicionada pela CsA acompanha-se de um aumento na reabsorção proximal de sódio que se traduz por uma redução da depuração do lítio (Whiting e col., 1988). Os mecanismos envolvidos na retenção de sódio, que acompanha a administração da CsA, não estão ainda bem caracterizados, embora nela possam estar envolvidas a estimulação do sistema RAA, como consequência directa da hipoperfusão renal (Ishikawa e col., 1991) ou dos mecanismos de retroactivação tubuloglomerular (Siegl e Ryffel, 1982) e a hiperactividade simpática (Murray e Paller, 1986).

Como corolário, um elemento comum a todas as formas de nefrotoxicidade pela CsA é o desenvolvimento de hipertensão arterial, em cuja fisiopatologia está envolvido o binómio vasoconstricção renal/aumento desproporcionado da reabsorção de sódio. A importância desta forma de hipertensão assenta na frequência com que se associa à administração do imunossupressor (atingindo cerca de 80% em alguns centros) e na morbilidade que condiciona. Por outro lado, a semelhança entre os processos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão condicionada pela CsA e os que se supõe estarem subjacentes ao desenvolvimento da hipertensão essencial, tem levado alguns autores a sugerir que o modelo de hipertensão que acompanha a administração deste imunossupressor pode corresponder a um excelente instrumento de trabalho para o estudo dos processos

envolvidos na fisiopatologia da hipertensão essencial (Luke, 1993).

Os segmentos tubulares onde se processa a síntese renal da DA e onde a amina exerce os seus efeitos autócrinos, correspondem aos locais do nefrónio onde se verifica um aumento da reabsorção tubular de sódio durante a administração da CsA. Este facto permite especular acerca do papel do sistema dopaminérgico renal na fisiopatologia da antinatriurese e da hipertensão arterial que resultam da acção do imunossupressor. De acordo com os elementos conhecidos, o efeito antinatriurético da CsA poderá associar-se a uma hiperactividade do sistema dopaminérgico renal, como mecanismo de compensação para contrariar a tendência antinatriurética justificada por outros mediadores ou, em alternativa, envolver directamente na sua fisiopatologia um défice, absoluto ou relativo, na produção renal de DA.

Em favor desta segunda hipótese, poderão ser invocados os resultados de estudos em que se evidenciou que: (1) a hipertensão condicionada pela CsA é sensível ao sódio, à semelhança do que se passa nas formas de hipertensão que têm sido associadas a um défice na formação renal de DA (Curtis e col., 1988); (2) a utilização de DA ou agonistas selectivos dos receptores da DA é, quer no Rato quer no Homem, eficaz na reversão do fenómeno inicial de hipoperfusão renal decorrente da administração do imunossupressor, resultando em reversão completa das perturbações hemodinâmicas intra-renais e da antinatriurese, bem como em normalização da taxa de ultrafiltração glomerular, da depuração do paraminohipurato e da excreção fraccional de sódio (Conte e col., 1988, 1989; Sabbatini e col., 1989; Brooks e col., 1990).

No presente capítulo, estudámos a actividade do sistema dopaminérgico renal num modelo experimental de nefrotoxicidade pela CsA. Para o efeito, determinámos a excreção urinária de DA e dos seus metabolitos desaminado (DOPAC) e desaminado+metilado (HVA) em ratos submetidos à administração continuada de CsA na dose de 50 mg/kg/dia por via s.c. (a administração continuada desta dose de CsA ao Rato mostrou condicionar alterações morfológicas e distúrbios na função tubular renal com redução da excreção fraccional de sódio; Petric e col., 1990); avaliámos ainda a evolução da pressão arterial e determinámos as concentrações plasmáticas de L-DOPA, AD, NA e DOPEG; avaliámos a actividade das enzimas envolvidas na síntese (DAAA) e na metabolização renal da DA (MAO, tipos A e B; COMT); estudámos o transporte da L-DOPA em túbulos renais isolados e caracterizámos a cinética do efluxo da DA recém-formada nos tecidos renais.

2. Material e métodos

2.1. Estudos *in vivo*

2.1.1. Espécies animais

Nestas experiências foram utilizados, como material de estudo, ratos machos da raça Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciências, Oeiras, Portugal), com 45 a 60 dias de idade e 250 a 320 gramas de peso. Os animais eram normotensos e foram seleccionados depois de um período de estabilização de 7 dias em que se procedeu à sua adaptação às condições de determinação da pressão arterial.

2.1.2. Colheitas de urina e sangue e determinação da pressão arterial

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas sob condições ambientais controladas (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão, à temperatura de 24°C) e avaliou-se diariamente o consumo de líquidos e de comida. Efectuaram-se colheitas de urina de 24 horas em recipientes contendo 1 ml de HCl (6 M), para impedir a decomposição espontânea das monoaminas e seus metabolitos. Após um período de estabilização de 7 dias administrou-se a CsA, na dose diária de 50 mg/kg s.c., durante 7 (n=4) ou 14 (n=4) dias consecutivos. Um terceiro grupo de animais (n=4) foi injectado durante 14 dias por via s.c. com o veículo da CsA (azeite de oliveira; 0,5 ml/kg/dia) e serviu como controlo; neste grupo, a comida foi fornecida diariamente em quantidade idêntica à consumida pelos ratos tratados com CsA.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas na artéria da cauda entre as 7 e as 10 a.m., ao 4º dia do período de estabilização e ao 14º dia de administração da CsA, por intermédio de um detector fotoeléctrico (LE 5000, Letica, Barcelona, Espanha).

No final do período de tratamento, os ratos foram anestesiados com 60 mg/kg de pentobarbital sódico por via i.p., os rins foram expostos através de uma incisão abdominal na linha média e colheu-se o sangue da veia cava para a determinação de catecolaminas plasmáticas, ionograma, ureia, creatinina e osmolalidade. A colheita do sangue foi efectuada em tubos heparinizados e introduzidos em gelo.

2.2. Estudos *in vitro*

2.2.1. Espécies animais

Nestes trabalhos foram utilizados, como material de estudo, ratos da mesma raça, sexo, idade e peso dos utilizados nos estudos *in vivo*. Os animais foram mantidos em número de dois por gaiola, à temperatura de 24°C e em ambiente controlado (ciclos diários de 12 horas, alternando luz e escuridão); as experiências foram efectuadas durante o dia.

Os tecidos renais utilizados nos estudos *in vitro* foram obtidos a partir de cinco diferentes grupos de ratos: (1) ratos tratados com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.) durante 7 dias (n=12); (2) ratos tratados com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.) durante 14 dias (n=20); (3) ratos tratados com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.) durante 7 dias (n=12); (4) ratos tratados com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.) durante 14 dias (n=20); nestes quatro grupos de ratos a comida foi fornecida sem restrições. Um quinto grupo de ratos foi tratado com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.) durante 14 dias consecutivos (n=4) e restringiu-se o consumo de comida para uma quantidade diária idêntica à consumida pelos animais tratados com CsA.

2.2.2. Avaliação da actividade da DAAA

Em algumas experiências estudámos a descarboxilação da L-DOPA em homogeneizados de túbulos renais provenientes de animais tratados com CsA durante 7 (n=4) e 14 (n=4) dias e de animais tratados durante 14 dias com azeite (n=4). No final do período de tratamento (ao 7º ou ao 14º dia), os ratos foram anestesiados com éter, sacrificados por decapitação e os rins foram removidos através de uma incisão abdominal na linha média.

O protocolo experimental utilizado nestes estudos reproduziu globalmente o das experiências em que avaliámos a actividade da DAAA em homogeneizados de túbulos renais isolados provenientes de ratos tratados com L-NAME (ver cap. V), com a excepção de que ao meio de incubação foram adicionados 120 µM de fosfato de piridoxal, como cofactor da DAAA.

Numa série de experiências, incubámos homogeneizados de túbulos provenientes de animais tratados durante 14 dias com CsA ou com azeite na presença de L-DOPA (100 µM) e de diferentes concentrações de fosfato de piridoxal (de 0 a 3000 µM).

Os valores de K_m e V_{max} para a DAAA foram calculados por análise de regressão linear; a quantidade do substrato descarboxilado (correspondente à quantidade de DA formada) por mg de proteína e por hora de incubação, foi correlacionada com o produto da divisão entre a quantidade total de DA formada e a de substrato adicionado ao meio (V vs V/S).

O conteúdo em proteínas das suspensões de túbulos renais (em mg de proteína/grama de tecido) foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

2.2.3. Avaliação da actividade renal da monoamina oxidase (MAO)

Em algumas experiências avaliámos a actividade da MAO nos tecidos renais. Utilizámos rins de animais tratados durante 7 dias com CsA ($n=4$) e rins de animais tratados durante 14 dias com CsA ($n=4$) ou com azeite ($n=4$). Preparámos homogeneizados de córtex renal com tampão fosfato (67 mM), a pH 7,2 e a 4°C, utilizando homogeneizadores de vidro (Duell-Kontes). As actividades das isoenzimas da MAO foram determinadas com substratos específicos para a MAO-A e para a MAO-B, a [^3H]5-hidroxitriptamina ([^3H]5-HT) e a [^{14}C]β-feniletilamina ([^{14}C]β-FEA), respectivamente. A reacção era realizada através da adição de 50 µl de homogeneizado a 50 µl de tampão fosfato (67 mM; pH 7,2) e [^3H]5-HT (75 a 3000 µM) ou [^{14}C]β-FEA (10-500 µM). Após vinte minutos de incubação a 37°C sob agitação constante, os tubos eram transferidos para um banho gelado e a reacção suspensa pela adição de 10 µl de HCl (3 M). Os produtos desaminados eram então extraídos com 500 µl de acetato de etilo e quantificados num contador de cintilação líquida, segundo técnica descrita por Jarrot (1971).

Os valores de K_m e V_{max} , correspondentes à metabolização da [^3H]5-HT e da [^{14}C]β-FEA nos homogeneizados de córtex renal, foram calculados por análise de regressão linear; correlacionou-se a quantidade do substrato adicionado ao meio de incubação com o produto da divisão entre a quantidade de substrato adicionado ao meio e a quantidade total de substrato metabolizado, por mg de proteína e por hora de incubação (S vs S/V).

O conteúdo em proteínas dos homogeneizados de rim (em mg de proteína por grama de tecido) foi determinado pelo método de Lowry e col. (1951), utilizando albumina humana como padrão.

2.2.4. Avaliação da actividade renal da COMT

Em alguns estudos avaliámos a actividade da COMT nos tecidos renais. Utilizámos rins de animais tratados durante 7 dias com CsA (n=4) e rins de animais tratados durante 14 dias com CsA (n=4) ou com azeite (n=4). Após remover a cápsula, os rins foram pesados e prepararam-se homogeneizados com tampão fosfato (0,5 M), a pH 7,8 e a 4°C, utilizando homogeneizadores de vidro (Duell-Kontes). A actividade da COMT foi determinada através da avaliação da capacidade dos homogeneizados para metilar a adrenalina em metanefrina. Pré-incubaram-se amostras de 0,5 ml de homogeneizado com 0,5 ml de tampão fosfato (0,5 M) durante 20 minutos; subsequentemente, as amostras foram incubadas durante 30 minutos com seis concentrações crescentes de adrenalina (de 5 a 500 μ M) na presença de um dador de grupos metilo (100 μ M de S-adenosilmetionina); o meio de incubação continha ainda 100 μ M de pargilina, 100 μ M de $MgCl_2$ e 1 mM de EGTA. A pré-incubação e a incubação decorreram a 37°C, na ausência de oxigénio, em condições de protecção da luz e sob agitação constante. No final da incubação, os tubos foram transferidos para um banho gelado e a reacção suspensa pela adição de 15 μ l de ácido perclórico (2 M). Centrifugaram-se depois as amostras (a 1098 rpm e a 4°C, durante 4 minutos), filtraram-se através de microfiltros Millipore (MF1) e utilizaram-se alíquotas de 500 μ l do sobrenadante do filtrado para a determinação da metanefrina.

Os valores de K_m e V_{max} , correspondentes à metabolização da adrenalina nos homogeneizados de córtex renal, foram calculados por análise de regressão linear; correlacionou-se a quantidade do substrato metilado (correspondente à quantidade de metanefrina formada) por mg de proteína e por hora de incubação, com o produto da divisão entre a quantidade de metanefrina formada e a de substrato adicionado ao meio (V vs V/S).

A determinação das proteínas nos homogeneizados foi efectuada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina humana como padrão.

2.2.5. Estudo cinético do transporte da dopamina recém-formada nos tecidos renais

2.2.5.1. Colheita dos tecidos

Em algumas experiências avaliámos os parâmetros cinéticos do efluxo da DA

e do DOPAC formados nos tecidos renais, em estudos *in vitro ex vivo*. Utilizámos rins de animais tratados durante 14 dias com CsA (n=4) ou com azeite (n=4). Ao 14º dia, os animais foram injectados por via intraperitoneal com L-DOPA (30 mg/kg) e sacrificados por decapitação 15 minutos depois da administração do precursor da DA. Os rins foram rapidamente removidos através de uma incisão abdominal na linha média e introduzidos em solução salina (NaCl 0,9%), arrefecida a 4°C. Subsequentemente, os rins foram colocados numa placa de vidro sobre gelo, os pólos renais removeram-se e dissecaram-se fatias de córtex com cerca de 2 mm de espessura e 60 mg de peso. Uma série de fatias de córtex foi imediatamente introduzida em recipientes contendo 2 ml de ácido perclórico (0,2 M), para a quantificação da DA e do DOPAC. Outra série de fatias de córtex foi colocada em câmaras individuais de perfusão. O processo de preparação, pesagem e colocação dos fragmentos nas câmaras de perfusão teve a duração de cerca de 15 minutos.

2.2.5.2. Perifusão dos tecidos

O protocolo experimental utilizado na perfusão das preparações reproduziu, globalmente, o descrito para os estudos *in vitro ex vivo* apresentados no capítulo III.

A metodologia utilizada na análise cinética do efluxo da DA e do DOPAC reproduziu também, globalmente, a descrita para os estudos *in vitro ex vivo* apresentados no capítulo III.

2.2.6. Transporte da L-DOPA em túbulos renais isolados

Em algumas experiências avaliámos o transporte da L-DOPA em túbulos renais isolados. Utilizámos rins de animais tratados durante 14 dias com CsA (n=4) ou com azeite (n=4) e rins de animais tratados durante 14 dias com azeite aos quais foi fornecida diariamente uma quantidade de comida idêntica à consumida pelos ratos tratados com CsA (n=4).

Os animais foram injectados com benserazida (10 mg/kg i.p.), anestesiados com éter e sacrificados por decapitação 30 minutos após a administração do inibidor da DAAA; de seguida, os rins foram removidos através de uma incisão abdominal na linha média. Depois de retirar as cápsulas renais, os rins foram cortados ao meio e introduzidos em soro salino (NaCl 0,9%), arrefecido em gelo. Posteriormente, a medula renal foi cuidadosamente dissecada com uma tesoura.

A preparação dos túbulos renais e a avaliação da sua viabilidade foi efectuada através da metodologia anteriormente descrita (avaliação da actividade da DAAA, 2.2.2).

Incubámos suspensões de túbulos (500 μ l) num meio de Hanks com a seguinte composição (em mM): NaCl 137, KCl 5, $MgSO_4$ 0,8, Na_2HPO_4 0,33, KH_2PO_4 0,44, $CaCl_2$ 0,25, $MgCl_2$ 1,0, Tris HCl 0,15 e butirato de sódio 1,0, pH=7,4. O meio de Hanks continha ainda 0,1 mM de pargilina e 1 μ M de tolcapone com o objectivo de inibir, respectivamente, a MAO e a COMT. A pré-incubação e a incubação dos túbulos foi efectuada em tubos de vidro sob agitação e gaseificação (95% O_2 e 5% CO_2) contínuas. Após a pré-incubação, os túbulos foram incubados durante 15 minutos com concentrações crescentes de L-DOPA (50 a 2000 μ M). No final da incubação, a reacção foi suspensa pela introdução dos tubos em gelo; de seguida, transferiram-se alíquotas de 300 μ l do meio de incubação, contendo os túbulos renais, para tubos de centrifuga Spin-X (Costar), procedendo-se à sua centrifugação (a 16500 rpm e 4°C, durante 4 minutos) através de filtros com 0,22 μ m; os túbulos foram lavados por duas vezes com 500 μ l de solução de Hanks, arrefecida em gelo. A extracção da L-DOPA presente nos túbulos renais foi efectuada pela adição de 500 μ l de ácido perclórico (0,2 M) aos tubos Spin-X, no final do segundo período de lavagem; procedeu-se depois a nova centrifugação.

Efectuaram-se experiências a 4°C e a 37°C. O componente não saturável do transporte da L-DOPA foi determinado nas experiências realizadas à temperatura de 4°C; o componente saturável foi calculado através do resultado da subtracção da quantidade da L-DOPA acumulada nas experiências efectuadas a 4°C à verificada nos estudos efectuados a 37°C. O conteúdo em proteínas das suspensões de túbulos renais foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina humana como padrão.

O V_{max} e K_m do componente saturável do transporte da L-DOPA foram calculados por análise de regressão linear; correlacionou-se a quantidade de substrato transportado por mg de proteína e por hora de incubação, com o produto da divisão entre a quantidade de substrato transportado e a concentração adicionada ao meio (V vs V/S). A constante de difusão foi determinada através da inclinação da recta de acumulação da L-DOPA, nas experiências efectuadas a 4°C (Neame e Richards, 1972).

2.3. Determinação das catecolaminas

A quantificação das catecolaminas e dos seus metabolitos na urina (DA, DOPAC e HVA), nos tecidos (DA e DOPAC), no plasma (L-DOPA, NA, AD e DOPEG) e no meio de perfusão (DA e DOPAC) foi efectuada por HPLC-ECD, como descrito nos capítulos anteriores. A quantificação da metanefrina nos homogeneizados e a da L-DOPA nos túbulos renais foi também determinada por HPLC-ECD; injectaram-se alíquotas de 50 μ l dos respectivos filtrados directamente no cromatógrafo. Os limites inferiores de detecção da L-DOPA, DA, AD, NA, DOPEG, DOPAC, HVA e metanefrina oscilaram entre 350 e 1000 fmol/50 μ l.

A determinação do Na⁺, do K⁺, da osmolalidade, da ureia e da creatinina na urina e no plasma foram efectuadas como descrito nos capítulos anteriores.

2.4. Análise estatística

Os resultados são apresentados em médias $\pm$ EPM para o número indicado de determinações. A análise dos resultados dentro de cada grupo foi efectuada através do teste de Friedman, por comparação entre a totalidade dos valores obtidos com os correspondentes à situação basal (últimos quatro dias do período de estabilização) ou por comparação entre os valores de interesse com os correspondentes do controlo. O significado estatístico da diferença entre um grupo controlo e vários grupos de experiências foi avaliado pelo teste de Tukey-Kramer (Sokal e Rohlf, 1981). A diferença entre duas médias foi avaliada pelo test *t* de Student para valores não emparelhados. Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

As taxas constantes de efluxo da DA e do DOPAC e a constante de difusão para a L-DOPA foram calculadas em médias geométricas, com intervalos de confiança para 95%.

2.5. Fármacos utilizados

O azeite de oliveira foi obtido na Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, E.U.A. A CsA, em solução oral, foi obtida a partir do fabricante (Sandoz, Basileia, Suíça). O tolcapone foi gentilmente oferecido pelo fabricante (Hoffmann-La Roche, Basileia, Suíça). Os restantes fármacos utilizados foram adquiridos como descrito nos capítulos anteriores.

3. Resultados

3.1. Estudos *in vivo*

A administração continuada de CsA (50 mg/kg s.c.) durante 14 dias condicionou o desenvolvimento de hipertensão arterial. Os valores basais médios da pressão sistólica e da pressão diastólica foram de, respectivamente, 127 ± 2 mmHg e 86 ± 1 mmHg. Ao 14º dia de administração da CsA, quer a pressão sistólica quer a diastólica tinham aumentado significativamente para, respectivamente, 183 ± 4 mmHg ($P < 0.01$) e 110 ± 3 mmHg ($P < 0.05$). Por outro lado, a frequência cardíaca que durante o período de estabilização era em média de 412 ± 1 pulsações/min, não foi significativamente modificada pelo tratamento com CsA (427 ± 41 pulsações/min, ao 14º dia).

A variação observada no peso corporal dos ratos tratados durante 14 dias com CsA (aumento de 8%) foi sobreponível à verificada no grupo de animais tratados com o veículo (aumento de 7,9%).

Durante o período de estabilização, a ingestão diária de líquidos e o volume urinário diário dos animais tratados com CsA foi em média de, respectivamente, $141,95 \pm 13,2$ ml/kg/dia e $65,24 \pm 10,35$ ml/kg/dia; ao longo dos 14 dias de administração do imunossupressor verificou-se uma redução na ingestão diária de líquidos (até 40%; $P < 0,05$) e no volume urinário diário (até 56%; $P < 0,01$) (figura 1). Nos animais tratados com azeite, pelo contrário, a ingestão diária de líquidos não variou significativamente e o volume urinário diário aumentou durante a segunda semana de tratamento (até 86%; $P < 0,01$) (figura 1).

A excreção urinária diária de Na^+ , K^+ e creatinina durante o período de estabilização foi em média de, respectivamente, $6,52 \pm 0,69$ mmol/kg/dia, $10,03 \pm 0,55$ mmol/kg/dia e $30,64 \pm 0,95$ mg/kg/dia. No grupo de ratos tratados com CsA, verificou-se a partir do 5º-6º dia de tratamento uma redução progressiva na excreção urinária de Na^+ (de 24 a 52%; $P < 0,01$) e de K^+ (de 32 a 53%; $P < 0,01$) (figura 2). Pelo contrário, a excreção urinária diária de Na^+ e de K^+ não variou significativamente ao longo do estudo no grupo de ratos tratados com o veículo.

A excreção urinária de creatinina no grupo de ratos tratados com CsA baixou ligeiramente durante a segunda semana de administração do imunossupressor (de 11 a 27%). Pelo contrário, nos animais tratados com o veículo da CsA a excreção urinária diária de creatinina aumentou ligeiramente durante a segunda semana do tratamento. As variações observadas na excreção urinária de creatinina

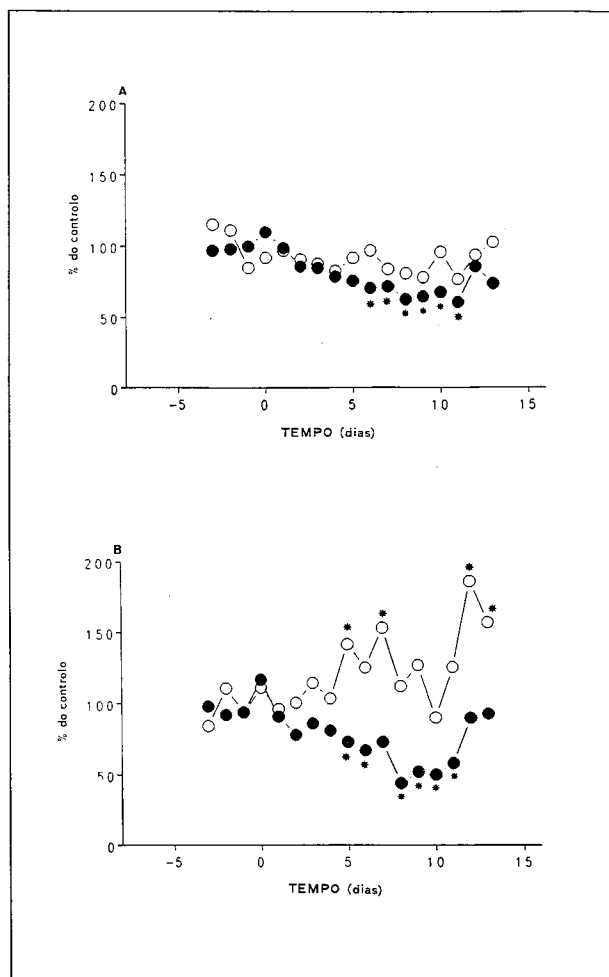


Figura 1. Evolução (A) da ingestão de líquidos e (B) do volume urinário de ratos durante os últimos quatro dias do período de estabilização (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de CsA (50 mg/kg/dia s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ●) ou azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ○). Os resultados são apresentados como percentagens de variação de cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; os valores do EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,05$).

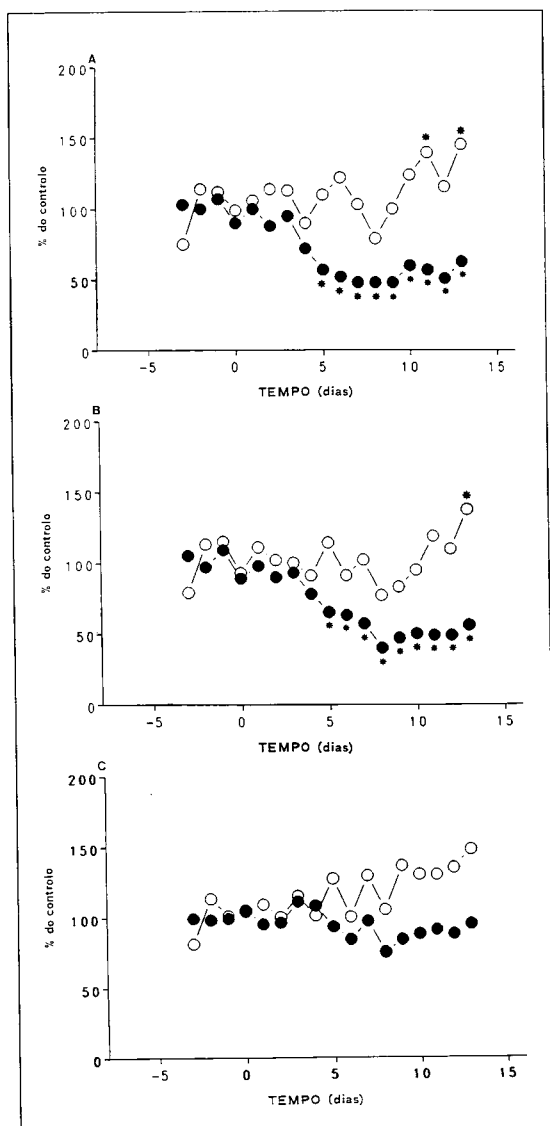


Figura 2. Evolução da excreção urinária diária de (A) sódio, (B) potássio e (C) creatinina, durante os últimos quatro dias do período de estabilização (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de CsA (50 mg/kg/dia s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ●) ou azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ○). Os resultados são apresentados como percentagens de variação de cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; os valores do EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,05$).

não atingiram, no entanto, significado estatístico, em qualquer dos grupos (figura 2).

Durante o período de estabilização, a osmolalidade urinária foi em média de $1409,9 \pm 142,6$ mOsm/kg H_2O . Nos animais tratados com a CsA, a osmolalidade urinária aumentou durante a segunda semana do tratamento (até 77%; $P < 0,01$). Pelo contrário, durante a segunda semana de tratamento com o azeite verificou-se uma redução ligeira na osmolalidade urinária, a qual não atingiu, no entanto, significado estatístico (figura 3).

A excreção urinária diária de DA, DOPAC e HVA durante os últimos quatro dias do período de estabilização foi em média de, respectivamente, $55,46 \pm 6,23$, $145,56 \pm 20,7$ e $739,7 \pm 78,7$ nmol/kg/dia. Nos ratos tratados com CsA, verificou-se uma redução progressiva na excreção urinária diária de DA (de 19 a 46%, $P < 0,05$), DOPAC (de 16 a 48%, $P < 0,05$) e HVA (de 18 a 42%, $P < 0,05$) a partir dos dias 5º-6º de administração do imunossupressor (figura 4). Pelo contrário, no grupo de ratos tratados com o veículo da CsA a excreção urinária de DA e DOPAC aumentou a partir do 5º dia de tratamento (DA até 60%, $P < 0,01$; DOPAC até 36%, $P < 0,05$)

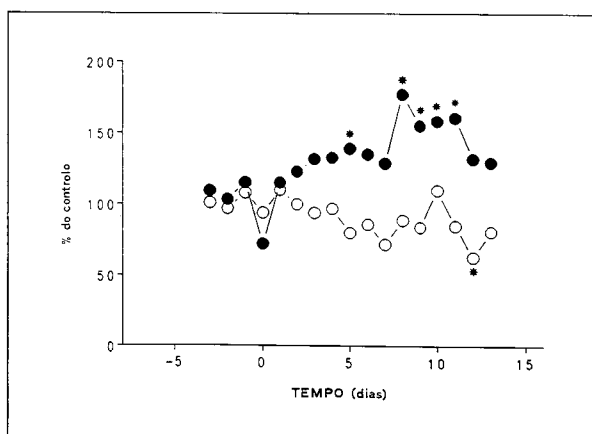


Figura 3. Evolução da osmolalidade urinária de ratos durante os últimos quatro dias do período de estabilização (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de CsA (50 mg/kg/dia s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ●) ou azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ○). Os resultados são apresentados como percentagens de variação de cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; os valores do EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,05$).

