

JORGE PROENÇA

**A INIBIÇÃO DO SISTEMA O-METILANTE  
E A RESPOSTA A AGONISTAS  
DOS RECEPTORES BETA**

PORTO - 1991

Jorge Alberto de Barros Brandão Proença

A INIBIÇÃO DO SISTEMA O-METILANTE  
E A RESPOSTA A AGONISTAS  
DOS RECEPTORES BETA

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

Porto -1991

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

À Faculdade de Farmácia do Porto

A MEUS PAIS

À MINHA MULHER  
ÀS MINHAS FILHAS

## Agradecimentos

Para o Senhor Professor Serafim Guimarães são as minhas primeiras palavras de agradecimento, pela disponibilidade com que sempre me recebeu, pela orientação científica neste e noutros trabalhos, pelas preciosas críticas e sobretudo, pelo grande incentivo e apoio que sempre me manifestou em horas particularmente difíceis da minha carreira académica.

Ao Senhor Professor Alfredo Amaral Albuquerque quero manifestar o meu agradecimento pelo apoio e confiança que sempre me concedeu.

Ao Senhor Professor Walter Osswald desejo agradecer as disponibilidades concedidas para a realização das experiências com compostos radiactivos no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto e também por me fazer sentir como parte integrante do grupo de investigação que tão sabiamente dirige.

À Doutora Quitéria Paiva agradeço o carinho, a disponibilidade e o apoio em todas as horas e as críticas que me dispensou, que muito contribuíram para a realização deste trabalho, e em particular o meu profundo agradecimento por me ter iniciado na investigação em Farmacologia.

Aos meus colegas de trabalho Dr. Jorge Gonçalves, Dr<sup>a</sup> Carminda Cunha e Dr. Felix Carvalho, agradeço todo o apoio e as críticas que me manifestaram.

A todos quanto trabalham no Laboratório de Farmacologia da

Faculdade de Farmácia desejo agradecer o carinho e a disponibilidade que sempre manifestaram, não querendo deixar de referir a excelente ajuda técnica prestada pela Maria do Céu Pereira, bem como à Maria Fernanda Pereira, D. Conceição Meireles e D. Olímpia Pereira, pela excelente ajuda na preparação de soluções e dos animais.

A todos quantos trabalham no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina o meu agradecimento pela forma carinhosa com que sempre me receberam. Ao Professor Daniel Moura desejo agradecer as preciosas críticas e o apoio concedido na análise estatística dos resultados.

À Manuela Moura e Prazeres Cleto agradeço a preciosa colaboração técnica, nas experiências com compostos radioacticos.

Ao Sr Diogo do serviço de reprografia agradeço toda a disponibilidade prestada para a reprodução deste trabalho..

Por último os agradecimentos vão para a minha mulher e filhas pelo sacrifício que tiveram de suportar, para que este trabalho se tornasse uma realidade.

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

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

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

Guimarães S, Paiva MQ, Moura D, Proença J (1985) The saturability of a site of loss and the degree of supersensitivity to agonists which are substrates of this site of loss . Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 329: 30-35

Proença J, Paiva MQ, Guimarães S (1988) The guinea-pig trachea O-methylating system is more effective in modulating  $\beta_2$ -than  $\beta_1$  adrenoceptor-mediated responses to isoprenaline. J Pharm Pharmacol 40: 76-77

-Proença J, Paiva MQ, Guimarães S (1988) Influence of inhibition of extraneuronal uptake and O-methylation on the sensitivity of sympatomimetic amines. Br J Pharmacol 95: 846 p

-Proença J, Guimarães S (1990) Enhancement by U-0521 and hydrocortisone of hyperglycaemia caused by  $\beta$ -adrenoceptor agonists. J Auton Pharmacol 10: 32

-Proença J, Paiva MQ, Guimarães S (1990) Supersensitivity to catecholamines after inhibition of extraneuronal uptake (uptake<sub>2</sub>) or O-methylation. J Neur Trans [suppl] 32: 182-187

A contribuição pessoal nos trabalhos em colaboração, constituiu na:

- colaboração no planeamento do protocolo experimental
- realização das experiências
- colaboração na discussão dos resultados e na sua publicação

## Abreviaturas

COMT	Catecol-O-metil transferase
Iso- <sup>3</sup> H	isoprenalina tritiada
MAO	Monoaminoxídase
OMI- <sup>3</sup> H	metabolitos O-metilados tritiados
U-0521	3',4'-di-hidroxi-2-metilpropiofenona;

## SUMÁRIO

### I - INTRODUÇÃO

### II - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1-Preparações usadas

- 1.1-Traqueia de Cobaia isolada
- 1.2-Útero de Rato isolado
- 1.3- Glândulas submaxilares de Ratinho isoladas
- 1.4-Determinação de glicemia no Rato "in vivo"
- 1.5-Estudo da metabolização da isoprenalina radioactiva

#### 2- Protocolos experimentais

##### 2.1-Traqueia de Cobaia

##### 2.2-Útero de Rato

##### 2.3-Determinação de actividade enzimática nas glândulas submaxilares de Ratinho

2.3.1-Acção das aminas simpaticomiméticas na secreção de alfa-amílase pelas glândulas submaxilares de Ratinho

2.3.2-Secreção de alfa-amílase na presença de propranolol

2.3.3-Influência do bloqueio das COMT e da inibição da captação extraneuronal, na secreção de alfa-amílase

2.4 -Análise da influência exercida pelo bloqueio dos locais de perda sobre o efeito hiperglicemiante dos agonistas adrenérgicos

2.4.1-Influência da (-)-isoprenalina na glicemia do rato

2.4.2-Influência da (-)-adrenalina na glicemia do Rato

2.4.3-Influência da dopamina na glicemia do Rato

2.4.3-Influência da(+)-dobutamina na glicemia do Rato

2.4.5-Influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal, na hiperglicemia induzida por aminas simpaticomiméticas.

3 - Estudo da metabolização da isoprenalina marcada

3.1- Influência da (-)-isoprenalina .(-)-adrenalina, dopamina e (+)-dobutamina na metabolização e acumulação da Iso-<sup>3</sup>H. Determinação da CI<sub>50</sub>

3.2- Influência da inibição da COMT ou da inibição da captação extraneuronal no metabolismo da Iso-<sup>3</sup>H

3.3- Determinação do espaço extracelular

4 - Doseamento da radioactividade

5-Estudos estatísticos

6- Fármacos usados

### III - RESULTADOS

#### 1-Traqueia de Cobaia

#### 2-Útero de Rato

#### 3-Glândulas submaxilares

3.1-Secreção de alfa-amílase em presença de propranolol

3.2-Influência do bloqueio da COMT e do bloqueio da captação extraneuronal na secreção de alfa-amílase induzida por aminas simpaticomiméticas.

#### 4 -Indução da hiperglicemia co Rato " in vivo".

4.1-Influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal na hiperglicemia induzida pela isoprenalina.

4.2-Influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal na hiperglicemia induzida pela adrenalina.

#### 5- Metabolização da isoprenalina marcada

5.1- Determinação da concentração inibitória 50 % (CI<sub>50</sub>)

5.2-Metabolização da Iso-<sup>3</sup>H.

### IV - DICUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

### V - RESUMO

VI - SUMMARY

VII - BIBLIOGRAFIA

## I - INTRODUÇÃO

Decorreram já 25 anos desde o momento em que Iversen (1965a) verificou que no coração de Rato, a noradrenalina era, não só captada pelos terminais dos nervos simpáticos, - captação neuronal ou captação<sub>1</sub>, mas também por células não neuroniais - captação extraneuronal ou captação<sub>2</sub>. Iversen verificou também, que o valor do Km dessa captação para a noradrenalina, era cerca de 1000 vezes mais alto do que para a captação<sub>1</sub> e, além disso, não funcionava para baixas concentrações de aminas (Iversen, 1965a).

Esta captação<sub>2</sub> foi identificada em numerosos tecidos e órgãos. A nível cardiovascular, por exemplo, onde foi primeiramente identificada e caracterizada, verificou-se a sua presença no coração de Rato e Gato (Iversen, 1965a; Graefe, 1981), na artéria umbilical humana (Gulati e Sivaramakrishna, 1975), na artéria mesentérica de Cão (Garrett e Branco, 1977), na veia safena de Cão (Paiva e Guimarães, 1978), nas arteríolas, coronárias e vénulas de Rato (Azevedo *et al.*, 1983) e na artéria coronária de Cão (O'Donnell e Reid, 1984). Mas, além do sistema cardiovascular, este processo foi também identificado em outras estruturas, como no músculo traqueal de diferentes espécies animais como a Cobaia (Anning *et al.*, 1979; Garland *et al.*, 1981), o Rato (O'Donnell e Reid, 1984), o Coelho (O'Donnell e Reid, 1984) e o Gato (O'Donnell e Reid, 1984), no útero de Cobaia (Anning *et al.*, 1978) e no útero de Coelho (Kennedy e de la Lande, 1984), na membrana nictitante de Gato (Graefe e Trendelenburg, 1974), nas glândulas salivares de Rato (Almgren e Jonason, 1976) e nas células humanas "Caki-

1"provenientes de carcinomas renais (ATCC HTB 46) (Schömig *et al.*, 1990.)

Em todos estes órgãos, a captação extraneuronal é um mecanismo de transporte activo, menos rápido e menos ávido que a captação neuronal, saturável, sensível a bloqueadores como os corticoides (Iversen e Salt, 1970), às  $\beta$ -haloalquilaminas (Iversen *et al.*, 1972; Salt, 1972) e aos metabolitos das catecolaminas (Salt, 1972; Mireylees e Foster, 1973; Bönisch *et al.*, 1974).

Contrariamente ao descrito inicialmente por Iversen (1965a; 1965b) a captação extraneuronal é um processo estereosselectivo. Na aorta de Coelho, por exemplo verificou-se uma metabolização preferencial do isómero (-)-isoprenalina (Barone *et al.*, 1983). Essa preferência pelos substratos levógiros foi, também, demonstrada noutros órgãos como a traqueia de Cobaia (Bryan e O'Donnell, 1984), o coração de Rato (Grohman e Trendelenburg, 1984), a aorta de Coelho (Henseling, 1984) e a veia safena de Cão (Guimarães e Paiva, 1984). Além disso, este sistema apresenta especificidade para certos substratos, sendo máxima a sua preferência para a dobutamina e progressivamente menor para a isoprenalina, adrenalina, noradrenalina e dopamina, por esta ordem. A captação extraneuronal não é normalmente influenciada pelas variações de concentração dos iões sódio ou cloro, mas é influenciada pelas condições, que de algum modo, podem reduzir o gradiente de concentração do ião potássio ou despolarizar a membrana celular (inibição da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ; anóxia e privação de glicose; diminuição da concentração de ião cálcio) (Bönisch *et al.*, 1985; Ludwig *et al.*, 1986).

Mais recentemente foi descrito um processo de captação para células não neuroniais, mas que apresentam certas características comuns à

captação neuronal e que foi proposto como captação 3. É o caso do verificado no epitélio glandular do endométrio de Coelho (Kennedy e de La Lande, 1987) nos fibroblastos da polpa dentária de Coelho (Parker *et al.*, 1987), no endotélio vascular do pulmão do Rato (Bryan *et al.*, 1988), no cortex cerebral de Rato (Wilson *et al.*, 1988) e no hepatócito de Rato (Acevedo *et al.*, 1990) em que o mecanismo de captação se mostra resistente a inibidores clássicos da captação extraneuronal como os corticoides, apresenta um elevado valor de Km e tem um mecanismo de transporte sensível à cocaína. Estas características não permitem classificar este mecanismo como captação<sub>1</sub> ou captação<sub>2</sub>, estando ainda por estabelecer o seu enquadramento nos mecanismos de remoção de catecolaminas.

Qualquer mecanismo de inactivação é um local de perda para os agonistas que são seu substrato, na medida em que, a inactivação subtrai moléculas de agonista, rarefazendo a sua concentração na biofase.

Assim, quando se fornece uma amina a uma estrutura (órgão isolado ou animal inteiro) após inibição de parte ou da totalidade do sistema de O-metilação (formado por um primeiro passo que é a captação extraneuronal e por um segundo que é a O-metilação, associados em série (ver Trendelenburg, 1984)) a concentração de moléculas activas da amina na biofase é maior do que na ausência de inibição, o que aumenta a amplitude e a duração da resposta causada por essa amina. Este aumento de sensibilidade pode ser usado para verificar a influência de um local de perda sobre uma resposta mediada por um determinado tipo de receptor (Trendelenburg, 1972; 1980; Guimarães e Trendelenburg, 1985).

Este aumento de sensibilidade (de tipo I ou "Deviation supersensitivity" assim designada por Fleming em 1975 para a musculatura lisa), pode ser influenciada por alguns factores, como por exemplo, as constantes cinéticas que caracterizam o local de perda, a distância dos receptores ao local de perda em estudo e a potência do agonista (Guimarães e Paiva, 1981a e b; Guimarães, 1982).

O diferente grau de hipersensibilidade para os efeitos alfa ou beta de uma mesma amina gerado pelo bloqueio de um local de perda, permitiu estabelecer relações preferenciais de certos locais de perda com diferentes tipos de receptores adrenérgicos, ou seja, permitiu definir mais do que uma biofase para as aminas simpaticomiméticas: uma biofase dos receptores alfa, estritamente associada com a captação neuronal; outra biofase dos receptores beta, intimamente ligada com a COMT. Isto foi demonstrado em tecidos como o intestino de Coelho (Guimarães e Paiva, 1977), a artéria mesentérica e a veia safena de Cão (Guimarães e Paiva, 1981a e b; Guimarães *et al.*, 1982; Guimarães, 1983, 1984).

Demonstrado o efeito modulador da acção da COMT nas respostas mediadas pelos receptores beta, foi possível verificar que essa modulação era mais intensa nos tecidos em que o sub-tipo dos receptores dominante era o beta<sub>2</sub> (Paiva e Guimarães, 1976; Bryan *et al.*, 1981; Russell e Moran, 1980; Hawthorn e Broadley, 1982; Barnes *et al.*, 1983; Broadley *et al.*, 1984; Proença *et al.*, 1988).

A determinação da actividade enzimática em diferentes fracções de homogeneizados de tecidos, tem permitido um maior esclarecimento sobre a presença de diferentes enzimas nos tecidos. Assim, Axelrod e Tomchic (1958) encontraram em homogeneizados de fígado de Rato, duas formas de COMT: uma fracção solúvel ou citoplasmática (78.000xg), e uma pequena fracção ligada fortemente a membranas. Esta separação das diferentes fracções e identificação das duas enzimas, não permitiu no entanto esclarecer a localização destas duas formas enzimáticas.

Uma actividade semelhante foi detectada no tecido hepático humano e nas glândulas salivares de Rato. Nesta mesma espécie, Assicot e Bohuon (1971) encontraram nos glóbulos rubros duas diferentes formas de COMT, uma delas associada a "ghosts" eritrocitários (forma ligada) e outra de forma livre ou citosólica.

Determinaram-se para as duas variantes de COMT, diferentes valores do Km nas fracções livre e ligada, tendo a fracção ligada maior afinidade para as catecolaminas do que a fracção livre. As preparações de COMT provenientes das duas fracções diferem não só pelas suas características cinéticas, mas também pelo pH óptimo de funcionamento, estabilidade ao calor ou reactividade imunoquímica (Guldberg e Marsden, 1975).

Recentemente Bertocci *et al.*(1990) usando anticorpos monoclonais identificaram as duas formas enzimáticas em tecidos de Rato e Porco. Assim, na fracção solúvel, determinaram a presença de COMT citosólica, no fígado de Porco e fígado e rim de Rato. Na fracção microsomal além da enzima referida anteriormente, determinaram também a presença da COMT membranar.

Em face da presença das diferentes formas de COMT nos homogeneizados de tecidos, levanta-se o problema da sua localização e do seu envolvimento nos processos de metabolização, nomeadamente de catecolaminas ou amins com elas relacionadas.