(figura 4); contudo, à semelhança do que se observou nos animais tratados com CsA, a excreção urinária do HVA baixou durante a segunda semana de tratamento, no grupo de animais tratados com o veículo (de 27 a 60%, $P < 0,01$) (figura 4).

Na tabela 1 apresentam-se os níveis plasmáticos de L-DOPA, NA, AD, DOPEG, Na^+ , K^+ , ureia, creatinina e a osmolalidade no plasma dos ratos tratados durante 7 e 14 dias com CsA e dos animais tratados durante 14 dias com azeite.

Verificou-se que a concentração plasmática da NA nos ratos tratados durante 14 dias com CsA era significativamente mais elevada do que no grupo de controlo. Pelo contrário, os níveis plasmáticos da L-DOPA eram mais baixos nos ratos tratados com CsA do que nos animais tratados com o veículo.

Não se evidenciaram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas da creatinina, K^+ ou na osmolalidade plasmática entre os três grupos de animais (animais tratados com CsA durante 7 e 14 dias e animais tratados com azeite durante 14 dias). A ureia plasmática era significativamente mais elevada nos ratos tratados durante 14 dias com CsA do que nos tratados com o veículo. A

	Controlo	CsA 7 dias	CsA 14 dias
L-DOPA (pmol/ml)	4,8±0,5	-----	2,6±0,5#
NA (pmol/ml)	3,0±0,7	-----	8,9±1,9*
AD (pmol/ml)	3,8±1,9	-----	5,7±2,6
DOPEG (pmol/ml)	5,5±0,5	-----	7,3±0,8
Na^+ (mM)	137±0,7	136±0,7	131±1*
K^+ (mM)	4,95±0,5	4,33±0,3	5,28±0,46
Ureia (mg/dl)	27,8±2,3	46±7,4	74,3±7,7**
Creatinina (mg/dl)	0,38±0,05	0,5±0,02	0,5±0,03
Osmolalidade (mOsm/kg H_2O)	286,3±9,4	291±2,5	292±4,5

Tabela 1. Osmolalidade plasmática e níveis plasmáticos de L-3,4-diidroxi-fenilalanina (L-DOPA), noradrenalina (NA), adrenalina (AD), 3,4-diidroxi-fenilglicol (DOPEG), Na^+ , K^+ , ureia e creatinina em animais tratados com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; durante 14 dias ($n=4$)) e em ratos tratados com CsA (50 mg/kg; s.c.) durante 7 ($n=4$) e 14 ($n=4$) dias. Os valores apresentados são médias ± EPM correspondentes a um número de 4 determinações em cada grupo. Significativamente diferente em comparação com os valores de controlo correspondentes utilizando o teste *t* de Student (* $P < 0,01$; ** $P < 0,02$; # $P < 0,05$).

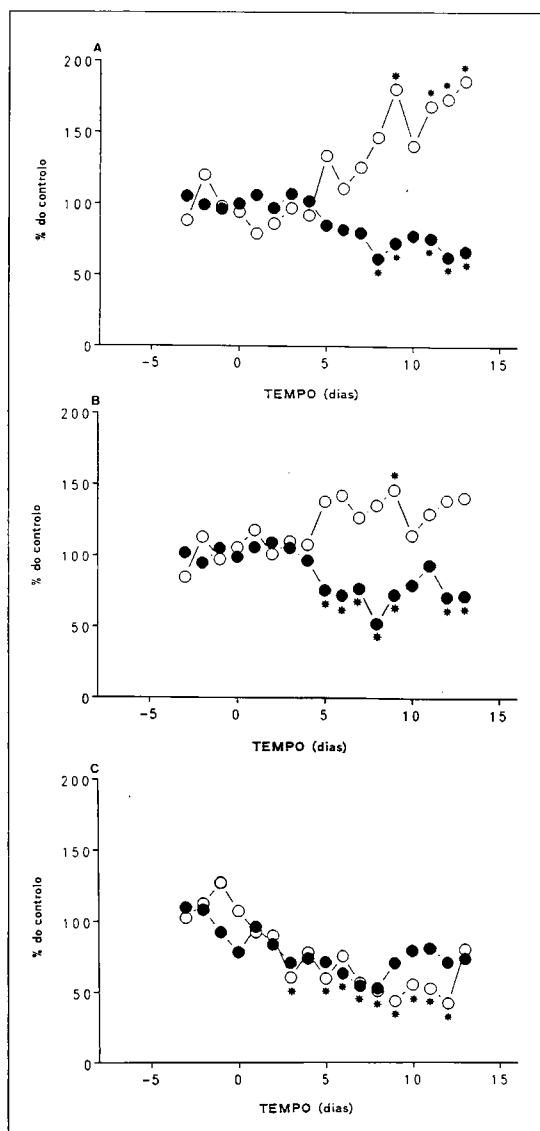


Figura 4. Evolução da excreção urinária diária de (A) DA (B) DOPAC e (C) HVA, durante os últimos quatro dias do período de estabilização (do dia -4 até ao dia 0) e durante a administração de CsA (50 mg/kg/dia s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ●) ou azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; do dia 0 até ao dia 14; ○). Os resultados são apresentados como percentagens de variação de cada valor individual em relação aos valores basais. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; os valores do EPM foram inferiores a 10% dos valores das médias correspondentes. Significativamente diferente em comparação com os valores basais correspondentes (* $P < 0,05$).

concentração plasmática de Na^+ , pelo contrário, era significativamente mais reduzida nos animais tratados durante 14 dias com CsA do que a observada quer no grupo de controlo quer nos ratos tratados durante 7 dias com o imunossupressor.

3.2. Estudos *in vitro*

3.2.1. Actividade da DAAA

Nos estudos efectuados com homogeneizados de túbulos renais isolados, a descarboxilação da L-DOPA em DA mostrou ser dependente da concentração de L-DOPA adicionada ao meio de incubação (50 a 20000 μM) (figura 5). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de V_{max} para a DAAA entre os ratos tratados com CsA e os de controlo, ou entre os ratos tratados com CsA durante 7 e 14 dias (tabela 2). Os valores de K_m para a DAAA foram também semelhantes nos três grupos de animais (tabela 2). Nas experiências efectuadas com concentrações crescentes de fosfato de piridoxal no meio de

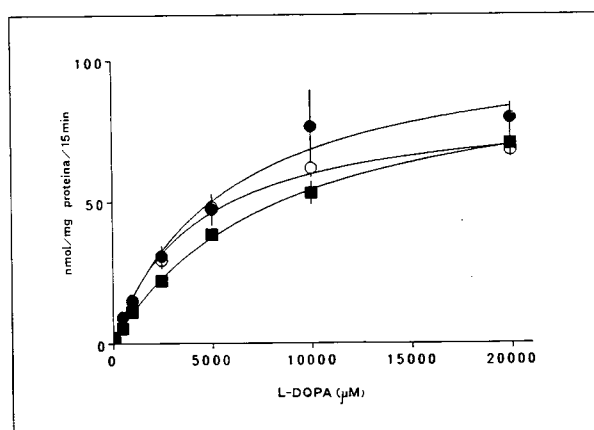


Figura 5. Curvas de saturação da descarboxilase dos ácidos aminados aromáticos (DAAA) em homogeneizados de túbulos de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○) e de ratos tratados com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.) durante 7 (●) e 14 dias (■). A actividade da DAAA está representada em coordenadas cartesianas como a velocidade de formação da DA (em nmol/mg de proteína/15 minutos) vs a concentração de L-DOPA (μM) adicionada ao meio. Cada ponto representa a média de 4 a 6 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

	Controlo	CsA 7 dias	CsA 14 dias
V_{max}	305±24	326±91	316±13
K_m	3580±630	3338±1466	5892±779

Tabela 2. Parâmetros cinéticos (V_{max} , em nmol/mg de proteína/hora; K_m , em μM) da actividade da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA) em homogeneizados de túbulos renais de ratos tratados com CsA (50 mg/kg) durante 7 (n=4) e 14 (n=4) dias e de animais tratados com o veículo da CsA (0,5 ml/kg/dia, s.c.; n=4) durante 14 dias. Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM correspondentes 4 experiências por grupo.

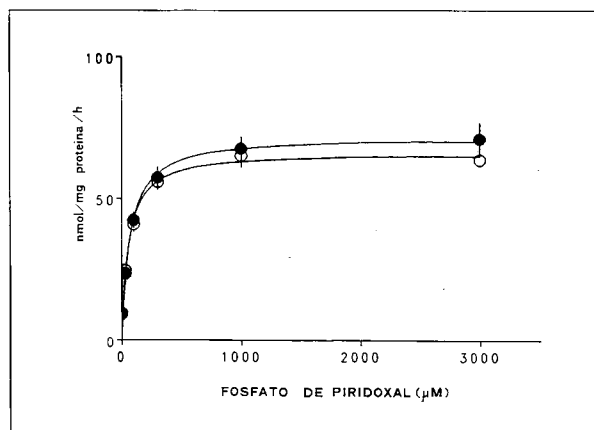


Figura 6. Curvas da actividade da descarboxilase dos ácidos aminados aromáticos (DAAA) em homogeneizados de túbulos de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○) e com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.; ●). A actividade da DAAA está representada em coordenadas cartesianas como a velocidade de formação da DA (em nmol/mg de proteína/hora) na presença de 100 μM de L-DOPA Vs a concentração de fosfato de piridoxal (μM) adicionada ao meio. Cada ponto representa a média de 4 a 6 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

incubação, a descarboxilação da L-DOPA em DA nos homogeneizados de túbulos renais provenientes de ratos tratados com CsA não foi diferente da observada no grupo de controlo (figura 6).

3.2.2. Actividade da MAO

Na tabela 3 apresentam-se os parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_m) das duas formas de MAO, tipos A e B, nos homogeneizados de córtex renal de animais tratados com CsA durante 7 e 14 dias e de ratos tratados com azeite durante 14 dias.

Os valores, quer de $V_{\max}$ quer de K_m para a [^3H]5-HT (MAO-A), foram semelhantes nos três grupos de experiências. Não se verificaram também diferenças significativas nos valores de $V_{\max}$ ou de K_m para a [^{14}C]β-FEA (MAO-B) entre as experiências efectuadas com tecidos provenientes de animais tratados com CsA e com azeite (figura 7).

3.2.3. Actividade da COMT

Verificou-se que a actividade ($V_{\max}$) da COMT nos tecidos renais dos animais tratados durante 7 e 14 dias com CsA era significativamente mais elevada do que a observada nos rins dos ratos tratados durante 14 dias com o veículo (tabela 4 e figura 8). Não se evidenciaram diferenças nos valores de $V_{\max}$ para a COMT entre os animais tratados com CsA durante 7 e 14 dias. Os valores de K_m para a COMT nos tecidos renais não foram diferentes entre os três grupos de animais.

	MAO-A		MAO-B	
	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m
Controlo (n=4)	44,7±1	1254±26	23,5±1	42±6
CsA 7 dias (n=4)	41,2±1,2	1217±11	24,6±1	42±3
CsA 14 dias (n=4)	43,2±2	1217±24	22,7±1	40±4

Tabela 3. Parâmetros cinéticos da MAO-A e da MAO-B ($V_{\max}$, em nmol/mg de proteína/hora; K_m , em μM) em homogeneizados de córtex renal de ratos tratados durante 7 (n=4) e 14 (n=4) dias com CsA (50 mg/kg sc) e de animais tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; n=4). Os valores apresentados são médias ± EPM correspondentes a 4 experiências por grupo.

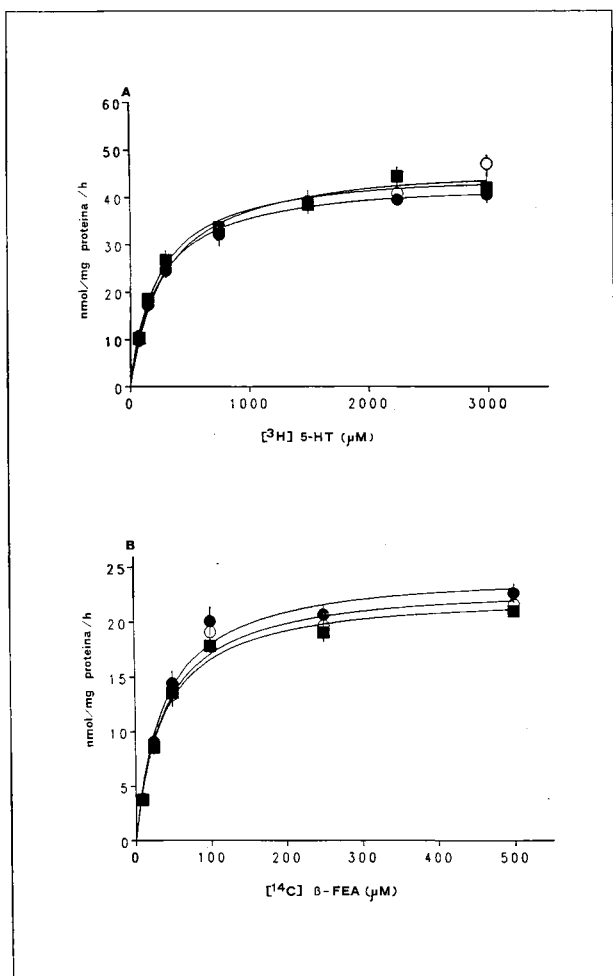


Figura 7. Actividade da MAO em homogeneizados de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○) e de ratos tratados com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.) durante 7 (●) e 14 dias (■). A actividade da enzima foi determinada através da desaminação da [³H]5-HT e da [¹⁴C]β-FEA, como substratos específicos para, respectivamente, a (A) MAO-A e a (B) MAO-B, e está expressa em nmol de substrato desaminado por mg de proteína e por hora de incubação. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

	V_{max}	k_m
Controlo (n=4)	2282±230	22,3±1,5
CsA 7 dias (n=4)	3778±377*	24,1±1,5
CsA 14 dias (n=4)	3791±539*	22,8±1,3

Tabela 4. Parâmetros cinéticos da COMT (V_{max} , em pmol/mg de proteína/hora; K_m , em μM) em homogeneizados de rins de ratos tratados durante 7 (n=4) e 14 (n=4) dias com CsA (50 mg/kg, s.c.) e de animais tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; n=4). Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM correspondentes a 4 experiências por grupo. Significativamente diferente em comparação com os valores correspondentes do controlo (* $P<0,05$).

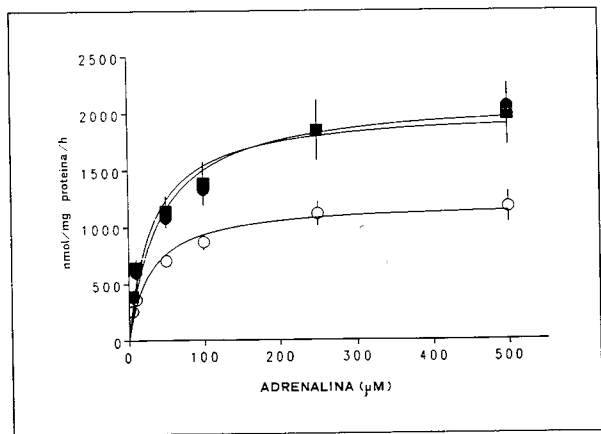


Figura 8. Actividade da COMT em homogeneizados de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○) e de ratos tratados com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.) durante 7 (●) e 14 dias (■). A actividade da enzima foi determinada através da metilação da adrenalina em metanefrina e está expressa em pmol de substrato metabolizado por mg de proteína e por hora de incubação. Cada ponto representa a média de 4 a 5 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

3.2.4. Avaliação da cinética do efluxo da DA e do DOPAC formados nos tecidos renais

Como se pode verificar na tabela 5, a acumulação da DA e do DOPAC nos

	DA	DOPAC	DOPAC/DA
Antes da perfusão			
CsA	315±47*	143±28*	0,45±0,05*
Controlo	138±23	33±5	0,24±0,02
Após a perfusão			
CsA	109±16*	42±5*	0,39±0,01
Controlo	41±3	11±1	0,26±0,02

Tabela 5. Acumulação tecidual (em nmol/g) da DA e do DOPAC e proporção DOPAC/DA nas fatias de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com CsA (50 mg/kg, s.c.) ou com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.) e injectados com L-DOPA (30 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do sacrifício. Os resultados dizem respeito aos teores verificados nos tecidos renais imediatamente após o sacrifício e no final da perfusão dos tecidos. Apresentam-se as médias± EPM relativas a 4 experiências por grupo. Significativamente diferente do valor observado nos tecidos renais do controlo (* $P<0,01$).

tecidos renais dos ratos tratados com CsA durante 14 dias e injectados com 30 mg/kg de L-DOPA por via i.p. foram duas vezes e meia e quatro vezes superiores, respectivamente, à acumulação da amina e do metabolito desaminado nos tecidos renais dos animais tratados durante 14 dias com o azeite.

Esta diferença verificou-se não só nos tecidos renais colhidos imediatamente após o sacrifício dos animais, mas também nos tecidos colhidos no final das perfusões. A relação DOPAC/DA nos tecidos renais foi também mais elevada nos animais tratados com CsA ($P<0,01$) do que no grupo de controlo.

Os níveis da DA e do DOPAC no efluente dos tecidos renais baixaram progressivamente ao longo do período de perfusão e reflectiram a acumulação tecidual respectiva, da amina e do metabolito desaminado (figura 9). A inclinação das rectas de queda da DA mostrou ser semelhante à do DOPAC nas experiências efectuadas com tecidos renais provenientes de ratos tratados, quer com CsA quer com azeite. Por outro lado, a constante de efluxo (k) do DOPAC mostrou ser cerca de duas vezes superior à da DA nas duas séries de experiências. Não se evidenciaram diferenças significativas na inclinação das rectas de queda ou nos valores das constantes de efluxo, quer para a DA quer para o DOPAC, entre os

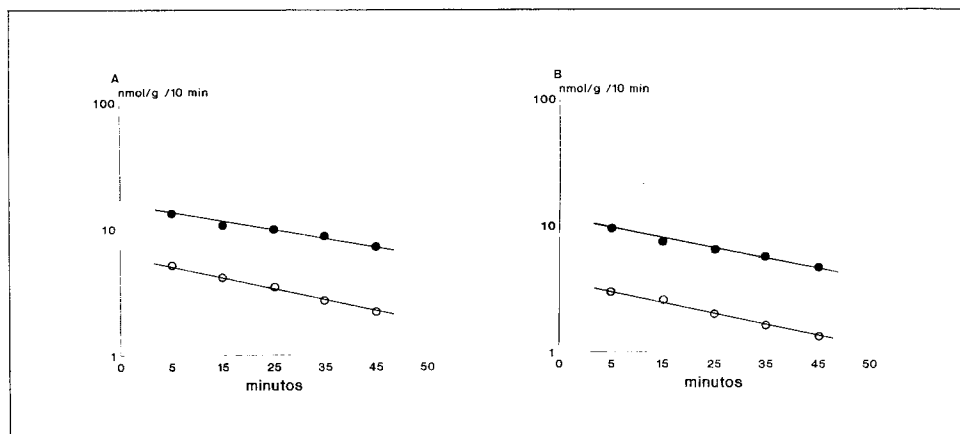


Figura 9. Níveis (em nmol/g/10 min) (A) da DA e do (B) DOPAC nas colheitas de 10 minutos do líquido de perfusão das fatias de córtex renal obtidas de animais injectados com L-DOPA (30 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do sacrifício. As curvas de efluxo dizem respeito a estudos efectuados com tecidos renais provenientes de animais tratados durante 14 dias com CsA (50 mg/kg/dia, s.c.; ●) ou com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; o E.P.M. foi inferior a 10% dos valores das médias correspondentes. Os valores da relação entre os pontos foram, nos ratos tratados com CsA: DA, $r=0,9879$, $n=20$; DOPAC, $r=0,9907$, $n=20$; no controlo: DA, $r=0,9988$, $n=20$; DOPAC, $r=0,9982$, $n=20$.

	DA	DOPAC
CsA	0,0064 (0,0042; 0,0096)	0,0106 (0,0057; 0,0197)*
Controlo	0,0058 (0,0046; 0,0073)	0,0137 (0,0086; 0,0218)*

Tabela 6. Constantes de efluxo (k ; /min) da DA e do DOPAC no efluente de fatias de córtex renal de ratos tratados durante 14 dias com CsA (50 mg/kg, s.c.) ou com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.) e injectados com L-DOPA (30 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do sacrifício. Os resultados apresentados são médias geométricas com intervalos de confiança para 95%, relativas a 4 experiências por grupo.

estudos efectuados com tecidos renais provenientes de animais tratados com CsA e com o veículo (tabela 6). A relação DOPAC/DA no meio de perfusão dos tecidos renais provenientes de animais tratados com CsA não foi também diferente da verificada com tecidos de animais tratados com o veículo (figura 10).

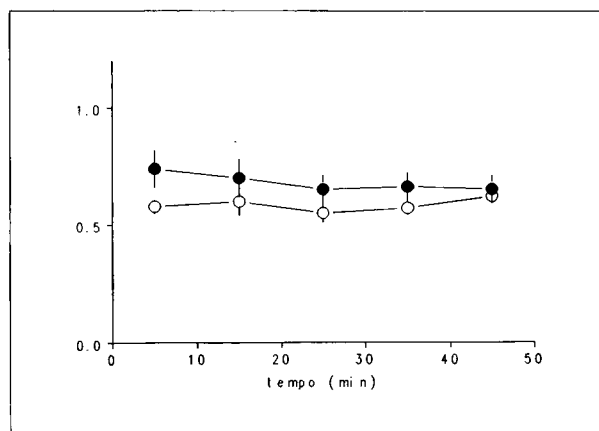


Figura 10. Relação DOPAC/DA nas colheitas de 10 minutos do líquido de perfusão dos tecidos de córtex renal de animais injectados com L-DOPA (30 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes do sacrifício. Os resultados respeitam a estudos efectuados com ratos tratados durante 14 dias com CsA (50 mg/kg/dia s.c.; ●) ou com o veículo (0,5 ml/kg/dia, s.c.; ○). Cada ponto representa a média de 4 experiências por grupo; as linhas verticais mostram o E.P.M.

3.2.5. Avaliação do transporte da L-DOPA em túbulos isolados

Nas experiências efectuadas a 4°C com os três grupos de ratos, a acumulação da L-DOPA nos túbulos renais foi dependente da concentração do substrato adicionada ao meio de incubação. Nas experiências efectuadas a 37°C, a acumulação da L-DOPA nos túbulos renais foi superior à observada nas experiências efectuadas a 4°C e evidenciou uma tendência para a saturação. O componente saturável foi calculado através da diferença entre a quantidade de L-DOPA acumulada nas experiências a 37°C e a observada nos estudos a 4°C.

O V_{max} para o componente saturável do transporte da L-DOPA nos túbulos renais dos ratos tratados com CsA foi significativamente mais elevado do que o observado nos estudos com túbulos renais de animais tratados com o veículo, com e sem dieta restritiva (figura 11 e tabela 7).

Não se verificaram diferenças significativas nos valores de K_m para o componente saturável da captação da L-DOPA entre os estudos efectuados com túbulos renais de animais tratados com CsA e com o veículo. As constantes de difusão para o transporte da L-DOPA foram também semelhantes nas três séries de experiências.

	V_{max}	K_m	Constante de difusão
Controlo	6,39±0,57	272 (249; 298)	0,0012 (0,001; 0,0016)
Controlo + dieta restritiva	7,32±0,18	215 (166; 279)	0,0012 (0,001; 0,0014)
CsA 14 dias	12,37±0,53*	219 (166; 299)	0,0012 (0,009; 0,0015)

Tabela 7. Parâmetros cinéticos (V_{max} , em nmol/mg de proteína/hora; K_m , em μM ; constante de difusão, μmol) relativos ao transporte da L-DOPA em túbulos renais isolados de ratos tratados com CsA (50 mg/kg, s.c.) durante 14 dias (n=4), de ratos tratados com o veículo da CsA (0,5 ml/kg/dia, s.c.) durante 14 dias (n=4) e de ratos tratados com o veículo da CsA (0,5 ml/kg/dia, s.c.) durante 14 dias e submetidos a dieta restritiva. Os valores apresentados são médias $\pm$ EPM correspondentes a 4 experiências por grupo. Significativamente diferente em comparação com os valores correspondentes observados nos estudos efectuados com o veículo (* $P<0,01$).

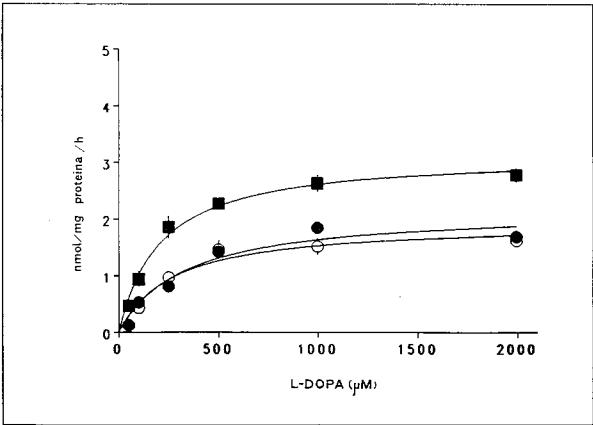


Figura 11. Curvas respeitantes ao componente saturável do transporte da L-DOPA em suspensões de túbulos renais isolados provenientes de ratos tratados durante 14 dias com azeite (0,5 ml/kg/dia, s.c.), com (●) e sem (○) dieta restritiva e de animais tratados durante 14 dias com CsA (50 mg/kg/dia s.c.; ■). O componente saturável foi calculado através do resultado da subtracção da quantidade de L-DOPA acumulada nas experiências efectuadas a 4° C à verificada nos estudos efectuados a 37° C. Cada ponto representa a média de 4 determinações por grupo; as linhas verticais mostram o EPM.

4. Comentários

Os resultados dos estudos apresentados neste capítulo revelam que a administração continuada de CsA condicionou uma redução na excreção urinária de sódio e o desenvolvimento de hipertensão arterial. A hipertensão resultante da administração da CsA acompanhou-se de uma redução na excreção urinária de DA, aparentemente em consequência de uma redução no aporte do seu precursor (L-DOPA) às células tubulares renais. A administração da CsA não modificou a actividade da enzima responsável pela formação da DA nas células tubulares renais (DAAA), nem as características cinéticas do efluxo da DA recém-sintetizada nos tecidos renais. É interessante verificar, no entanto, que a redução na excreção urinária de DA, observada nos animais tratados com CsA, se associou a uma maior capacidade dos tecidos renais destes ratos para sintetizar a amina quando a L-DOPA exógena foi administrada. Este fenómeno parece resultar de uma actividade mais elevada do sistema de transporte para a L-DOPA ao nível das células tubulares renais, nos animais tratados com CsA.

Verificou-se uma redução paralela na excreção urinária da DA e do DOPAC a partir dos dias 5^o-6^o de administração da CsA. Os teores urinários do HVA baixaram também durante a 2^a semana de administração do imunossupressor. Estes resultados sugerem uma redução na síntese da DA durante a administração da CsA e favorecem a possibilidade de que essa redução se tenha verificado não só a nível renal, mas também a nível extrarenal. De facto, supõe-se que o HVA urinário resulta sobretudo da metabolização da DA formada em tecidos extrarenais (Kopin, 1985), enquanto que uma quantidade considerável do DOPAC urinário parece ter origem na desaminação da DA de síntese renal (Wolfowitz e col., 1993; Vieira-Coelho e col., 1994). Nos animais tratados com o veículo da CsA evidenciou-se uma redução na excreção urinária do HVA de dimensão semelhante à observada nos ratos tratados com CsA, mas dissociada de qualquer redução na excreção urinária diária, quer de DA quer de DOPAC; pelo contrário, verificou-se um aumento na excreção urinária de DA e de DOPAC durante a 2^a semana de tratamento com o veículo da CsA. Estes resultados vêm reforçar a conclusão de que os efeitos da CsA sobre a excreção urinária da DA e do seu metabolito desaminado resultaram de processos diferentes dos responsáveis pelas modificações ao nível da excreção urinária do HVA; estes resultados sugerem ainda que os efeitos da CsA sobre a excreção urinária do HVA podem ter resultado de acções mediadas pelo seu veículo.

Verificou-se que os teores circulantes da L-DOPA nos animais tratados com CsA eram inferiores aos observados nos ratos tratados com o veículo. Este achado sugere que a redução na excreção urinária de DA e de DOPAC, durante a segunda semana de administração da CsA, pode ter resultado de uma redução no aporte do precursor da DA aos tecidos renais desses animais. De facto, como foi referido nos capítulos anteriores, estudos recentes têm evidenciado que uma quantidade substancial da L-DOPA plasmática é removida pelos rins e que pelo menos de 80% da DA urinária deriva da L-DOPA plasmática. A L-DOPA plasmática parece ter origem, sobretudo, em compartimentos neuronais simpáticos, de tal forma que os seus níveis plasmáticos se correlacionam com os da NA e do DOPEG (Goldstein e col., 1991; Eisenhofer e col., 1989). Admitindo que os níveis plasmáticos da NA reflectem a libertação desta catecolamina a partir dos neurónios simpáticos, é possível concluir que os animais tratados com CsA evidenciavam um aumento do tono simpático. A hiperactividade simpática, resultante da administração da CsA, está de acordo com os resultados de outros autores (Murray e Paller, 1986) e fazia prever um aumento concomitante na libertação plasmática da L-DOPA; no entanto, algo inesperadamente, verificou-se uma correlação inversa entre os teores plasmáticos da NA e da L-DOPA nos animais tratados com CsA. Os resultados destes estudos não permitem concluir sobre a origem do fenómeno responsável pela redução dos níveis plasmáticos da L-DOPA nos animais tratados com CsA; como hipóteses de explicação poderão ser sugeridas, no entanto, interferências potenciais da CsA sobre a via de síntese das catecolaminas nos neurónios simpáticos, ou ao nível dos processos envolvidos na libertação da L-DOPA a partir de tecidos extraneuronais, tais como o parênquima pulmonar, ou as células cromafins do intestino (Goldstein e col., 1991).

A redução na excreção urinária de DA durante o período de tratamento com CsA poderia ter resultado de uma redução no transporte da amina, do compartimento de síntese para o lúmen tubular. Contra essa hipótese, no entanto, está o aumento do tono simpático evidenciado pelos ratos tratados com CsA. De facto, como foi referido no capítulo anterior, a activação dos adrenoreceptores tubulares, quer α_1 quer α_2 , associou-se a um aumento no transporte da DA em fatias de rim de Rato, cujo mecanismo subjacente mostrou envolver a estimulação do trocador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (Soares-da-Silva, 1993c); como a NA circulante parece particularmente activa sobre os adrenoreceptores α_1 , é legítimo admitir que este mecanismo tenha facilitado o transporte da DA para o lúmen tubular.

Para estudar o efeito da CsA sobre o processo de efluxo da DA recém-

-formada nos tecidos renais efectuaram-se experiências *in vitro ex vivo* com tecidos renais de animais tratados com CsA e com veículo, aos quais foi administrada a L-DOPA antes do sacrifício. Nesta série de estudos, não se evidenciaram diferenças significativas nos parâmetros do efluxo, quer da DA quer do DOPAC, entre os dois grupos de ratos. No entanto, algo inesperadamente, verificámos que os níveis da DA e do DOPAC nos tecidos e no líquido de perfusão eram cerca de 3 a 4 vezes mais elevados nos ratos tratados com CsA do que nos animais tratados com o veículo.

Poder-se-ia explicar este fenómeno por modificações condicionadas pela CsA ao nível da actividade específica da enzima responsável pela síntese da DA no citoplasma das células tubulares renais, a DAAA. Contudo, a actividade da DAAA em túbulos proximais isolados provenientes de animais tratados com CsA não mostrou ser diferente da observada nos respectivos animais de controlo.

Outra conclusão que pode ser retirada destes estudos é a de que a maior acumulação de DA nos tecidos renais dos ratos tratados com CsA não resultou de uma redução na metabolização desaminativa da amina recém-formada; de facto, a actividade específica das duas formas de MAO (tipos A e B) nos tecidos renais dos ratos tratados com CsA mostrou ser idêntica à observada no grupo de controlo.

Verificou-se um aumento significativo na actividade da COMT nos tecidos renais dos animais tratados durante 7 e 14 dias com CsA. Este achado traduz uma maior capacidade dos tecidos renais dos ratos tratados com o imunossupressor para metilar a DA recém-formada, mas não permite também explicar a maior acumulação de DA nos tecidos renais dos ratos tratados com CsA, quando a L-DOPA exógena foi administrada. De facto, tem-se evidenciado que a importância da metilação na metabolização da DA de síntese renal é muito inferior à da desaminação (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993); por outro lado, a intensificação do processo de metilação da DA deveria traduzir-se por uma redução e não por um aumento dos níveis da DA, quer nos tecidos quer no efluente. O aumento na actividade da COMT nos rins dos animais tratados com CsA constitui, por outro lado, um argumento importante a favor de que a redução observada na excreção urinária do HVA não resultou de uma diminuição da capacidade do rim para metilar a DA.

Outra hipótese alternativa para explicar a maior acumulação de DA nos tecidos renais dos ratos tratados com CsA, assenta num aumento da capacidade para o transporte da L-DOPA, ao nível das células tubulares renais desses animais. Os resultados dos estudos em que foi avaliado o transporte da

L-DOPA em túbulos renais isolados revelaram que a L-DOPA é transportada através de mecanismos saturáveis e não saturáveis. A actividade máxima do transporte da L-DOPA (V_{max}) através do componente saturável mostrou ser significativamente mais elevada nos túbulos renais dos animais tratados durante 14 dias com CsA do que nos animais tratados com o veículo. Por outro lado, quer a afinidade do transportador para o substrato (K_m) quer a constante de difusão para a L-DOPA revelaram ser semelhantes entre os animais tratados com CsA e os de controlo. Estes resultados revelam uma maior actividade do transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares renais dos ratos tratados com CsA.

É conhecida a capacidade da CsA para interactuar com as membranas biológicas e estão bem documentadas na literatura interferências condicionadas por este imunossupressor sobre sistemas de transporte de membrana (Whiting e col., 1986). O transporte tubular da L-DOPA mostrou ser um processo dependente de energia, sensível ao transporte de sódio, regulado pela actividade da ATPase Na^+-K^+ da membrana basolateral (ver cap. IIC) e passível de inibição pela proteína cínase C (Soares-da-Silva, 1993a). Como a CsA mostrou inibir a acumulação da proteína cínase C ao nível das células tubulares renais (Walker e col., 1989), é legítimo admitir que o aumento na captação da L-DOPA pelas células tubulares renais dos ratos tratados com CsA possa ter resultado de um aumento na actividade da ATPase Na^+-K^+ , por esse mecanismo. Contudo, se o aumento na capacidade de transporte para a L-DOPA nos túbulos renais dos animais tratados com CsA resultasse de um efeito directo da CsA, seria de prever que esse fenómeno se traduzisse por um aumento na excreção urinária de DA, o que não se verificou; pelo contrário, a excreção urinária diária de DA, nos animais tratados com CsA, baixou progressivamente ao longo do período de tratamento. Por esse motivo, é legítimo admitir que o aumento na captação da L-DOPA possa ter resultado, em alternativa, de um mecanismo de compensação desenvolvido como resposta à redução no aporte do precursor da DA às células tubulares renais.

A administração continuada de CsA condicionou uma redução significativa na excreção urinária de sódio, a partir do 5º dia de administração do imunossupressor. Este efeito da CsA sobre a excreção urinária de sódio está de acordo com as descrições da literatura que têm documentado a associação entre toxicidade pela CsA e antinatriurese, quer no Homem quer no Rato (Kaskel, 1987; Petric e col., 1990; Dieperink e col., 1988). A antinatriurese que acompanha a nefrotoxicidade pela CsA parece resultar de uma redução na carga filtrada de sódio e de um aumento na sua reabsorção, sobretudo a nível proximal. A fisiopatologia

subjacente a este fenómeno não é ainda conhecida com exactidão, embora tenham sido avançados, como hipóteses de explicação, efeitos resultantes de acções hemodinâmicas secundárias à produção de mediadores vasoconstritores, com aumento na fracção de filtração e na pressão oncótica peritubular. Os estudos apresentados neste capítulo evidenciaram um paralelismo entre a redução na excreção urinária de sódio e DA nos animais tratados com CsA e permitem sugerir que a redução na síntese renal de DA, que se verificou durante a administração da CsA, pode ter representado um factor adicional implicado no desenvolvimento da tendência antinatriurética observada. O facto de em estudos anteriores, no Homem e no animal de experiência, se ter evidenciado que a vasoconstrição renal e a antinatriurese que acompanham a administração da CsA podem ser antagonizadas através do uso da DA ou de agonistas selectivos para os receptores da DA (Conte e col., 1988; Brooks e col., 1990), permite reforçar essa sugestão.

Verificou-se uma redução na excreção urinária de potássio e um aumento na osmolalidade urinária nos ratos tratados com CsA. Estes resultados estão de acordo com as descrições da literatura que têm associado à nefrotoxicidade pela CsA uma tendência para a retenção de potássio, por incapacidade de secreção tubular distal (Battle e col., 1986) e disfunções na capacidade de diluição tubular, sem perda da capacidade de concentração (Kaskel e col., 1987; Gnutzman e col., 1986).

Outra observação diz respeito à redução na concentração plasmática de Na^+ dos animais tratados durante 14 dias com CsA. Embora não dispondo de uma explicação definitiva para a origem deste fenómeno, pode avançar-se, de acordo com as descrições que atribuem à CsA interferências sobre a capacidade de diluição tubular (Gnutzman e col., 1986), que o aumento na reabsorção tubular proximal, induzido pelo imunossupressor, possa ter reduzido o aporte de fluido tubular aos segmentos diluidores e, independentemente dos níveis de vasopressina, limitado o potencial para a geração de água livre; o facto de estes animais terem evidenciado um aumento desproporcionado nos níveis plasmáticos da ureia, em relação aos da creatinina, está de acordo com esta interpretação. Tem-se verificado, no entanto, que a libertação da hormona antidiurética pode ser de importância fundamental para justificar a hiponatremia que acompanha as situações que cursam com redução do aporte de fluido aos segmentos diluidores do nefrónio, tais como a insuficiência cardíaca congestiva, a insuficiência adrenal e a insuficiência hepática; de facto, os antagonistas da vasopressina mostraram reverter os defeitos na excreção de água livre observados em modelos experimen-

tais destes distúrbios (Rose, 1994). Por esse motivo, é legítimo admitir que a libertação inapropriada e/ou a potenciação dos efeitos tubulares da vasopressina possam ter contribuído para o desenvolvimento da hiponatremia observada nestes animais. Neste contexto, as descrições que atribuem à DA um papel tónico inibitório, não só sobre a libertação hipofisária da hormona antidiurética (Chiodera e col., 1986), mas também sobre as suas acções renais (Muto e col., 1985), permitem especular acerca do envolvimento, na instalação deste distúrbio, da redução observada na síntese de DA.

Em conclusão, os resultados dos estudos apresentados neste capítulo evidenciam:

- 1 - que a hipertensão que resulta da administração continuada de CsA se acompanha de uma redução na excreção urinária de DA, aparentemente em consequência de uma redução no aporte da L-DOPA aos tecidos renais;
- 2 - que a administração da CsA não condiciona modificações na actividade das enzimas responsáveis pela síntese (DAAA) e pela desaminação (MAO-A e B) da DA endógena de síntese renal.
- 3 - que a administração da CsA condiciona um aumento na actividade da enzima responsável pela metilação (COMT) da DA nos tecidos renais.
- 4 - que a maior capacidade dos tecidos renais dos animais tratados com CsA para sintetizar DA a partir da L-DOPA exógena resulta, aparentemente, de uma maior actividade do transporte de membrana para a L-DOPA.

VII - SISTEMA DOPAMINÉRGICO RENAL E TRANSPLANTE RENAL. ESTUDO DO PERFIL DE EXCREÇÃO URINÁRIA DE DOPAMINA E DOS SEUS METABOLITOS NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE RENAL IMEDIATO

1. Introdução

Como foi referido nos capítulos anteriores, estudos efectuados, quer no Homem quer no animal de experiência, evidenciaram que pelo menos 80% da DA urinária é formada nas células dos túbulos contornados proximais a partir da descarboxilação da L-DOPA, presente no filtrado tubular ou no sangue que perfunde os capilares peritubulares (Wolfovitz, 1993; Grossman, 1992). Por este motivo os níveis urinários da DA têm sido utilizados como parâmetro para avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal. No entanto, verificou-se que uma quantidade importante da DA recém-formada nos tecidos renais, em condições experimentais *in vitro*, é rapidamente metabolizada por desaminação, num processo que assume maior dimensão no rim humano e não é modificado pela desnervação simpática do rim (ver cap. II e III). Nestas condições, verificou-se ainda que uma quantidade menos importante da DA formada nos tecidos renais é convertida em HVA, por acção da MAO e da COMT, e que uma parcela ainda menor pode ser metilada em 3-MT (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993). Outros estudos vieram reforçar a importância atribuída à desaminação na metabolização da DA de síntese renal, ao sugerir que a amina formada nos tecidos renais é significativamente convertida em DOPAC, antes de ter acesso à circulação (Vieira-Coelho e col., 1994). Os estudos *in vivo* apresentados nos capítulos anteriores, por outro lado, vieram corroborar a importância da desaminação na metabolização da DA recém-formada nos tecidos renais; de facto, ao contrário do que se observou em relação aos outros metabolitos da DA, verificou-se que a excreção urinária do DOPAC variou sempre em paralelo com a excreção urinária da amina (ver cap. IV, V e VI).

Na medida em que os níveis urinários do DOPAC são, quer no Homem quer no Rato, significativamente mais elevados do que os da DA, as evidências que

atribuem à desaminação um papel de relevo na inactivação da DA formada nos tecidos renais permitem sugerir que a quantificação do DOPAC urinário possa representar um parâmetro útil para avaliar com mais rigor a actividade do sistema dopaminérgico renal.

Como a DA de síntese renal tem sobretudo origem nas células tubulares renais, é legítimo admitir que o potencial para sua formação seja limitado pela dimensão do compartimento de síntese, ou seja, pelo número de unidades funcionais tubulares que dispõem de DAAA.

O objectivo do trabalho apresentado neste capítulo foi o de estudar o perfil de excreção urinária da L-DOPA, DA e dos seus metabolitos desaminado (DOPAC), metilado (3-MT) e desaminado+metilado (HVA), durante a recuperação funcional de rins únicos desnervados, em doentes submetidos a transplante renal (nos 12 primeiros dias do pós-transplante) e colher indicações sobre os parâmetros que melhor permitem avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal, nessas condições.

Como a 5-HT pode ser sintetizada nas células tubulares renais e, tal como a DA, é passível de metabolização desaminativa em ácido 5-HIAA, os perfis de excreção urinária da 5-HT e do 5-HIAA foram também avaliados nesses doentes, durante o mesmo período.

2. Material e métodos

2.1. Doentes

Foram admitidos ao estudo 11 doentes com insuficiência renal crónica terminal (4 mulheres e 7 homens), submetidos a transplante de rim de cadáver. A idade média dos doentes era de 39 ± 7 anos (de 23 a 57) e o peso corporal médio de $60,4 \pm 3,5$ Kg (50,5 a 70,8 kg). Oito dos doentes estavam em anúria; os três doentes restantes apresentavam um volume urinário residual inferior a 100 ml/dia.

A etiologia da insuficiência renal crónica era a seguinte: glomerulonefrite crónica, 4; nefroangioesclerose hipertensiva, 1; displasia renal, 1 e indeterminada, 5.

Todos se encontravam em programa regular de hemodiálise. O período de tempo médio em tratamento era de $40,1 \pm 12$ meses (oscilando entre 9 e 126 meses).

Os doentes foram todos medicados com terapêutica imunossupressora tripla, incluindo ciclosporina A (10 mg/kg/dia p.o., dividida por duas doses diárias), azatioprina (2mg/kg/dia p.o.) e prednisolona (1 mg/kg/dia, com redução progressiva diária até 20 mg/dia ao 9º dia pós-transplante). Foi ainda efectuada profilaxia antibiótica, do primeiro até ao 6º dia com ceftazidima (1 g/dia) e piperacilina (4g cada 12 h) e até ao 30º dia pós-transplante com trimetoprim/sulfametoxazol (160/800 mg/dia).

Os doentes foram avaliados diariamente, clínica e bioquimicamente, em termos da evolução da sua função renal (creatinina e ureia plasmática e depuração plasmática da creatinina).

A pressão arterial foi avaliada diariamente, entre as 8h30m e as 9h30m em decúbito dorsal, após repouso de cinco minutos, através de um monitor DINAMAP. No último dia do estudo (12º dia pós-transplante), procedeu-se à monitorização ambulatoria de 24 horas da pressão arterial aos doentes estudados, fazendo uso de um monitor Spacelabs 90207, programado para efectuar determinações com intervalos de 15 minutos.

Os níveis da CsA foram determinados diariamente, no sangue total colhido antes da administração matinal do imunossupressor, por imunofluorescência com anticorpo monoclonal (TDX-FPIA, Abbott).

2.2. Dadores

Os rins utilizados para transplante foram obtidos a partir de nove dadores (2 mulheres e 7 homens) com uma média de idades de 32 ± 7 anos (de 16 a 59). A morte cerebral foi secundária a traumatismo craneoencefálico em sete casos e a hemorragia intracerebral em dois.

Os valores plasmáticos de ureia e creatinina à data da colheita não excediam, respectivamente, 80 mg/dl e 1 mg/dl, em qualquer dos dadores. O débito urinário nas seis horas que precederam a colheita foi, em todos os casos, superior a 50 ml/h. Quatro dos dadores (ao que correspondem os rins utilizados em seis dos transplantados incluídos neste estudo) receberam perfusão de DA em doses que oscilaram entre 2,5 e 10 µg/kg/min, no período que antecedeu a colheita.

O período de tempo de isquemia quente foi em média de 50 minutos e o de isquemia fria não ultrapassou as 25 horas, em nenhum dos casos.

2.3. Colheitas de urina

Colheram-se amostras de urina de 24 horas para a quantificação da excreção urinária da L-DOPA, DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT, 5-HIAA, Na⁺, K⁺ e osmolalidade. As colheitas foram efectuadas em meio acidificado (em recipiente contendo ácido clorídrico 6 M), para impedir a oxidação espontânea das catecolaminas e dos seus derivados, desde o dia da cirurgia até ao 12º dia pós-transplante.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do H.S.João.

2.4. Determinação das catecolaminas

A quantificação das catecolaminas na urina e a determinação dos restantes parâmetros bioquímicos foi efectuada pelos métodos descritos nos capítulos anteriores.

2.5. Análise estatística

Os resultados são apresentados em médias $\pm$ EPM para o número indicado de determinações. A diferença entre duas médias foi avaliada pelo teste *t* de Student para valores não emparelhados. Um valor de P menor que 0,05 foi aceite como traduzindo uma diferença significativa.

3. Resultados

Em sete dos doentes estudados (figura 1), a função renal recuperou progressivamente ao longo dos primeiros 12 dias que se seguiram à realização do transplante, o que se traduziu por uma redução progressiva do valor médio da creatinina plasmática que baixou de $5,8 \pm 0,5$ mg/dl, no primeiro dia, para $1,9 \pm 0,2$ mg/dl, ao 12º (Grupo 1). Nos restantes 4 doentes, a função renal manteve valores reduzidos e a creatinina plasmática mantinha um valor médio de $7,5 \pm 1$ mg/dl ao 12º dia pós-transplante (Grupo 2).

Na figura 2 está representada a evolução dos valores médios da pressão arterial e a dos níveis da CsA no sangue dos dois grupos de transplantados. Como se pode verificar, a pressão arterial manteve valores estáveis ao longo dos 12 dias

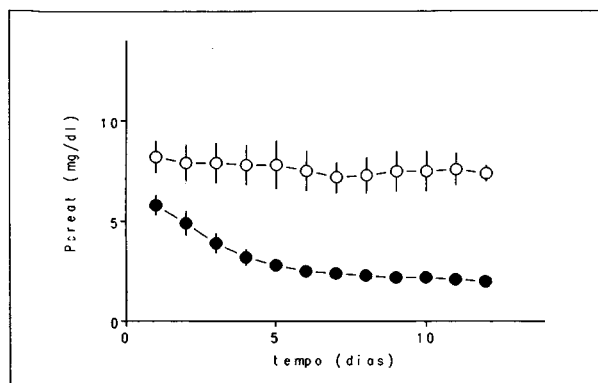


Figura 1. Evolução dos valores da creatinina plasmática em dois grupos de transplantados renais (grupo 1, ●; grupo 2, ○) durante os primeiros doze dias que se seguiram à realização do transplante. Cada ponto representa a média de grupos de 7 (grupo 1) ou 4 (grupo 2) determinações; as linhas verticais mostram o EPM. Todos os valores para o grupo 1 são significativamente diferentes ($P < 0,05$) dos correspondentes para o grupo 2.

do estudo e não se observaram diferenças entre os valores registados nos dois grupos de doentes.

Durante a monitorização ambulatoria de 24 horas da pressão arterial, efectuada ao 12º dia pós-transplante, não se evidenciaram também diferenças entre os dois grupos, quer nos valores médios da pressão sistólica ($155,1 \pm 11,9$ no grupo 1; $154,5 \pm 24,7$ no grupo 2) quer nos da diastólica ($101,8 \pm 9,8$ no grupo 1; $95 \pm 14,1$ no grupo 2).

Tal como se verificou em relação aos valores da pressão arterial, não se verificaram diferenças significativas nos níveis de CsA ao longo do estudo entre os dois grupos de transplantados.

A evolução da excreção urinária diária da L-DOPA, DA e DOPAC nos dois grupos de doentes está ilustrada na figura 3. Como se pode observar, a excreção urinária diária de L-DOPA não variou significativamente ao longo do estudo em qualquer dos dois grupos; por outro lado, não se verificaram diferenças significativas na excreção urinária diária do precursor da DA entre os dois grupos de doentes (figura 3A).

Nos transplantados do grupo 1 a excreção urinária diária de DA permaneceu estável durante os primeiros cinco dias pós-transplante, em valores da ordem dos 300 a 400 nmol/dia (figura 3B); nos últimos sete dias do estudo a excreção urinária

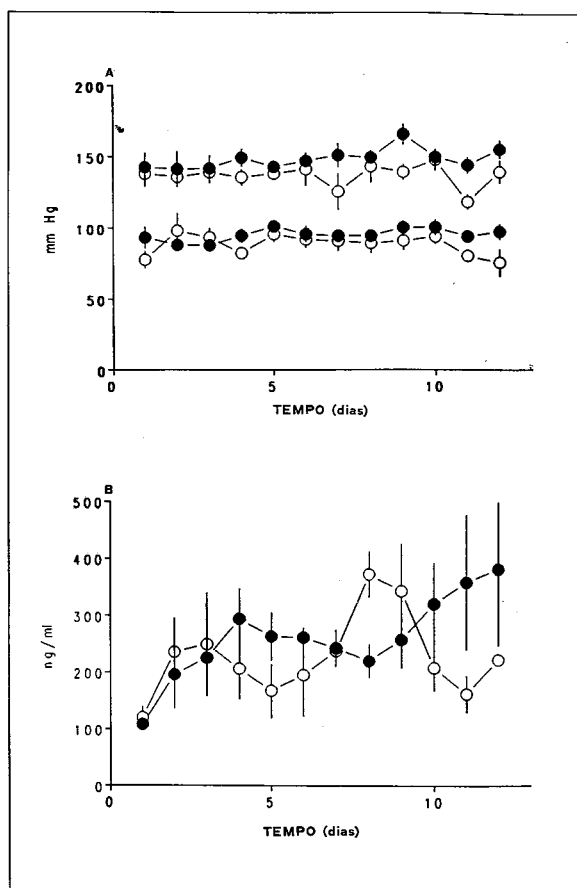


Figura 2. Evolução diária da (A) pressão arterial e dos (B) níveis de CsA no sangue de dois grupos de transplantados renais (grupo 1, ●; grupo 2, ○) durante os primeiros doze dias que se seguiram à realização do transplante. Cada ponto representa a média de grupos de 7 (grupo 1) ou 4 (grupo 2) determinações; as linhas verticais mostram o EPM.

diária de DA, neste grupo de doentes, foi cerca de metade da observada durante a fase inicial do estudo. Pelo contrário, a excreção urinária do DOPAC aumentou progressivamente, passando de 680 nmol/dia no primeiro dia para 3070 nmol/dia ao nono dia e mantendo-se depois dentro de valores idênticos até ao final do período de colheitas (figura 3C). Estes resultados traduziram-se por uma correlação positiva entre a excreção urinária do DOPAC e a depuração da creatinina

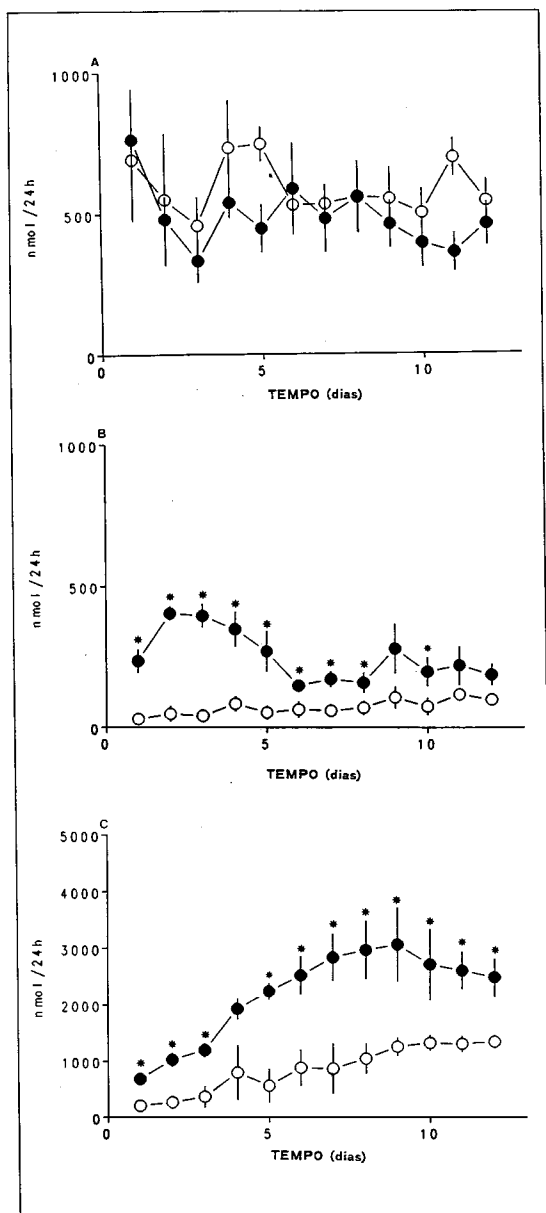


Figura 3. Evolução da excreção urinária diária de (A) L-DOPA, (B) DA e (C) DOPAC em dois grupos de transplantados renais (grupo 1, ●; grupo 2, ○) durante os primeiros doze dias que se seguiram à realização do transplante. Cada ponto representa a média de grupos de 7 (grupo 1) ou 4 (grupo 2) determinações; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores correspondentes para o grupo 2 (* $P < 0,05$).

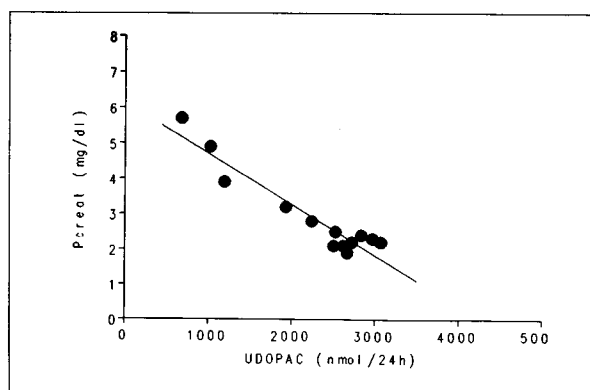


Figura 4. Correlação entre a concentração plasmática de creatinina e a excreção urinária diária de DOPAC nos transplantados do grupo 1, durante os primeiros doze dias que se seguiram à realização do transplante. O valor da correlação foi de: $r=0,9040$ ($P<0,01$).

(figura 4) e por um aumento de sete vezes na relação DOPAC/DA na urina, ao longo do período de colheitas.