Não completamente explicado pelo modelo proposto por Trendelenburg (1984), em que o sistema O-metilante é constituído por um primeiro passo (captação), sem o qual não poderia dar-se o segundo (O-metilação) era o facto repetidamente observado de que, o bloqueio da COMT originava respostas potenciadas rápidas no seu desenvolvimento e potenciações maiores do que as causadas pelos bloqueadores da captação extraneuronal (Paiva e Guimarães, 1980). Uma resposta tão potenciada e rápida só poderia ser devida ao bloqueio de uma COMT muito acessível e não a uma COMT intracelular.

O problema da localização das diferentes formas de COMT, foi abordado por Head *et al.* (1985) ao estudarem a actividade O-metilante da COMT, na aorta de Coelho com o recurso a um dador de grupo metilo a

[metil-<sup>3</sup>H]-S-adenosil-l-metionina. Este dador do grupo metilo apresenta como característica a sua baixa capacidade de transpor membranas celulares. Os autores desenvolveram uma hipótese simples com a qual pretendiam demonstrar a existência de uma COMT cuja localização não seria intracelular, explorando igualmente a estereosseletividade das aminas usadas, e a influência do íon cálcio (conhecido inibidor da actividade O-metilante).

Reid *et al.* (1986) encontraram igualmente, na aorta de Coelho, duas formas de COMT com características cinéticas diferentes: a COMT ligada à membrana tinha, para a isoprenalina um  $K_m$  de  $0,9 \mu\text{mol/l}$ , enquanto que a COMT citosólica solúvel apresentava para a mesma amina um  $K_m$  de  $121 \mu\text{mol/l}$  (baixa afinidade).

A COMT da membrana tem grande afinidade, mas é de saturação mais fácil, enquanto que a COMT citoplasmática possui uma afinidade mais baixa ( $K_m$  elevado) e é dificilmente saturável.

Se a COMT da membrana é a responsável pela inactivação das aminas na biofase como foi proposto por Head *et al.* (1985), pode admitir-se então que da sua inibição vai resultar um aumento da concentração efectiva dos agonistas ao nível dos receptores, e conseqüentemente, uma potenciação de resposta, como de facto se verifica experimentalmente. A proposta de um sistema O-metilante disposto em série (captação - O-metilação) é verdadeiro em parte e na medida em que a COMT intracitoplasmática desempenha algum papel. Parece contudo que o principal papel O-metilante é desempenhado pela COMT da membrana, o que invalida o conceito proposto por Trendelenburg de um sistema composto por dois passos, em série: captação e O-metilação.

Além disso, a captação extraneuronal e a O-metilação variam na sua importância de tecido para tecido.

No nosso trabalho estudamos o comportamento do sistema O-metilante, em tecidos com respostas mediadas predominantemente por

receptores beta<sub>2</sub>, comparando o papel desempenhado por cada um dos dois passos que levam à inactivação extraneuronal das catecolaminas (captação extraneuronal e metilação pela COMT) recorrendo a inibidores específicos e fornecendo ao sistema diferentes aminas que são substrato do sistema O-metilante.

Na escolha dos modelos experimentais, atendemos fundamentalmente, ao predomínio dos receptores beta<sub>2</sub> nos órgãos cujas respostas desejávamos estudar e à existência de uma inactivação extraneuronal eficaz nesses mesmos órgãos. Assim, foram seleccionados a traqueia de Cobaia (Foster, 1966; Paiva e Guimarães, 1976; O'Donnell *et al.*, 1978; O'Donnell e Wanstall, 1979a; Zaagsma *et al.*, 1983) e o útero de Rato (Levy e Tozzi, 1963; Digges, 1982, Cheng e Woodwar, 1984), tecidos que apresentam uma captação extraneuronal intensa (O'Donnell e Saar, 1978).

Além disso, decidiu-se pela primeira vez, proceder ao estudo da importância da captação extraneuronal "in vivo". Para isso, escolhemos a glicemia do Rato, como parâmetro biológico fortemente dependente da actividade dos receptores beta<sub>2</sub>.

Finalmente resolvemos, também, estender à mesma análise a secreção salivar de Ratinho.

Por fim, utilizamos compostos radioactivos para avaliação da capacidade O-metilante dos órgãos analisados, como contraprova para os estudos funcionais.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

## 1-PREPARAÇÕES USADAS:

No nosso estudo realizamos experiências em órgãos isolados, como a traqueia de Cobaia, o útero de Rato e as glândulas salivares de Ratinho, e experiências no animal inteiro (Rato).

### 1.1-Traqueia de Cobaia

Usaram-se cobaias de sexo masculino e de sexo feminino, com peso entre 350 a 500 g, mortas por deslocamento cervical e posterior sangria. A traqueia foi retirada e colocada em placa de Petri contendo solução de Krebs refrigerada e oxigenada. Limpou-se a traqueia das aderências e cortou-se em espiral (Constantine, 1965). Suspenderam-se as preparações, (correspondentes a três anéis cada) em tinas de banho de órgãos isolados de

25 ml de capacidade, contendo solução de Krebs-Henseleit (com a seguinte composição em mmol/l: NaCl, 118,6; KCl, 4,7; CaCl<sub>2</sub>, 2,52; KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,18; MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, 1,23; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; Glicose 10,0; Ácido ascórbico, 0,057 ; Etilenodiaminotetracetato de sódio, 0,027). A solução foi mantida a 37° C, e oxigenada com uma mistura de 95% de oxigênio e 5 % de dióxido de carbono.

As preparações foram ligadas a miógrafos isotônicos da Ugo Basile (ref. 7006) e ficavam submetidas a uma tensão de 1g. Como sistema de registo usou-se um polígrafo da mesma marca (ref.7070).

De cada traqueia obtinham-se normalmente quatro preparações.

Estas preparações deixavam-se estabilizar durante um periodo de 90 minutos, durante o qual se renovava o líquido nutritivo (15 em 15 minutos).

## 1.2- Útero de Rato

As experiências com esta preparação foram realizadas, em condições experimentais condicionadas. Dada a variação da actividade da COMT e a variação do conteúdo em catecolaminas com o ciclo ovulatório (Giles e Miller, 1967), os animais eram sacrificados quando se encontravam na mesma fase do ciclo (estros). Com este procedimento minimizavam-se possíveis modificações nos resultados, devidas a alterações que normalmente ocorrem no tecido uterino em função da fase do ciclo .

Usaram-se ratos Wistar, com peso entre 250-350 g, na fase de estro verificada previamente por observação microscópica de esfregaços vaginais, que eram corados pelo método de Shorr (Roque, 1971).

Após sacrifício dos animais feito por deslocamento cervical e posterior sangria, retiravam-se os dois cornos uterinos que eram mergulhados em solução de Jalon refrigerada e oxigenada. Aí, os cornos uterinos eram limpos de todas as aderências e cortados longitudinalmente. Assim preparados, os cornos uterinos eram introduzidos em tinas de banhos de órgãos isolados com a capacidade de 25 ml contendo solução de Jalon (com a seguinte composição em mmol/l: NaCl, 154,1; KCl, 5,63; CaCl<sub>2</sub>, 0,2; NaHCO<sub>3</sub>, 5,95; glicose, 2,52; ácido ascórbico, 0,057; Etilenodiaminotetracetato de sódio, 0,027). A solução no banho era mantida a 37°C e oxigenado com uma mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. Os fragmentos eram depois presos por uma extremidade a uma haste de suporte e pela outra extremidade a uma alavanca de inscrição frontal, com uma ampliação de 5 vezes, e contrabalançadas de forma a sujeitar a preparação a uma tensão de 0,5g. Para registo da actividade contráctil usou-se um quimógrafo (Palmer) e cilindros revestidos a negro de fumo.

As preparações estabilizavam durante um periodo de 45 a 60 minutos, durante o qual se procedia à mudança de líquido nutritivo com um intervalo de 15 minutos. De cada animal sacrificado obtinham-se normalmente quatro preparações.

### 1.3 - Glândulas submaxilares de Ratinho

Usaram-se ratinhos "Charles River CD<sub>1</sub>" com peso entre 25-30 g, mantidos em jejum de 12 horas com água "ad libitum". Sob anestesia feita com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) retiraram-se as glândulas submaxilares que foram de seguida mergulhadas em solução de Krebs

refrigerada e oxigenada. Depois de limpas de aderências foram introduzidas em tinas de incubação contendo 2,5 ml de solução nutritiva.

A solução nas tinas de incubação foi mantida a 37°C, permanentemente oxigenada com mistura de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono e em agitação constante (Banho GFL 1083).

As experiências decorreram em dois períodos sucessivos de incubação, cada um com a duração de 30 minutos. No fim do primeiro período as glândulas eram passadas para novas tinas (contendo solução nutritiva aquecida e oxigenada), dando-se então início ao segundo período de incubação de 30 minutos. Ao fim de cada um dos períodos de incubação retiravam-se amostras das soluções de incubação, que eram refrigeradas a -20°C determinando-se, posteriormente o teor em alfa-amilase, por cinética enzimática com reagente de marca "Human".

#### 1.4 -Determinação da glicemia no Rato "in vivo"

Para a realização destas experiências usaram-se ratos macho "Wistar", com peso compreendido entre 250 - 350 g, mantidos em jejum de 12 horas com água "ad libitum". Anestesiaram-se os animais com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), retirou-se-lhes o pâncreas e canularam-se a artéria carótida esquerda (para obtenção posterior de amostras de sangue arterial) e a veia femoral direita (para infusão de soluções de fármacos ou soro fisiológico). Para facilitar a respiração do animal introduziu-se uma cânula na traqueia. Antes da canulação dos vasos, e para bloquear a captação neuronal e os receptores alfa, os animais recebiam 5,9 µmol/kg de cocaína e 5,5 µmol/kg de fentolamina.

Após canulação dos vasos e durante um período de 30 minutos, infundia-se soro fisiológico (controle) ou as soluções das substâncias cuja influência sobre a ação das catecolaminas se desejava estudar. A infusão realizou-se com uma bomba peristáltica de fluxo constante "Gilson Minipuls 2" a uma velocidade de 0,03 ml / minuto.

Recolheram-se amostras de sangue arterial ( $0,20 \pm 0,05$  ml), que eram passadas para tubos Eppendorf contendo EDTA dipotássico como anti-coagulante. Após agitação e para se proceder à separação do plasma, centrifugaram-se as amostras durante 10 minutos. As amostras obtidas foram refrigeradas de imediato a uma temperatura compreendida entre 2 e 8°C determinando-se posteriormente a glicemia pelo método enzimático GOD-PAP com reagente de marca "Human" em espectrofotômetro Shymadzu UV-265.

Recolheu-se a primeira amostra antes do início da infusão de soro fisiológico ou de fármacos (t), o que nos permitiu verificar o nível glicêmico do animal antes da infusão dos fármacos (controle). Após 30 minutos de infusão salina ou da dos fármacos, recolheu-se a segunda amostra ( $t_0$ ). A recolha desta segunda amostra permitiu verificar se a infusão salina ou dos fármacos provocava modificações significativas da glicemia, em relação ao valor determinado antes de se iniciar a infusão (t). As restantes amostras recolheram-se de 5 em 5 minutos, imediatamente após o início da infusão dos agonistas e durante um intervalo de 25 minutos, recolhendo-se no total 7 amostras.

## 1.5 - Estudo da metabolização da isoprenalina radioactiva

Incubaram-se com isoprenalina-<sup>3</sup>H (Iso-<sup>3</sup>H) porções de tecidos com pesos compreendidos entre 70-90 mg, em tinhas de incubação contendo 2ml de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, oxigenada com mistura de 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono e sob agitação contínua. No fim do periodo de incubação os tecidos foram rapidamente lavados em solução de Krebs refrigerada, secos em papel de filtro e imediatamente pesados. Procedeu-se, seguidamente à sua homogeneização que foi feita em 3 ml de ácido perclórico 0,01 mol/l. O ácido perclórico era adicionado aos líquidos de incubação de modo a atingir a concentração final de 0,01 mol/l.

Os líquidos de incubação e os tecidos foram mantidos à temperatura de 2-8°C, deixando-se permanecer em contacto durante 24 horas. Em cada série de experiências incubaram-se nas mesmas condições, amostras de líquido nutritivo sem qualquer tecido. Os resultados obtidos com esta amostra permitiram a correcção da contaminação ou da degradação espontânea da Iso-<sup>3</sup>H.

A separação da Iso-<sup>3</sup>H e da O-metilisoprenalina-<sup>3</sup>H (OMI-<sup>3</sup>H) realizou-se por cromatografia em coluna de alumina e Dowex. Passaram-se os líquidos e os extractos de tecidos por colunas de alumina e Dowex. A Iso-<sup>3</sup>H foi adsorvida pela coluna de alumina e eluida com ácido clorídrico 0,2N. A OMI-<sup>3</sup>H, adsorvida à coluna de Dowex, foi eluida com mistura em partes iguais de ácido clorídrico 6N e etanol.

Às amostras obtidas adicionou-se mistura de cintilação, sendo a radioactividade das diversas amostras medida em espectrofotómetro de cintilação líquida.

## 2 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 2.1 - Traqueia de Cobaia

Para estudar a influência da captação extraneuronal e da O-metilação na acção relaxadora das aminas (isoprenalina, adrenalina, dopamina e dobutamina), determinaram-se duas curvas concentração-resposta por preparação: a primeira na ausência e a segunda na presença de um bloqueador da captação extraneuronal (200 $\mu$ mol/l de hidrocortisona) ou de um bloqueador da O-metilação (55 $\mu$ mol/l de U-0521). Dado que a traqueia "in vitro" não possui tónus espontâneo, o relaxamento causado pelas aminas simpaticomiméticas seria muito reduzido ou nulo, o que tornaria o estudo impossível. Assim e para ampliar a resposta relaxadora às aminas que iam ser estudadas, induziu-se o tónus na preparação pela acção de 0,3 $\mu$ mol/l de carbacol.

As curvas concentração - resposta foram obtidas pelo método da adição cumulativa. A concentração de agonista no banho era aumentada por um factor de 3, fazendo-se esta adição só quando a resposta à concentração anterior tivesse atingido o seu nível máximo de resposta e tivesse atingido o equilíbrio. Os bloqueadores dos locais de perda (hidrocortisona ou U-0521) eram adicionados ao banho 20 minutos antes do indutor de tónus, permanecendo no banho até ao final da experiência. Simultaneamente realizaram-se experiências na ausência de bloqueadores dos locais de perda

(controle) .

Estas experiências foram feitas na presença de 12  $\mu\text{mol/l}$  de cocaína (inibidor da captação neuronal) e de 7  $\mu\text{mol/l}$  de fentolamina (antagonista dos receptores alfa). Quer a cocaína, quer a fentolamina foram mantidos no banho durante toda a experiência.

No fim de cada experiência determinou-se a contração máxima da preparação induzida pelo carbacol, rejeitando-se as experiências em que os valores obtidos para o tónus induzido pelo carbacol não estivessem entre os limites previamente estabelecidos de 60 a 80 % .

As curvas concentração-resposta foram registadas num sistema de coordenadas cartesianas dispendo em ordenadas as respostas expressas em percentagem de relaxamento máximo e em abcissas o logaritmo das concentrações molares dos agonistas.

Calculou-se para cada curva, por interpolação gráfica a concentração de agonista necessária para produzir 50% do efeito máximo ( $CE_{50}$ ).

A influência da inibição dos locais de perda na sensibilidade às aminas usadas, foi expressa pelo cociente entre as  $CE_{50}$  ( $F = CE_{50}$  na ausência de bloqueador/ $CE_{50}$  na presença de bloqueador).

## 2.2- Útero de Rato

Nesta preparação, seguiu-se uma metodologia idêntica à usada com o músculo traqueal, para obtenção de curvas de concentração-resposta às aminas anteriormente referidas. Como indutor de tónus usou-se o cloreto de potássio na concentração de 48  $\text{mmol/l}$ . Utilizaram-se os mesmos

inibidores dos locais de perda e nas mesmas concentrações, que as referidas para a traqueia de Cobaia.

Realizaram-se todas as experiências na presença de 12  $\mu\text{mol/l}$  cocaína (inibidor da captação neuronal) e de 7  $\mu\text{mol/l}$  de fentolamina (antagonista dos receptores alfa) que se mantiveram no banho durante toda a experiência.