No grupo de quatro doentes que manteve uma função renal reduzida ao longo do estudo (grupo 2), os teores urinários da DA e do DOPAC foram inferiores aos observados nos restantes sete doentes. As diferenças observadas assumiram, no entanto, particular significado em relação à excreção urinária do DOPAC que se manteve consistentemente 2 a 4 vezes mais elevada ao longo do período de colheitas nos doentes do grupo 1 (figura 3).

Nos doentes do grupo 1 a excreção urinária diária, quer do HVA quer do 5-HIAA, não sofreu modificações significativas ao longo do estudo, apesar da progressiva recuperação evidenciada pela função renal (figura 5). Pelo contrário, no grupo de transplantados em que a função renal se manteve em valores reduzidos, a excreção urinária diária do HVA aumentou progressivamente ao longo do estudo para atingir, ao 9º dia, valores semelhantes aos observados nos restantes sete doentes. A excreção urinária do 5-HIAA nos doentes do grupo 1 não foi diferente da observada nos doentes do grupo 2, ao longo do período de colheitas (figura 5).

A 3-MT e a 5-HT não foram detectadas na urina de qualquer dos doentes estudados.

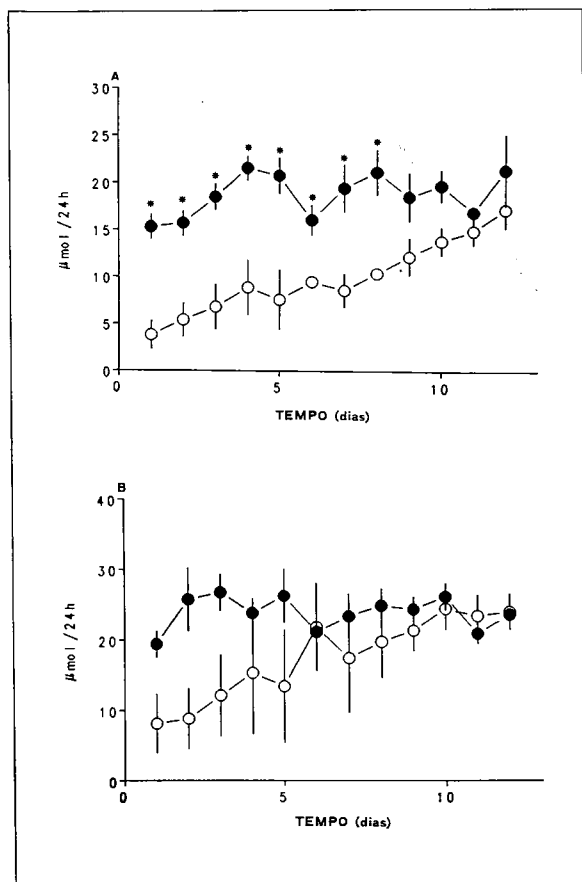


Figura 5. Evolução da excreção urinária diária de (A) HVA e (B) 5-HIAA em dois grupos de transplantados renais (grupo 1, $\bullet$; grupo 2, $\circ$) durante os primeiros doze dias que se seguiram à realização do transplante. Cada ponto representa a média de grupos de 7 (grupo 1) ou 4 (grupo 2) determinações; as linhas verticais mostram o EPM. Significativamente diferente em comparação com os valores correspondentes para o grupo 2 (* $P < 0,05$).

4. Comentários

Os resultados do estudo apresentado no presente capítulo evidenciam que a recuperação funcional de rins, únicos e desnervados, em doentes submetidos a transplante renal, se traduz por um aumento na capacidade dos tecidos renais para formar DA e para a desaminar em DOPAC. Estes resultados reforçam a importân-

cia atribuída à desaminação como o processo de maior relevo envolvido na metabolização da DA formada nos tecidos renais.

Quer a excreção urinária de DA quer a de DOPAC foram mais elevadas ao longo do período de colheitas no grupo de doentes em que a função renal recuperou para atingir valores mais elevados (grupo 1). No entanto, as diferenças observadas foram sobretudo manifestas em relação à excreção urinária do metabolito desaminado da DA, a qual foi consistentemente 2 a 4 vezes mais elevada ao longo do estudo nos transplantados do grupo 1.

Verificou-se que a excreção urinária diária da L-DOPA não foi diferente ao longo do estudo entre os dois grupos de transplantados; este achado sugere que a formação renal da DA nos doentes do grupo 2 não foi limitada pelo acesso do precursor aos tecidos renais. Sabendo-se que a DA eliminada diariamente na urina resulta da descarboxilação da L-DOPA nas células tubulares renais, estes resultados sugerem uma relação directa entre a função renal global e a capacidade de síntese e metabolização desaminativa da DA, nos tecidos renais.

O perfil da excreção urinária de DA nos transplantados do grupo 1 não se assemelhou ao do DOPAC. De facto, ao contrário do que se verificou em relação à excreção urinária do metabolito desaminado da DA, a excreção urinária diária da amina, neste grupo de doentes, não aumentou progressivamente ao longo do estudo, tendo inclusivamente diminuído significativamente a partir do 5º dia de colheitas. Este achado poderia ser interpretado como a tradução de uma redução no processo de síntese da DA nesses doentes, caso os teores urinários da amina fossem o único parâmetro utilizado para avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal. O perfil da excreção urinária de DOPAC evidenciou, contudo, que à redução na excreção urinária de DA se associou um aumento progressivo na excreção urinária do metabolito desaminado, sugerindo que um desvio no sentido da metabolização desaminativa da DA poderá ter sido o factor responsável pela redução nos níveis urinários da amina, a que se assistiu a partir do 5º dia do estudo.

A excreção urinária diária, quer do HVA quer do 5-HIAA, não variou significativamente ao longo do estudo no grupo de doentes em que a função renal recuperou para atingir valores mais elevados. Este achado evidencia que, apesar da recuperação progressiva da função renal, a produção diária destes dois metabolitos não variou ao longo do período de colheitas; estes resultados sugerem uma origem predominantemente extra-renal do HVA e do 5-HIAA e estão de acordo com estudos anteriores que evidenciaram uma proveniência predomina-

temente central destes dois metabolitos, quer no Rato quer em primatas (Kopin, 1985). Outro achado que vem reforçar a noção, quanto à origem predominantemente extra-renal do HVA e do 5-HIAA, é a verificação de que a excreção urinária destes dois metabolitos atingiu nos transplantados do grupo 2 valores idênticos aos observados nos do grupo 1, apesar da função renal se ter mantido em valores estáveis e reduzidos ao longo de todo o período de colheitas.

Não se detectou 3-MT na urina ao longo do estudo em nenhum dos transplantados estudados. Este achado sugere que, nestas condições, o papel desempenhado pela metilação na metabolização da DA de síntese renal é muito inferior ao da desaminação e vem reforçar as conclusões dos trabalhos que avaliaram a metabolização da DA em condições experimentais *in vitro* (Fernandes e Soares-da-Silva, 1993).

Não se detectou também 5-HT na urina ao longo do estudo, em nenhum dos transplantados. Duas hipóteses alternativas de interpretação podem ser avançadas para esse facto: (1) a síntese renal de 5-HT é, nestas condições, reduzida, de tal forma que os seus teores urinários se tornam indetectáveis; (2) a 5-HT formada nos tecidos renais é significativamente metabolizada sendo eliminada, sobretudo, sob a forma de metabolitos. Na medida em que a metabolização da 5-HT está sobretudo a cargo da MAO, do que resulta a formação de 5-HIAA, a segunda hipótese implicaria, no entanto, um aumento progressivo na excreção urinária do 5-HIAA ao longo do estudo nos doentes do Grupo 1, facto que não se verificou. Por outro lado, a excreção urinária do 5-HIAA nos doentes com função renal reduzida não foi diferente da observada nos doentes em que a função renal recuperou progressivamente ao longo do estudo. Deve salientar-se, no entanto, que a excreção urinária de 5-HIAA tem proveniência predominantemente central, desconhecendo-se ainda qual a contribuição da 5-HT formada no rim para os teores de 5-HIAA eliminados diariamente na urina.

Em conclusão, os resultados do estudo apresentado neste capítulo evidenciam que a recuperação da função renal em rins humanos, únicos e desnervados, se traduz por um aumento progressivo na capacidade dos tecidos renais para sintetizar DA e para desaminar a DA recém-formada. Estes resultados sugerem também que, nestas condições, os níveis urinários do DOPAC poderão corresponder a um bom parâmetro para avaliar a formação da DA nos tecidos renais.

VIII - CONCLUSÕES E DISCUSSÃO GERAL

Conclusões

Os resultados deste trabalho forneceram, como mais relevantes, as seguintes conclusões:

- A síntese da DA nos tecidos renais ocorre, sobretudo, em estruturas celulares extraneuronais, localizadas na zona cortical (cap. II).
- A DA formada nos tecidos renais não é captada significativamente pelas terminações neuronais simpáticas (cap. II).
- A L-DOPA é libertada no plasma em resposta a estímulos apropriados e o seu aporte aos tecidos renais funciona como um elemento regulador da actividade do sistema dopaminérgico renal, podendo assumir, inclusivamente, o papel de passo limitante na síntese renal da DA (cap. IV, V e VI).
- O transporte tubular da L-DOPA é um processo parcialmente dependente do gradiente de concentração de sódio entre o espaço extra e intracelular e sensível a manobras que interferem com o transporte de sódio nas células tubulares renais, tais como a inibição da ATPase $\text{Na}^+\text{-K}^+$ e o aumento da permeabilidade da membrana celular ao sódio (cap. II).
- A actividade do transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares exerce um papel regulador da síntese da DA nos tecidos renais (cap. IV e VI).
- A actividade da descarboxilase dos L-ácidos aminados aromáticos (DAAA) pode regular a síntese da DA nos tecidos renais; o seu papel nesse processo está, contudo, condicionado pelo aporte da L-DOPA ao citoplasma das células tubulares (cap. II).
- Dependendo do aporte de L-5 hidroxitriptofano (L-5-HTP) ao citoplasma das células tubulares renais, as variações na actividade da DAAA renal podem repercutir-se sobre a formação da 5-hidroxitriptamina (5-HT), cujos efeitos antinatriuréticos e vasoconstritores são antagonísticos dos da DA (cap. IV e V).

- A desaminação assume um papel de grande dimensão na inactivação da DA de síntese renal, em particular no Homem e ocorre, sobretudo, em estruturas celulares extraneuronais (cap. II).
- O metabolito desaminado da DA (o DOPAC) é aquele cuja excreção urinária melhor reflecte a actividade do sistema dopaminérgico renal (cap. IV, V, VI, VII).
- Ambas as formas de monoaminoxidase (MAO), tipos A e B, estão envolvidas na desaminação da DA de síntese renal, embora actuando em compartimentos distintos (cap. II e III).
- A DA de síntese renal é significativamente desaminada no decurso dos fenómenos que intervêm no seu efluxo a partir das células tubulares renais; este processo parece envolver, maioritariamente, os teores da amina que abandonam as células tubulares através do bordo basolateral (cap. III).
- No Rato, o processo de desaminação da DA nos tecidos renais é parcialmente dependente do gradiente de concentração de sódio entre o espaço extra e intracelular e sensível às manobras que interferem com o transporte de sódio nas células tubulares renais, tais como a inibição da ATPase Na^+/K^+ e o aumento da permeabilidade da membrana celular ao sódio (cap. II).
- A DA formada nos tecidos renais a partir da γ -glutamil-L-DOPA (GluDOPA) é significativamente menos desaminada do que a que resulta da descarboxilação da L-DOPA.
- As características do efluxo da DA e da NA formadas nas células tubulares renais e as dos seus respectivos metabolitos desaminados, DOPAC e DOPEG, são reguladas pela lipofilia relativa dos diferentes compostos (cap. III).
- A dimensão do processo de formação renal da DA em resposta à carga salina pode variar com a estirpe animal estudada e com a dimensão da carga salina administrada (cap. IV).
- A inibição continuada da síntese do óxido nítrico (ON) condiciona o desenvolvimento de hipertensão arterial sustentada e acompanha-se de um aumento na actividade da DAAA, nos tecidos renais; a administração de L-arginina em simultâneo com a do inibidor da síntese do ON impede o desenvolvimento quer da hipertensão quer do aumento na actividade da DAAA, nos tecidos renais (cap. V).

- A antinatriurese e a hipertensão que resultam da administração de ciclopiorina A (CsA) acompanham-se de uma redução na excreção urinária de DA, aparentemente em consequência de uma redução no aporte de L-DOPA aos tecidos renais; contudo, os tecidos renais desses animais dispõem de uma maior capacidade para sintetizar DA a partir de L-DOPA exógena; este fenómeno não está relacionado com alterações nos parâmetros cinéticos da DAAA ou da MAO, mas parece resultar de um aumento na actividade do transporte da L-DOPA pelas células tubulares renais dos animais tratados com o imunossupressor (cap. VI).
- A recuperação funcional de rins, únicos e desnervados, em doentes submetidos a transplante renal, traduz-se por um aumento na actividade do sistema dopaminérgico renal (cap. VII).

"How can it be that there is so much dopamine in human urine, greatly out of proportion to noradrenaline and adrenaline ?"

Ball e Lee (1977). Br J Cl Pharmacol, 4: 115-119

Discussão geral

Subjacente ao propósito que levou à realização deste trabalho está a importância crescente que tem vindo a ser atribuída ao sistema dopaminérgico renal, como elemento regulador da homeostasia do sódio e da volemia, de parceria com outros mecanismos neurohumorais tais como o sistema RAA, o simpático, as prostaglandinas, as cininas ou o factor natriurético.

Tem-se evidenciado que a DA de síntese renal desempenha um papel de relevo na regulação da reabsorção tubular de sódio. De facto, a carga salina constitui o estímulo mais poderoso conhecido para a síntese renal de DA e verificou-se que a resposta natriurética apropriada à carga salina pode ser significativamente atenuada quando, em simultâneo com a administração de sódio, se impede a síntese renal da DA (Ball e Lee, 1977) ou são administrados antagonistas selectivos para os receptores da DA (Siragy e col., 1989).

Aceita-se presentemente que o sistema dopaminérgico renal constitui um sistema extraneuronal assente na capacidade das células dos túbulos contornados proximais para formar DA. Apesar da DA poder exercer efeitos natriuréticos em consequência de acções conhecidas, quer sobre a vasculatura renal (Lee, 1993) quer sobre a libertação da aldosterona a nível da supra-renal (Missale e col., 1990), verificou-se que os efeitos natriuréticos da amina formada nos tecidos renais resultam, fundamentalmente, de acções inibitórias sobre a reabsorção tubular de sódio (Felder e col., 1989). Na medida em que a DA é formada em células ou na proximidade das células que dispõem de receptores específicos, tem-se sugerido que o sistema dopaminérgico renal constitui um sistema local em que a amina exerce os seus efeitos como uma substância autócrina ou parácrina (Siragy e col., 1989).

Este sistema dispõe de uma dinâmica elevada, distinta da que é conhecida para os neurónicos adrenérgicos. De facto, os locais para armazenamento das aminas e os mecanismos reconhecidamente envolvidos na regulação da síntese e na libertação das aminas nas estruturas neuronais, não foram detectados nas

células tubulares renais.

O interesse subjacente ao esclarecimento dos processos que regulam a actividade do sistema dopaminérgico renal decorre directamente do conhecimento das importantes acções renais da DA, diurética, natriurética e vasodilatadora, as quais têm levado a atribuir-lhe um papel de relevo como mediador independente. O estudo destes processos poderá permitir esclarecer a forma como se articula a interacção, que tem vindo a ser sugerida, entre os efeitos renais da DA endógena e os de outros mediadores neurohumorais, envolvidos na regulação da função renal e da volemia. Por outro lado, o conhecimento da forma como é modulada a actividade do sistema dopaminérgico renal poderá contribuir de forma relevante para a compreensão dos processos envolvidos na fisiopatologia de situações clínicas que cursam com retenção de sódio e água e de determinadas formas de hipertensão.

De acordo com os elementos conhecidos, a actividade do sistema dopaminérgico renal poderá ser regulada por dois tipos de factores:

- os que intervêm directamente na síntese renal da DA, tais como o aporte da L-DOPA aos tecidos renais, o transporte da L-DOPA pelas células tubulares renais e a actividade descarboxilásica presente nessas células e
- os que regulam o acesso da amina recém-formada aos receptores próprios, como são os que controlam o transporte da DA para o exterior do compartimento de síntese e os que intervêm na sua metabolização.

O objectivo central deste trabalho foi o de contribuir para o estudo do sistema dopaminérgico renal através da investigação dos processos envolvidos na regulação da síntese, transporte e metabolização da DA formada nos tecidos renais.

Regulação da síntese renal da DA

Tem-se evidenciado que a L-DOPA plasmática constitui a principal fonte de DA urinária, quer no Homem (Goldstein e col., 1989a) quer no animal de experiência (Grossman e col., 1990; 1991; Zimlichman e col., 1988). Na medida em que a síntese renal da DA resulta da descarboxilação da L-DOPA, é legítimo admitir que as variações nos níveis do substrato para a descarboxilação, com acesso às células tubulares, possam funcionar como um elemento regulador da actividade deste sistema.

Em todos os estudos *in vivo* incluídos neste trabalho, verificámos que as variações na excreção urinária de DA, utilizada como parâmetro para avaliar a

actividade do sistema dopaminérgico renal, foram acompanhadas por modificações no mesmo sentido dos teores plasmáticos e/ou urinários de L-DOPA. De facto, nos animais submetidos a inibição continuada da síntese do ON e nos ratos tratados com dieta HS verificámos um aumento simultâneo na excreção urinária de L-DOPA e DA, enquanto que, inversamente, nos animais tratados com CsA observámos uma redução na excreção urinária de DA em simultâneo com uma diminuição nos níveis plasmáticos de L-DOPA. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores (Goldstein e col., 1989a; Grossman e col., 1990) e sugerem que a síntese renal da DA pode ser regulada através da libertação da L-DOPA na circulação e do seu aporte ao rim, em resposta a estímulos apropriados. O presente trabalho não permitiu concluir sobre a natureza dos fenómenos responsáveis pela redução dos níveis circulantes de L-DOPA, nos animais tratados com CsA; no entanto, é interessante ter-se verificado que os tecidos renais dos ratos tratados com CsA evidenciaram uma maior capacidade do que os do controlo para formar DA quando a L-DOPA exógena foi administrada. Globalmente, estes estudos revelam que o aporte da L-DOPA ao rim constitui um factor implicado na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal, o qual pode assumir, inclusivamente, o papel de passo limitante na síntese renal da DA (ver cap. VI).

Nos animais tratados com CsA verificámos uma redução em simultâneo na excreção urinária de DA e de sódio. Este facto sugere que a redução na formação de DA pode ter estado implicada na tendência antinatriurética evidenciada por esses animais. Na medida em que a redução que a CsA condicionou sobre a formação renal de DA resultou de uma redução no aporte de L-DOPA aos tecidos renais, estes estudos sugerem que a DA, os precursores da DA ou os agonistas para os receptores da DA podem ser de utilidade para influenciar favoravelmente as alterações da função renal, condicionadas pelo imunossupressor. Tal conclusão vem ao encontro dos resultados de estudos em que se tem evidenciado que a DA e os agonistas selectivos para os receptores da DA revertem os distúrbios que a CsA condiciona sobre a perfusão renal e sobre a excreção fraccional de sódio, quer no Rato quer no Homem (Conte e col., 1988, 1989; Sabbatini e col., 1989; Brooks e col., 1990).

Verificámos que os teores urinários da L-DOPA nos animais submetidos a dieta HS e à inibição crónica da síntese do ON, variaram no mesmo sentido que os indicadores da actividade simpática (avaliada através dos teores urinários da NA). Estes resultados estão de acordo com os dos estudos que referem os

compartimentos neuroniais simpáticos como o principal local de origem da L-DOPA plasmática (Grossman e col., 1992) e com os que evidenciaram que o processo de libertação da L-DOPA, a partir dos compartimentos neuroniais simpáticos, acompanha em paralelo a actividade de síntese da NA (Grossman e col., 1992; Eisenhofer e col., 1989).

A verificação de que a libertação da L-DOPA se processa a partir de compartimentos neuroniais simpáticos, em paralelo com a actividade de síntese da NA, leva a especular acerca do significado fisiológico deste achado e merece alguns comentários. É interessante referir, a este propósito, que não só a L-DOPA, mas também a DA, pode ser libertada a partir dos neurónios simpáticos, em simultâneo com a NA. No caso da DA, libertada a partir de compartimentos neuroniais, os seus efeitos à periferia (acção vasodilatadora directa, por activação dos receptores D1 e acção vasodilatadora indirecta, secundária à inibição da libertação do mediador simpático, por activação dos receptores D2), permitiram atribuir-lhe o papel de substância moduladora das acções que resultam da actividade simpática (Soares-da-Silva, 1987). Também à DA endógena de síntese renal tem sido atribuído o papel de substância moduladora da acção de outros mediadores. Conhecida a acção tubular antinatriurética da NA, é possível admitir que a libertação da L-DOPA a partir dos neurónios simpáticos, ao promover a síntese renal da DA, possa funcionar a nível renal como um factor destinado a estimular a natriurese, por forma a contrariar o estímulo antinatriurético que resulta da actividade simpática. De acordo com essa possibilidade, meramente especulativa, a dinâmica dos processos envolvidos na síntese das catecolaminas nos neurónios simpáticos poderá determinar, em cada situação, o balanço entre a libertação de L-DOPA e NA, com as implicações inerentes ao nível da regulação da natriurese. Esta interacção, a verificar-se, deverá envolver em particular os neurónios simpáticos do rim, já que estes são responsáveis pela libertação, no local, quer da L-DOPA quer da NA. De acordo com esta interpretação, nos estudos em que observámos uma variação no mesmo sentido dos teores urinários da L-DOPA e da NA (animais submetidos a dieta HS e animais sujeitos a inibição crónica da síntese do ON), não se verificou uma tendência antinatriurética (ver cap. IV e V); pelo contrário, nos estudos em que se evidenciou uma redução inapropriada dos teores plasmáticos da L-DOPA em simultâneo com um aumento nos níveis plasmáticos da NA (animais tratados com CsA), verificou-se uma tendência antinatriurética (ver cap. VI). Decorre destes resultados a sugestão de que a actividade simpática pode estar envolvida na fisiopatologia dos distúrbios

que caracterizam a nefrotoxicidade pela CsA. Tal sugestão vem ao encontro das descrições que atribuem à desnervação renal e aos bloqueadores adrenérgicos um papel protector dos efeitos nefrotóxicos que resultam da administração do imunossupressor (Murray e Paller, 1986).

A actividade da DAAA no citoplasma das células tubulares renais tem sido referida, a par dos teores de L-DOPA que têm acesso a essas células, como o factor mais importante envolvido na modulação da síntese da DA nos tecidos renais; de facto, a actividade renal da DAAA mostrou estar aumentada em animais de experiência durante a carga salina (Seri e col., 1990; Soares-da-Silva, 1993a) e em idades avançadas (Soares-da-Silva, 1991b) e, inversamente, revelou estar reduzida nos tecidos renais de animais submetidos a dieta hiposalina (Hayashi e col., 1990).

No presente trabalho, corroborámos o papel que tem vindo a ser atribuído à descarboxilase na regulação da síntese renal da DA, ao verificar um aumento simultâneo na excreção urinária de DA e na actividade renal da DAAA em animais com hipertensão secundária à inibição crónica da síntese do ON (ver cap. V).

Embora possa estar localizada em neurónios noradrenérgicos e em hipotéticos nervos dopaminérgicos (Dinerstein e col., 1979), tem-se evidenciado que a DAAA responsável pela formação da DA nos tecidos renais está presente, sobretudo, nas células dos túbulos contornados proximais (Hayashi e col., 1990). No presente trabalho, reforçámos esse conceito, ao evidenciar que:

- a síntese renal de DA em fatias de rim de Rato se verifica, sobretudo, na zona cortical (ver cap. IIB);
- a síntese de DA em fatias de rim de Rato não é modificada pela desnervação simpática (ver cap. IID);
- a produção e metabolização desaminativa da DA em rins únicos e desnervados de doentes submetidos a transplante renal, acompanha paralelamente o processo de recuperação da função renal (ver cap. VII).

Verificámos que o rim de Rato tem maior capacidade do que o rim humano ou o de Cão para sintetizar DA a partir da L-DOPA exógena e que esse facto resulta da existência de uma maior actividade (V_{max}) de DAAA no Rato, em comparação com a existente nos tecidos renais do Cão ou do Homem (ver cap. IIA). No entanto, a afinidade da DAAA para o seu substrato (K_m) não permitiu distinguir as enzimas presentes nos tecidos renais das três espécies estudadas. Os valores

de K_m para a DAAA oscilaram entre 55 e 80 μM , revelando estar incluídos numa gama de concentrações significativamente mais elevada do que a concentração de L-DOPA que tem acesso às células tubulares em condições fisiológicas, a qual foi descrita como estando incluída na gama do nanomolar (Cuche e col., 1972). Estes resultados sugerem que as modulações ao nível da actividade da DAAA podem ver limitado o seu papel na regulação da síntese renal de DA, pelos processos que controlam o aporte da L-DOPA ao rim e o seu transporte pelas células tubulares renais. De facto, como foi referido anteriormente, o aporte da L-DOPA ao rim pode ser regulado em resposta a estímulos apropriados. Por outro lado, o transporte tubular da L-DOPA mostrou ser dependente de energia (Chan, 1976; cap. IIC) e susceptível de ser modulado (ver cap. IV e VI), pelo que é legítimo admitir que as concentrações do precursor da DA, a nível intracelular, possam, por seu intermédio, atingir valores significativamente mais elevados do que os presentes no meio extracelular.

No que respeita ao papel desempenhado pela DAAA na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal merece ainda referência o facto de que esta enzima mostrou ser responsável, não só pela descarboxilação da L-DOPA em DA, mas também pela descarboxilação de outros substratos, tais como o L-5-HTP, a tirosina, o triptofano e a fenilalanina. Neste contexto, verificou-se que a 5-HT formada a partir da descarboxilação do L-5-HTP exerce a nível renal acções antagónicas das da DA, nomeadamente ao nível do transporte tubular de sódio, admitindo-se presentemente que os dois sistemas renais, dopaminérgico e 5-hidroxitriptaminérgico, são responsáveis por efeitos recíprocos sobre a regulação da natriurese (Itskovitz e col., 1988).

No presente trabalho, procedemos à avaliação simultânea do comportamento dos dois sistemas renais, dopaminérgico e 5-hidroxitriptaminérgico, em animais submetidos a uma dieta HS (ver cap. IV) e em ratos nos quais se procedeu à inibição continuada da síntese do ON (ver cap. V). Nessas condições, assistimos em ambos os casos a uma variação no mesmo sentido da excreção urinária de DA e de 5-HT. Embora não dispondo de todos os parâmetros potencialmente implicados na regulação da síntese renal da DA e da 5-HT nesses contextos, é interessante termos verificado que a variação em paralelo na excreção urinária das duas aminas teve como pano de fundo um aumento na actividade da descarboxilase comum e não foi acompanhada, em qualquer dos casos, por uma tendência antinatriurética. Na medida em que as variações na actividade da DAAA renal se podem repercutir, indiscriminadamente, sobre a formação de compostos

com efeitos antagónicos ao nível do transporte tubular de sódio, julgamos poder concluir que o papel da descarboxilase na regulação da natriurese, dependente da actividade do sistema dopaminérgico renal, está condicionado não só pelos teores de L-DOPA que têm acesso ao citoplasma celular, mas também pelos teores citoplasmáticos dos outros substratos para a descarboxilação.

Desconhece-se ainda a natureza dos sinais que são responsáveis pela regulação da actividade da DAAA nos tecidos renais. No presente trabalho, verificámos um aumento na actividade da DAAA nos rins de animais com hipertensão sustentada, desenvolvida na sequência da inibição crónica da síntese do ON. Quer o aumento na actividade da DAAA quer o desenvolvimento da hipertensão, foram impedidos quando se procedeu à administração de L-arginina em simultâneo com o inibidor da síntese do ON. Concluimos que, nestas condições, as modificações na actividade da DAAA poderiam ter envolvido na sua génese uma redução na geração do ON, nos níveis do GMPc, ou ainda um sinal dependente do desenvolvimento da hipertensão arterial.

Se atendermos a que a actividade das enzimas pode ser modulada pelas variações na concentração do substrato, com uma redução na concentração a estimular a actividade e vice-versa, poderia supor-se que o aumento na actividade da DAAA estivesse relacionado com um défice no aporte de L-DOPA ao citoplasma das células tubulares renais. Contudo, nos estudos em que se procedemos à inibição continuada da síntese do ON (cap. V), verificámos um aumento na actividade renal da DAAA, o qual foi observado em simultâneo com um acréscimo no aporte de L-DOPA aos tecidos renais. Pelo contrário, nos animais tratados com CsA, nos quais se assistiu a uma redução no aporte de L-DOPA aos tecidos renais, verificámos que a actividade descarboxilásica não foi modificada, apesar da tendência antinatriurética e da hipertensão, entretanto estabelecidas (ver cap. VI).

O processo de transporte da L-DOPA ao nível das células dos túbulos contornados proximais constitui também, como a propósito se referiu, um factor de potencial importância na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal. No presente trabalho, reforçámos a importância do transporte tubular da L-DOPA na regulação da síntese renal da DA ao evidenciar que este processo é sensível ao transporte de sódio nas células tubulares renais. Nesses estudos (ver cap. IIC), verificámos que a formação da DA, em fatias de córtex renal humano e de Rato, mas não em homogeneizados, é inibida por manobras que interferem com o

transporte de sódio ao nível das células tubulares tais como a inibição da ATPase Na^+/K^+ , o aumento da permeabilidade da membrana celular ao Na^+ e a redução do gradiente de concentração de sódio entre o espaço extra e intracelular; em complemento desses estudos, verificámos que a influência do transporte de sódio sobre o transporte da L-DOPA não é modificada pela desnervação simpática do rim (ver cap. IID). Globalmente, estes resultados revelam que a L-DOPA é co-transportada com o Na^+ ao nível da membrana das células tubulares renais e que esse processo não é modificado pela presença de estruturas neuronais.

Se assumirmos que o transporte de membrana para a L-DOPA pode modular a actividade do sistema dopaminérgico renal, é legítimo admitir que esse processo possa ser regulado. De acordo com essa possibilidade, alguns estudos incluídos no presente trabalho evidenciaram modificações na actividade do transporte de membrana para a L-DOPA:

- no capítulo VI, verificámos um aumento na actividade do componente saturável do transporte tubular da L-DOPA em rins de animais submetidos a tratamento com CsA. O aumento na captação tubular da L-DOPA mostrou ser o factor responsável pela maior capacidade evidenciada pelos tecidos renais desses animais para sintetizar DA, quando a L-DOPA exógena foi administrada; de facto, foi possível excluir outras hipóteses de explicação para esse fenómeno, tais como modificações na actividade das enzimas responsáveis, quer pela síntese (DAAA) quer pela metabolização renal da DA (MAO e COMT). O aumento na captação tubular da L-DOPA, que se verificou nos rins dos ratos tratados com CsA, pode ser interpretado como um mecanismo de compensação, destinado a estimular a síntese renal da DA e os seus efeitos natriuréticos, em face da redução observada no aporte da L-DOPA aos tecidos renais e da tendência antinatriurética evidenciada por esses animais;
- no capítulo IV, concluímos pela evidência de uma redução no transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares renais, durante a carga salina; neste caso, a redução verificada no transporte tubular da L-DOPA pode ser interpretada como um mecanismo tendente a impedir a formação excessiva de DA e os seus efeitos natriuréticos, em face do aumento verificado no aporte da L-DOPA aos tecidos renais e da resposta natriurética apropriada que se evidenciou nesses animais. Tal interpretação é sustentada pelo facto de estes animais não terem desenvolvido retenção salina ou hipertensão arterial, ao longo do estudo.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o transporte tubular da L-DOPA pode ser regulado por forma a adaptar a síntese da DA nos tecidos renais às necessidades de garantir o balanço de sódio; estes resultados sugerem ainda que as variações na actividade do transporte tubular para a L-DOPA estão dependentes, em cada situação, da resposta dos restantes factores envolvidos na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal.

Coloca-se então a questão de saber quais são os factores que regulam a captação da L-DOPA e a ajustam às necessidades de garantir a homeostasia do sódio. Se atendermos a que o transporte do precursor da DA nas células tubulares renais é dependente do transporte de sódio (ver cap. IIC), é legítimo admitir que os factores que regulam o transporte tubular de sódio e a actividade da ATPase Na^+/K^+ possam intervir na modulação da síntese renal da DA, dependente da captação do seu precursor, por essas células.

De acordo com esta análise, os factores antinatriuréticos que estimulam a actividade da ATPase Na^+/K^+ e o transporte de sódio nas células tubulares proximais poderão promover a captação tubular da L-DOPA e a formação renal de DA, enquanto que, inversamente, os que reduzem o transporte de sódio a nível tubular proximal poderão inibir o transporte da L-DOPA e a formação renal da DA. Este poderá constituir, porventura, um mecanismo de interacção entre o sistema dopaminérgico renal e os factores que regulam o transporte tubular de sódio ao nível das células dos túbulos contornados proximais.

Em favor desta interpretação, o α -ANP e o GMPcíclico, ambos com reconhecidos efeitos inibitórios sobre o transporte tubular de sódio (Harris e col., 1987; Garvin, 1989), mostraram reduzir a captação tubular da L-DOPA e a formação renal de DA, nos tecidos renais (Soares-da-Silva e Fernandes, 1992a).

Os conhecidos efeitos estimulatórios da NA sobre a actividade da ATPase Na^+/K^+ permitem supor, por sua vez, que da acção deste mediador possa resultar uma estimulação do transporte tubular da L-DOPA. De acordo com essa possibilidade, a estimulação do transporte tubular da L-DOPA pela NA associar-se-ia ao aumento do aporte da L-DOPA ao rim, a que atrás se fez referência, para promover a formação renal de DA, por forma a contrariar os efeitos antinatriuréticos do mediador simpático. Idêntico papel pode ser assumido para a AII, que exerce reconhecidas acções sobre o transporte tubular de sódio dependentes da estimulação da ATPase Na^+/K^+ . Como reflexo de um possível controle da síntese da DA pelos mediadores que estimulam a actividade da ATPase Na^+/K^+ , evidenciou-se recentemente que os efeitos estimulatórios da NA e da AII sobre a ATPase

Na^+/K^+ (Ibarra e col., 1993; Aperia e col., 1992; 1994) são antagonizados pela DA endógena.

De acordo com esta análise, a DA, ao inibir a actividade da ATPase Na^+/K^+ (Felder e col., 1989) e o transporte tubular de sódio, poderá assumir, por sua vez, não só o papel de antagonizar os efeitos de mediadores antinatriuréticos, mas também o de regular o transporte do seu precursor e, dessa forma indirecta, a sua própria síntese. Essa possibilidade entra aparentemente em conflito, contudo, com as evidências que associam à carga salina um aumento na formação renal de DA. Deve salientar-se, no entanto, que o aumento na formação renal de DA que se verifica durante a carga salina tem sido atribuído, não a um aumento na actividade do transporte da L-DOPA ao nível das células tubulares renais, a qual poderá estar inclusivamente reduzida nessas situações (cap. IV), mas antes a incrementos, quer no aporte da L-DOPA ao rim (cap. IV) quer na actividade descarboxilásica dos tecidos renais (Soares-da-Silva, 1993a; Seri e col., 1990). A acção inibitória da DA sobre o transporte da L-DOPA poderá ser inclusivamente potenciada durante a carga salina, já que se verificou uma maior sensibilidade da ATPase Na^+/K^+ às acções inibitórias condicionadas pela DA, pela ubaína e pela proteína cínase C, em ratos submetidos a dieta HS (Bertorello e Aperia, 1989; Soares-da-Silva, 1993a).

A análise dos factores intervenientes na regulação do transporte tubular da L-DOPA necessita, finalmente, de ser analisada tomando em consideração que:

- a captação tubular da L-DOPA revelou ser só parcialmente sensível às manobras que reduzem o transporte tubular de sódio e à inibição máxima da ATPase Na^+/K^+ (ver cap. IIC);
- a L-DOPA pode ser transportada, não só pelo bordo luminal, mas também pelo bordo basolateral das células dos túbulos contornados proximais (Suzuki e col., 1984).

Estas realidades permitem sugerir a possibilidade de o transporte da L-DOPA pelo bordo luminal estar sujeito a diferentes mecanismos reguladores e poder envolver, inclusivamente, uma distinta relevância fisiológica da do transporte da L-DOPA através do bordo basolateral. Desta análise, resulta o interesse em estudar separadamente as características do processo de captação do precursor da DA através dos dois bordos da célula, na convicção de que a natureza dos dois transportadores poderá ser distinta, como distinta poderá ser a sua resposta aos diferentes mediadores e a sua importância fisiológica.

Ao abordar a questão dos mecanismos intervenientes na síntese renal da DA e dos factores potencialmente envolvidos na sua regulação (actividade da DAAA, aporte da L-DOPA ao rim e transporte da L-DOPA pelas células tubulares renais), torna-se claro que poderão ser inúmeros e antagónicos os efeitos dos diversos mediadores envolvidos. A complexidade dos fenómenos implicados assume ainda maior dimensão por se saber que a carga salina, apesar de ser o mais poderoso, não constitui o único estímulo para a formação renal de DA. De facto, sabe-se que a DA exerce importantes efeitos fosfatúricos, aditivos dos da paratormona (Berndt e col., 1993) e que quer a ingestão de proteínas quer a de fosfatos podem funcionar como estímulo para a formação renal da DA (Gahn e col., 1993). Desconhecem-se ainda, no entanto, os factores que estes estímulos utilizam para modular a actividade do sistema dopaminérgico renal, bem como é ainda desconhecido o papel fisiológico da DA de síntese renal nos contextos em que se inserem estas interacções.

Transporte e metabolização desaminativa da DA de síntese renal

A DA eliminada diariamente na urina mostrou ter origem, sobretudo, nas células tubulares renais; por esse motivo, a excreção urinária de DA tem sido utilizada como parâmetro para avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal. Duas ordens de razão podem contribuir, no entanto, para que a excreção urinária de DA não reflecta, apropriadamente, a verdadeira dimensão do processo de síntese renal da amina: (1) apesar de se saber que a DA formada nas células tubulares renais pode ser transportada, quer pelo bordo luminal quer pelo bordo basolateral (Suzuki e col., 1984; Stephenson e col., 1982), desconhece-se ainda a proporção da amina que abandona o compartimento de síntese através de cada uma destas vias; (2) na medida em que os tecidos renais dispõem de elevadas actividades de MAO e de COMT, é legítimo admitir que a DA possa ser metabolizada em local próximo do compartimento de síntese, desconhecendo-se ainda, no entanto, qual a dimensão do processo de metabolização a que a amina é submetida, a anteceder a sua excreção urinária. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no transporte e na metabolização da DA formada nas células tubulares renais assume ainda maior relevância se atendermos a que os receptores da DA estão localizados na superfície externa das células, obrigando a amina a ter de abandonar o compartimento de síntese para poder exercer os seus efeitos.

Ao longo deste trabalho, servimo-nos de diversas metodologias para avaliar o transporte e a metabolização da DA formada nos tecidos renais. Efectuámos estudos *in vitro*, estudos *in vitro ex vivo* e estudos *in vivo*. No que diz respeito à avaliação da metabolização da DA formada nos tecidos renais, centrámo-nos, sobretudo, no estudo da metabolização desaminativa, já que este mostrou ser o processo mais importante envolvido na inactivação da DA formada no rim de Rato (Fernandes e Soares-Silva, 1993) e o rim humano dispõe de uma actividade desaminativa significativamente mais elevada do que o de Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992).

A partir dos resultados desses trabalhos, foi-nos possível concluir que a DA formada no rim humano, de Rato e de Cão é extensamente desaminada em DOPAC (cap. IIA); esse processo mostrou ser particularmente intenso no rim humano, o que está de acordo com a existência de uma actividade desaminativa significativamente mais elevada nos tecidos renais humanos do que nos de Rato (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992).

Fazendo uso de inibidores selectivos para a MAO-A e para a MAO-B, evidenciámos o envolvimento das duas formas de MAO na desaminação da DA recém-formada em fatias de rim de Rato, bem como o papel preponderante da MAO-A nesse processo (ver cap. IIB). Nesses estudos, a inibição selectiva da MAO-A condicionou uma redução na acumulação tecidual do DOPAC e um aumento na acumulação tecidual de DA, de uma forma dependente da concentração; por outro lado, o inibidor selectivo da MAO-B não modificou a acumulação tecidual da DA, embora tenha reduzido a acumulação do DOPAC, de uma forma dependente da concentração. Estes resultados foram interpretados como traduzindo a presença da MAO-A em compartimentos distintos daqueles em que a MAO-B está localizada e vêm ao encontro das conclusões de estudos histomorfométricos que, fazendo uso de substratos específicos para a MAO-A e MAO-B (Saura e col., 1992), evidenciaram uma distribuição diferente das duas formas da enzima nos tecidos renais de Rato.

Perante as evidências que sugeriam o envolvimento de diferentes compartimentos no processo de desaminação da DA de síntese renal, decidimos proceder à avaliação das características do efluxo da DA e do seu metabolito desaminado, em estudos de perfusão. Esses estudos (Cap. III) pretendiam colher elementos que pudessem fornecer resposta em relação às seguintes questões:

- Como é regulado o efluxo da DA formada nas células tubulares renais?
- Qual a relação entre a desaminação da DA e o seu efluxo celular?

Estudámos as características cinéticas do efluxo da DA e do DOPAC formados nos tecidos renais a partir da L-DOPA, procedemos à sua comparação com as características respectivas da amina e do metabolito desaminado formados a partir da GluDOPA e com as da NA e do seu metabolito desaminado (DOPEG) formados, no mesmo compartimento renal extraneuronal, a partir do L-DOPS. Finalmente, ao constatar-se uma relação entre o processo de efluxo da DA e o da sua metabolização desaminativa, procedemos à avaliação da influência de inibidores da MAO, selectivos e não selectivos, sobre o efluxo da DA e do DOPAC, em tecidos renais humanos e de Rato.

Os resultados desses estudos evidenciaram que as características cinéticas de efluxo, nos tecidos renais, das aminas e dos seus respectivos metabolitos desaminados, são governadas pelas características lipofílicas dos diferentes compostos.

A caracterização cinética do efluxo da DA e do DOPAC revelou que a amina tem origem num sistema monocompartimental, com actividade de MAO e em estabilidade de efluxo. Este fenómeno verificou-se para a DA formada a partir quer da L-DOPA quer da GluDOPA, mas não foi reproduzido nos estudos em que se avaliou o efluxo da NA formada nos tecidos renais com origem em L-DOPS. Concluímos que a DA é recirculada, ou cruza durante o efluxo celular, um compartimento rico em MAO, que funciona como uma barreira metabólica envolvida na sua inactivação desaminativa, processo ao qual a NA poderá, eventualmente, escapar (ver cap. IIIB).

Apesar de não dispormos de evidências definitivas, vários elementos sugerem fortemente que o processo de desaminação que se verifica durante o efluxo da DA envolve, sobretudo, os teores da amina que abandonam as células tubulares renais através do bordo basolateral:

- 1) demonstrou-se que a DA transportada pelas células tubulares renais para o lúmen tubular não é depois novamente reabsorvida, ou metabolizada em grau significativo, devendo ser como tal eliminada na urina (Chan, 1976; Baines e col., 1979);
- 2) a MAO é uma enzima mitocondrial e nos túbulos contornados proximais as estruturas mitocondriais estão sobretudo presentes na zona basal das células;
- 3) estudos *in vitro* levados a cabo com fatias de rim evidenciaram o colapso dos lúmens tubulares, tendo-se sugerido que, nessas condições experimentais, o bordo luminal seria desprovido de relevância funcional (Rennick,

1981; Wedeen e Weiner, 1973);

- 4) nas experiências *in vitro* descritas no capítulo III (nas quais o bordo luminal perde relevância funcional em favor do basolateral), evidenciou-se uma potenciação do processo de desaminação da DA durante o seu efluxo celular, em comparação com o observado nos estudos *in vitro ex vivo*;
- 5) estudos efectuados no Homem saudável evidenciaram que a síntese renal da DA, a partir da L-DOPA administrada por via sistémica, se traduz a nível urinário por um aumento paralelo na excreção de L-DOPA, DA e DOPAC enquanto que, no plasma, apenas a L-DOPA e o DOPAC aumentam significativamente (Wolfowitz e col., 1993).

De acordo com as evidências apresentadas, a tese que defendemos é a de que a DA transportada pelo bordo luminal tem acesso ao fluido tubular, de onde não é posteriormente reabsorvida ou metabolizada em grau significativo, ao passo que a DA transportada pelo bordo basolateral é submetida a um processo intenso de metabolização desaminativa, a anteceder o seu acesso à circulação e/ou a sua secreção na urina.

A localização da barreira metabólica que a DA cruza durante o seu efluxo merece também alguns comentários. Várias evidências acumuladas ao longo do presente estudo permitem concluir que a DA formada nos tecidos renais não é significativamente captada por terminações neuronais simpáticas, estando a sua desaminação confinada, maioritariamente, a estruturas extraneuronais:

- 1) a desnervação simpática do rim não modificou a actividade das duas formas de MAO (tipos A e B), quando avaliada em tecidos renais de Rato por métodos radioquímicos e fazendo uso de substratos específicos (ver cap. IID);
- 2) a dimensão do processo de desaminação da DA recém-formada nos tecidos renais não foi modificada pela desnervação simpática do rim (ver cap. IID),
- 3) os teores de NA em fatias de rim não foram modificados pela incubação dos tecidos com concentrações crescentes de L-DOPA, até 2500 μM (ver cap. IIB) e
- 4) a recuperação funcional de rins, únicos e desnervados, em doentes submetidos a transplante renal, traduziu-se por uma correlação positiva entre a recuperação da função renal e a capacidade dos tecidos renais para desaminar a DA em DOPAC.

Excluído um papel de relevo dos compartimentos neuroniais na desaminação da DA de síntese renal, as evidências acumuladas ao longo deste trabalho favorecem a possibilidade de que sejam as próprias células onde a síntese da DA se processa a constituir o principal compartimento responsável pela desaminação da amina, durante o seu efluxo. De facto, os estudos apresentados no cap IIB sugeriram que a MAO-A está localizada no compartimento onde a síntese da DA se processa, enquanto que a MAO-B poderá predominar no exterior desse compartimento. Por outro lado, a análise do efluxo da DA e do DOPAC nos estudos de perfusão evidenciou que a amina e o metabolito desaminado têm origem num sistema monocompartimental, com actividade de MAO, no qual a MAO-A desempenha um papel proeminente (ver cap. III).

O envolvimento das células tubulares renais no processo de desaminação da DA que se observa durante o seu efluxo, implica, no entanto, que a DA possa estar protegida dos efeitos da MAO a nível intracelular ou, em alternativa, que a amina seja submetida a um processo de recirculação nessas estruturas celulares, depois de as ter abandonado. Não existem evidências que sustentem a presença de formas de armazenamento da DA nas células tubulares renais; por outro lado, o bordo basolateral das células dos túbulos contornados proximais está implicado na secreção activa das catecolaminas, incluindo a DA, presente no espaço peritubular (Rennick, 1981). Estes factos, associados à evidência de que o processo de metabolização desaminativa da DA, em fatias de rim de Rato, é sensível às manobras que interferem com o transporte de sódio nas células tubulares renais (cap. IIC), permitem favorecer a hipótese de uma recirculação/recaptação da DA, nas células tubulares, dependente do transporte de sódio, a quem poderá caber a responsabilidade pelo acesso da amina ao local de desaminação.

A importância atribuída à desaminação na metabolização da DA de síntese renal ficou bem patente ao longo deste trabalho, não só nos estudos *in vitro* a que atrás se fez referência, mas também em todos os estudos *in vivo* que avaliaram a actividade do sistema dopaminérgico renal durante a carga salina, em condições de inibição continuada da síntese do ON, no decurso da administração de CsA e ao longo da recuperação da função renal, em doentes submetidos a transplante renal (ver capítulos IV, V, VI e VII). De facto, o metabolito desaminado da DA (DOPAC) foi, em todas as condições, aquele cuja excreção urinária melhor se correlacionou com a actividade do sistema dopaminérgico renal.

Este achado permite avançar, como conclusão importante deste trabalho, que a determinação da excreção urinária de DOPAC deve ser assumida como

parâmetro adicional, a incluir nos estudos que têm por objectivo avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal.

A importância que envolve o conhecimento dos fenómenos que regulam a metabolização desaminativa da DA respeita também a hipótese de, através da inibição desse processo, ser possível aumentar os teores da amina ao nível dos receptores, por forma a potenciar os seus efeitos. Neste contexto, os estudos que avaliaram a influência da selegilina (um inibidor selectivo da MAO-B), sobre a resposta natriurética à administração da GluDOPA no Homem saudável, não evidenciaram qualquer potenciação das acções natriuréticas da DA formada no rim a partir deste pró-fármaco, apesar do aumento observado na excreção urinária da amina e da redução, concomitante, verificada na excreção urinária de DOPAC (Freestone e col., 1992). Estes autores atribuíram à elevada concentração de DA atingida nos tecidos renais com a dose de GluDOPA administrada e à consequente saturação dos receptores da DA, a ausência de efeitos da inibição selectiva da MAO-B sobre a excreção urinária de sódio.

Apesar das evidências que sugerem que a MAO-B pode assumir importância na desaminação da DA formada no rim humano (Fernandes e Soares-da-Silva, 1992; cap. IIIC) é possível, no entanto, que esta forma da enzima desempenhe um papel menos relevante do que a MAO-A na metabolização que antecede o acesso da DA aos seus receptores; de facto, como atrás se fez referência, os resultados deste trabalho sugerem que a MAO-A está localizada no compartimento onde a síntese da DA se processa, enquanto que a MAO-B parece estar localizada no exterior desse compartimento (ver cap. IIB).

Embora a influência da inibição selectiva da MAO-A sobre a actividade do sistema dopaminérgico renal não tenha sido ainda avaliada no Homem, estudos de inibição selectiva da MAO-A no Rato durante a carga salina evidenciaram, algo inesperadamente, uma resposta antinatriurética, ao que se associou uma redução na excreção urinária de DA e de DOPAC e um aumento na excreção urinária de 5-HT (Vieira-Coelho e col., 1993b). Este efeito antinatriurético, resultante da inibição selectiva da MAO-A durante a carga salina, não se verificou em condições de dieta NS e foi anulado pelo antagonista selectivo para os receptores 5-HT_{1A}, o WAY 100135 (Soares-da-Silva e col., 1994), facto que permitiu concluir que teria resultado de efeitos mediados pela 5-HT de síntese renal sobre receptores 5-HT_{1A}. Torna-se evidente, através dos resultados desses estudos, que a actividade das enzimas envolvidas na metabolização renal da DA poderá exercer uma influência determinante na actividade do sistema, não só pelo seu envolvimento directo na

inactivação da DA, mas também pela sua intervenção sobre os níveis de mediadores com efeitos antagónicos dos da DA, como a propósito se verificou para a 5-HT.

A relevância clínica do que atrás ficou exposto abarca um grande leque de situações fisiopatológicas, na génese das quais foi sugerido o envolvimento de desregulações na actividade do sistema dopaminérgico renal. Como resulta do conhecimento das acções da DA endógena, esses distúrbios incluem, sobretudo, formas de hipertensão e situações que cursam com tendência antinatriurética.

Tem sido documentada em determinados grupos de doentes hipertensos uma incapacidade para aumentar apropriadamente a excreção urinária de DA durante a carga salina. Na medida em que a DA é, pelos seus efeitos natriuréticos e vasodilatadores, um mediador anti-hipertensor potencial, essa constatação levou a sugerir que algumas formas de hipertensão arterial poderiam envolver na sua génese uma incapacidade para ajustar a reabsorção tubular de sódio durante a carga salina, em consequência de uma deficiência na produção renal de DA. Essa disfunção foi inicialmente observada por autores japoneses e descrita para doentes com hipertensão sensível ao sódio (Shikuma e col., 1986) ou com actividade de renina baixa (Imura e col., 1990), bem como para os seus familiares do primeiro grau, normotensos (Saito e col., 1986). Mais tarde, a produção renal de DA durante a carga salina foi avaliada em outros grupos, quer de hipertensos quer de normotensos, revelando-se diferenças na resposta do sistema dopaminérgico renal entre as diferentes etnias (Lee e col., 1990). Neste contexto, estudos efectuados com indivíduos de raça caucasiana evidenciaram uma boa correlação entre a excreção de sódio e DA na urina nos normotensos e permitiram separar os hipertensos em dois grupos; à semelhança dos estudos de autores japoneses, a característica de sensibilidade ao sódio da hipertensão mostrou associar-se a uma incapacidade para aumentar apropriadamente a produção renal de DA durante a carga salina, facto que não se verificou no grupo em que a hipertensão mostrou ser resistente ao sódio. Em indivíduos de raça negra, por outro lado, verificou-se uma incapacidade para aumentar apropriadamente a produção renal de DA durante a carga salina, quer em normotensos quer em hipertensos (Sowers e col., 1988). Esta característica da raça negra, quanto à produção renal de DA em resposta à ingestão de sódio, pode traduzir a maior prevalência de um défice do sistema dopaminérgico renal nesta população e permite sugerir o seu envolvimento na maior predisposição que este grupo revela

para o desenvolvimento de hipertensão, com as características de sensibilidade ao sódio.

Desconhece-se ainda a natureza do(s) distúrbio(s) responsáveis pela incapacidade evidenciada por estes doentes para aumentar apropriadamente a formação renal de DA durante a carga salina. A verificação de que o aporte da L-DOPA aos tecidos renais pode ser regulado e assumir o papel de passo limitante na síntese renal da DA, permite sugerir o envolvimento, na patogénese dessas situações, de uma incapacidade para mobilizar apropriadamente a L-DOPA com acesso ao rim. De acordo com essa possibilidade, as formas de hipertensão a que se fez referência poderão envolver, na sua fisiopatologia, um distúrbio idêntico ao observado em doentes com edema cíclico idiopático (Kuchel e col., 1987) ou nos animais tratados com CsA (ver cap. VI), nos quais se verificou uma tendência antinatriurética, associada a uma redução na formação renal de DA, tendo como pano de fundo uma deficiência no aporte da L-DOPA aos tecidos renais. Tal sugestão é reforçada pelos resultados de estudos que evidenciaram uma hipersensibilidade dos receptores da DA em doentes hipertensos, traduzida, nessas situações, por efeitos mais acentuados da DA e dos agonistas dos receptores da DA sobre a diurese, a natriurese e a hemodinâmica renal (Andrejak e Hary, 1986; Worth e col., 1985b).

Outra possibilidade alternativa que pode explicar a incapacidade de determinados grupos de doentes hipertensos para aumentar apropriadamente a produção renal de DA diz respeito à existência de uma disfunção na descarboxilação renal da L-DOPA. Tal sugestão é sustentada pelos resultados de um estudo em que foi avaliada a resposta de doentes hipertensos, e dos seus controlo normotensos, à administração da L-DOPA (Kuchel e Shigetomi, 1992); nesse trabalho, os hipertensos evidenciaram uma menor capacidade para formar DA a partir da L-DOPA exógena, consistente com a existência de uma incapacidade dos tecidos renais para descarboxilar o precursor da DA.

É possível que as alterações na actividade do sistema dopaminérgico renal que se verificam em alguns doentes hipertensos possam resultar também de disfunções nas vias de transdução do sinal intracelular que resulta da activação dos receptores da DA. A investigação experimental centrada nesta questão tem sido intensa e permitiu evidenciar, no Rato espontaneamente hipertenso (SHR), uma resposta deficiente do AMPc à activação dos receptores da DA; este fenómeno mostrou resultar, por sua vez, da presença de deficiências ao nível dos receptores tubulares D_1 , neste modelo animal de hipertensão (Felder e col., 1992;

Ohbu e Felder, 1993). Outros estudos, também no SHR, sugeriram disfunções na via da fosfolípase C e o seu envolvimento na incapacidade para se conseguir uma inibição apropriada da ATPase Na^+/K^+ durante a activação dos receptores da DA (Chen e col., 1993). No Rato Dahl sensível ao sódio, por outro lado, foi identificada uma incapacidade dos agonistas D_1 para estimular a acumulação de AMPc no córtex renal, facto que não se verificou no Rato Dahl resistente ao sódio (Nishi e col., 1993). Apesar do interesse inegável destes resultados, as evidências colhidas não são, no entanto, de fácil extrapolação para o Homem; de facto, as disfunções ao nível dos receptores da DA e nas vias de transdução dos sinais intracelulares decorrentes da sua activação entram em conflito com as evidências que associam às disfunções do sistema dopaminérgico renal, no Homem, uma hipersensibilidade dos receptores, traduzida por efeitos mais acentuados à administração da DA.