No final de cada experiência determinou-se a contração máxima da preparação por adição de 144 mmol/l de cloreto de potássio, rejeitando-se as experiências em que o tónus da preparação induzido pelo cloreto de potássio não estava entre os limites de 60 a 80%.

Quantificou-se a influência da inibição dos locais de perda através do cociente entre as  $CE_{50}$  ( $F = CE_{50}$  na ausência do bloqueador/ $CE_{50}$  na presença do bloqueador).

### 2.3-Determinação da actividade enzimática

Com glândulas salivares de Rato "in vivo", a metodologia normalmente seguida, tem como base a determinação quantitativa da saliva produzida pelas glândulas. Porém, com as glândulas salivares de Ratinho, e pelo pequeno calibre apresentado pelos canais excretores das glândulas submaxilares, não nos foi possível realizar a sua canulação. Assim, como em experiências preliminares tínhamos verificado que, quer a incubação de glândulas submaxilares de Rato, quer a incubação de glândulas submaxilares de Ratinho, libertavam alfa-amílase para o líquido de incubação em quantidades doseáveis, optamos por determinar a concentração de alfa-amílase no líquido de incubação como parâmetro quantificador da actividade secretória das glândulas submaxilares de Ratinho.

O trabalho experimental foi dividido em três fases:

1º- Verificar se a secreção de alfa-amílase era dependente da dose do agonista e estabelecer a dose a usar.

2º Determinar o envolvimento dos receptores beta na secreção de alfa-amílase.

3º Verificar a influência da inibição da COMT ou da captação extraneuronal na secreção de alfa-amílase pelas glândulas submaxilares do Ratinho.

A enzima foi doseada por cinética enzimática utilizando um reagente produzido pela "Human", sendo os resultados expressos em U/l. Em cada ensaio realizaram-se duas determinações com períodos de incubação sucessivos de 30 minutos cada.

Determinaram-se as concentrações de alfa-amílase nas amostras obtidas nos dois períodos de incubação ( $t_1$  = concentração obtida no primeiro período de incubação; e  $t_2$  = concentração obtida no segundo período de incubação). Todas as experiências foram realizadas na presença de  $12\mu\text{mol/l}$  de cocaína para inibir a captação neuronal e de  $7\mu\text{mol/l}$  fentolamina para bloquear os receptores adrenérgicos alfa. Rejeitavam-se as experiências sempre que a concentração de alfa-amílase no líquido de incubação referente ao primeiro período fosse inferior a 60 U/l.

Em experiências prévias determinaram-se os teores enzimáticos de alfa-amílase nos tempos correspondentes aos dois períodos de incubação (experiências controle), não se encontrando diferenças estatisticamente significativas entre eles.

A influência dos agonistas e dos bloqueadores dos locais de perda, foi avaliada portanto, partindo-se do princípio de que, no segundo periodo de incubação, se liberta para o meio de incubação a mesma quantidade de enzima produzida durante o primeiro periodo de incubação ( $t_1$ ) adicionada da enzima que era produzida por acção dos agonistas adrenérgicos, no segundo periodo de incubação (Concentração em  $t_2$  - Concentração em  $t_1 = X$  U/l de alfa-amílase).

### 2.3.1-Acção das aminas simpaticomiméticas na secreção de alfa-amílase pelas glândulas submaxilares

Realizaram-se incubações prévias, na ausência de agonistas (controlo) e na presença de 5; 15; 45 e 135 nmol/l de (-)-isoprenalina, de 50; 150; 450 e 1.350 nmol/l de (-)-adrenalina, de 1; 3; 9 e 27  $\mu$ mol/l de dopamina e de 1; 3; 9 e 27  $\mu$ mol/l de (+)-dobutamina para verificar se os efeitos eram dependentes da dose.

Após ter-se verificado que havia secreção de alfa-amílase dependente da dose, seleccionaram-se, para todos os agonistas, as concentrações eficazes mínimas, que foram depois usadas no estudo da influência dos locais de perda nessa secreção.

Foram as seguintes as doses escolhidas : 15 nmol/l de (-)-isoprenalina; 150 nmol/l de (-)-adrenalina; 3  $\mu$ mol/l de dopamina e 1  $\mu$ mol/l de (+)-dobutamina

### 2-3.2- Secreção de alfa-amílase em presença de propranolol

Realizaram-se incubações das glândulas salivares, nas condições de ensaio anteriormente descritas, em presença de propranolol (bloqueador beta<sub>1</sub> e beta<sub>2</sub>) na concentração de 1,7 µmol/l, na ausência e na presença de aminas simpaticomiméticas nas concentrações acima referidas.

### 2-3.3-Influência do bloqueio da COMT e da inibição da captação extraneuronal na secreção de alfa-amílase induzida pelas aminas simpaticomiméticas

Para o estudo da influência da inibição da captação extraneuronal ou da inibição da COMT nesta preparação, em cada série experimental utilizaram-se seis ratinhos, dos quais se retiravam as glândulas submaxilares. As 12 glândulas submaxilares isoladas foram distribuídas por seis grupos experimentais (duas glândulas / grupo).

No primeiro grupo (controlo) e nos dois períodos de incubação, as glândulas foram incubadas na ausência de agonistas ou bloqueadores dos locais de perda. No segundo e terceiro grupos (controlo de bloqueadores) e igualmente durante os dois períodos de incubação, as glândulas foram incubadas na presença de 55 µmol/l de U-0521 ou de 200 µmol/l de hidrocortisona.

Cada um dos restantes três grupos sofreu tratamento prévio, adicionando-se respectivamente no primeiro período de incubação soro fisiológico (4º grupo), U-0521 (5º grupo) ou hidrocortisona (6º grupo) nas concentrações referidas anteriormente. No segundo período de incubação as referidas glândulas sofreram o mesmo tratamento, mas adicionou-se ao líquido de incubação a dose de agonista previamente estabelecida.

O desenvolvimento experimental seguido foi em esquema, o seguinte:

Primeiro período de incubação	Segundo período de incubação
1º grupo : Controlo salino	Controlo salino
2º grupo : U-0521	U-0521
3º grupo : Hidrocortisona	Hidrocortisona
4º grupo : Salino	Salino + agonista
5º grupo : U-0521	U-0521+ agonista
6º grupo : Hidrocortisona	Hidrocortisona+ agonista

Nas amostras do líquido de incubação recolhidas, determinaram-se as concentrações de alfa-amílase pela técnica descrita anteriormente e compararam-se os valores obtidos para os diferentes grupos (diferença entre os valores determinados na segunda incubação e os valores da primeira incubação).

## 2.4 - Análise da influência exercida pelo bloqueio dos locais de perda sobre o efeito hiperglicemiante dos agonistas adrenérgicos.

Este estudo fez-se em duas fases: na primeira verificou-se se a infusão da amina em estudo induzia variações significativas na glicemia do Rato, estabelecendo-se igualmente, a dose mais conveniente, os tempos de recolha das amostras sanguíneas e a duração da experiência.

Na segunda fase estudou-se a influência da inibição da COMT ou do bloqueio da captação extraneuronal na hiperglicemia induzida pelas aminas simpaticomiméticas.

O doseamento da glicose nas diferentes amostras de plasma, fez-se pelo método enzimático "GOD-PAP Human", sendo os resultados expressos em mg/100ml .

O "perfil glicémico" durante a experiência, foi obtido usando como valor de referência a concentração determinada ao fim dos 30 minutos iniciais ( $t_0$ ), (ver métodos), considerando-se o efeito produzido pelas aminas, como a diferença entre os valores de glicemia obtidos e os valores de controlos, nos diferentes tempos considerados ( $t_5 - t_0$ ;  $t_{10} - t_0$ ; etc.).

### 2.4.1 - Influência da (-)-isoprenalina na glicemia do Rato

Para verificar se a isoprenalina produzia efeito hiperglicemiante, ministraram-se (a três grupos de animais) diferentes concentrações desta amina (0,005, 0,05 e 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$ ), bem como soro fisiológico (grupo

controle) num volume idêntico àquele em que as soluções foram infundidas. A dose de  $0,05\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . foi a dose mínima de isoprenalina que produziu variações significativas do controle, a partir do 10º minuto ( $t_{10}$ ). Na dose de  $0,5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  a isoprenalina originou variações significativas a partir do 5º minuto ( $t_5$ ).

Face aos resultados obtidos, escolhemos a dose de  $0,05\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , atendendo a que na segunda fase experimental (após o bloqueio dos locais de perda), se previa um aumento de glicemia com deslocamento da curva para a esquerda.

#### 2.4.2-Influência da (-)- adrenalina na glicemia do Rato

Para verificar se a adrenalina produzia efeito hiperglicemiante, ministraram-se(a três grupos de animais) diferentes concentrações desta amina ( $0,01$ ,  $0,1$  e  $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .), bem como soro fisiológico(controle) num volume idêntico àquele em que as soluções foram infundidas. A dose de  $0,1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . foi a dose mínima de adrenalina que produziu variações significativas do controle, a partir do 10º minuto ( $t_{10}$ ). Na dose de  $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  a adrenalina originou variações significativas a partir do 5º minuto ( $t_5$ ).

Da mesma forma que para a isoprenalina, optamos por usar a dose intermédia correspondente a  $0,1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ .

#### 2.4.3- Influência da dopamina na glicemia do Rato

As experiências prévias realizadas com dopamina, nas condições de ensaio anteriores, não foram esclarecedores quanto à acção desta amina na indução de glicemia no Rato. As diferentes doses de agonista utilizadas não originaram variações glicémicas ao longo do tempo que permitissem a sua contabilização.

#### 2.4.4- Influência da (+)- dobutamina na glicemia do Rato

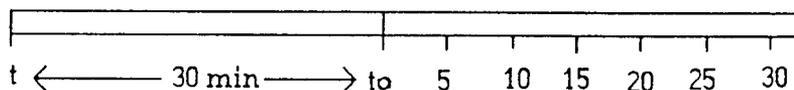
A infusão de diferentes concentrações de dobutamina em ratos, não produziu variações glicémicas que permitissem a obtenção da "curva de glicemia".

Com a infusão desta amina alguns dos animais apresentavam efeitos indesejáveis, nomeadamente taquicárdia muito acentuada, dificuldades respiratórias, morrendo mesmo alguns dos animais durante a experiência.

Tentamos minimizar o efeito taquicardizante produzido por esta amina, tratando previamente os animais com atenolol (bloqueador beta<sub>1</sub> específico). Os animais melhoraram sem dúvida, quanto ao seu comportamento face à infusão da dobutamina. Porém, o desenvolvimento glicémico não permitiu uma contabilização precisa, verificando-se situações de hiperglicemia e hipoglicemia durante a infusão da amina.

#### 2.4.5 -Influência da inibição da COMT ou da inibição da captação extraneuronal, na hiperglicemia induzida por aminas simpaticomiméticas

Para estudar a influência da inibição da captação extraneuronal pela hidrocortisona (20,7 $\mu$ mol/Kg) e da inibição da COMT pelo U-0521 (41,5 $\mu$ mol/Kg) na hiperglicemia induzida pelas aminas simpaticomiméticas usaram-se 6 grupos de animais, distribuídos segundo o esquema seguinte:



Grupo 1 : Salino	Salino
Grupo 2 : U-0521	Salino
Grupo 3 : Hidrocortisona	Salino
Grupo 4 : Salino	Agonista
Grupo 5: U-0521	Agonista
Grupo 6: Hidrocortisona	Agonista

Usaram-se três grupos controlo, (salino, U-0521 e hidrocortisona) e três grupos que sofreram o mesmo tratamento, mas que foram infundidos com as aminas simpaticomiméticas em estudo. Trataram-se todos os animais com 5,5  $\mu$ mol/Kg de fentolamina para prevenir efeitos alfa e 5,9  $\mu$ mol/Kg de cocaína para bloquear a captação neuronal.

Compararam-se entre si os valores da variação glicémica determinados ao fim dos mesmos tempos: 5, 10, 15, 20, 25 minutos após início da infusão.

Colocaram-se em ordenadas os valores de variação glicêmica em mg/100ml e em abcissas o tempo em minutos, obtendo-se curvas de variação glicêmica em função do tempo.

### 3 -ESTUDO DA METABOLIZAÇÃO DA ISOPRENALINA MARCADA

3.1-Influência da (-)-isoprenalina, (-)-adrenalina, dopamina e (+)-dobutamina na metabolização e acumulação da Iso-<sup>3</sup>H. Determinação da CI<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50%).

Pré-incubaram-se anéis de traqueia de Cobaia ou fragmentos de tecido uterino de Rato em 2 ml de solução de Krebs-Henseleit contendo 1 mmol/l pargilina (para inibir a MAO), a 37°C e oxigenada com mistura de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono, sob agitação constante durante um período de 30 minutos. Seguiu-se uma incubação de igual período em solução de Krebs com 30µmol/l de cocaína (para inibir a captação neuronal), nas mesmas condições de incubação mantendo-se este bloqueador até ao final da experiência.

De seguida e durante o mesmo período de tempo, fizeram-se incubações com 0,1µmol de Iso -<sup>3</sup>H, quer na presença de concentrações crescentes de: (-)-isoprenalina; (-)-adrenalina; dopamina e (+) -dobutamina, quer na ausência de qualquer amina.

Representou-se num sistema de coordenadas cartesianas em ordenadas a percentagem de inibição da formação de metabolitos metilados e em abcissas o logaritmo da concentração molar das amins frias usadas, calculando-se por interpolação gráfica os valores de  $CI_{50}$  (concentração de amina fria necessária para inibir em 50% a produção de metabolitos O-metilados).

### 3.2-Influência da inibição da COMT ou da captação extraneuronal no metabolismo da Iso- $^3H$

Para determinar a influência da inibição da COMT ou da inibição da captação extraneuronal no metabolismo da Iso- $^3H$ , realizaram-se incubações de fragmentos de tecidos (traqueia e útero) na ausência (controlo) e na presença de 55  $\mu\text{mol/l}$  de U-0521 e 200  $\mu\text{mol/l}$  de hidrocortisona, em preparações previamente tratadas com pargilina e cocaína, segundo protocolo descrito anteriormente. Determinaram-se e compararam-se os teores dos metabolitos metilados totais (OMI- $^3H$ ) e da amina intacta acumulada nos tecidos (pmol/g/30 min.), quer nos grupos não tratados, quer nos grupos tratados com os inibidores dos locais de perda (U-0521 e hidrocortisona).

### 3.3 - Determinação do espaço extracelular

Incubaram-se fragmentos de tecido uterino de Rato e anéis de traqueia de Cobaia durante 30 minutos em 3 ml de Krebs-Henseleit contendo sorbitol-<sup>14</sup>C. No fim da incubação lavaram-se rapidamente as tiras em Krebs-Henseleit refrigerado, limpam-se, pesaram-se e homogeneizaram-se para determinação de radioactividade. Determinou-se também a radioactividade em aliquotas do líquido de incubação.

Corrigiram-se todos os valores de acumulação de amina-<sup>3</sup>H intacta nos tecidos por subtracção do valor correspondente ao espaço extracelular, admitindo que a distribuição extracelular do sorbitol-<sup>14</sup>C é semelhante à das aminas marcadas. O valor médio determinado para o espaço extracelular na traqueia de Cobaia foi de  $0,56 \pm 0,03$  ml/g (n=6) e para o tecido uterino de Rato foi de  $0,61 \pm 0,03$  ml/g (n=6) após 30 minutos de incubação.

### 4 - DOSEAMENTO DA RADIOACTIVIDADE

A radioactividade das diversas amostras foi medida por cintilometria líquida em contador de cintilações (Tri-Carb Scintillation Spectrometer mod. 3320, Packard, Warrenville, ILL, USA ou Líquid Scintillation Counter BF 500, Berthold, Wildbad, RFA) usando como líquido de cintilação uma mistura de 330 ml Triton x-100, 5,5 g de Permablend III e 1000 ml de tolueno ou uma mistura de 330 ml de Triton X-100, 5 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) e

0,5 g de p-bis (o-metilestiril) benzeno (bis MSB) e tolueno até perfazer 1000 ml.