Nos últimos anos, a DA administrada por via exógena tem vindo a ser largamente utilizada como arma terapêutica para prevenir o desenvolvimento, ou atenuar a gravidade, de formas de insuficiência renal aguda (IRA). Os contextos em que a sua aplicação tem revelado maiores vantagens são os que se acompanham de hipoperfusão renal secundária a depleção de volume ou vasoconstrição renal. As razões que fundamentam a sua utilização nestas situações decorrem da importante acção vasodilatadora renal da DA, a qual pode ajudar a preservar o fluxo sanguíneo renal em zonas do nefrónio com maior sensibilidade à redução no aporte de O_2 (túbulo contornado proximal e ramo ascendente da ansa de Henle). Por outro lado, o efeito inibitório da DA sobre a actividade da ATPase Na^+/K^+ pode resultar em benefício na IRA, não só por reduzir o consumo de O_2 nas células tubulares, mas também pelo estímulo natriurético de que se acompanha. A DA e os precursores da DA mostraram atenuar a gravidade da IRA secundária a agressões isquémicas e nefrotóxicas quer no Homem (Henderson e col., 1980; Davis e col., 1982) quer no Rato (Iaina e col., 1977; Casson e col., 1983a). Desconhece-se ainda, no entanto, a forma como se comporta a actividade do sistema dopaminérgico renal nas diferentes formas de IRA. A sua avaliação nestas situações poderá contribuir não só para fundamentar a utilização dos agentes dopaminérgicos na IRA já estabelecida, como permitirá sugerir a sua utilização, com carácter profiláctico, nos contextos em que se verifique um défice na actividade do sistema dopaminérgico renal.

Uma situação que se acompanha de tendência para a retenção de sódio e hipertensão é a insuficiência renal crónica (IRC). Nesta, os estudos que avaliaram a produção renal de DA documentaram uma redução na excreção urinária da

amina e uma incapacidade para aumentar apropriadamente a sua produção, durante a carga salina (Casson e col., 1983b). A incapacidade dos doentes com IRC para aumentar a produção renal de DA durante a carga salina pode reflectir a perda de unidades funcionais com capacidade para descarboxilar a L-DOPA circulante. Na IRC, a existência de um défice, relativo ou absoluto, na produção renal de DA, permite sugerir a utilização de agentes dopaminérgicos, não só para combater a tendência antinatriurética e a hipertensão sensível ao sódio, mas também para procurar prevenir a deterioração da função renal que resulta do fenómeno de hiperfiltração glomerular, consequente à perda da reserva funcional do rim. De facto, a DA e os agonistas da DA do tipo D₁ exercem efeitos renais vasodilatadores que se traduzem, sobretudo, por um aumento do fluxo sanguíneo renal, com reduções da fracção de filtração e da pressão intraglomerular (Hsieh e Golberg, 1979). A sugestão a favor do uso de agentes dopaminérgicos para prevenir a progressão da IRC é sustentada pelos resultados de estudos que documentaram a preservação da taxa de filtração glomerular em doentes com insuficiência renal moderada através do uso da ibopamina, um agonista para os receptores da DA (Docci e col., 1986). Contudo, tal opinião não é partilhada pelos resultados de outros estudos; de facto evidenciou-se que embora a resposta natriurética à DA possam estar preservada na IRC, os efeitos vasodilatadores da amina poderão ser significativamente atenuados, em paralelo com a perda da reserva funcional do rim (Smith, 1990). Na IRC, aos efeitos vasodilatador e natriurético dos agentes dopaminérgicos poderão ainda associar-se, com vantagem, efeitos inibitórios sobre a reabsorção tubular de fósforo. De facto, como foi referido anteriormente, foram recentemente descritos efeitos fosfatúricos da DA, independentes e aditivos dos da paratormona (Kaneda e Bello Reuss, 1983; Gahn e col., 1993). Tal sugere a possibilidade de o défice da actividade do sistema dopaminérgico renal que se verifica na IRC poder contribuir para a incapacidade revelada por estes doentes para controlar a propriadamente o balanço de fósforo. O papel da DA e dos agentes dopaminérgicos no controlo do hiperparatiroidismo e da osteodistrofia renal, embora merecedores de um estudo aprofundado e que se revela aliciante atendendo às suas implicações clínicas, cai ainda, contudo, no campo da especulação.

O fenómeno de hiperfiltração glomerular e o seu potencial envolvimento na instalação de lesões de esclerose glomerular tem sido também documentado na diabetes. Neste caso, a hiperfiltração glomerular assume-se como um achado precoce, a que se assiste na presença de uma função renal ainda conservada. Na

diabetes está bem documentada, também, a dificuldade em conseguir-se o controle apropriado da excreção urinária de sódio durante a carga salina, mesmo em fases iniciais da doença (Roland e col., 1986). É interessante ter-se verificado em diabéticos, mesmo normotensos, uma deficiente produção renal de DA e uma incapacidade para aumentar apropriadamente a excreção urinária da amina durante a carga salina (Stevinkel e col., 1991). Neste contexto, é possível admitir que um déficit na produção renal de DA possa estar envolvido no desenvolvimento da hipertensão e na redução da ARP, que caracteristicamente se associam à evolução desta doença; essa possibilidade, associada ao fenómeno de hiperfiltração glomerular a que se fez referência, permite perspectivar o interesse potencial da utilização de agentes dopaminérgicos na diabetes e justifica o estudo da actividade do sistema dopaminérgico renal, nesta situação.

Conhecida a associação entre a carga salina e a produção renal de DA, é possível ainda antecipar que as situações que se acompanham de uma tendência para a formação de edema, como a insuficiência cardíaca congestiva, possam envolver na sua fisiopatologia disfunções na actividade do sistema dopaminérgico renal. Desconhece-se ainda a forma como é regulada a actividade do sistema dopaminérgico renal na insuficiência cardíaca bem como qual a responsabilidade da DA endógena na tendência antinatriurética que se observa nessa situação. Alguns dados permitem sugerir a possibilidade de um aumento da produção renal de DA na insuficiência cardíaca: (1) a hiperactividade simpática que acompanha as formas graves da doença (Hasking e col., 1986), à qual poderá associar-se um aumento na libertação da L-DOPA com acesso ao rim (cap. IV e V); (2) o aumento nos níveis plasmáticos de NA e de AI que estimulam o transporte de sódio a nível tubular proximal (Levine e col., 1982) e (3) o aumento nos níveis plasmáticos de DOPAC que foi documentado em formas de insuficiência cardíaca descompensada (Mercurio e col., 1984). Outros elementos, contudo, permitem suspeitar nesta situação da existência de um déficit relativo ou absoluto na actividade do sistema dopaminérgico renal: (1) os conhecidos efeitos inibitórios do ANP sobre o transporte tubular da L-DOPA e a formação renal da DA (Soares-da-Silva e Fernandes, 1991a; 1992a) e (2) a hipersensibilidade dos receptores da DA que está bem documentada na insuficiência cardíaca e que se traduz, nestas situações, por efeitos renais mais acentuados à administração da amina (Ramdhore e col., 1973) e aos agonistas para os receptores da DA (Rajfer e col., 1986).

A interacção entre a DA e os outros mediadores envolvidos na regulação do transporte tubular de sódio representa um campo de estudo que só agora começa

a ser avaliado, mas que poderá revelar-se da maior importância para a compreensão dos processos que o rim utiliza para garantir a homeostasia do sódio e da volemia. É possível que alguns dos distúrbios caracterizados por uma tendência antinatriurética e que se acompanham de uma incapacidade para aumentar apropriadamente a produção renal de DA possam envolver, na sua fisiopatologia, um desequilíbrio entre a acção da DA e a de mediadores responsáveis por efeitos antagónicos sobre o transporte tubular de sódio. De acordo com esta possibilidade, essas situações poderão reproduzir o fenómeno observado no Rato, em condições de inibição selectiva da MAO-A durante a carga salina, a que anteriormente se aludiu, o qual se traduziu por uma tendência antinatriurética, acompanhada de uma redução na excreção urinária de DA e de uma potenciação das acções da 5-HT sobre a reabsorção tubular de sódio (Vieira-Coelho e col., 1993b; Soares-da-Silva e col., 1994). O facto de este fenómeno não ter sido observado em condições de dieta NS, vem salientar o papel determinante do balanço do sódio no comportamento recíproco destes dois sistemas.

Pelos motivos expostos, a análise em simultâneo do comportamento dos dois sistemas renais, dopaminérgico e 5-hidroxitriptaminérgico, nas situações caracterizadas por tendência antinatriurética ou hipertensão, constitui um campo aliciante de investigação clínica e experimental, a prosseguir no futuro.

IX - RESUMO

Admite-se que a DA endógena de síntese renal desempenha um papel de relevo na regulação fisiológica da natriurese. Constitui ainda um desafio, no entanto, o esclarecimento dos mecanismos que regulam a síntese da DA nos tecidos renais. O objectivo do presente trabalho foi o de contribuir para o estudo do sistema dopaminérgico renal através da avaliação dos processos envolvidos na síntese, transporte e metabolização da DA formada nos tecidos renais.

Para o efeito, procedemos à realização de:

- estudos *in vitro*, em que avalíamos: (1) a formação da DA nas estruturas renais; (2) a contribuição dos elementos neuronais na síntese e metabolização renal da DA; (3) a influência do transporte de sódio na síntese e metabolização renal da DA; (4) os processos que caracterizam o transporte da DA para o exterior do compartimento celular e (5) os fenómenos envolvidos na sua metabolização desaminativa, no Homem e no animal de experiência;
- estudos *in vivo*, em que avalíamos a actividade do sistema dopaminérgico renal: (6) em resposta ao aumento da ingestão de sódio na dieta; (7) durante o estabelecimento de formas de hipertensão produzidas em modelos experimentais pela inibição continuada da síntese do óxido nítrico (ON); (8) num modelo experimental de nefrotoxicidade pela ciclosporina A (CsA) e (9) na recuperação funcional deste sistema dopaminérgico, em doentes insuficientes renais crónicos submetidos a transplante renal.

Estudos *in vitro*

• Avalíamos a síntese renal da DA em experiências nas quais procedemos à incubação de tecidos de córtex e medula renal de Rato com concentrações crescentes de L-DOPA. Nesses estudos, a formação da DA nos tecidos renais mostrou ser dependente da concentração de L-DOPA adicionada ao meio, ocorreu sobretudo na zona cortical e não foi acompanhada de modificações nos teores teciduais de NA. Numa série de experiências em que avalíamos a formação da DA

em rins inervados e desnervados, verificámos que a formação da amina nos tecidos renais não é modificada pela desnervação simpática.

Globalmente, os resultados destes trabalhos revelam que a DA de síntese renal tem origem, sobretudo, em estruturas celulares extraneuronais localizadas na zona cortical do rim e que a amina recém-formada não é significativamente captada pelas terminações neuronais simpáticas.

- Numa série de estudos, procedemos à incubação de fatias e homogeneizados de rim provenientes de três espécies (Homem, Rato e Cão) na presença de concentrações crescentes de L-DOPA exógena. Estas experiências revelaram que o rim de Rato dispõe de maior capacidade do que o rim humano ou o de Cão para sintetizar DA e que esse facto resulta da existência de uma actividade de DAAA mais elevada no rim de Rato, do que nos tecidos renais das outras duas espécies. Estes trabalhos evidenciaram uma grande semelhança na afinidade da DAAA pelo seu substrato (K_m) entre os tecidos provenientes de rim humano, de Cão e de Rato; os valores encontrados para este parâmetro revelaram ser significativamente mais elevados do que os descritos para a concentração plasmática da L-DOPA.

Globalmente, os resultados destas experiências revelam que as características cinéticas da DAAA não permitem distinguir a enzima presente nas três espécies estudadas e sugerem que o aporte da L-DOPA ao citoplasma das células tubulares renais poderá exercer um papel mais importante na regulação da actividade do sistema dopaminérgico renal do que as variações na actividade da DAAA.

- Avaliámos a influência do sódio na síntese renal da DA. Nessas experiências, a formação da DA em fatias de córtex renal humano e de Rato, mas não em homogeneizados, mostrou ser dependente da concentração de sódio presente no meio extracelular e sensível a manobras que interferem com o transporte do sódio nas células tubulares renais, tais como a inibição da ATPase Na^+/K^+ (ubaína) e o aumento da permeabilidade da membrana celular ao sódio (anfotericina B). A influência do sódio sobre o transporte da L-DOPA em fatias de rins inervados e desnervados mostrou não ser modificada pela desnervação simpática.

Globalmente, estes estudos evidenciam que a síntese da DA nos tecidos renais ocorre sobretudo em estruturas celulares extraneuronais e revelam também que a formação da amina nestes compartimentos depende, em parte, do

transporte do seu precursor através de um processo dependente de energia, em que o transporte de sódio desempenha um papel fundamental.

O papel da desaminação na metabolização da DA de síntese renal e a sua relação com os processos que intervêm no efluxo da DA formada nos tecidos renais foram avaliados em estudos *in vitro* e *in vitro ex vivo*.

- Em estudos efectuados com tecidos renais provenientes de três espécies (Homem, Rato e Cão) verificámos que a desaminação constitui um processo importante envolvido na inactivação da DA em todos tecidos renais estudados, assumindo, no entanto, maior dimensão no rim humano. Nas experiências em que avaliámos a desaminação da DA formada em tecidos de córtex e medula renal de Rato na presença de concentrações crescentes de L-DOPA, verificámos que a desaminação ocorre sobretudo na zona cortical, acompanhando paralelamente a formação da DA, quer no córtex quer na medula. Numa série de estudos em que avaliámos a desaminação da DA em rins inervados e desnervados, verificámos que a desaminação da DA nos tecidos renais não é modificada pela desnervação simpática.

Globalmente, estes resultados evidenciam que a desaminação assume um papel de grande dimensão na inactivação da DA de síntese renal, em particular no Homem, e que ocorre, sobretudo, em estruturas celulares extraneuronais que dispõem de elevada actividade de MAO.

- Verificámos que a desaminação da DA em fatias de córtex renal de Rato, mas não em homogeneizados, é dependente da concentração de sódio presente no meio extracelular e sensível a manobras que interferem com o transporte do sódio nas células tubulares renais, tais como a inibição da ATPase Na^+/K^+ (ubaína) e o aumento da permeabilidade da membrana celular ao sódio (anfotericina B). Em experiências efectuadas com rins inervados e desnervados, verificámos que a influência do sódio sobre a desaminação da DA, em fatias de rim, não é modificada pela desnervação simpática.

Globalmente, estes resultados reforçam o conceito de que a desaminação da DA nos tecidos renais ocorre, sobretudo, em estruturas celulares extraneuronais e revelam que o acesso da amina ao compartimento onde a desaminação se processa é parcialmente sensível às manobras que interferem com o transporte de sódio nas células tubulares renais.

- Avaliámos o papel da MAO-A e da MAO-B na desaminação da DA de síntese renal, em estudos de incubação, com fatias de córtex renal de Rato. Nesses trabalhos, a inibição selectiva da MAO-A condicionou um aumento dependente da concentração na acumulação tecidual da DA e uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual do DOPAC; a inibição selectiva da MAO-B, por outro lado, produziu uma redução dependente da concentração na acumulação tecidual do DOPAC, sem modificar a acumulação da DA nas fatias de rim.

Globalmente, estes resultados evidenciam o envolvimento das duas formas de MAO na desaminação da DA de síntese renal e sugerem que a sua acção se exerce em compartimentos distintos.

- Perifundimos tecidos renais provenientes de animais tratados com L-DOPA 15 minutos antes do sacrifício (estudos *in vitro ex vivo*); estes estudos evidenciaram um sistema monocompartimental e em estabilidade de efluxo, como responsável pela origem dos níveis da DA e do DOPAC no meio de perfusão. Nestas condições, a relação DOPAC/DA no meio de perfusão foi cerca de duas vezes mais elevada do que a observada nos tecidos. Numa série de experiências em que perifundimos as fatias de rim depois da incubação dos tecidos com L-DOPA (estudos *in vitro*), verificámos uma potenciação do processo de desaminação da DA durante o seu efluxo, comparativamente com o observado nos estudos *in vitro ex vivo*.

Globalmente, estes resultados revelam que a DA de síntese renal é significativamente metabolizada por desaminação no decurso dos processos que intervêm no seu efluxo celular e sugerem que este processo envolve, predominantemente, os teores da amina que abandonam as células tubulares renais através do bordo basolateral.

- Verificámos que a DA formada nos tecidos renais com origem em GluDOPA é significativamente menos desaminada do que a DA formada a partir da L-DOPA. As características cinéticas do efluxo da DA e do DOPAC formados a partir da GluDOPA não se distinguiram, no entanto, das características respectivas da amina e do metabolito desaminado formados a partir da L-DOPA.

Globalmente, estes resultados sugerem que as divergências surgidas entre os efeitos da DA formada no rim a partir dos dois precursores poderão encontrar

explicação no facto de a DA formada a partir da GluDOPA ser significativamente menos desaminada do que a que resulta da descarboxilação da L-DOPA.

- Comparámos as características cinéticas do efluxo da DA e do DOPAC formados a partir da L-DOPA, com as da NA e do DOPEG formados nos mesmos compartimentos celulares a partir do L-DOPS (estudos *in vitro ex vivo*). Nessas experiências, o efluxo da DA e do DOPAC revelou ter origem num sistema monocompartimental, com actividade de MAO e em estabilidade de efluxo; pelo contrário, o efluxo do DOPEG não evidenciou ter origem no mesmo compartimento que a NA.

Globalmente, estes resultados sugerem que os processos envolvidos na metabolização desaminativa da NA formada nas células tubulares renais se distinguem dos que são responsáveis pela desaminação da DA de síntese renal.

- Os resultados dos estudos *in vitro ex vivo* efectuados com tecidos renais de animais tratados com L-DOPA e L-DOPS permitiram-nos calcular as constantes de efluxo (k) da DA, NA, DOPAC e DOPEG nos tecidos renais, as quais evidenciaram a seguinte ordem de grandeza: ${}^k\text{DOPEG} \gg {}^k\text{DOPAC} > {}^k\text{DA} = {}^k\text{NA}$.

Globalmente, estes resultados revelam que as características de efluxo dos compostos catecólicos sintetizados nas células tubulares renais são reguladas pela sua lipofilia relativa.

- Perante as evidências de que a DA formada nas células tubulares renais é significativamente desaminada no decurso do processo de efluxo celular, decidimos estudar o papel das duas formas de MAO (tipos A e B) nesse processo; estudámos a influência de inibidores da MAO, selectivos e não selectivos, sobre o efluxo da DA, em experiências de perfusão com tecidos de córtex renal humano e de Rato.

Esses estudos evidenciaram que, no rim de Rato, a MAO do tipo A é a forma mais importante da enzima envolvida na desaminação da DA durante o efluxo celular, embora a amina possa ter também um acesso limitado à MAO-B; no rim humano, por outro lado, o papel da MAO-B no processo de desaminação da DA durante o efluxo celular parece assumir uma importância maior do que no Rato.

Estudos *in vivo*

Em todos os estudos *in vivo* procedemos à colheita de amostras de urina de 24 horas para quantificação da excreção urinária de DA, do seu metabolito desaminado (DOPAC) e desaminado+metilado (HVA). Em alguns estudos, procedemos ainda à determinação da excreção urinária do precursor da DA (L-DOPA), do metabolito metilado da DA (3-MT), da NA, AD, 5-HT e do seu metabolito desaminado (5-HIAA). A excreção urinária destes compostos foi correlacionada com a excreção urinária de sódio e com os indicadores da função renal. Em alguns trabalhos, determinámos os níveis plasmáticos da L-DOPA, NA, AD e DOPEG. Alguns estudos *in vivo* foram ainda complementados com experiências *in vitro* em que avaliámos: (1) a actividade das enzimas responsáveis pela formação (DAAA) e pela metabolização (MAO-A e B; COMT) da DA de síntese renal; (2) o transporte da L-DOPA pelas células tubulares renais e (3) as características cinéticas de efluxo da DA formada nos tecidos renais. Estes estudos proporcionaram, como mais relevantes, os seguintes resultados:

- Um aumento no aporte da L-DOPA aos tecidos renais de animais submetidos a dieta HS e à inibição continuada da síntese do ON. Pelo contrário, verificámos uma redução no aporte do precursor da DA aos tecidos renais de ratos submetidos a tratamento continuado com doses nefrotóxicas de CsA. Nas três situações, as variações na excreção urinária de DA traduziram as modificações observadas no aporte da L-DOPA aos tecidos renais. Os tecidos renais dos animais tratados com CsA evidenciaram uma maior capacidade para formar DA quando a L-DOPA exógena foi administrada.

Globalmente, estes resultados evidenciam que o precursor da DA pode ser libertado a nível sistémico em resposta a estímulos apropriados e sugerem que o seu aporte aos tecidos renais pode constituir um passo limitante na síntese renal da DA.

- Verificámos nos animais submetidos a dieta HS e nos tratados com o inibidor da síntese do ON, que o aporte da L-DOPA aos tecidos renais se correlacionou directamente com os indicadores da actividade simpática. Pelo contrário, nos ratos tratados com CsA os níveis plasmáticos da L-DOPA não acompanharam no mesmo sentido os indicadores da actividade simpática. É interessante ter-se

observado uma tendência antinatriurética nos ratos tratados com CsA, facto que não se verificou nos animais tratados com o L-NAME, nem nos ratos tratados com dieta HS.

Globalmente, estes resultados sugerem que a libertação da L-DOPA a partir dos compartimentos neuronais simpáticos pode funcionar como um mecanismo modulador da tendência antinatriurética que resulta da acção da NA.

- Verificámos um aumento na actividade renal da DAAA em animais com hipertensão secundária à inibição continuada da síntese do ON; o aumento na actividade da DAAA dos animais tratados com L-NAME foi acompanhado de um aumento simultâneo na excreção urinária diária de DA e de 5-HT.

Globalmente, estes resultados sugerem que as modificações na actividade da DAAA renal podem estar implicadas na regulação da síntese renal da DA. Estes resultados sugerem também que as modificações na actividade da DAAA se repercutem, indiscriminadamente, sobre a formação de mediadores com efeitos antagónicos sobre a reabsorção tubular de sódio, como a propósito se verificou para a DA e a 5-HT.

- Verificámos que a actividade do transportador da L-DOPA nas células tubulares renais está aumentada nos animais submetidos a nefrotoxicidade pela CsA. Este fenómeno, que se verificou na presença de uma redução na excreção urinária de DA, poderá ter sido secundário a efeitos directos da CsA sobre o transporte de membrana para a L-DOPA ou, em alternativa, ter resultado de um mecanismo desenvolvido por forma a compensar a redução no aporte da L-DOPA aos tecidos renais destes animais. O aumento na actividade do transporte da L-DOPA nos tecidos renais dos animais tratados com CsA mostrou ser responsável pela sua maior capacidade para formar DA quando a L-DOPA exógena foi administrada.

Globalmente, estes resultados revelam que a captação tubular da L-DOPA pode exercer um papel importante na regulação da síntese da DA nos tecidos renais.

- Nos estudos efectuados com ratos Wistar submetidos a uma dieta HS, não observámos modificações significativas na excreção urinária de DA e dos seus metabolitos (DOPAC, 3-MT, HVA), ou da 5-HT e do seu metabolito desaminado (5-HIAA). No entanto, verificámos um aumento significativo na excreção urinária de

L-DOPA, durante o mesmo período. É possível que o perfil discrepante entre a excreção urinária da DA e da L-DOPA durante a dieta HS possa ter resultado de uma redução na captação tubular do precursor da DA, já que a actividade descarboxilásica do rim mostrou estar aumentada nestas condições.

Globalmente, os resultados destes estudos sugerem que a resposta do sistema dopaminérgico renal à carga salina pode variar com a estirpe animal estudada e com a dimensão da carga salina utilizada. Estes resultados reforçam também a importância do transporte tubular da L-DOPA na regulação da síntese da DA nos tecidos renais.

- Em todos os estudos *in vivo* incluídos neste trabalho verificámos que o DOPAC foi o metabolito da DA cuja excreção urinária melhor se correlacionou com a actividade do sistema dopaminérgico renal. Este facto, associado à importância que os estudos *in vitro* atribuíram à desaminação, no processo de inactivação da DA de síntese renal, permite sugerir que a determinação dos níveis urinários de DOPAC deve ser incluída nos estudos que têm por objectivo avaliar a actividade do sistema dopaminérgico renal.

X - SUMMARY

Dopamine of renal origin is believed to play a major role in the renal handling of sodium. However, the mechanisms which regulate the activity of the renal dopaminergic system are largely unknown yet. The aim of the present work was to study the processes involved in the synthesis, transport and metabolism of dopamine formed in renal tissues.

Some studies were performed under *in vitro* conditions in order to evaluate: (1) the formation of dopamine in renal tissues; (2) the involvement of the renal nerves on the synthesis and metabolism of renal dopamine; (3) the role of sodium on the synthesis and metabolism of renal dopamine; (4) the outflow of dopamine formed in renal tissues and (5) the involvement of deamination on the metabolism of renal dopamine in the human and the rat kidney.

Another group of studies were performed under *in vivo* conditions in order to evaluate the activity of the renal dopaminergic system: (6) during high sodium intake; (7) in an experimental model of hypertension induced by chronic nitric oxide synthase inhibition; (8) in an experimental model of cyclosporine A induced nephrotoxicity and (8) during the recovery of the renal function in human transplant recipients.

***In vitro* experiments**

- The formation of dopamine was studied in tissues of the renal cortex and medulla of rats incubated with increasing concentrations of L-DOPA. In these experiments, the formation of dopamine was found (1) to occur mainly in the cortical zone, (2) to be dependent on the concentration of L-DOPA used and (3) not to be accompanied by changes in noradrenaline tissue levels. Another group of studies was performed in order to study the formation of dopamine in denervated and control kidneys; these experiments revealed that the renal synthesis of dopamine is not influenced by the presence of renal nerves.

It is concluded that, in the kidney, the synthesis of dopamine occurs mainly in extraneuronal compartments located in the cortical zone and the newly-formed amine is not taken up significantly by renal sympathetic neurones.

- In experiments performed in slices of human, dog and rat kidney loaded with increasing concentrations of L-DOPA, the accumulation of dopamine in all three species was found to be dependent on the concentration of L-DOPA, being the rat renal tissues endowed with a greater ability to produce dopamine, followed by the human and the dog tissues. AAAD activity as determined in kidney homogenates was found to be higher in the rat kidney than that occurring in the human and the dog kidney. No statistically significant differences were found between the K_m values of the three species and these were found to be included in the μM range.

It is concluded that the decarboxylation of L-DOPA to dopamine is greater in the rat kidney followed by the human and the dog kidney; it is also suggested that the involvement of changes in AAAD activity on the renal synthesis of dopamine may be critically dependent on the amount of L-DOPA made available to AAAD.

- In experiments performed in human and rat kidney slices loaded with L-DOPA, the formation of dopamine was found to be dependent on the concentration of sodium in the medium, to be sensitive to the inhibition of the enzyme Na^+-K^+ adenosine triphosphatase (ouabain) and to the activation of mechanisms which bypass the tubular transport of sodium (amphotericin B). In another group of experiments, the sodium-dependent formation of dopamine in renal slices loaded with L-DOPA was found to be similar in denervated and control kidneys.

It is concluded that the synthesis of dopamine in renal tissues occurs mainly in extraneuronal compartments and the access of L-DOPA to AAAD involves a cotransport system of sodium and L-DOPA into the tubular epithelial cells.

- The role of deamination in the metabolism of renal dopamine was examined in human, dog and rat renal tissues loaded with exogenous L-DOPA. In these studies, the newly-formed dopamine was found to undergo rapid deamination into DOPAC in all three species, though more intensely in the human than in the dog or rat kidney. The deamination of newly-formed dopamine in tissues of the renal cortex and medulla of rats incubated with increasing concentrations of L-DOPA revealed that the formation of DOPAC paralleled the synthesis of dopamine, thus occurring mainly in the cortical zone. In studies performed in denervated and control

kidneys, the deamination of renal dopamine and the activity of the two forms of MAO (types A and B), both in the cortex and in the medulla, were found not to be influenced by the presence of renal nerves.

It is concluded that, in the kidney, the deamination of dopamine plays an important role in the inactivation of the amine and occurs mainly in MAO rich extraneuronal compartments located in the cortical zone.

- In experiments performed with rat kidney slices loaded with L-DOPA, but not in kidney homogenates, the deamination of newly-formed dopamine to DOPAC was found to be dependent on the concentration of sodium in the medium, sensitive to the inhibition of the enzyme $\text{Na}^+\text{-K}^+$ adenosine triphosphatase (ouabain) and to activation of mechanisms which bypass the tubular transport of sodium (amphotericin B). In another group of studies, the sodium-dependent deamination of dopamine in renal slices loaded with L-DOPA was not different in denervated and control kidneys.