## 5 - ESTUDOS ESTATÍSTICOS

Os resultados experimentais obtidos na traqueia e no útero estão representados pela média geométrica com os limites do intervalo fiduciário correspondente a 95%. Na comparação entre as médias dos diferentes grupos utilizou-se o teste t de Student para valores emparelhados. Consideraram-se significativas as diferenças entre as médias sempre que  $P < 0.05$ .

Para as experiências em que se compararam diferentes grupos entre si usou-se a análise de variância "ANOVA" ( $P < 0,05$ ) (Wallenstein *et al.*, 1980) com programa de computador Macintosh SE.

## 6-FÁRMACOS USADOS

Bitartarato de (-)-adrenalina (Sigma, St.Louis, MO, USA); cloreto de potássio p.a.(Merck Darmstadt, RFA); cloridrato de cocaína (Uquipa, Lisboa, Portugal); carbacol (Sigma, St. Louis, MO, USA); cloridrato de ( $\pm$ )-dobutamina (Lilly, Indianapolis, IN46285, USA); dopamina (3-hydroxytyramine, Sigma, St. Louis, MO, USA); cloridrato de fentolamina

(Ciba Geigy Portuguesa Lda, Lisboa, Portugal); 21-hemisuccinato de sódio de hidrocortisona, (Sigma, St.Louis, MO, USA); (-)-isoprenalina (Sigma, St. Louis, MO, USA); Pargilina (Sigma, St. Louis, MO, USA); pentobarbital sódico (Siegfred Zofingen, Suíça); cloridrato de (+)-propranolol, (Sigma, St Louis, MO .USA); U-0521, (3,4-di-hidroxy-metilpropiofenona, Upjohn, Kalamazoo, USA; (+)-isoprenalina-<sup>3</sup>H, (8,4 Ci /mmol NEN Chemicals, Dreieich, RFA); D-(U-<sup>14</sup>C)-sorbitol, (304 mCi/mmol, NEN Chemicals, Dreieich, RFA); reagente para determinação da glicose ref: 10121 "Human" e reagente para determinação da alfa-amilase ref.10335"Human"( Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, RFA)

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

### III - RESULTADOS

## 1- Traqueia de Cobraia

Os valores apresentados correspondem a 34 experiências em que as traqueias usadas apresentaram graus de sensibilidade diferentes para as aminas simpaticomiméticas usadas.

Como podemos observar na tabela I pelos valores da  $CE_{50}$ , a preparação revelou maior sensibilidade para a isoprenalina, nos dois grupos estudados apresentando valores de  $CE_{50}$  de 10,5 e 9,1 nmol/l, seguindo-se a adrenalina com  $CE_{50}$  de 36,3 e 39,1 nmol/l. Para a dopamina e a dobutamina, a sensibilidade da preparação foi francamente menor sendo os valores de  $CE_{50}$  de 30,1 e 25,4  $\mu$ mol/l e 2,3 e 2,3  $\mu$ ml/l respectivamente.

Os inibidores dos locais de perda (U-0521 e hidrocortisona) causaram deslocamentos paralelos para a esquerda, das curvas de concentração-resposta para as quatro aminas utilizadas (fig.1 e 2).

O U-0521 potenciou 3,9 vezes a capacidade relaxante da isoprenalina e da dobutamina e de 2,2 vezes as da adrenalina e da dopamina. Por sua vez, a hidrocortisona provocou uma potenciação da acção das quatro aminas, mas de menor intensidade, pois os factores de potenciação verificados foram de 1,9 vezes para a isoprenalina, 1,8 vezes para a adrenalina e 1,5 e 1,4 vezes

para a dopamina e dobutamina respectivamente (ver tabela I).

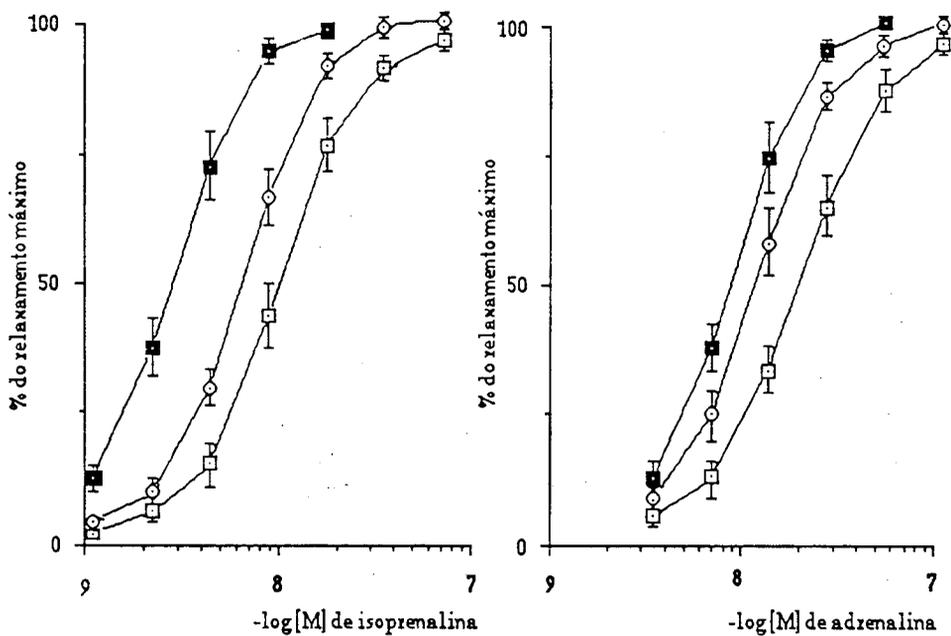


Figura 1: Curvas de concentração - resposta obtidas na traqueia de Cobaia para a isoprenalina (n=10) e para a adrenalina (n=9), na ausência (□—□) e na presença de U-0521 (■—■) ou de hidrocortisona (○—○). Média  $\pm$  erro padrão

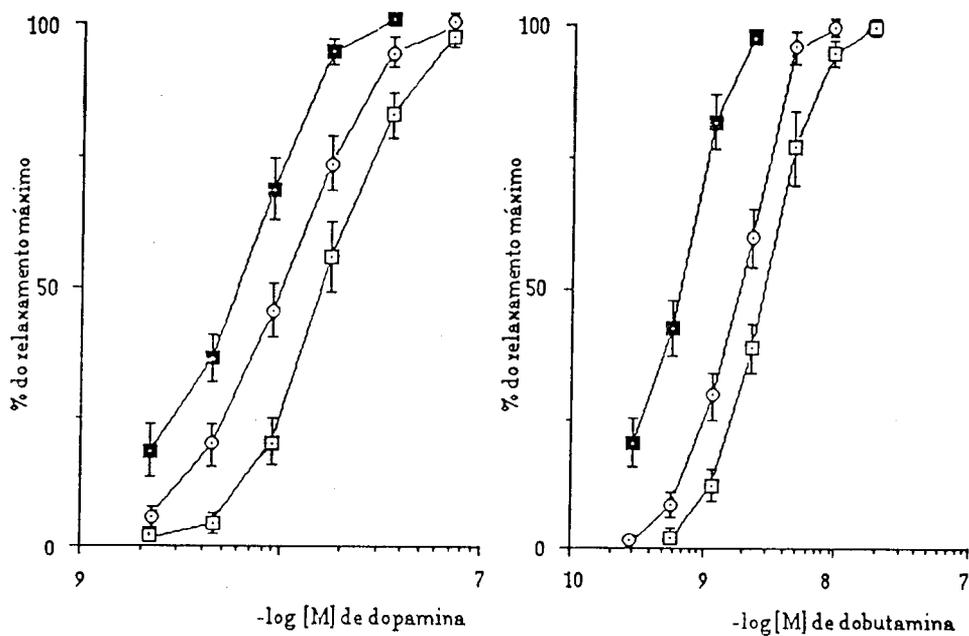


Figura 2: Curvas de concentração - resposta obtidas na traqueia de Cobaia para a dopamina (n=8) e para a dobutamina (n=7), na ausência ( □-□ ) e na presença de U-0521 ( ■-■ ) ou de hidrocortisona ( ○-○ ). Média  $\pm$  erro padrão.

Os valores da  $CE_{50}$  obtidos a partir das curvas de concentração-resposta, antes e após o bloqueio da COMT pelo U-0521 ou da inibição da captação extraneuronal pela hidrocortisona, estão representados na tabela I, bem como os factores de potenciação (  $F = CE_{50}$  na ausência do bloqueador /  $CE_{50}$  na presença do bloqueador ).

**Tabela I:** CE<sub>50</sub> para as quatro aminas simpaticomiméticas. Estes valores foram determinados na traqueia de Cobaia na ausência (controle) e na presença de 55µmol/l de U-0521 ou de 200 µmol/l de hidrocortisona. Estão representados, também, os factores da potenciação causada pelo U-0521 e pela hidrocortisona (razão entre a CE<sub>50</sub> na ausência e a CE<sub>50</sub> na presença de inibidores).

Amina	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub> (U-0521)	F	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub> (Hidroc.)	F
(-)-Isoprenalina (nmol/l) (n=10)	10,5 ( 8,5-13,0)	2,7 (2,3-3,1)	3,9 <sup>a</sup> (2,5-5,0)	9,1 (7,5-11,0)	4,7 (4,1-5,4)	1,9 <sup>e</sup> (1,72,1)
(-)-Adrenalina (nmol/l) (n=9)	36,3 (28,2- 46,9)	16,2 (10,9-25,0)	2,2 <sup>b</sup> (1,9-2,5)	39,1 (26,4-58,2)	20,9 (14,4-30,3)	1,8 <sup>f</sup> (1,7-2,1)
Dopamina (µmol/l) (n=8)	30,1 (21,2-41,6)	13,5 (8,5-21,6)	2,2 <sup>c</sup> (1,7-2,7)	25,4 (20,1-32,1)	18,5 (12,7-26,8)	1,5 <sup>g</sup> (1,3-1,7)
(+)-Dobutamina (µmol/l) (n=7)	2,3 (1,7-3,1)	0,6 (0,4-0,8)	3,9 <sup>d</sup> (3,6-4,2)	2,3 (1,8-2,9)	1,7 (1,3-2,1)	1,4 <sup>h</sup> (1,3-1,5)

Os valores das CE<sub>50</sub> estão representados pela média geométrica e limites de confiança 95%.

O teste t foi determinado para valores emparelhados. Diferenças significativas entre : <sup>a</sup> e <sup>c</sup>; <sup>b</sup> e <sup>f</sup>; <sup>c</sup> e <sup>g</sup> e entre <sup>d</sup> e <sup>h</sup> (P<0.05).

F= razão entre CE<sub>50</sub> controle e a CE<sub>50</sub> após tratamento.

n representa o número de experiências realizadas.

Pela análise dos valores obtidos, verificamos que quer a inibição da COMT, quer a inibição da captação extraneuronal provocam um aumento de sensibilidade às aminas usadas, havendo no entanto, uma maior potenciação de efeitos após bloqueio da COMT.

Surpreendente, foi o resultado obtido com a dobutamina, em que a inibição da COMT, ocasionou uma potenciação igual à obtida com a isoprenalina, (potenciação de 3,9 vezes) e que foi bastante maior do que a verificada para as restantes aminas, em que a potenciação foi de 2,2 vezes.

Já com a inibição da captação extraneuronal não se verificou nada semelhante; a isoprenalina foi a amina mais potenciada (1,9 vezes) seguida da adrenalina (1,8 vezes), da dopamina (1,5 vezes) e finalmente da dobutamina (1,4 vezes).

## 2-Útero de Rato

Os resultados apresentados na tabela II correspondem a 24 experiências. O útero de Rato mostrou ser uma preparação sensível às quatro aminas ensaiadas como podemos verificar pelos valores da  $CE_{50}$ . A isoprenalina foi a amina mais potente, sendo os valores da  $CE_{50}$  de 2,2 nmol/l para a série experimental em que foi ensaiado o efeito do U-0521, e de 2,4 nmol/l, na série em que foi testado o efeito da hidrocortisona. A segunda amina mais potente foi a adrenalina ( $CE_{50}$  de 12,0 e 14,6 nmol/l, respectivamente para a série onde foi ensaiado o efeito do U-0521 e o da hidrocortisona), seguindo-se a dobutamina ( $CE_{50}$  de 1,10 e 1,03  $\mu$ mol/l respectivamente) e a menos potente foi a dopamina ( $CE_{50}$  de 12,0 e 15,0  $\mu$ mol/l,

respectivamente) .

O tratamento da preparação com os inibidores dos locais de perda (U-0521 e hidrocortisona) produziu um deslocamento paralelo das curvas de concentração-resposta para a esquerda (fig. 3 e 4).

O tratamento com o U-0521 potenciou a dobutamina 4,2 vezes, a adrenalina de 2,4 vezes, a dopamina 2,1 vezes e a isoprenalina 2,0 vezes.

Nas preparações tratadas com a hidrocortisona a potenciação foi menor, sendo para a isoprenalina de 1,3 vezes, para a adrenalina de 1,4 vezes, para a dopamina 1,7 vezes e, finalmente, para a dobutamina 2,4 vezes (ver Tabela II)

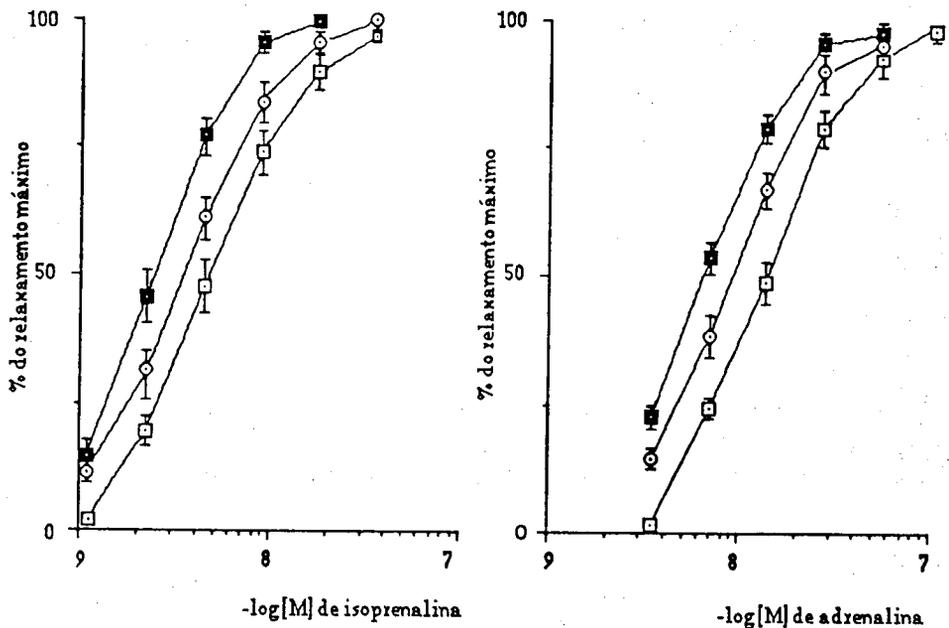


Figura 3 : Curvas de concentração-resposta obtidas no útero de Rato e produzidas pela isoprenalina (n=6) e pela adrenalina (n=6), na ausência ( □-□ ) e na presença de U-0521 ( ■-■ ) ou de hidrocortisona ( ○-○ ). Média  $\pm$  erro padrão.

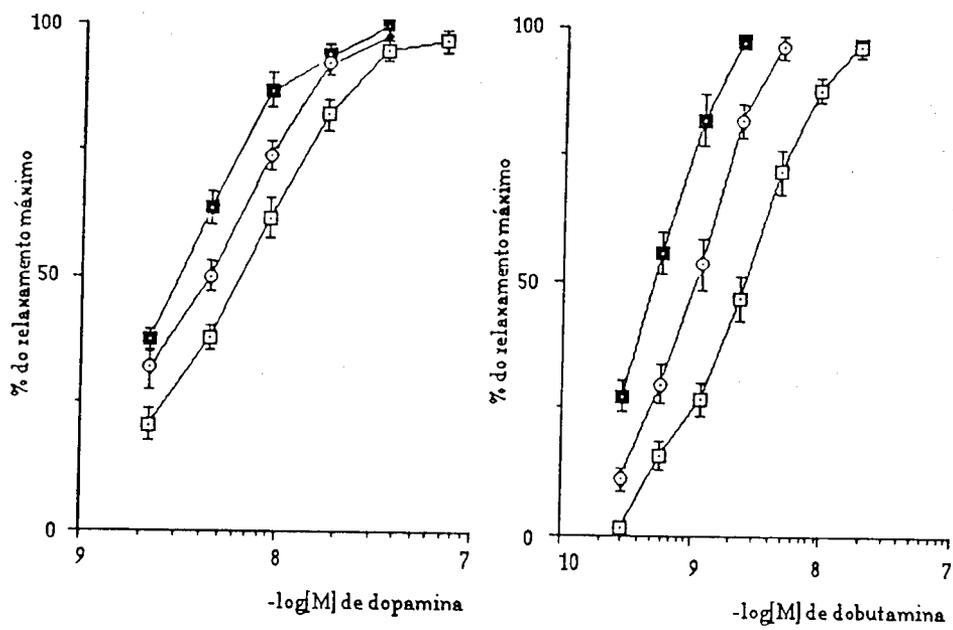


Figura 4 : Curvas de concentração - resposta obtidas no útero de Rato para a dopamina (n=6) e para a dobutamina (n=6), na ausência (□-□) e na presença de U-0521 (■-■) ou de hidrocortisona (○-○). Média  $\pm$  erro padrão.

Tabela II : CE<sub>50</sub> para as quatro aminas simpaticomiméticas. Estes valores foram determinadas no útero de Rato, na ausência (controle) e na presença de 55µmol/l de U-0521 ou 200 µmol/l de hidrocortisona. Estão também representados os factores da potenciação pelo U-0521 e pela hidrocortisona (razão entre CE<sub>50</sub> na ausência e CE<sub>50</sub> na presença de inibidores).

Amina	CE <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub> (U-0521)	F	ED <sub>50</sub>	ED <sub>50</sub> (Hidroc.)	F
(-)-Isoprenalina (nmol/l) (n=6)	2,2 (1,4-3,7)	1,1 (0,8-1,5)	2,0 <sup>a</sup> (1,4-3,3)	2,4 (1,1-4,1)	1,8 (1,1-2,8)	1,3 <sup>e</sup> (1,0-1,5)
(-)-Adrenalina (nmol/l) (n=6)	12,0 (8,8-16,2)	5,0 (3,8-6,8)	2,4 <sup>b</sup> (1,8-3,0)	14,6 (9,4-22,6)	10,4 (6,7-16,0)	1,4 <sup>f</sup> (1,2-1,6)
Dopamina (µmol/l) (n=6)	12,0 (8,5-17,2)	5,7 (3,5-9,6)	2,1 <sup>c</sup> (1,6-2,7)	15,0 (10,8-22,9)	8,8 (6,1-12,5)	1,7 <sup>g</sup> (1,5-1,9)
(±)-Dobutamina (µmol/l) (n=6)	1,10 (1,06-1,13)	0,25 (0,22-0,28)	4,2 <sup>d</sup> (3,4-4,9)	1,03 (0,99-1,07)	0,42 (0,35-0,48)	2,4 <sup>h</sup> (1,9-3,1)

Os resultados estão representados pela média geométrica e limites de confiança para 95%.

Teste t foi determinado para valores emparelhados. Diferenças significativas entre : <sup>a</sup> e <sup>e</sup>; <sup>b</sup> e <sup>f</sup>; <sup>c</sup> e <sup>g</sup> e entre <sup>d</sup> e <sup>h</sup> (P<0,05).

F= razão entre CE<sub>50</sub> (controle) e a CE<sub>50</sub> após tratamento.

n representa o número de experiências realizadas

### 3 - GLÂNDULAS SALIVARES

#### 3.1-Secreção de alfa-amílase pelas glândulas submaxilares de Ratinho, em presença de propranolol

Como já foi dito (ver métodos) estas experiências foram realizadas na presença de propranolol ( $1,7\mu\text{mol/l}$ ) usado para bloquear os receptores beta. Verificou-se que as aminas simpaticomiméticas, na presença de propranolol, na concentração indicada, ocasionou uma acentuada redução na secreção de alfa-amílase. Esta redução foi de 87% para a isoprenalina, de 86,5% para a adrenalina, de 84% para a dopamina e finalmente de 79% para a dobutamina (ver tabela III).

Qualquer uma destas reduções é altamente significativa, o que prova que a secreção de alfa-amílase induzida pelas aminas usadas é, pelo menos parcialmente mediada por receptores beta.

Tabela III : Glândula submaxilar de Ratinho: Influência do propranolol na secreção de alfa-amilase condicionada pela (-)-isoprenalina; (-)-adrenalina; dopamina e (+)-dobutamina

	Amina	Amina+Propranolol
Isoprenalina (15 nmol/l) (n=6)	915±85	118±22±*
Adrenalina (150nmol/l) (n=7)	661±142	89±22 *
Dobutamina (1µmol/l) (n=8)	532±59	112±16 *
Dopamina (3µmol/l) (n=6)	618±90	98±7 *

Concentração de alfa-amilase (U /l) libertada para o meio de incubação por acção das aminas, na ausência e na presença de 1,7 µmol/l de (+)- propranolol. Os resultados estão expressos pela média ± erro padrão.

\* Significativamente diferente do controlo ( $P < 0,05$ , ANOVA ).

n representa o número de experiências realizadas.

### 3.2-Influência do bloqueio da COMT e da inibição da captação extraneuronal na secreção de alfa-amilase induzida pelas aminas simpaticomiméticas.

Como se pode ver na tabela IV, nem o U-0521, nem a hidrocortisona produziram por si só alterações na secreção de alfa-amilase significativamente diferentes das verificadas no controlo salino.

**Tabela IV:** Glândula de Ratinho. Influência do U-0521 e da hidrocortisona na secreção espontânea de alfa-amilase

Tratamento	n	Alfa-amilase U/l (t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub> )
Salino	8	83±42
U-0521	8	118±38 <sup>ns</sup>
Hidrocortisona	8	152±74 <sup>ns</sup>

Valores de alfa-amilase produzida pela glândula submaxilar de Ratinho, na ausência e na presença de 55µmol/l de U-0521 ou de 200µmol/l de hidrocortisona. Resultados expressos pela média ± erro padrão.

n = número de experiências realizadas

ns = não significativa a diferença relativamente ao controlo salino.

Como se pode ver na Figura 5, todas as aminas produziram um aumento na secreção de alfa-amilase. As quantidades de enzima libertada para o líquido de incubação foram respectivamente 961±169 U/l para a isoprenalina, 748±143 U/l para a adrenalina, 483±86 U/l para a dobutamina e, finalmente, 635±95 U/l para a dopamina.

O bloqueio da COMT pelo U-0521 aumentou significativamente a quantidade de alfa-amilase produzida por acção das aminas. Assim, a concentração de alfa-amilase segregada por acção da isoprenalina após U-0521 foi de 2658±302 U/l, de 1717±167 U/l para a adrenalina, de 2374±244 para a dobutamina e finalmente, de 1722± 246 U/l para a dopamina.

Estas concentrações de alfa-amilase correspondem a um aumento de 4,9 vezes para a dobutamina, 2,8 vezes para a isoprenalina, 2,7 vezes para a dopamina e de 2,3 vezes para a adrenalina.

Ao contrário do U-0521, a hidrocortisona não causou qualquer modificação na secreção de alfa-amilase desencadeada pelas aminas (ver TabelaV).

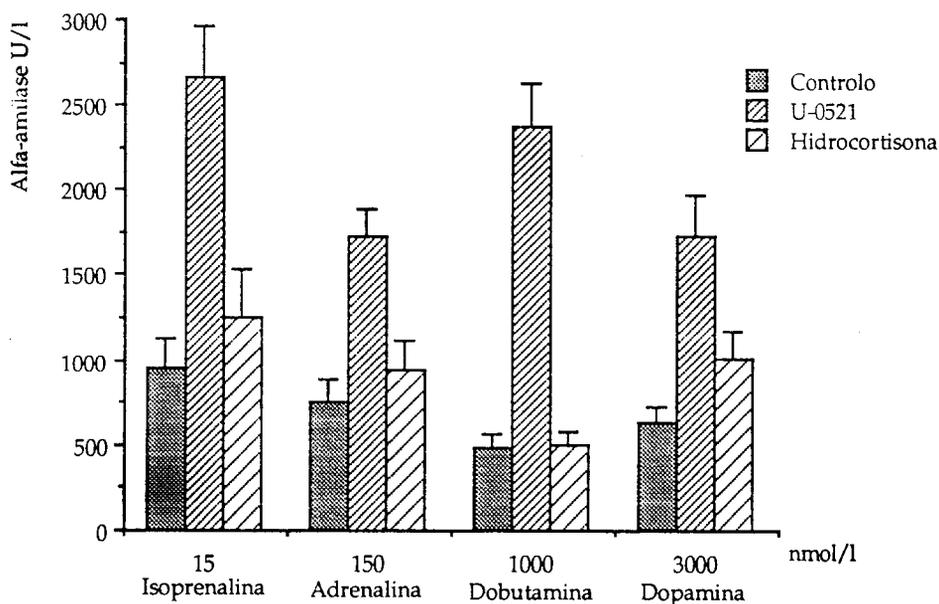


Figura 5: Influência da (-)-isoprenalina (n=8), (-)-adrenalina (n=8), dopamina (n=8) e (+)-dobutamina (n=8), na secreção de alfa-amilase pela glândula submaxilar de Ratinho na ausência (controlo) e na presença de U-0521 ou de hidrocortisona. Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  erro padrão.

**Tabela V :** Glândula submaxilar de Ratinho. Influência da inibição da captação extraneuronal (pela hidrocortisona) e da inibição da COMT (pelo U-0521), na secreção de alfa-amilase condicionada por algumas aminas simpaticomiméticas.

Aminas	Controlo	Amina+U-0521	Amina+Hidroc.
Isoprenalina(15nmol/l) (n=8)	961±169 <sup>a</sup>	2658±302 <sup>b</sup>	1247±283 <sup>c</sup>
Adrenalina(150nmol/l) (n=8)	748±134 <sup>d</sup>	1717±167 <sup>e</sup>	947±164 <sup>f</sup>
Dobutamina(1µmol/l) (n=8)	483±86 <sup>g</sup>	2374±244 <sup>h</sup>	503±77 <sup>i</sup>
Dopamina(3µmol/l) (n=8)	635±95 <sup>j</sup>	1722±246 <sup>l</sup>	1004±168 <sup>m</sup>

Resultados (U/l) expressos pela média ± erro padrão. Encontraram-se diferenças entre. <sup>a</sup> e <sup>b</sup>; <sup>d</sup> e <sup>e</sup>; <sup>g</sup> e <sup>h</sup> e entre <sup>i</sup> e <sup>l</sup> (P<0,05). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (<sup>a</sup>, <sup>d</sup>, <sup>g</sup> e <sup>i</sup>).

n = número de experiências.

#### 4 - INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA NO RATO, "IN VIVO"

##### 4.1.-Influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal na hiperglicemia induzida pela isoprenalina

Os resultados apresentados correspondem a 48 experiências (para cada experiência foi usado um animal (\*). Os animais foram distribuídos por seis grupos, ficando cada grupo com 8 animais (ver Métodos). As curvas de glicemia obtidas após infusão de soro fisiológico ou de isoprenalina, na ausência ou na presença de bloqueadores dos locais de perda (U-0521 ou hidrocortisona) estão representadas na Figura 6. Os diferentes pontos das curvas foram determinados pela diferença entre o valor basal ou de referência ( $t_0$ ) e o valor determinado em cada tempo de recolha.

Como podemos ver pela Tabela VI, a infusão dos bloqueadores dos locais de perda em estudo, nas doses usadas (41,5  $\mu\text{mol/kg}$ , de U-0521 e 20,7  $\mu\text{mol/kg}$  de hidrocortisona) não provocaram diferenças estatisticamente significativas na glicemia, quando comparados com o grupo infundido com soro fisiológico.

---

\* Foram rejeitadas as experiências em que os animais apresentavam um valor inicial de glicemia superior a 140 mg/100 ml .

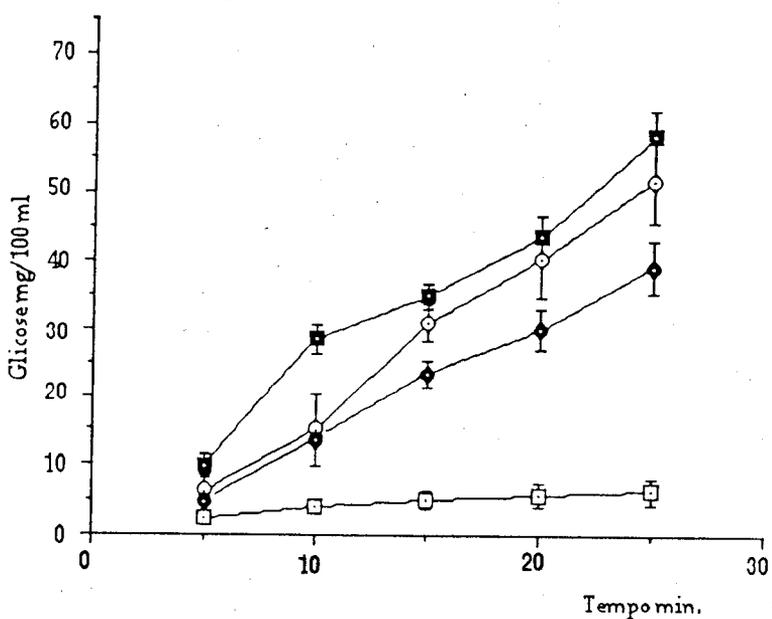


Figura 6: Curva de glicemia após infusão de soro fisiológico (controle) (□-□) e de isoprenalina (0,36 nmol/kg/min.), na ausência (◆-◆) e na presença de U-0521 (■-■) ou de hidrocortisona (○-○).

Os valores de glicemia estão representados pela média  $\pm$  erro padrão.

O efeito hiperglicemiante induzido pela isoprenalina (1,8 nmol/kg) foi significativamente diferente do efeito produzido pela infusão de soro fisiológico (controle) a partir de 10 minutos de infusão ( $t_{10}$ ), e para todos os tempos subsequentes: 15, 20 e 25 minutos (ver Tabela VI).

Tabela VI: Glicemia no Rato (mg/100ml), após infusão de soro fisiológico, (na ausência e na presença de U-0521 ou de hidrocortisona) ou de isoprenalina ( 0,36 nmol/kg/min.).

Tratamento	Tempo após início de infusão ( min.)				
	5	10	15	20	25
Salino/Salino n=8	2,2±0,5	4,1±0,5	4,9±0,4	5,6±0,6	6,4±0,7
U-0521/salino n=8	2,4±0,7	4,0±0,5	4,8±0,8	4,3±0,6	5,4±0,6
Hidrocort./Salino n=8	3,3±0,7	4,5±0,3	5,4±0,3	7,1±1,1	9,4±1,3
Salino / Iso n=8	4,9±0,8	13,8±1,3 *	23,4±1,3 *	29,8±2,4 *	39,4±3,5 *

Os resultados estão expressos pela média  $\pm$  erro padrão. \* Significativamente diferente do controle salino (  $P < 0,05$ , ANOVA).

n= número de experiências.

O U-0521, produziu uma potenciação significativa da hiperglicemia induzida pela isoprenalina. Essa potenciação começa a detectar-se ao fim de 5 minutos mantendo-se até aos 25 minutos de infusão. Os valores de glicemia condicionados pela infusão de isoprenalina na presença de U-0521 estão representados na TabelaVII.

Nos animais que receberam hidrocortisona, a hiperglicemia condicionada pela isoprenalina, foi também potenciada, mas esta potenciação só foi significativa a partir de 15 minutos de infusão.

O efeito potenciador do U-0521 sobre a hiperglicemia causada pela isoprenalina foi significativamente maior do que o efeito potenciador da hidrocortisona sobre a hiperglicemia causada por essa mesma amina, mas só aos 10 minutos de infusão ( $P < 0,01$ ).