These results reinforce the conclusion that the deamination of renal dopamine occurs mainly in extraneuronal compartments and also show that the access of dopamine to MAO is partially dependent on the transport of sodium in tubular epithelial cells.

- The role of MAO-A and MAO-B in the deamination of renal dopamine was studied in experiments performed with rat kidney slices loaded with exogenous L-DOPA. MAO-A selective inhibition produced a concentration-dependent increase of newly-formed dopamine and also reduced DOPAC formation. MAO-B selective inhibition did not affect the accumulation of newly-formed dopamine, but significantly reduced the levels of DOPAC.

It is concluded that both forms of MAO are involved in the deamination of renal dopamine; it is also suggested that most of MAO located inside the compartment where the synthesis of dopamine occurs is of A type.

- The outflow of dopamine and DOPAC formed in renal tissues was evaluated in *in vitro ex vivo* experiments. Rats were injected with L-DOPA, sacrificed 15 min after the injection and slices of the renal cortex were perfused for 50 min thereafter. The analysis of the efflux curves for dopamine and DOPAC revealed that the amine originated in a one compartment system with MAO activity, in steady state of efflux. In these steady state conditions, the ratio of DOPAC to dopamine in the perfusate

was two fold that found in the tissues. When renal slices were incubated with L-DOPA and perfused for 50 min (*in vitro* studies), the ratio of DOPAC to dopamine in the perfusate was found to be three fold that in the tissues and progressively increased throughout the perfusion period.

It is concluded that dopamine may cross a MAO rich cellular compartment before reaching the perfusion medium; it is also suggested that this process involves mainly the amount of dopamine exiting from tubular epithelial cells through the basolateral cell border.

- In some *in vitro ex vivo* experiments, dopamine formed in renal tissues from γ -glutamyl-L-DOPA (GluDOPA) was found to be significantly less deaminated than that resulting from the decarboxylation of L-DOPA. The analysis of the efflux curves for DA and DOPAC originating from GluDOPA did not differ, however, from the corresponding parameters observed with L-DOPA.

It is concluded that the different effects observed in the kidney with dopamine originating from GluDOPA and L-DOPA may be related with the reduced deamination of dopamine formed from GluDOPA.

- In another group of *in vitro ex vivo* experiments, a comparative study of the outflow of dopamine and noradrenaline originating in renal tissues from, respectively, L-DOPA and (L)-*threo*-dihydroxyphenylserine (L-DOPS), was performed. In these studies, the kinetic analysis of the efflux of noradrenaline from renal tissues of rats given L-DOPS revealed the presence of a monocompartmental system with great similarity to that used by dopamine. The processes involved in the formation and outflow of DOPEG appeared, however, to differ from those observed for DOPAC; in fact, in contrast with that observed with dopamine and DOPAC originating from L-DOPA, the tissue levels and outflow of DOPEG did not parallel the rise in noradrenaline tissue and outflow levels.

It is concluded that dopamine and noradrenaline formed in tubular cells may be differently handled namely in mechanisms responsible for their deamination.

- The *in vitro ex vivo* experiments performed with rats given L-DOPA and L-DOPS revealed the following ranking order for the rate constants of efflux of the amines and amine metabolites: $k_{\text{DOPEG}} > k_{\text{DOPAC}} > k_{\text{DA}} = k_{\text{NA}}$.

It is concluded that the outflow of dopamine, noradrenaline, DOPAC and DOPEG formed in tubular epithelial cells depend on their relative lipophyllities, as has been described in other cell types loaded with these catechol derivatives.

- Some experiments were performed in order to evaluate the involvement of MAO-A and MAO-B in the deamination process observed during the efflux of dopamine synthesized in human and rat renal tissues. In studies performed with rat kidney slices, dopamine was found to be deaminated during the efflux mainly by MAO-A. In the human kidney, MAO-B was suggested to play a greater role in the deamination of renal dopamine than in the rat. These results also reinforce the view that MAO-A and MAO-B may act in at least two different cellular compartments.

***In vivo* studies**

In these studies, 24 h acidified urine samples were collected for the quantification of daily urinary excretion of dopamine, DOPAC and HVA. In some studies, daily urinary excretion of L-DOPA, 3-MT, NA, AD, 5-HT and 5-HIAA was also determined. The urinary levels of catechol and catechol derivatives were correlated with the urinary excretion of sodium and with the parameters for the evaluation of the renal function. In some studies, the plasma levels of L-DOPA, NA, AD and DOPEG were also determined. In some of these studies, *in vitro* experiments were also performed, in order to evaluate: (1) the activity of the enzymes responsible for the formation (AAAD) and metabolism (MAO-A and B; COMT) of renal dopamine; (2) the transport of L-DOPA in tubular epithelial cells and (3) the characteristics of the efflux of dopamine formed in renal tissues. These studies provided, as particularly relevant, the following results:

- An increase in the plasma and urinary levels of L-DOPA was observed in conditions of high sodium intake and during chronic NO synthase inhibition. By contrast, the plasma levels of L-DOPA were found reduced in rats treated with CsA for 14 days. In all these conditions, the urinary excretion of dopamine reflected the changes observed in the amount of L-DOPA made available to the kidney. When exogenous L-DOPA was administered to CsA treated rats, they were found to be endowed with a greater ability to synthesise dopamine.

It is concluded that the release of L-DOPA into the plasma may occur in response to appropriate stimuli and the delivery of L-DOPA to the kidney may correspond to a rate limiting step of dopamine formation in renal tubular cells.

- In animals treated with a high sodium diet and in those submitted to chronic NO synthase inhibition, the plasma levels of L-DOPA were found to increase in parallel with the parameters of the sympathetic activity. By contrast, in CsA treated rats the plasma levels of L-DOPA did not parallel the increase observed in NA and DOPEG plasma concentrations; it is interesting to note that CsA treated rats evidenced an antinatriuretic tendency which was observed in neither high sodium diet treated rats, nor in animals submitted to NO synthase inhibition.

In conclusion, these results suggest that the release of L-DOPA from sympathetic neurones and its delivery to renal tubular cells may be important in modulating the antinatriuretic effects of noradrenaline.

- An increase in AAAD activity was observed in hypertensive rats during chronic NO synthase inhibition by L-NAME; the increase in AAAD activity was accompanied by a simultaneous increase in daily urinary excretion of both dopamine and 5-HT.

It is concluded that the changes in renal AAAD activity may be involved in the regulation of the renal synthesis of dopamine; however, the increase in AAAD activity may also produce changes in the formation of other substances such as 5-HT whose effects upon the tubular handling of sodium are antagonistic to those of dopamine.

- The saturable component of L-DOPA transport in tubular epithelial cells was found to be significantly increased in CsA treated rats; this finding was observed in conditions of a reduced delivery of L-DOPA to the kidney and may correspond to a compensatory mechanism developed in order to stimulate the formation of dopamine in conditions of a reduced availability of L-DOPA to the tubular cells. The tubular uptake of L-DOPA was found to be reduced in Wistar rats submitted to a high sodium diet; this was found to be accompanied with neither hypertension nor with sodium retention.

It is concluded that the tubular uptake of L-DOPA may be involved in the regulation of dopamine formation in tubular epithelial cells.

- In studies performed with Wistar rats submitted to a high sodium diet, no significant changes were observed in either daily urinary excretion of dopamine and its metabolites (DOPAC, 3-MT, HVA) or in the urinary excretion of 5-HT and its deaminated metabolite (5-HIAA); however, an increase in daily urinary excretion of L-DOPA was observed in this group of animals.

It is concluded that the response of the renal dopaminergic system to a high sodium load may be different concerning the animal strain and the magnitude of the sodium load.

- In all studies performed under *in vivo* conditions, DOPAC closely followed the activity of the renal dopaminergic system and this was found not to be the case with the other metabolites of dopamine.

It is suggested that the urinary excretion of DOPAC may correspond to a useful parameter for the evaluation of the activity of the renal dopaminergic system.

Bibliografia

- Adam W, Culvenor A, Hall J, Jarrot B, Wellard M (1986). Aromatic L-amino acid decarboxylase: Histochemical localization in rat kidney and lack of effect of dietary potassium or sodium loading on enzyme distribution. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 13:47-53.
- Aisaka K, Gross S, Griffith O, Levi R (1989). N^G-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: Does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun*, 160:881-886.
- Albert, Z., Orlowski, M & Szewczuk, A. (1961). Histochemical demonstration of γ -glutamyl-transpeptidase. *Nature (Lond.)*, 191:767-768.
- Albino-Teixeira A, Azevedo I, Martel F, Osswald W (1991). Superoxide dismutase partially prevents sympathetic denervation by 6-hydroxydopamine. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 344:36-40.
- Alexander R, Gill J, Yamabe H, Lovenberg W, Keiser H (1974). Effect of dietary sodium and of acute saline infusion on the interrelationship between dopamine excretion and adrenergic activity in man. *J Clin Invest*, 54:194-200.
- Andrejak M, Hary L (1986). Enhanced dopamine renal responsiveness in patients with hypertension. *Clin Pharmacol Ther*, 40:610-614.
- Aoki K, Kikuchi K, Yamaji I (1989). Attenuated renal production of dopamine in patients with low renin essential hypertension *Clin Exp Hypertens Part A; II (Suppl)*:403-409.
- Aperia A, Hökfelt T, Meister B, Bertorello A, Frykstedt J, Holtbäck U, Seri I (1990). The significance of L-amino acid decarboxylase and DARPP-32 in the kidney. *Am J Hypertens*, 3:S11-S13.

Aperia A, Ibarra F, Svensson L, Klee C, Greengard P (1992). Calcineurin mediates α -adrenergic stimulation of Na^+K^+ ATPase activity in renal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci*, 89:7394-7397.

Aperia A (1994). Dopamine action and metabolism in the kidney. *Curr Opin Nephrol and Hypert*, 3:39-45.

Aperia A, Holtbäck U, Syrén ML, Svensson L, Frickstedt J, Greengard P (1994). Activation/deactivation of renal Na^+K^+ ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *Faseb J*, 8:436-439.

Arnal J, Warin L, Michel J (1992). Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 90:278-281.

Baines A, Craan W, Morgunov N (1979). Tubular secretion and metabolism of dopamine, norepinephrine, metoxytyramine and normetanephrine by the rat kidney. *J Pharmacol Exp Therap*, 208:144-147.

Baines A, Chan W (1980). Production of urine free dopamine from DOPA; a micropuncture study. *Life Sci.*, 26:253-259.

Baines A (1982). Effects of salt intake and renal denervation on catecholamine catabolism and excretion. *Kidney Int*, 21:316-322.

Ball S, Lee M (1977). The effect of carbidopa administration on urinary sodium excretion. Is dopamine an intrarenal natriuretic hormone? *Br J Clin Pharmacol*, 4:115-119.

Ball S, Oates N, Lee M (1978). Urinary dopamine in man and rat: effects of inorganic salts on dopamine excretion. *Clin Sci Mol Med*, 55:167-173.

Barthelmebs M, Caillette A, Ehrhardt JD, Velly J, Imbs JL (1990). Metabolism and vascular effects of γ -glutamyl-L-dopa on the isolated rat kidney. *Kidney Int*, 37, 1414-1422.

- Bartholini G, Constantinidis J, Puig M, Tissot R, Pletscher A (1975). The stereoisomers of 3,4-dihydroxyphenylserine as precursors of norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther*, 193: 523-532.
- Battle D, Gutterman C, Tarka J, Prasad R (1986). Effect of short term cyclosporine A administration on urinary acidification. *Clin Nephrol*, 25:62-69.
- Baylis C, Harton P, Engels K (1990). Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J Am Soc Nephrol*, 1:875-881.
- Baylis C, Mitruka B, Deng A (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest*, 90:278-281.
- Bell C (1987). Endogenous renal dopamine and control of blood pressure. *Clin Exp Hypertens*, A9:955-975.
- Bell C (1993). Involvement of endogenous dopamine in control of renal function. Em: Cardiovascular and renal actions of dopamine. (Advances in the Biosciences, Vol. 88) Soares-da-Silva P. (ed.) Oxford, Pergamon Press, p.1-10.
- Bell C, Lang W, Laska F (1978). Dopamine containing vasomotor nerves in the dog kidney. *J Neurochem*, 26:77-83.
- Bello-Reuss E, Pastoriza-Munoz E, Colindres R (1977). Acute unilateral renal denervation in rats with extracellular volume expansion. *Am J Physiol*, 232:F26-F32.
- Ben-Jonathan N, Arbogast L, Rhoades T, Schillo K, Pau K, Jackson G (1983). Plasma catecholamines in the chronically cannulated sheep fetus: predominance of L-dihydroxyphenylalanine. *Endocrinology*, 113:216-221.
- Berndt T, Isaac T, Dousa T, Tyce G, Knox F (1993). Effect of changes in dietary phosphate intake on urinary dopamine excretion. Em: Cardiovascular and renal actions of dopamine. (Advances in the Biosciences, Vol. 88) Soares-da-Silva P. (ed.) Oxford, Pergamon Press, p.218.

Bertorello A, Aperia A (1988). Both DA₁ and DA₂ receptor agonists are necessary to inhibit Na⁺-K⁺-ATPase activity in proximal tubules from rat kidney. *Acta Physiol Scand*, 132:441-443.

Bertorello A, Hokfelt T, Goldstein M, Aperia A (1988). Proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol*, 254:F795-F801.

Bertorello A, Aperia A (1989). Na⁺-K⁺-ATPase is an effector protein for protein kinase C in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol*, 256:F370-F373.

Berty RM, Adler S (1991). In vivo and in vitro rat model for cyclosporine-induced proximal tubular toxicity. *J Lab Clin Med*, 118:17-25.

Bloch R, Zikos D, Fisher K, Schleicher et al (1992). Activation of proximal tubular Na⁺-H⁺ exchange by Ang II. *Am J Physiol*, 263: F 135-F143.

Boateng YA, Barber HE, MacDonald TM, Petrie JC, Lee MR, Whiting PH (1990). The pharmacokinetics of γ -glutamyl-L-DOPA in normal and anephric rats and rats with glycerol-induced acute renal failure. *Br J Pharmacol*, 101:301-306.

Bradford M (1976). A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.

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

Bratell S, Haraldsson G, Herlitz H, Jonsson O, Pettersson S, Schersten T, Waldeström J (1990). Protective effects of pretreatment with superoxide dismutase, catalase and oxypurinol on tubular damage caused by transient ischemia. *Acta Physiol Scand*, 139:417-425.

Bredt D, Hwang P, Snyder S (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347:768-770.

- Brodie B, Costa E, Dlabac A, Neff N, Smookler H (1966). Application of steady state kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther*, 154:493-498.
- Brooks D, Drutz D, Ruffolo R (1990). Prevention and complete reversal of cyclosporine A induced renal vasoconstriction and nephrotoxicity in the rat by fenoldopam. *J Pharmacol Exp Ther*, 254:375-379.
- Buss W, Stepanek J, Bennett W (1989). A new proposal for the mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity. Inhibition of renal microsomal protein chain elongation following in vivo cyclosporine A. *Biochem Pharmacol*, 38(22):4085-4093.
- Caramona M, Soares-da-Silva P (1985). The effects of chemical sympathectomy on dopamine, noradrenaline and adrenaline content in some peripheral tissues. *Br J Pharmacol*, 86:351-356.
- Caramona M, Soares-da-Silva P (1990). Evidence for an extraneuronal location of monoamine oxidase in renal tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 341:411-413.
- Carey RM, van Loon GR, Baines AD, Ortt EM (1981). Decreased plasma and urinary dopamine during dietary sodium depletion in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 52:903-909.
- Carey R, Siragy H, Felder R (1990). Physiological modulation of renal function by the renal dopaminergic system. *J Auton Pharmacol*, 10 (Suppl. 1):s47-s51.
- Casson I, Lee M, Brownjohn A, Parsons F, Davison A, Will E, Clayden A (1983). The protective effect of GluDOPA on the glycerol treated rat model of acute renal failure. *Clin Sci*, 65: 159.
- Chan Y (1976). Cellular mechanisms of renal tubular transport of L-DOPA and its derivatives in the rat: microperfusion studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 199:17-24.

Chen C, Beach R, Lokhandwala M (1993). Dopamine fails to inhibit renal tubular sodium pump in hypertensive rats. *Hypertension*, 21:364-372.

Chiodera P, Valpi R, Delsignore R (1986). Different effects of metoclopramide and domperidone on arginine-vasopressine secretion in man. *Br J Cl Pharmacol*, 22:479-482.

Conte G, Sabbatini M, Napodano P, De Nicola L, Gigliotti G, Fuiano G, Testa A, Russo D, Esposito C, Libetta, Dal Canton A, Andeucci V (1988). Dopamine coneracts the acute renal effects of cyclosporine in normal subjects. *Transplant Proc*, 3:563-567.

Conte G, Dal Canton A, Sabbatini M, Napodano P, De Nicola L, Gigliotti G, Fuiano G, Testa A, Esposito C, Russo D (1989). Acute renal cyclosporine dysfunction reversed by dopamine infusion in healthy subjects. *Kidney Int*, 36:1086-1092.

Craighead I, Heys S, Smart L, Thomson A, Whiting P (1990). Alleviation of experimental cyclosporin A toxicity by substitution of fish muscle oil as drug vehicle. *Immunopharmacology*, 20:21-29.

Critchley J, Lee M (1986). Salt-sensitive hypertension in west africans: an uncoupling of the renal sodium-dopamine relation. *Lancet*, ii:460.

Cuche J, Kuchel O, Barbeau A, Boucher R, Genest J (1972). Relationship between the adrenergic nervous system and renin during adaptation to upright posture: a possible role for 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopamine). *Clin Sci*, 43:481-491.

Cuche J (1988). Sources of circulating dopamine: a personal view. Em C. Bell e McGrath (eds), *Peripheral actions of dopamine*, Macmillan Press Ltd, Houndmills, p 1-23.

Curtis J, Luke R, Jones P, Diethelm A (1988). Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *Am J Med*, 85:134-138.

Dananberg J, Sider R, Grekin R (1993). Sustained hypertension induced by orally administered Nitro-L-arginine. *Hypertension*, 21:359-363.

Davis R, Demitrios G, Kirklin J (1982). Acute oliguria after cardiopulmonary bypass: renal functional improvement with low-dose dopamine infusion. *Crit Care Med*, 10: 852.

De Feo M, Jadhav A, Lokhandwala M (1987). Dietary sodium intake and urinary dopamine and sodium excretion during the course of blood pressure development in Dahl salt sensitive and salt resistant rats. *Clin Exp Hypertens, Part A* 9:2049-2060.

De Fronzo R, Cook C, Andres P, Faloona G Davis P (1975). The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. *J Clin Invest*, 55:845-855.

Dieperink H, Leyssac P, Starklint H, Kemp E (1988). Long term cyclosporin nephrotoxicity in the rat: effects on renal function and morphology. *Nephrol Dial Transplant*, 3(3):317-326.

Dinerstein R, Vannice R, Henderson L, Roth L, Goldberg J, Hoffman P (1979). Histofluorescence techniques provide evidence for dopamine-containing neuronal elements in canine kidney. *Science*, 205:497-499.

Docci D, Pistocchi E, Turci F, Baldrati L (1986). Effect of ibopamine on the progression of chronic renal failure. *Clin Nephrol*, 26: 121.

Eisenhofer G, Meredith I, Ferrier C (1989). Increased plasma dihydroxyphenylalanine and total body and regional noradrenergic activity in humans. *J Clin Endocrinol Met*, 68:247-255.

Falcão de Freitas A (1986). The heart in portuguese amyloidosis. *Postgr Med J*, 62:601-605.

Felder RA, Felder CC, Eisner GM, Jose PA. (1989). The dopamine receptor in adult and maturing kidneys. *Am J Physiol*, 257:F315-F327.

Felder R, Seikaly M, Cody P, Eisner G, Jose P (1990). Attenuated renal response to dopaminergic drugs in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 15:560-569.

Felder R, Kinoshita S, Ohbu K, Mouradian M, Sibley D, Monsma F, Minowa M, Canessa L, Jose P (1992). Organ specificity of the dopamine 1 receptor/adenyl cyclase coupling defect in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, 264:R726-R732.

Fernandes MH, Pestana M, Soares-da-Silva P. (1991). Deamination of newly-formed dopamine in rat renal tissues. *Br J Pharmacol*, 102:778-782.

Fernandes MH, Vieira-Coelho MA, Soares-da-Silva P (1992). Influence of 3-O-methylDOPA on the synthesis of dopamine in the rat kidney. *Br J Pharmacol*, 106:83P.

Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1990). Effects of MAO-A and B selective inhibitors Ro 41-1049 and Ro 19-6327 on the deamination of newly-formed dopamine in the rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 255:1309-1313.

Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1992). Type A and B monoamine oxidase activities in the human and rat kidney. *Acta Physiol Scand*, 145:363-367.

Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1993). Sequential involvement of monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase in the metabolism of newly-formed dopamine in rat renal tissues. Em: Cardiovascular and renal actions of dopamine. (Advances in the Biosciences, Vol. 88) Soares-da-Silva P. (ed.) Oxford, Pergamon Press, p.21-30.

Freestone S, Li Kam T, Lee M (1993). Further studies on gludopa in man: the effect of the monoamine oxidase inhibitor selegiline. Em: Cardiovascular and renal actions of dopamine. (Advances in the Biosciences, Vol. 88) Soares-da-Silva P. (ed.) Oxford, Pergamon Press, p.195-202.

Frelin C, Vigne P, Barby P, Ladzunski M (1987). Molecular properties of amiloride action and its sodium transporting targets. *Kidney Int*, 32:785-793.

Gamelin L, Zager R (1988). Evidence against oxidant injury as a critical mediator of postischemic acute renal failure. *Am J Physiol*, 255:F450-F460.

Garvin JL (1989). Inhibition of Jv by ANF in the rat proximal straight tubules requires angiotensin. *Am J Physiol*, 257:F907-F911.

Gill J, Gullner H, Lake C, Lakatua D, Lang G (1988). Plasma and urinary catecholamines in salt sensitive idiopathic hypertension. *Hypertension*, 11:312-319.

Gillum DM, Truong L, Tasby J, Suky WN (1989). Effects of uninefrectomy and high protein feeding in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int*, 36:194-200.

Glahn R, Onsgard M, Tyce G, Chinnow S, Knox F, Dousa T (1993). Autocrine/paracrine regulation of renal Na⁺-phosphate cotransport by dopamine. *Am J Physiol*, 264:F618-F622.

Gnutzman K, Hering K, Gutshe H (1986). Effect of cyclosporine on the diluting capacity of the rat kidney. *Clin Nephrol*, 25 (Suppl 1):S51-S56.

Goldberg L (1972). Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacol Rev*, 24:1-29.

Goldstein D, Stull R, Eisenhofer G, Gill J (1989a). Urinary excretion of dihydroxyphenylalanine and dopamine during alterations of dietary salt intake in humans. *Clin Sci*, 76:517-522.

Goldstein D, Polinsky R, Garty M (1989b). Patterns of plasma levels of catechols in neurogenic orthostatic hypotension. *Ann Neurol*, 26:558-563.

Goldstein D, Cannon R, Quyyumi I (1991). Regional extraction of circulating norepinephrine, dopa, and dihydroxyphenylglycol in humans. *J Auton Nerv Syst*, 34:17-36.

Grossman E, Hoffman A, Chang P, Keiser H, Goldstein D (1990). Increased spillover of dopa into arterial blood during dietary salt loading. *Clin Sci*, 78:423-429.

Grossman E, Hoffman A, Tamrat M, Armando I, Keiser HR, Goldstein DS (1991). Endogenous dopa and dopamine responses to dietary salt loading in salt-sensitive rats. *J Hypertens*, 9:259-263.

Grossman E, Hoffman A, Armando I, Abassi Z, Kopin I, Goldstein D (1992). Sympathoadrenal contribution to plasma dopa (3,4-dihydroxyphenylalanine) in rats. *Clin Sci*, 83:65-74.

Guttman Y, Segal J (1972). Effect of calcium, sodium and potassium on adrenal tyrosine hydroxylase in vitro. *Biochemical Pharmacol*, 21:2664-2666.

Hagege J, Richet G (1985). Proximal tubule dopamine histofluorescence in renal slices incubated with L-DOPA. *Kidney Int*, 27:3-8.

Harada S, Tokunaga S, Momohara M, Masaki H, Tagawa T, Imaizumi T, Takeshita A (1993). Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Circ. Res*, 72:511-516.

Harris PJ, Thomas D, Morgan TO (1987). Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature (Lond)*, 326:697-698.

Harvey J, Casson I, Clayden A, Cope G, Perkins C, Lee M (1984). A paradoxical fall in urine dopamine output when patients with essential hypertension are given added dietary salt. *Clin Sci*, 67:83-88.

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T (1990). Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am J Physiol*, 258:F28-F33.

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T (1991). Effects of high salt intake on dopamine production in rat kidney. *Am J Physiol*, 260:E675-E679.

Hasking G, Esler M, Jennings J, Burton D, Korner P (1986). Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*, 73: 618.

Healy D, Huo T, Bogdanov V, Grenader A (1993). Pharmacological studies of dopamine receptors in cultured renal epithelial cells. Em: Cardiovascular and renal actions os dopamine. (Advances in the Biosciences, Vol. 88) Soares-da-Silva P. (ed.) Oxford, Pergamon Press, p63-72.

Henderson B, Beatti T, Kennedy A (1980). Dopamine hydrochloride in oliguric states. *Lancet*, 18: 827.

Holtz P, Credner K, Koepp W (1942). Die enzymatische entstehung von oxytyramin im organisms und die physiologische bedeutung der dopadecarboxylase. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol Exp Pathol*, 200: 356-388.

Hsieh Y, Goldberg L (1979). Hemodinamic consequences of administration of phentolamine or nitroprusside with dopamine in dog. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1: 379-388.

Iaina A, Solomon S, Gavendo S, Eliahou H (1977). Reduction in severity of acute renal failure in rats by dopamine. *Biomedicine*, 27: 137.

Ibarra F, Aperia A, Svensson L, Eklöf A, Greengard P (1993). Bidirectional regulation of Na^+K^+ ATPase activity by dopamine and an α -adrenergic agonist. *Proc Natl Acad Sci*, 90:21-24.

Ignarro L, Byrns R, Buga G, Wood K (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, 61:866-879.

Imura O, Shimamoto K, Ura N (1987). The patophysiological role of renal dopamine kallikrein kinin and prostaglandin systems in essential hypertension. *Agents Actions*, 22:247-56.

Imura O, Shimamoto K (1990). Supressed dopaminergic activity and water-sodium handling in the kidneys at the prehypertensive stage of essential hypertension. *J Auton Pharmacol*, 10(Suppl 1) S73-S77

Ishikawa A, Sakaguchi M, Nakano M, Ushiyama T, Ohta N, Ohtawara Y, Tajima A, Kawabe K, Aso Y (1991). Cyclosporine induced nephrotoxicity and justaglomerular apparatus in mice. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*, 82:1286-1291.

Itskovitz H, Chen Y, Stier C (1988). Reciprocal effects of dopamine and 5-hydroxytryptamine formed within the kidney. *Clin Sci*, 75:503-507.

- Jaeger C, Teitelman G, Joh T, Albert V, Park D, Reis D (1983). Some neurones of the rat central nervous system contain aromatic L-amino acid decarboxylase but not monoamines. *Science*, 219:1233-1235.
- Jarrot B (1971). Occurrence and properties of monoamine oxidase in adrenergic neurons. *J Neurochem*, 18:7-16.
- Jeffrey R, MacDonald T, Rutter M, Freestone S, Brown J, Samson R, Lee M (1987). The effect of intravenous frusemide on urine dopamine in normal volunteers: studies with indomethacin and carbidopa. *Clin Sci*, 73:151-157.
- Jeffrey R, MacDonald T, Marwick K, Lee M (1988a). The effect of carbidopa and indomethacin on the renal response to γ -L-glutamyl-L-dopa in normal man. *Br J Clin Pharmacol*, 25:195-201.
- Jeffrey R, MacDonald T, Lee M (1988b). A comparison of the renal actions of γ -L-glutamyl-L-dopa and γ -L-glutamyl-L-tyrosine in normal man. *Clin Sci*, 74: 37-40.
- Johnson R, Freeman R (1992). Pressure natriuresis in rats during blockade of the L-arginine/nitric oxide pathway. *Hypertension*, 19:333-338.
- Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimran A (1993). Sodium and angiotensin in hypertension by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension*, 21:944-948.
- Kaneda Y, Bello Reuss E (1983). Effect of dopamine on phosphate reabsorption in isolated perfused rabbit proximal tubules. *Minel Electrolyte Metab*, 9: 147.
- Kaneko S, Eisner G, Jose P (1990). Effect of pramipexole a dopamine₁/dopamine₂ agonist on sodium excretion and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol*, 10 (suppl 1):553-560.
- Kaskel F, Devarajan P, Arbeit L, Partin J, Moore L (1987). Cyclosporine nephrotoxicity: sodium excretion, autoregulation and angiotensin II. *Am J Physiol*, 252: F733-F742.