O facto de não ser significativa a diferença entre o efeito potenciador do U-0521 e o da hidrocortisona para os tempos diferentes dos 10 minutos, deve-se provavelmente, ao facto da hidrocortisona promover por si mesma uma hiperglicemia que, até um certo limite aumentava com o tempo (experiências preliminares).

Tabela VII : Glicemia no Rato. Estão representados os valores de glicose (mg/100ml), a tempos diferentes, após infusão de isoprenalina (0,36nmol/kg/min.), na ausência e na presença de U-0521 ou de hidrocortisona.

Tratamento	Tempo após início de infusão ( min.)				
	5	10	15	20	25
Salino / Isoprenalina n=8	4,9±0,8	13,8±1,3	23,4±1,3	29,8±2,4	39,4±3,5
U-0521 / Isoprenalina n=8	9,8±1,0	28,5±1,6*	34,8±1,6*	39,8±2,7*	58,2±3,3*
Hidrocort. / Isoprenalina n=8	6,5±1,0	15,0±1,8	33,8±1,8*	47,2±5,7*	52,2±4,7*

Resultados expressos pela média ± erro padrão. \* Significativamente diferente do controlo respectivo, ( $P < 0,05$ ). Além disso, o valor verificado aos 10 minutos para a isoprenalina após U-0521 é significativamente diferente do valor verificado aos 10 minutos para isoprenalina após hidrocortisona ( $P < 0,01$  ANOVA ).

n = número de experiências

#### 4.2.-Influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal, sobre a hiperglicemia induzida pela adrenalina

Os resultados apresentados correspondem a 48 experiências (para cada experiência foi usado um animal (\*)). Os animais foram distribuídos por 6 grupos, com 8 animais cada. As curvas de glicemia obtidas após infusão de soro fisiológico ou de adrenalina, na ausência ou na presença de bloqueadores dos locais de perda (41,5  $\mu\text{mol/kg}$  de U-0521 ou 20,7  $\mu\text{mol/kg}$  de hidrocortisona) estão representadas na Figura 7. Da mesma forma que para a isoprenalina, os diferentes pontos das curvas foram determinados pela diferença entre o valor basal ou de referência ( $t_0$ ) e os valores determinados para os diferentes tempos de amostragem.

Como podemos ver pela Tabela VIII, a infusão dos bloqueadores dos locais de perda em estudo, na doses usadas (41,5  $\mu\text{mol/kg}$ , de U-0521 e 20,7  $\mu\text{mol/kg}$  de hidrocortisona) não provocaram diferenças estatisticamente significativas na glicemia, quando comparados com o grupo infundido com soro fisiológico.

O efeito hiperglicemiante induzido pela adrenalina foi significativamente diferente do efeito produzido por infusão de soro fisiológico (controle). Essa diferença só se tornou significativa a partir de 10 minutos de infusão ( $t_{10}$ ), correspondente a uma dose de 5,5 nmol/kg de adrenalina. Encontraram-se diferenças significativas para as doses seguintes até ao fim do período de infusão de 25 minutos (ver tabela XIII).

---

\* Foram rejeitados os resultados de animais que apresentavam um valor glicêmico inicial ( $t$ ) superior a 140 mg/100ml .

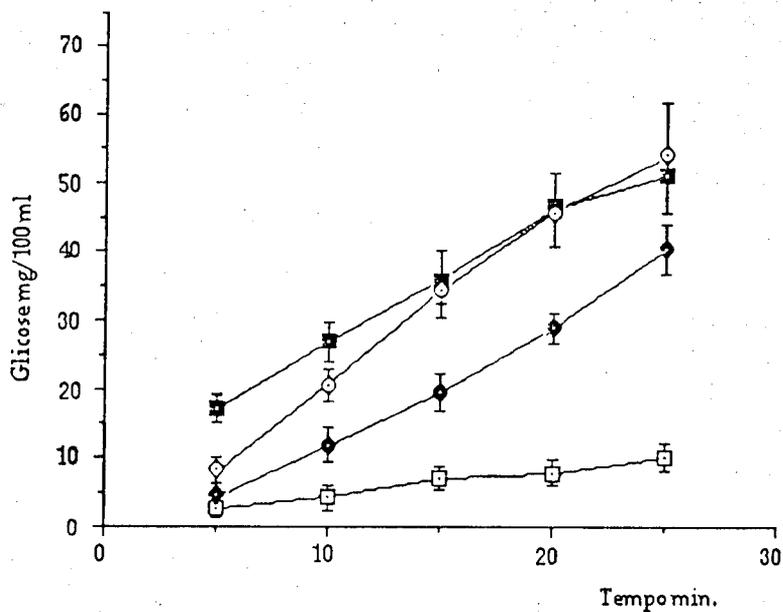


Figura 7 : Curva de glicemia após infusão de soro fisiológico ( controle) ( □-□ ) e de adrenalina (0,55 nmol/kg/min.), na ausência ( ●-● ) e na presença de U-0521 ( ■-■ ) ou de hidrocortisona ( ○-○ ).

Os valores de glicemia estão representados pela média  $\pm$  erro padrão.

Da mesma forma que para a isoprenalina, o U-0521 produziu uma potenciação significativa da hiperglicemia induzida pela adrenalina. Essa potenciação evidencia-se no entanto mais cedo do que para a isoprenalina, verificando-se já a partir dos 5 minutos e mantendo-se até aos 25 minutos de infusão. Nos animais que receberam hidrocortisona, a hiperglicemia causada pela adrenalina, foi também potenciada a partir dos 5 minutos ( $t_5$ ).

**Tabela VIII : Glicemia no Rato.** Estão representados os valores de glicose (mg/100ml) a tempos diferentes, após infusão de soro fisiológico (na ausência e na presença de U-0521 ou hidrocortisona), ou de adrenalina (0,55nmol/kg/min)

Tratamento	Tempo após início de infusão (min.)				
	5	10	15	20	25
Salino n=8	2,7±0,7	4,5±0,5	7,1±0,5	7,8±0,9	10,0±0,9
U-0521 /Salino n=8	1,8±0,7	3,3±0,4	4,6±0,5	4,8±0,5	5,0±0,6
Hidrocort. /Salino n=8	3,1±0,7	4,8±0,3	6,1±0,6	9,1±0,6	11,6±0,9
Adrenalina /Salino n=8	4,3±0,9	11,8±0,6*	19,6±1,7*	28,8±2,2*	40,2±3,6*

Resultados expressos pela média ± erro padrão. \* Significativamente diferente do controle salino (P<0,05).

n = número de experiências

Aos 5 minutos de infusão o efeito potenciador do U-0521 sobre a hiperglicemia causada pela adrenalina, foi significativamente maior do que o efeito potenciador da hiperglicemia causado pela hidrocortisona (P<0,01).

**Tabela IX : Glicemia no Rato.** Na tabela estão representados os valores de glicose (mg/100 ml) a tempos diferentes, após infusão de adrenalina (0,55 nmol/kg/min.), na ausência e na presença de U-0521 ou de hidrocortisona.

Tratamento	Tempo após início de infusão (min.)				
	5	10	15	20	25
Salino/Adrenalina n=8	4,3±0,9	11,8±0,6	19,6±1,7	28,8±2,2	40,2±3,6
U-0521/Adrenalina n=8	17,1±1,4 *	26,9±1,8 *	36,1±1,8 *	46,2±4,0 *	51,2±2,7 *
Hidrocort. /Adrenalina n=8	8,1±1,1	20,7±2,2 *	34,2±4,1 *	46,1±5,5 *	53,7±7,5 *

Resultados expressos pela média  $\pm$  erro padrão. Significativamente diferente do controle respectivo ( $P < 0,05$ ). Além disso, o valor verificado aos 5 minutos para a adrenalina, após U-0521, é significativamente diferente do valor verificado aos 5 minutos para adrenalina após hidrocortisona ( $P < 0,01$  ANOVA ).

n = número de experiências.

## 5 - METABOLIZAÇÃO DA ISOPRENALINA MARCADA (Iso-<sup>3</sup>H)

### 5.1- Determinação da concentração inibitória 50 % (CI<sub>50</sub>)

A incubação de anéis de traqueia de Cobaia e de tecido uterino de Rato, com Iso-<sup>3</sup>H, na presença de concentrações crescentes de aminas frias ( (-)-isoprenalina, (-)-adrenalina, dopamina e (+)-dobutamina) permitiu a determinação das concentrações necessárias para inibir em 50% a formação de metabolitos O-metilados da isoprenalina.

Na traqueia de Cobaia e para cada uma das quatro aminas, usaram-se concentrações de 1 ; 3 ; 9 ; 27 e 81 µmol/l. Em presença destas aminas e nestas concentrações, houve uma redução na produção de metabolitos O-metilados (OMI-<sup>3</sup>H), dependente da dose.

Como podemos ver, na Tabela X, estão representados as concentrações inibitórias 50%, para as quatro aminas. As CI<sub>50</sub> determinadas foram: para a isoprenalina 5,8 µmol/l, para a dobutamina 5,1 µmol/l, para a adrenalina 11,6 µmol/l e para a dopamina 44,1 µmol/l .

Tabela X: CI<sub>50</sub> da (-)-isoprenalina, (-)-adrenalina, dopamina e (+)-dobutamina na traqueia de Cobaia.

Amina	CI <sub>50</sub> (μmol/l)	n
Isoprenalina	5,8±1,0	3
Adrenalina	11,6±0,3	3
Dopamina	44,1±6,1	3
Dobutamina	5,5±0,2	3

Os valores de CI<sub>50</sub> estão representados pela média ± o erro padrão.

n = número de experiências realizadas.

No músculo uterino de Rato, as concentrações de aminas frias usadas foram superiores às utilizadas para a determinação dos valores de CI<sub>50</sub> na traqueia de Cobaia. Para a isoprenalina, adrenalina e dopamina usaram-se as concentrações de 9; 27; 81; e 243 μmol/l e para a dobutamina usaram-se as concentrações mais baixas 1; 3; 9 e 27 μmol/l.

Para a isoprenalina obteve-se um valor de CI<sub>50</sub> de 70,6 μmol/l, de 45,8 μmol/l para a adrenalina, de 49,3 μmol/l para a dopamina. Para a dobutamina o valor de CI<sub>50</sub> obtido foi de 9,7 μmol/l (ver tabela XI).

Tabela XI: CI<sub>50</sub> da (-)-isoprenalina, (-)-adrenalina, dopamina e (+)-dobutamina no útero de Rato.

Amina	CI <sub>50</sub> (μmol/l)	n
Isoprenalina	70±16,8	3
Adrenalina	45,8±9,9	3
Dopamina	49,3±5,5	3
Dobutamina	9,7±1,3	3

Os valores de CI<sub>50</sub> estão representados pela média ± o erro padrão.

n = número de experiências realizadas.

Os resultados obtidos com estas experiências, foram de certa forma surpreendentes, pois revelaram um comportamento diferente da O-metilação em relação à isoprenalina nos dois tecidos utilizados. O valor de CI<sub>50</sub> obtido para a isoprenalina na traqueia de Cobaia é substancialmente mais baixo (5,8) do que o obtido no útero de Rato (70,8). Para a dobutamina encontramos nas duas situações um valor baixo de CI<sub>50</sub>.

## 5.2 - Formação de OMI-<sup>3</sup>H a partir de Iso-<sup>3</sup>H

Nestas experiências, a incubação dos tecidos (traqueia de Cobaia e útero de Rato) foi feita com 0,1μmol/l de Iso-<sup>3</sup>H durante 30 minutos. A quantidade de OMI-<sup>3</sup>H formado a partir de Iso-<sup>3</sup>H, mostra que, na traqueia a formação de OMI-<sup>3</sup>H foi de 428±76,5 pmol/g/30 min., enquanto que a formação de OMI-<sup>3</sup>H pelo útero de Rato foi de 559,9±56 pmol/g/30 min. .

A inibição da COMT pelo U-0521 (55μmol/l) na traqueia de Cobaia

reduziu a produção de OMI-<sup>3</sup>H, que baixou para 53,5±37 pmol/g/30min. . No tecido uterino a inibição da COMT reduziu também a produção de derivados O-metilados, que baixou para 70,0±21 pmol/g/30min. de OMI-<sup>3</sup>H.

Após tratamento pela hidrocortisona (200µmol/l) a traqueia de Cobaia produziu 249,5±52 pmol/g/30min. e o útero de Rato 491,2±34,4 pmol/g/30min de OMI-<sup>3</sup>H. (ver Tabela XII).

O tratamento pelo U-0521 reduziu em 87,5% a produção de OMI-<sup>3</sup>H quer na traqueia de Cobaia quer no útero de Rato. O efeito da hidrocortisona nos dois tecidos foi menor, já que a redução na produção de OMI-<sup>3</sup>H foi de 41,8% para a traqueia de Cobaia e de apenas 12,2% para o útero de Rato (ver Tabelas XII e XIII).

Quanto à acumulação de Iso-<sup>3</sup>H nos tecidos, o comportamento das duas preparações foi também diferente. Verificamos que a acumulação de Iso-<sup>3</sup>H na traqueia de Cobaia na situação de controlo foi de 152,2±37,4 pmol/g/30 min. e em presença de U-0521 foi de 351,4±48,9 pmol/g/30 min, enquanto que na presença da hidrocortisona se acumularam 161,0±41,2 pmol/g/30 min.. No tecido uterino de Rato não há praticamente acumulação de Iso-<sup>3</sup>H na situação de controlo (1,3pmol/g/30 min.), o que pode significar uma intensa O-metilação neste tecido; na presença de U-0521 já se acumularam 192,4 pmol/g/30 min. . Na presença de hidrocortisona a acumulação de Iso-<sup>3</sup>H não foi significativamente diferente do controlo; acumularam-se apenas 2,2 pmol/g/30 min. (ver Tabelas XII e XIII).

Tabela XII: Metabolização e acumulação de Iso-<sup>3</sup>H (0,1μmol/) após incubação de 30 minutos o com anéis de traqueia de Cobaia na ausência (controle) e na presença de U-0521 (55μmol/l) ou de hidrocortisona (200μmol/l).

Traqueia de Cobaia			
Tratamento	n	Metabolitos <sup>3</sup> H totais (OMI)	Iso- <sup>3</sup> H acumulada no tecido
Controle	6	428 ±76,5	152,7±37,4
U-0521 (55μmol/l)	6	53,5± 37 *	351,4±48,9*
Hidrocort. (200μmol/l)	6	249,5± 52 *	161,1±41,2

Os resultados estão expressos em pmol/g/30 min e representam a média±erro padrão.

n = número de experiências.

\*Valores significativamente diferentes do controle (t emparelhado); P<0,01.

**Tabela XIII:** Metabolização e acumulação de Iso-<sup>3</sup>H (0,1μmol/l) durante um período de 30 minutos de incubação de fragmentos de tecido uterino de Rato na ausência (controle) e na presença de U-0521 (55μmol/l) ou de hidrocortisona (200μmol/l).

Útero de Rato			
Tratamento	n	Metabolitos <sup>3</sup> H totais (OMI)	Iso- <sup>3</sup> H acumulada no tecido
Controle	5	559,9±56,0	1,3±0,2
U-0521 (55μmol/l)	5	70,0± 21,0 *	192,4±49,6 *
Hidrocort. (200μmol/l)	5	491,2±34,4	2,2± 0,5

Os resultados estão expressos em pmol/g/30 min e representam a média±erro padrão.

n = número de experiências.

\* Valores significativamente diferentes do controle (t emparelhado) ; P<0,05

#### IV- DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O objectivo das experiências realizadas, foi o de analisar o papel do sistema O-metilante das estruturas extraneuronais, na inactivação de agonistas simpaticomiméticos, em tecidos em que as respostas a esses agonistas, são mediadas predominantemente por uma população de adrenoceptores beta<sub>2</sub>. A análise da importância do sistema O-metilante foi determinada mediante a comparação da sensibilidade desses tecidos a essas aminas antes e depois do bloqueio desse sistema O-metilante, que funciona como um local de perda.

#### **Potência das aminas simpaticomiméticas**

As experiências realizadas na traqueia de Cobaia e no útero de Rato, permitiram-nos verificar que as aminas utilizadas tem potências muito diferentes. Em ambos os órgãos, os valores de CE<sub>50</sub> estão compreendidos entre 1nmol/l para a (-)-isoprenalina e 3µmol/l para a dopamina.

É de referir no entanto, que a ordem de potência das quatro aminas foi idêntica, no útero de Rato, e na traqueia de Cobaia, sendo a (-)-isoprenalina a amina mais potente em ambos os tecidos, (valor de CE<sub>50</sub> mais baixa),

vindo logo a seguir, a (-)-adrenalina, depois a (+)-dobutamina e por fim a dopamina.

Nas experiências realizadas com glândulas submaxilares de Ratinho, as concentrações eficazes mínimas para as quatro aminas utilizadas estão compreendidas entre 15nmol/l para a (-)-isoprenalina e 3µmol/l para a dopamina. Também com esta preparação, a ordem de potência das quatro aminas foi igual à obtida nas experiências com a traqueia de Cobaia e útero de Rato.

Dado o tipo de receptores envolvidos nas respostas das preparações usadas, esta era a ordem de potência esperada, na medida em que foi esta a ordem de potência verificada por outros autores noutros tecidos (Trendelenburg *et al.*, 1971; Paiva e Guimarães, 1976; Guimarães e Paiva, 1977; Goldie *et al.*, 1982; Foster *et al.*, 1983; O'Donnell e Wanstall, 1983) na traqueia e no útero (Levy e Tozzi, 1963; O'Donnell *et al.*, 1978; Ariëns, 1981; Digges, 1982; Carswell e Nahorski, 1983; Cheng e Woodward, 1984) e nas glândulas salivares (Leslie *et al.*, 1976; Carlsöö *et al.*, 1978; Peusner *et al.*, 1979).

### Potenciação dos efeitos das aminas após bloqueio dos locais de perda

Na traqueia de Cobaia e útero de Rato verificamos que, quer a inibição da COMT, quer a inibição da captação extraneuronal, provocaram potenciação dos efeitos das quatro aminas simpaticomiméticas. Além disso, em ambos os tecidos, a inibição da COMT pelo U-0521 causou uma potenciação dos efeitos de todas as aminas maior do que a provocada pela inibição da captação extraneuronal

No entanto e surpreendente, foi o facto de o grau de potenciação dos efeitos das quatro aminas ter uma ordem diferente nas duas preparações.

A ordem dos valores da potenciação observada para as diferentes aminas após bloqueio da COMT na traqueia de Cobaia foi a seguinte: isoprenalina (3,9 vezes) = dobutamina (3,9 vezes) > adrenalina (2,2 vezes) = dopamina (2,2 vezes). Por sua vez no útero de Rato, a inibição da COMT originou uma ordem de valores de potenciação de efeitos claramente diferente da anterior, sendo a dobutamina a amina mais potenciada (4,2 vezes), seguindo-se a adrenalina (2,4 vezes), dopamina (2,1 vezes) e por fim surpreendentemente a isoprenalina (2,0 vezes).

Diferente foi também o comportamento das duas preparações face à hidrocortisona, verificando-se também, uma diferente ordem dos valores de potenciação na traqueia de Cobaia e útero de Rato. Assim, para a traqueia de Cobaia, a maior potenciação foi verificada com a isoprenalina (1,9 vezes), seguindo-se a adrenalina (1,8 vezes), a dopamina (1,5 vezes) e por último a dobutamina (1,4 vezes). No útero de Rato, também se verificou uma diferente ordem de potenciação na presença de hidrocortisona, sendo nesta situação, verificada a maior potenciação para a dobutamina (2,4 vezes), seguindo-se a dopamina (1,7 vezes), a adrenalina (1,4 vezes) e por último a isoprenalina (1,3 vezes).

A potenciação dos efeitos provocados pela inibição da COMT, que foi maior do que a provocada pela inibição da captação extraneuronal, era um facto esperado, pois tem sido verificado por diversos autores, em trabalhos realizados noutras preparações como a membrana nictitante de Gato (Graefe e Trendelenburg, 1974), a veia safena de Cão (Guimarães *et al.*, 1975; Azevedo e Osswald, 1976; Paiva e Guimarães, 1980); a artéria coronária de Gatinho (Cornish e Goldie, 1980); aorta de Coelho (Kalsner, 1969; Branco *et al.*, 1981); o coração de Rato (Magaribuchi *et al.*, 1987). É de referir, que Paiva e Guimarães (1976) obtiveram uma maior potenciação dos efeitos provocados pelas isoprenalina (4,2 vezes) e adrenalina (2,6 vezes), na traqueia de Cobaia após tratamento com hidrocortisona, enquanto que pelos nossos resultados foi obtida uma potenciação mais baixa. Isto pode ser devido às diferentes condições experimentais em que se realizaram as

experiências, nomeadamente em relação ao tónus da preparação, condições experimentais, que de algum modo podem influenciar os resultados (Iakovidis *et al.*, 1980; O'Donnell e Wanstal, 1980; Karlsson e Persson, 1981). A temperatura de incubação ou modificações iónicas podem também influenciar os resultados, como foi verificado por Anning *et al.* (1978) na traqueia e útero de Cobaia. Estes autores não obtiveram qualquer potenciação dos efeitos relaxantes da isoprenalina por bloqueio da captação extraneuronal (pela fenoxibenzamina ou pela metanefrina) em experiências funcionais no tecido uterino de Cobaia, quando as experiências foram realizadas a 27°C em solução de Krebs ou solução de Jalon.

Os resultados obtidos na traqueia da Cobaia e no útero de Rato, foram confirmados nas glândulas submaxilares de Ratinho, um tecido que tem características funcionais e histológicas perfeitamente distintas dos dois tecidos referidos anteriormente.

A realização de experiências prévias com as glândulas submaxilares de Rato e de Ratinho, permitiram-nos verificar que as glândulas das duas espécies apresentavam um comportamento idêntico, quanto à libertação para o meio de incubação (por acção dos amins simpaticomiméticas) de alfa-amílase. Em experiências realizadas posteriormente, confirmou-se também o envolvimento dos receptores beta na secreção de alfa-amílase, demonstrado pelos resultados obtidos na presença de propranolol, (ver Resultados) o que está de acordo com o verificado nas glândulas submaxilares (Leslie *et al.*, 1976) e parótidas de Rato (Peusner *et al.*, 1979).

Os resultados obtidos nesta preparação mostraram que a inibição da COMT, nas glândulas submaxilares de Ratinho, provoca um grande potenciação dos efeitos das amins, demonstrada pela elevada concentração de alfa-amílase segregada para o meio de incubação, contrariamente ao verificado nas experiências realizadas em presença do inibidor da captação extraneuronal (hidrocortisona) que não produziu aumentos de secreção da alfa-amílase significativamente diferentes do controlo.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos nas glândulas submaxilares de Rato, que revelaram uma grande capacidade O-metilante de catecolaminas (Almgren e Jonason, 1971; Major *et al.*, 1978). Almgren e Jonason (1973), em ensaios preliminares "in vivo" com as glândulas submaxilares de Rato, não encontraram uma potenciação dos efeitos da noradrenalina (secreção de saliva) após bloqueio da captação extraneuronal pela hidrocortisona. Contudo, quando usaram a cortexona como inibidor da captação extraneuronal, verificaram uma potenciação dos efeitos. Segundo estes mesmos autores a diferença de actividade dos dois inibidores da captação extraneuronal dever-se-ia ao facto da cortexona ser segregada pelo Rato, ao contrário do verificado com a hidrocortisona que não é segregada pelo Rato.

Numa abordagem experimental diferente, submetemos preparações de traqueia de Cobaia e de útero de Rato a experiências de incubação com isoprenalina tritiada (Iso-<sup>3</sup>H) (que proporcionam um método directo de avaliação dos metabolitos formados e da quantidade de amina intacta acumulada no tecido até um dado momento) em presença de um bloqueador da captação extraneuronal e do inibidor da COMT.

Também nas experiências realizadas com Iso-<sup>3</sup>H, nas quais determinamos a influência da inibição da COMT e da inibição da captação extraneuronal, na produção de OMI-<sup>3</sup>H, verificamos que o comportamento da traqueia de Cobaia e útero de Rato foram diferentes. Assim, a redução na produção de OMI-<sup>3</sup>H foi idêntica para os dois tecidos após tratamento com o U-0521, havendo uma redução de 87,5% nessa produção. Esta redução, é no entanto manifestamente diferente da provocada pela hidrocortisona, já que esta substância reduziu em cerca de 50% a produção de OMI-<sup>3</sup>H na traqueia de Cobaia e apenas em cerca de 12% a produção desse metabolito no útero de Rato.

Os nossos resultados mostram assim, um comportamento diferente do

sistema O-metilante, que varia de tecido para tecido quanto à sua susceptibilidade perante os inibidores.

A existência de um sistema O-metilante "resistente" à hidrocortisona, foi verificada também por outros autores em diferentes preparações, como a membrana nictitante de Gato (Graefe e Trendelenburg, 1974), a veia safena de Cão (Guimarães *et al.*, 1975; Azevedo e Osswald, 1976, Paiva e Guimarães, 1980); a artéria coronária de Gatinho (Cornish e Goldie, 1980); aorta de Coelho (Branco *et al.*, 1981); o coração de Rato (Magaribuchi *et al.*, 1987).

Garland *et al.* (1981) na traqueia de Cobaia, verificaram uma redução da produção de OMI-<sup>3</sup>H nas preparações tratadas com corticosterona (1mmol/l) de 46% e uma inibição total da produção de OMI-<sup>3</sup>H, após tratamento com o U-0521 (100µmol/l). Também Broadley e Paton (1990) encontraram um diferente comportamento dos tecidos estudados (traqueia, músculos papilares, aurícula esquerda e pulmão de Cobaia) em presença do U-0521 e de metanefrina, concluindo que existem dois compartimentos O-metilantes, sendo apenas um deles sensível à metanefrina. De acordo com os nossos resultados estão também os obtidos por Azevedo e Osswald (1976) na veia safena de Cão em que o U-0521 inibiu fortemente a O-metilação de Iso-<sup>3</sup>H e a cortexona exerceu um efeito inibitório menor. No coração de Rato por sua vez a corticosterona inibe completamente a formação de OMI (Uhlig *et al.*, 1974).

No caso dos nossos resultados, é fácil verificar a existência de um diferente comportamento das preparações em face das diferentes aminas, relativamente à influência causada pelos inibidores dos locais de perda. Em primeiro lugar, verificou-se sempre uma maior e mais rápida potenciação dos efeitos (relaxamento na traqueia e no útero e aumento da secreção de alfa-amílase pelas glândulas submaxilares) para as quatro aminas na

presença do inibidor da COMT (U-0521), do que em presença do inibidor da captação extraneuronal (hidrocortisona). Além disso, nas experiências em que se usou a Iso-<sup>3</sup>H, a inibição da COMT produziu também, uma redução na produção de OMI-<sup>3</sup>H maior do que a produzida pela inibição da captação extraneuronal. Em segundo lugar constatou-se uma diferente ordem para os valores da potenciação dos efeitos (em presença dos inibidores dos locais de perda) para as aminas em estudo nas três preparações.

Estes resultados mostram que a inibição dos locais de perda, influencia diferentemente as respostas às aminas simpaticomiméticas, que são substrato desses locais de perda.

Entende-se como local de perda para agonistas que são seu substrato, qualquer mecanismo que reduza o número de moléculas activas do agonista na biofase. Se este local de perda é capaz de gerar um gradiente de concentração entre o meio de incubação e o espaço extracelular, então a inibição desse local origina um aumento de moléculas activas do agonista na biofase, surgindo uma potenciação dos efeitos desse agonista (Trendelenburg, 1963; 1966; 1972; 1978; 1980;1986 Trendelenburg e Graefe, 1975; Guimarães e Trendelenburg, 1985; Guimarães *et al.*, 1985;

O sistema de O-metilação (constituído por um primeiro passo de captação e um segundo de O-metilação) é um local de perda na medida em que reduz o número de moléculas do agonista na biofase. Qualquer um dos mecanismos envolvidos neste processo (captação e O-metilação) está caracterizado cineticamente ( Kurahashi *et al.*, 1980; Trendelenburg, 1980; Trendelenburg, 1984b), e pode ser inibido selectivamente (Guimarães *et al.*, 1985; Guimarães e Trendelenburg, 1985). Assim, como o bloqueio da COMT causa um aumento de sensibilidade às aminas substrato da COMT, também a inibição da captação extraneuronal, primeiro processo

daquele sistema, causa aumento da sensibilidade às aminas que são substrato dessa captação (Kalsner, 1969; Kaumann, 1972; Foster, *et al.* 1983; O'Donnell e Wanstall, 1983). Os aumentos de sensibilidade obtidos por acção do bloqueio dos dois passos do sistema não são aditivos (Kalsner, 1969; Levin e Furchgott, 1970; Kaumann, 1972). Da inibição dos referidos locais, resulta uma potenciação dos efeitos dos agonistas que são substrato desse local de perda, mas, só se a sensibilidade dos tecidos a essas aminas é alta (Kaumann, 1970; Levin e Furchgott, 1970; Trendelenburg *et al.* 1971).

É sabido que, se a sensibilidade da preparação para o agonista é baixa, a inibição dos referidos locais de perda não causa ou causa apenas uma pequena potenciação dos efeitos, verificando-se o contrário quando a sensibilidade dos tecidos para a amina é alta. Isto é devido ao facto do "carrier" para o transporte transmembranar ou a actividade da enzima estarem já saturados ou perto da saturação quando há necessidade de usar grandes concentrações de agonistas para produzir efeitos (sensibilidade baixa). O mesmo é dizer que só há um aumento de sensibilidade a um agonista por inibição de um local de perda, quando o Km do local de perda for superior à CE<sub>50</sub> do agonista. Se a CE<sub>50</sub> do agonista for muito mais elevado do que o Km (baixa eficácia do agonista) não há aumento de sensibilidade ao agonista por inibição desse local de perda. Verifica-se assim, que a relação "Km do local de perda/CE<sub>50</sub> do agonista" reflete o grau de saturação do local de perda (Guimarães e Paiva, 1984; Paiva e Guimarães, 1984). Guimarães *et al.*(1985) confirmaram (em diferentes preparações, diferentes agonistas e envolvendo diferentes locais de perda) a hipótese de que o grau de potenciação obtido para um agonista, causado pela inibição do local de perda para esse agonista, depende da relação "Km/CE<sub>50</sub>". De facto, verificou-se que, para valores da relação "Km/CE<sub>50</sub>" superiores a 10, a inibição do local de perda provocava a máxima potenciação dos efeitos. Com valores de relação compreendidos entre 0,1 e 10, a potenciação obtida era sub-máxima. Nas situações em que o valor da referida relação era inferior a 0,1, a inibição do local de perda não provocava qualquer

potenciação dos efeitos. Na medida em que esta relação reflete o grau de saturação do local de perda, iremos mais à frente analisar os nossos resultados com base nesta relação

Segundo Trendelenburg (1984), quando a enzima intracelular é inibida, o funcionamento do sistema O-metilante muda de um "sistema de metabolização irreversível" para um "sistema de acumulação reversível". Como a captação extraneuronal fica funcionante, as células extraneuronais acumulam amina intacta no espaço intracelular. Poder-se-á dar então, o efluxo da amina intacta do espaço intracelular (onde se acumulou), para o espaço extracelular, activando posteriormente os receptores e originando assim, uma hipersensibilidade às aminas. Este tipo de sensibilização secundária, ou "secondary sensitization" descrita por Furchgott e Garcia (1968) desenvolve-se lentamente e origina mais um prolongamento da duração do efeito, do que uma potenciação rápida. No entanto, no presente trabalho, verificamos um aumento rápido nas respostas às aminas simpaticomiméticas após inibição da COMT, aumento que não pode ser completamente explicado pelo modelo proposto por Trendelenburg (1984). Se uma molécula tivesse de ser captada, tivesse de entrar para o espaço intracelular e tivesse de sair de novo, para o espaço extracelular por um processo activo (como parece ser a travessia da membrana celular das células que constituem o sistema extraneuronal (Trendelenburg, 1985)), nunca a potenciação poderia ser tão rápida.