Katz AI (1987). Renal ATPase: Its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J Physiol*, 242:F207-F219.

Kho T, Teule K, Leunissen G, Heidendal P, Amery A, Van Hoof J (1987). Nephrotoxic effect of cyclosporine A can be reversed by dopamine. *Transplant Proc*, 1: 1749-1753.

Kinoshita S, Sidhu A, Felder R (1989). Defective dopamine-1 receptor adenylate cyclase coupling in the proximal convoluted tubule from the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest*, 84:1849-1856.

Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I, Hoover RL (1990). Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int*, 37:1487-1491.

Kopin I (1985). Catecholamine metabolism: Basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev*, 37:333-362.

Kopp JB, Klotman PE (1990). Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*, 1:162-179.

Kuchel O, Buu N, Hamet P, Laroche P, Bourque M, Genest J (1982). Dopamine surges in hyperadrenergic essential hypertension. *Hypertension*, 4:845-852.

Kuchel O, Buu N, Racz K, de Léan A, Serri O, Kyncl J (1986). Role of sulfate conjugation of catecholamines in blood pressure regulation. *Fed Proc*, 45:2254-2259.

Kuchel O, Buun N, Racz K, Gutkowska (1987). Hormonal correlates of the inadequate natriuretic response to salt loading in idiopathic edema. *Clin Invest Med*, 10: 71-77.

Kuchel O, Shigetomi S (1992). Defective dopamine generation in stable essential hypertensive patients. *Hypertension*, 19:634-638.

Lang F, Messner G, Rehwald W (1986). Electrophysiology of sodium coupled transport in proximal renal tubules. *Am J Physiol*, 250:F953-F962.

Lee M, Critchley J, Gordon C, Makarananda K, Sriwatanakul K, Balali-Mood M, Boye G (1990). Ethnic differences in the renal sodium dopamine relationship. A possible explanation for regional variations in the prevalence of hypertension. *Am J Hypertens*, 3:S100-S103.

Lee MR (1993). Dopamine and the kidney-ten years on. *Clin Sci*, 84: 357-375.

Levine T, Francis G, Goldsmith S, Simon A, Cohn J (1982). Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure. *Am J Cardiol*, 49: 1659.

Li Kam Wa TC, Freestone S, Samson RR, Johnson NR, Lee MR (1993). A comparison of the renal and neuroendocrine effects of two 5-hydroxytryptamine renal prodrugs in normal man. *Clin Sci*, 85:607-614.

Lokhandwala M, Barrett R (1982). Cardiovascular dopamine receptors: physiological, pharmacological and therapeutic implications. *J Auton Pharmacol*, 3: 189-215.

Lowry OH, Rosenbrough NY, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275.

Luft F, Grim C, Higgins J, Weinberger M (1977). Differences in response to sodium administration in normotensive white and black subjects. *J Lab Clin Med*, 90:555-562.

Luke RG (1993). Essential hypertension: A renal disease? A review and update of the evidence. *Hypertension*, 21:380-390.

MacDonald TM, Jeffrey RF, Freestone S, Lee MR (1988). (+)-sulpiride antagonises the renal effects of γ -glutamyl-L-dopa in man. *Br J Clin Pharmacol*, 25: 203-212.

- MacDonald TM, Jeffrey RF, Lee MR (1989). The renal and haemodynamic effects of a 10 h infusion of γ -glutamyl-L-dopa in normal man. *Br J Clin Pharmacol*, 27:811-822.
- MacGrath B, Lim A, Bode K, Willis G, Smith G (1983). Differentiation of noradren-ergic and dopaminergic nerves in the rat kidney: Evidence against significant dopaminergic innervation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 10:543-553.
- Mack F, Bönisch H (1979). Dissociation constants and lipophilicity of catechola-mines and related compounds. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 310:1-9.
- Mason J, Muller-Schweinitzer E, Dupont M, Casellas D, Mihatsch M, Moore L, Kaskel F (1991). Cyclosporine and the renin-angiotensin system. *Kidney Int*, 32 (Suppl) S28-S32.
- Mayer R, Cockett A (1988). Cyclosporin-mediated increase in kidney glutathione and effects on gamma-glutamyl cycle enzymes. *J Biochem Toxicol*, 3:213-221.
- Mercuro G, Rosseti Z, Rivano C, Cherchi A, Gessa G (1984). Marked increase of plasma 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid in congestive heart failure. *Am Heart J*, 108: 1588.
- Metz Kurschel U; Wagner K; Mueller M (1990). The synthetic prostaglandin E1 analogue rioprostil reduces the nephrotoxic potential of cyclosporine A. *Transplant Proc*, 22(4):1713-1716.
- Mihatsch M, Gudat F, Ryffel B, Thiel G (1994). Cyclosporine nephropathy. In: *Renal pathology: with clinical and functional correlations*. Ed. Craig Tisher & B Brenner, second ed. J B Lippincott.
- Missale C, Lombardi C, Sigala S, Spano P (1990). Dopaminergic regulation of aldosterone secretion: biochemical mechanisms and pharmacology. *Am J Hyper-tension*, 3: S93-S95.
- Morgunov N, Baines AD (1987). Renal nerves and catecholamine excretion. *Am J Physiol*, 240:F75-F81.

Mühlbauer B, Osswald H (1992). Feeding but not salt loading is the dominant factor controlling urinary dopamine excretion in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 346:469-471.

Mühlbauer B, Osswald H (1993). Urinary dopamine excretion in conscious rats: Effect of carbidopa in different states of sodium balance. *Renal Physiol Biochem*, 16:117-124.

Murray B, Paller M (1986). Beneficial effects of renal denervation and prazosin on GFR and renal blood flow after cyclosporine in rats. *Clin Nephrol*, 25:193-198.

Muto S, Tabei K, Aano Y, Imai M (1985). Dopaminergic inhibition of the action of vasopressin on the cortical collecting tubule. *Eur J Clin Pharmacol*, 114:393-397.

Nakamura T, Alberola A, Granger J (1993). Role of renal interstitial pressure as a mediator of sodium retention during systemic blockade of nitric oxide. *Hypertension*, 21:956-960.

Narabayashi H, Kondo T, Hayashi A, Suzuki T and Nagatsu T (1981). L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine treatment for akinesia and freezing of parkinsonism. *Proc Jpn Acad*, 57:351-354.

Nast C, Adler S, Artishevesky A, Kresser C, Ahmed K, Anderson P (1991). Cyclosporine induces elevated procollagen alpha 1 (I) mRNA levels in the rat renal cortex. *Kidney Int*, 39(4):631-638.

Neame K, Richards T (1972). Elementary kinetics of membrane carrier transport. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Nishi A, Eklöf A, Bertorello A, Aperia A (1993). Dopamine regulation of renal Na⁺-K⁺ ATPase activity is lacking in Dahl salt sensitive rats. *Hypertension*, 21:767-771.

Oates NS, Ball SG, Perkins CM, Lee MR (1979). Plasma and urine dopamine in man given sodium chloride in the diet. *Clin Sci*, 56:261-264.

Obhu K, Felder R (1993). Nephron specificity of dopamine receptor-adenylyl cyclase defect in spontaneous hypertension. *Am J Physiol*, 264:F274-F279.

Olbricht C, Grone H, Bossaller C, Gutjahr E, Hertel R (1990). Alterations in proteolytic enzymes of the proximal tubule in a rat model of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*, 50(3):378-381.

Palaty V (1985). Inhibition of monoamine oxidase by amiloride. *Can J Physiol Pharmacol*, 63:1586:1589.

Palmer R, Ferrige A, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524-526.

Palmer R, Ashton D, Moncada S (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333:664-666.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1992). Renal outflow of dopamine: A Comparative study with L-Dopa and gama-glutamyl-L-Dopa. *Br J Pharmacol*, 106:P82.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1992). Influence of type A and B monoamine oxidase in the outflow of newly-formed dopamine in the rat kidney. *Nephrol Dial Transpl*, 7:P660.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1992). Cell outward transport of renal dopamine and the involvement of type A and B monoamine oxidase. *J Am Soc Nephrol*, 3:P833.

Pestana M, Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1993). Urinary excretion of dopamine and amine metabolites during chronic administration of cyclosporine A. *J Am Soc Nephrol*, 3:P458.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1993). Renal outflow of dopamine: A comparative study in human and rat renal tissues. Cardiovascular and renal actions of dopamine. Soares-da-Silva P. (ed.). *Advances in Biosciences* (1993). Pergamon Press, Oxford, P226.

Pestana M, Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1994). Urinary excretion of dopamine and Reduction in urinary dopamine excretion in an experimental model of cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity. *Kidney Int*, 45:P290.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1994). Urinary excretion of dopamine and Renal handling of newly-formed dopamine in a rat model of cyclosporine A induced nephrotoxicity. *J Auton Pharmacol*, 14:25.

Pestana M, Sameiro M, Baldaia J, Guerra L, Soares-da-Silva P (1994). Endogenous dopamine and the recovery of renal function in kidney transplant recipients. *Br J Cl Pharmacol*, 37(5):P479.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1994). The renal handling of dopamine originating from L-DOPA and Gama Glutamyl-L-DOPA. *Br J Pharmacol*, 112:417-422.

Pestana M, Soares-da-Silva P (1994). Outflow of dopamine and noradrenaline originating from L-DOPA and L-*threo*-DOPS in renal tissues. *Gen Pharmacol* (em publicação).

Pestana M, Fernandes MH, Vieira-Coelho MA, Soares-da-Silva P (1994). Renal aromatic L-amino acid decarboxylase, type A and B monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities in a rat model of cyclosporine A (CsA) induced nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transpl* (em publicação).

Petric R, Freeman D, Wallace C, McDonald J, Stiller C, Keown P (1990). Modulation of experimental cyclosporine A nephrotoxicity by inhibition of thromboxane synthesis. *Transplantation*, 50:558-563.

Petrovic T, Anderson W, Bell C (1986). Neuronal and nonneuronal contributions to renal catecholamine content in the dog. *J Neurochem*, 47:423-425.

Pollock D, Polakowski J, Divish B, Opgenorth T (1993). Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide inhibition. *Hypertension*, 21:660-666.

Quebbeman A, Rennick B (1970). Inhibition of renal tubular transport of catecholamines by cocaine: an organic base mechanism. *J Pharmacol Exp Ther*, 175:248-258.

Racz K, Kuchel O, Buu N (1987). Abnormal adrenal catecholamine synthesis in salt sensitive Dahl rats. *Hypertension*, 9:76-80.

Rajfer S, Rossen J, Douglas F, Goldberg L, Harrison T (1986). Effect of long-term therapy with oral ibopamine on resting hemodynamics and exercise capacity in patients with heart failure: Relationship to the generation of N-methyldopamine and to plasma norepinephrine levels. *Circulation*, 73: 740-748.

Ramdohr B, Scuren K, Biamino G, Schroder R (1973). Der einfluss von dopamin auf haemodynamic und nierenfunction bei der schweren hherzinsuffienz des menschen. *Klin Wochenschr*, 51:549-556.

Rees D, Palmer R, Moncada S (1989). Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86:3375-3378.

Remuzzi G, Bertani T (1989). Renal vascular and thrombotic effects of cyclosporine. *Am J Kidney Dis*, 13:261-272.

Rennick B (1968). Dopamine: Renal tubular transport in the dog and plasma binding studies. *Am J Physiol*, 215:532-534.

Rennick B (1981). Renal tubule transport of organic cations. *Am J Physiol*, 240:F83.

Ribeiro M, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo S, Zatz R (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 20:298-303.

Roby K.A.W., Shaw L.M. (1993). Effects of cyclosporine and its metabolites in the isolated perfused rat kidney. *J Am Soc Nephrol*, 2:168-177.

Roland M, O'Hare J, Walters G, Corrall R (1986). Sodium in response to saline infusion in uncomplicated diabetes mellitus. *Diabetes Res*, 3:2213-2215.

Romero J, Lahera V, Salom M, Biondi M (1992). Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol*, 2:1371-1387.

Rose BD (1994). *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders*. 4th ed., McGraw-Hill.

Rosen S, Greenfeld Z, Brezis M. (1990). Chronic cyclosporine-induced nephropathy in the rat; a medullary and inner stripe injury. *Transplantation*, 49:445-452.

Rossini M, Belloni A, Remuzzi G, Perico N (1990). Thromboxane receptor blockade attenuates the toxic effect of cyclosporine in experimental renal transplantation. *Circulation*, 81(1 Suppl):61-67.

Sabbatini M, Esposito C, De Nicola L, Uccello F, Altomonte M, Conte G, Dal Canton A, Andreucci VE. (1989). Reversibility of acute cyclosporin nephrotoxicity by dopamine. *Micropuncture study. Nephrol Dial Transplant*, 4:327-333.

Saito I, Takeshita E, Saruta T, Nagano S, Sekihara T (1986). Urinary dopamine excretion in normotensive subjects with or without family history of hypertension. *J Hypertension*, 4:57-60.

Sakuma I, Stuehr D, Gross S, Nathan C, Levi R (1988). Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:8664-8667.

Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, Levi R (1992). N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. *Circ. Res*, 70:607-611.

Salazar F, Pinilla J, Lopez F, Romero J, Quesada T (1992). Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, 20:113-117.

Satoh T, Cohen H, Katz A (1993). Signal transduction in the action of dopamine in rat renal tubules. In: Cardiovascular and Renal Actions of Dopamine (Advances in the Biosciences, Vol. 88) edited by P Soares-da-Silva, Oxford, Pergamon Press, 73-79.

Saura J, Kettler M, da Prada M, Richards JG (1992). Quantitative enzyme radioautography with 3H-Ro 41-1049 and 3H-Ro 19-6327 in vitro: Localization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs and human brain. *J Neuroscience*, 12(5):1977-1999.

Schmidt H, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K, Klein M, Nirommand F, Böhme E (1988). Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 154:213-216.

Schnabel FR, Wait RB, Kahng KU. (1991). The relationship of urinary thromboxane excretion to cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation*, 51:686-689.

Schoors DF, Dupont AG (1993). A role for intrarenal dopamine in sodium homeostasis in hypertension ? In: Cardiovascular and Renal Actions of Dopamine (Advances in the Biosciences, Vol. 88) edited by P Soares-da-Silva, Oxford, Pergamon Press, 133-141.

Seri I, Kone BC, Gullans SR, Aperia A, Brenner BM, Ballermann BJ (1990). Influence of Na⁺ intake on dopamine-induced inhibition of renal cortical Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol*, 258:F52-F60.

Shah S, Northrup T, Hui Y, Dousa T (1979). Action of serotonin (5-HT) on cyclic nucleotides in glomeruli of rat renal cortex. *Kidney Int*, 15: 463-472.

Shah S, Walker P (1988). Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. *Am J Physiol*, 255:F438-F443.

Shikuma R, Yoshimura M, Kambara S (1986). Dopaminergic modulation of salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Life Sci*, 38:915-21.

Shirota K, Fujisawa H (1988). Purification and characterization of aromatic L-amino acid decarboxylase from rat kidney and monoclonal antibody to the enzyme. *J Neurochem*, 51: 426-434.

Siegl H, Ryffel B (1982). Effect of cyclosporin on renin-angiotensin-aldosterone system. *Lancet* 1:1274.

Siragy HM, Felder RA, Howell NL, Carey RM (1989). Evidence that intrarenal dopamine acts as a paracrine substance at the renal tubule. *Am J Physiol*, 257:F469-F477.

Smit (1990). Dopamine in chronic renal failure. *Am J Hypertens*, 3: s75-s77.

Soares-da-Silva P (1987). Dopamine released from nerve terminals activates prejunctional dopamine receptors in dog mesenteric arterial vessels. *Br J Pharmacol*, 91:591-599.

Soares-da-Silva P (1988a). Dopamine and noradrenergic transmission. In: Vanhoutte PM. (ed) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*. Raven Press, New York, 187-195.

Soares-da-Silva P (1988b). Dopamine Storage in Sympathetic Nerves. In: Bell C, McGrath J (eds) *Peripheral actions of Dopamine*. MacMillan Press, London, 24-40.

Soares-da-Silva P (1988c). Further evidence for a noradrenaline-independent storage of dopamine in the dog kidney. *J Auton Pharmacol*, 8:127-133.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1990a). Synthesis and metabolism of dopamine in the kidney. Effects of sodium chloride, monoamine oxidase inhibitors and alpha-human atrial natriuretic peptide. *Am J Hypertens*, 3:7S-10S.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1990b). Regulation of dopamine synthesis in the rat kidney. *J Auton Pharmacol*, 10, Suppl 1, s25-s30.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M (1990). Influence of sodium chloride on the transport and intracellular availability of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in the rat kidney. *J Auton Pharmacol*, 10, Suppl 1:131.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1991a). Inhibitory effects of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate on the synthesis of dopamine in the rat kidney. *Br J Pharmacol*, 103:1923-1927.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1991b). A study on the renal synthesis of dopamine in aged rats. *Acta Physiol Scand*, 143:287-293.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M (1991). Dopamine synthesis in human renal tissues. *J Am Soc Nephrol*, 2:431.

Soares-da-Silva P (1992a). Actin cytoskeleton, tubular sodium and the renal synthesis of dopamine. *Biochem Pharmacol*, 44:1883-1886.

Soares-da-Silva P (1992b). Renal $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger activity, alpha-adrenoceptors and the control of dopamine outflow. *Br J Pharmacol*, 106:20P.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1992a). Effect of alpha-human atrial natriuretic peptide on the synthesis of dopamine in the rat kidney. *Br J Pharmacol*, 105:869-874.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH (1992b). Sodium dependence and ouabain sensitivity of the synthesis of dopamine in renal tissues of the rat. *Br J Pharmacol*, 105:811-816.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M (1992a). L-DOPA and gamma-glutamyl-L-DOPA as precursors for dopamine in human renal tissues. *Br J Clin Pharmacol*, 33:539P.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Albino-Teixeira A, Azevedo I, Pestana M (1992b). Brief transient ischemia induces renal denervation without affecting the renal aromatic amino acid decarboxylase and monoamine oxidase activities in the rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 260:902-908.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M, Vieira-Coelho MA, Teixeira AA (1992c). Renal dopamine production in the nitric oxide deprived hypertensive rat. *J Am Soc Nephrol*, 3:P553.

Soares-da-Silva P (1993a). Enhanced protein kinase C mediated inhibition of renal dopamine synthesis during high sodium intake. *Biochem Pharmacol*, 45:1791-1800.

Soares-da-Silva P (1993b). Preferential decarboxylation of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in rat renal tissues. *Gen Pharmacol*, 24:75-81.

Soares-da-Silva P (1993c). Renal dopamine outward transfer during Na⁺-H⁺ exchange activation by α_1 - and α_2 -adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol*, 109:569-576.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M (1993). Studies on the role of sodium on the synthesis of dopamine in the rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 264:406-414.

Soares-da-Silva P, Vieira-Coelho MA (1993). Increased sensitivity of renal catechol-O-methyltransferase to inhibition by tolcapone. *J Am Soc Nephrol*, 4:896.

Soares-da-Silva P, Pestana M, Fernandes MH (1993). Involvement of tubular sodium in the formation of dopamine in the human renal cortex. *J Am Soc Nephrol*, 3:1591-1599.

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M (1993). A comparative study on the synthesis of dopamine in the human, dog and rat kidney. *Acta Physiol Scand*, 148:347-351.

Soares-da-Silva P, Pestana M (1993). Studies on the tubular cell outward dopamine transporter in the rat kidney. Cardiovascular and renal actions of dopamine. P. Soares-da-Silva (ed.) *Advances in Biosciences*. Pergamon press, 41-50.

- Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pestana M, Vieira-Coelho MA, Teixeira AA (1993). Renal formation and cellular transport of dopamine in the nitric oxide-deprived hypertensive rat. Cardiovascular and renal actions of dopamine. Em: Soares-da-Silva P. (ed.). *Advances in Biosciences*. Pergamon Press, Oxford, P240.
- Soares-da-Silva P, Vieira-Coelho MA, Pestana M (1994). (+) WAY 100135 inhibits antinatriuresis following high sodium intake in conditions of selective type A monoamine oxidase inhibition. *Br J Pharmacol*, 112:106P.
- Soares-da-Silva P, Pestana P, Vieira-Coelho MA, Fernandes MH, Teixeira AA (1994). Enhanced renal dopaminergic activity during long-term nitric oxide synthase inhibition in the rat. *Br J Pharmacol* (em publicação).
- Sokal R, Rohlf F (1981). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. New York: Freeman and Company.
- Sowers JR, Crane PD, Beck FWJ, McClanahan M, Xing ME, Mohaney PK (1984). Relationship between urinary dopamine production and natriuresis after acute intravascular volume expansion with sodium chloride in dogs. *Endocrinology* (Baltimore), 115:2085-2090.
- Sowers J, Zemel M, Zemel F, Walsh M, Zawada E (1988). Salt sensitivity in blacks: salt intake and natriuretic substances. *Hypertension*, 12:485-490.
- Spurney RF, Mayros SD, Collins D, Ruiz P, Klotman PE, Coffman T. (1990) Thromboxane receptor blockade improves cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Prostaglandins*, 39:135-146
- Stephenson R, Sole M, Baines A (1982). Neural and extraneuronal catecholamine production by rat kidneys. *Am J Physiol*, 242:F261-F266.
- Stevinkel P, Saggat-Malick A, Warhenberg H, Diczfaluzy U, Bolinder J, Alvestrand A (1991). Impaired intrarenal dopamine production following intravenous sodium chloride infusion in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 34:114-118.

Stöker W, Hempel K (1976). Inactivation and excretion of dopamine by the cat kidney in vitro. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 295:123-126.

Strzelecki T, Kumar S, Khauli R, Menon M (1988). Impairment by cyclosporine of membrane mediated functions in kidney mitochondria. *Kidney Int*, 34(2):234-240.

Suzuki T, Higa S, Tsuge I, Sakoda S, Hayashi A, Yamamura Y, Takaba Y and Nakajima A (1980). Effect of infused L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine in patients with familial amyloid polyneuropathy. *Eur J Clin Pharmacol*, 17:429-435.

Suzuki T, Higa S, Sakoda S, Hayashi A, Yamamura Y, Takaba Y and Nakajima A (1981). Orthostatic hypotension in familial amyloid polyneuropathy: treatment with DL-threo-3,4-dihydroxyphenylserine. *Neurology (NY)*, 31:1323-1326.

Suzuki H, Haruyuki N, Kawamura M, Yoshizawa E, Saruta T (1984). Excretion and metabolism of dopa and dopamine by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol*, 247:E285-E290.

Svenson KL, Wibell LB (1985). Tubular proteinuria during treatment with cyclosporin A: a case report. *Ups J Med Sci*, 90:43-8.

Takeda Y, Itoh Y, Yoneda I, Miyamori I, Takeda R (1993). Cyclosporine A induces endothelin-1 release from cultured rat vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 233:299-301.

Trendelenburg U., Bönisch H., Graefe K.H., Henseling M (1979). The rate constant of the efflux of metabolites of catecholamines and phenylethylamines. *Pharmacol Rev*, 31:179-213.

Ulrich KJ, Rumrich G, Klöss S (1974). Sodium dependence of the amino acid transport in the proximal convolution of the rat kidney. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*, 351:49-60.

Valentine AD, Okonmah A, Panton L, Blyden GT (1990). Effect of cyclosporin A on rat kidney catecholamines. *Life Sci*, 47:255-261.

Van Loon G (1983). Plasma dopamine: regulation and significance. *Fed Proc*, 42:3012-3018.

Vieira-Coelho MA, Fernandes MH, Pestana M, Soares-da-Silva P (1993a). Effect of type A and B monoamine oxidase inhibitors on the urinary excretion of dopamine, 5-hydroxytryptamine and amine metabolites. *Br J Clin Pharmacol*, 36:153P.

Vieira-Coelho MA, Pestana M, Soares-da-Silva P (1993b). Type A monoamine oxidase inhibition produces antinatriuresis during high sodium intake. *J Am Soc Nephrol*, 3:P458.

Vieira-Coelho MA, Fernandes MH, Soares-da-Silva P (1994). In vivo effects of the monoamine oxidase inhibitors Ro 41-1049 and Ro 19-6327 on the production and fate of renal dopamine. *J Neural Trans (em publicação)*.

Vyas SJ, Jadhav AL, Eichberg J, Lokhandwala MF (1992). Dopamine receptor-mediated activation of phospholipase C is associated with natriuresis during high salt intake. *Am J Physiol*, 262:F494-F498.

Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ (1989). Cyclosporine A inhibits protein kinase C activity: a contributing mechanism in the development of nephrotoxicity? *Transplantation*, 48(2):321-327.

Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ (1990). Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*, 50:487-492.

Wedeen R, Weiner B (1973). The distribution of p-aminohippuric acid in rat kidney slices. Tubular localization. *Kidney Int*, 3:205-213.

Whiting PH, Thomson AW, Simpson JG (1986). Cyclosporine and renal enzyme excretion. *Clin Nephrol*, (Suppl 1): S100-104.

Whiting PH, Simpson JG (1988). Lithium clearance measurements as an indication of cyclosporin A nephrotoxicity in the rat. *Clin Sci*, 74:173-178.

- Whiting PH, Propper DJ, Simpson JG, McKay J, Jones MC, Catto GR (1988). The use of lithium clearance measurements to assess renal tubular function in experimental and clinical cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc*, 20 (Suppl 3):675-680.
- Wiegmann TB, Sharma R, Diederich DA, Savin VJ (1990). In vitro effects of cyclosporine on glomerular function. *Am J Med Sci*, 299:149-152.
- Wilk S, Mizoguchi H, Orlowski M (1978). γ -glutamyl-DOPA: A kidney specific dopamine precursor. *J Pharmacol Exp Ther*, 206:227-232.
- Williams GH, Gordon MS, Stuenkel CA, Conlin PR, Hollenberg NK (1990). Dopamine and nonmodulating hypertension. *Am J Hypertens*, 3:112s-115s.
- Wolfowitz E, Grossman E, Folio C, Keiser HR, Kopin I, Goldstein DS (1993). Derivation of urinary dopamine from plasma dihydroxyphenylalanine in humans. *Clin Sci*, 84:549-557.
- Worth DP, Harvey JN, Brown J, Lee MR (1985a). γ -L-glutamyl-L-dopa is a dopamine prodrug, relatively specific for the kidney in normal subjects. *Clin.Sci*, 69:207-214.
- Worth DP, Harvey JN, Brown J, Lee MR (1985b). Patients with essential hypertension have an exaggerated natriuretic response to the dopamine pro-drug glutamyl-dopa. *J Hypertens*, 3:S179-181.
- Yamazaki H, Yoshimura M, Kambara S, Lee L-C, Fukuyama M, Sasaki S, Takahashi H, Takeda K, Ijichi H (1986). Enhanced renal sympathetic nerve activity in response to salt loading in rats. *Jpn Circ J*, 50:442-448.
- Yoshimura M, Kambara S, Okabayashi H, Takahashi H, Ijichi H (1987a). Effect of decreased dopamine synthesis on the development of hypertension induced by salt loading in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens, Part A*, 9:1141-1157.

Yoshimura M, Kambara S, Takahashi H, Okabayashi H, Ijichi H (1987b). Involvement of dopamine in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rat; effect of carbidopa, inhibitor of peripheral dopa decarboxylase. *Life Sci*, 38:915-921.

Yoshimura M, Ikegaki I, Nishimura M, Takahashi H (1990). Role of dopaminergic mechanisms in the kidney for the pathogenesis of hypertension. *J Auton Pharmacol*, 10 (suppl 1):s67-s72.

Ziegler MG, Morrissey EC, Kennedy B, Elayan H (1990). Sources of urinary catecholamines in renal denervated transplant recipients. *J Hypertension*, 8:927-931.

Zimlichman R, Levinson P, Kelly G, Stull R, Keiser H, Goldstein (1988). Derivation of urinary dopamine from plasma dopa. *Clin Sci*, 75:515-520.

Zubieta J, Cragoe EJ, Cubeddu LX (1988). Effects of amiloride and 5-(N,N-hexamethylene)amiloride on dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther*, 247:88-95.