Uma resposta deste tipo pode ser explicada pela presença de uma COMT localizada nas membranas das células extraneuronais. De facto, a presença e actividade de duas formas de COMT (citosólica e ligada a membranas), foi verificada em diversos tecidos, como no fígado de Rato (Axelrod e Tomchic, 1958); eritrócitos de Rato (Assicot e Bohuon, 1971) e fígado de Rato (Raxworthy *et al.*, 1982; Bertocci *et al.*, 1990) e fígado de Porco (Bertocci *et al.*, 1990).

Recentemente, na aorta de Coelho a presença de duas formas de COMT foi demonstrada por Head *et al.*(1985) que estudaram a actividade O-metilante da COMT, no referido tecido, com o recurso a um dador do grupo metilo a [metil-<sup>3</sup>H]-S-adenosil-l-metionina. Este composto apresenta como característica importante que é a sua baixa capacidade para atravessar membranas celulares. Quando estes autores incubaram fragmentos de tecido com Iso-<sup>3</sup>H, verificavam uma metilação intracelular, dependente da S-adenosilmetionina existente intracelularmente. Esta metilação é bloqueada pelos inibidores clássicos da captação extraneuronal que impedem a entrada do substrato. No entanto, se a incubação for realizada na presença de S-adenosilmetionina-<sup>3</sup>H que, como se sabe, só dificilmente é capaz de passar através de membranas celulares devida à sua elevada hidrofília (Van Phi e Sholing, 1982), há metilação, que é verificada pela formação de OMI-<sup>3</sup>H. Esta operação O-metilante só pode ter tido lugar extracelularmente por uma enzima existente na membrana celular.

Major *et al.*(1978) demonstraram também e para as glândulas submaxilares de Rato a existência de um "sistema O-metilante" de baixo Km e elevada afinidade e um "sistema O-metilante" de elevado Km e baixa afinidade, ambos sensíveis à corticosterona e metanefrina, sugerindo a presença de duas diferentes COMT. Com a COMT inibida, a Iso-<sup>3</sup>H, acumula-se em dois compartimentos do tecido glandular, sendo esta acumulação diminuída pela corticosterona e fenoxibenzamina. Um dos compartimentos estaria ligado à metilação e o outro à acumulação da Iso-<sup>3</sup>H. Por outro lado, estes dois sistemas poderão localizar-se na mesma célula ou em diferentes células ou então poder-se-ão tratar de dois diferentes tipos de COMT (COMT membranal, com baixo Km e COMT livre ou citosólica com um elevado Km) com diferentes características cinéticas.

Também Reid *et al.*(1986) encontraram na aorta de Coelho, duas formas de COMT com características cinéticas diferentes: a COMT ligada à

membrana tinha, para a isoprenalina, um Km de 0,9  $\mu\text{mol/l}$ , enquanto que a COMT citosólica solúvel apresentava, para a mesma amina, um Km de 121  $\mu\text{mol/l}$  (baixa afinidade). Estes autores determinaram o envolvimento da COMT membranar na O-metilação da isoprenalina e das formas membranar e solúvel na O-metilação dos estrogêneos catecólicos.

Mais recentemente, Broadley e Paton (1990) usando diferentes tipos de tecidos (cardíacos e respiratórios da Cobaia) sugeriram a hipótese de haver três compartimentos O-metilantes: dois intracelulares, sendo apenas um deles sensível à metanefrina e um local de O-metilação extracelular. Porém, nada avançaram quanto às estruturas morfológicas correspondentes deixando tudo na mesma.

Analisando os resultados obtidos com base nesta hipótese, verifica-se que a hidrocortisona evitará o acesso da amina à COMT, localizada intracelularmente, mas não evita a acção da enzima O-metilante que possa estar localizada na membrana e que funciona, portanto, independentemente do transportador. Por outro lado, a inibição da COMT irá bloquear não só a actividade O-metilante da COMT dependente do transportador, mas também a actividade O-metilante da COMT localizada na membrana, ocasionando por isso um aumento rápido e considerável do agonista na biofase, explicando-se assim a rapidez com que se desenvolve a resposta potenciada e o maior efeito potenciador provocado pela inibição da COMT.

Parece-nos que esta hipótese da existência de uma COMT localizada nas membranas das células extraneuronais, estranha portanto ao arranjo proposto por Trendelenburg (1984) para o sistema O-metilante (bomba - enzima) pode explicar cabalmente a maior e mais rápida potenciação dos efeitos obtidos por inibição da COMT do que pela inibição da captação extraneuronal.

Outro ponto em análise, que não é explicado cabalmente pelo modelo proposto por Trendelenburg (1984) para o sistema O-metilante extraneuronal é o facto da inibição da COMT, que é uma enzima descrita como tendo uma localização intracelular e cuja acção está dependente de um transportador (captação extraneuronal ou captação<sub>2</sub>), induzir maior potenciação de efeitos do que a inibição do próprio transportador, como se tem verificado numerosas vezes, e é confirmado pelos presentes resultados?

A explicação deste facto não é fácil e têm sido propostas diversas hipóteses que tentam esclarecer este facto.

A existência de mais do que um sistema O-metilante, em que apenas um dos sistemas é sensível à hidrocortisona, como o verificado para a membrana nictitante de Gato (Graefe e Trendelenburg, 1974) artéria da orelha de Coelho (Head *et al.*, 1980) aorta de Coelho (Branco *et al.*, 1981) veia safena de Cão (Azevedo e Osswald, 1976; Paiva e Guimarães, 1978, 1980; Branco e Osswald, 1980), e demonstrado também pelos presentes resultados, poderá explicar a maior potenciação gerada pelo bloqueio da O-metilação. Assim, a hidrocortisona só evitaria o acesso à COMT dependente do "carrier" e sensível ao bloqueador, mas não evitaria o acesso à COMT do sistema resistente à hidrocortisona. Por outro lado, com a inibição da COMT pelo U-0521 consegue-se um bloqueio total da actividade O-metilante, justificando-se assim a maior potenciação dos efeitos pela inibição da COMT do que pela inibição do "carrier".

Uma outra hipótese que poderá explicar o facto referido, é a diversidade dos bloqueadores usados e a diferente actividade dos mesmos. Facto a que não ficaram alheios Foster *et al.*, (1983), na medida em que desenvolveram um trabalho experimental, no qual compararam a

diferente influência de numerosos bloqueadores da captação extraneuronal nas respostas a agonistas simpaticomiméticos, mediadas por receptores beta<sub>2</sub>.

Evidentemente que não podemos esquecer este facto, mas parece-nos que não será de considerar, como explicação plausível para a diferente potenciação de efeitos verificada por acção dos dois inibidores usados. São conhecidas as diferentes sensibilidades dos tecidos ao bloqueio da captação extraneuronal, por substâncias tidas como bloqueadoras do "carrier" do sistema-O-metilante como foi verificado em diferentes tecido, como na traqueia de Cobaia (Foster; 1969), na membrana nictitante de Gato (Graefe e Trendelenburg, 1974), nas glândulas submaxilares de Rato (Major *et al.*, 1978), nos brônquios de de Porco (Foster *et al.*, 1983), na aorta de Coelho (Kalsner, 1969; Levin e Furchgott, 1970; Barone *et al.*, 1987) ou no coração de Rato (Kaumann, 1972 Magaribuchi *et al.*, 1987). No entanto, no presente trabalho, a hidrocortisona foi usada numa concentração de 200µmol/l, que é uma concentração superior à usada por Kaumann (1972) e Paiva e Guimarães (1980) para inibir a captação extraneuronal. Além disso, verifica-se por vezes, que os bloqueadores da captação extraneuronal inibem não só o "carrier", mas também a COMT (Cornish e Goldie, 1980; Foster *et al.*, 1983). Isto poderá explicar porque é que, em alguns tecidos o bloqueio da captação extraneuronal potencia mais as respostas aos agonistas, do que o bloqueio da COMT.

No presente trabalho, o bloqueador da COMT foi usado numa concentração de 55µmol/l, que é considerada como suficiente para bloquear a COMT. Este inibidor é normalmente usado em concentrações que estão compreendidas entre os 30µmol/l e 120 µmol/l (Azevedo e Osswald, 1976; Bönisch e Trendelenburg, 1973; Graefe e Trendelenburg, 1974; Bryan *et al.*, 1980; Cornish e Goldie, 1980; Branco *et al.*, 1981; Azevedo, 1983; Guimarães *et al.*, 1985; Proença *et al.*, 1988). Segundo Bönisch *et al.* (1974), o U-0521 pode inibir também a captação extraneuronal, quando usado em concentrações de 230 µmol/l. Esta concentração é

substancialmente mais alta do que a concentração por nós usada, sendo por isso de excluir uma acção acessória como bloqueador da captação extraneuronal.

A entrada por difusão de aminas para o espaço intracelular, que devido à sua lipossolubilidade ganhariam acesso à enzima independentemente do "carrier" (Mack e Bönisch, 1979; Grohmann e Trendelenburg, 1984 ; Bryan e O'Donnell, 1984; Trendelenburg, 1988) justificaria também, a ineficácia dos inibidores da captação extraneuronal (Paiva e Guimarães, 1980; Bryan *et al.*, 1984; Barone *et al.*, 1985).

Esta ineficácia dos inibidores da captação extraneuronal relativamente às aminas muito lipossolúveis , pode verificar-se também se o tecido tem uma captação extraneuronal pouco desenvolvida ou ausente e, ainda, se forem necessárias grandes concentrações de agonistas para que se verifique uma resposta. Evidentemente que , quer a traqueia de Cobaia quer o tecido uterino de Rato, apresentam uma captação extraneuronal efectiva como está perfeitamente demonstrado (Green e Miller, 1965; Foster, 1966; Paiva e Guimarães, 1976; O'Donnell *et al.* 1978; O'Donnell e Wanstall, 1979a; Zaagsma *et al.*, 1983; Levy e Tozzi, 1963; Digges, 1982; Cheng e Woodwar, 1984). Quanto às glândulas salivares foram o primeiro órgão em que se verificou a captação extraneuronal de noradrenalina (Andén *et al.*, 1963). esta captação foi mais tarde confirmada histologicamente por Hamberger *et al.* (1967) e funcionalmente por Almgren e Jonason, 1971; Marsden *et al.*, 1971; Almgren e Jonason, 1974a e b; Major *et al.*, 1978).

Pelos resultados obtidos, a explicação da maior potenciação dos efeitos por inibição da COMT , do que pela inibição da captação extraneuronal, dever-se-á à presença de um compartimento O-metilante resistente à hidrocortisona, demonstrado pelos resultados obtidos nas experiências de sensibilidade e confirmado pelas experiências de metabolização com compostos marcados, que revelaram uma O-metilação particularmente

resistente à hidrocortisona, no útero de Rato.

Estas diferenças de comportamento dos dois tecidos em relação a um mesmo inibidor são a favor da hipótese de uma heterogeneidade do sistema O-metilante nos diferentes tecidos .

### Determinação da afinidade das aminas para o sistema O-metilante

Para ver em que medida a acção potenciadora dos inibidores da captação extraneuronal e da O-metilação exerciam os seus efeitos por interferirem na metabolização dos agonistas ensaiados, realizamos experiências com Iso-<sup>3</sup>H na presença de diferentes concentrações de aminas não marcadas (frias). A determinação do CI<sub>50</sub> mostrou que as aminas competem com a Iso-<sup>3</sup>H para os mesmos sistemas de transporte e/ou de metabolização. Na verdade o uso dessas aminas, em concentrações crescentes, estorva de forma crescente a metabolização da Iso-<sup>3</sup>H.

Nas nossas experiências obtiveram-se diferentes CI<sub>50</sub> (concentração externa que satura 50% do sistema O metilante; "half-saturation outside concentration " ou HSOC ; ver Paiva e Guimarães, 1984) para as diferentes aminas.

Os CI<sub>50</sub> foram diferentes consoante as aminas utilizadas. Para as diferentes aminas foram encontrados diferentes valores de CI<sub>50</sub> (ver resultados) salientando-se principalmente os valores encontrados para a isoprenalina (5,8µmol/l) e para a dobutamina (5,5 µmol/l) na traqueia de Cobaia .

Para o útero de Rato os valores de CI<sub>50</sub> obtidos para a dobutamina (9,7 µmol/l) e isoprenalina (70,6 µmol/l) são claramente diferentes. Consta-se por estes valores, que a isoprenalina e dobutamina, tem maior afinidade para o sistema O-metilante na traqueia de Cobaia. No útero de Rato, a amina mais afim para esse sistema é a dobutamina sendo a afinidade da

isoprenalina nesta preparação muito baixa

Os valores de  $CI_{50}$  na traqueia de Cobaia para a (-)-isoprenalina e (-)-adrenalina são muito semelhantes aos  $K_m$  determinados por Garland *et al.*(1981) nesta mesma preparação.

Pelos resultados obtidos por vários autores, sabe-se que a afinidade relativa para o sistema O-metilante é máxima para a isoprenalina e progressivamente menor para a adrenalina, noradrenalina e dopamina. Assim é para o coração de Rato perfundido (Fiebig e Trendelenburg, 1978; Bönisch, 1978), para a traqueia de Cobaia (Bryan e O'Donnell, 1984) e para a veia safena de Cão (Guimarães e Paiva, 1984). Uma ordem de afinidades semelhante foi obtida para cinco aminas simpaticomiméticas por Grohmann e Trendelenburg (1984) os quais verificaram que o  $K_m$  da captação extraneuronal para as aminas simpaticomiméticas aumenta da dobutamina < isoprenalina < adrenalina < noradrenalina e por fim a dopamina.

Os nossos resultados mostram uma ordem de afinidade das aminas para o sistema O-metilante extraneuronal claramente diferente nos dois tecidos. De qualquer modo há inteira coincidência entre os valores das potenciações obtidas por bloqueio dos locais de perda, nas experiências de índole farmacodinâmica, e os valores de  $K_m$  fornecidos pelos estudos bioquímicos, em que se utilizaram isótopos radioactivos e em que se contabilizaram os metabolitos formados.

Os resultados mais imprevistos foram os obtidos com a isoprenalina e com a dobutamina. Sabe-se que a isoprenalina não é captada pelas terminações nervosas (Hertting, 1964; Callingham e Burgen, 1966; Draskoczy e Trendelenburg, 1970; Trendelenburg, 1979) e é uma amina simpaticomimética classicamente considerada como um bom substrato para o sistema O-metilante (bomba-enzima). No entanto, no útero de Rato a isoprenalina comporta-se como um mau substrato para esse sistema. Quanto à dobutamina, ela está descrita como uma amina com afinidade preferencial para os receptores  $\beta_1$  e com uma fraca actividade sobre

receptores alfa e beta<sub>2</sub> (Tuttle e Mills, 1975). Por isso, não se esperava que fosse tão intensamente potenciada pelo bloqueio dos locais de perda reconhecidamente mais ligados aos receptores beta<sub>2</sub> (Paiva e Guimarães, 1976; Bryan *et al.*, 1981; Russell e Moran, 1980; Hawthorn e Broadley, 1982; Barnes *et al.*, 1983; Broadley *et al.*, 1984; Proença *et al.*, 1988). Além de ser bom substrato da captação extraneuronal (Grohmann e Trendelenburg, 1985), a dobutamina possui outras propriedades. Assim, bloqueia a captação neuronal (Michell *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1989) e inibe a recaptação vesicular da noradrenalina, sendo incapaz de provocar a libertação dessa amina para o espaço extracelular (Fisher *et al.*, 1989), passando com facilidade, através de membranas devido à sua elevada lipofilia (Mack e Bönisch, 1979). Aachamos contudo, que nenhuma destas propriedades poderá explicar porque é que a dobutamina é mais potenciada pelo bloqueio da COMT do que qualquer amina mais afim para os receptores beta<sub>2</sub>.

O conjunto dos nossos resultados, mas especificamente a elevada potenciação da dobutamina causada pelo U-0521 no útero de Rato e a modesta potenciação da isoprenalina por acção do U-0521, na mesma preparação não podem ser explicados com base na existência de um único tipo de COMT.

#### **Análise dos resultados com base na relação "Km/ED<sub>50</sub>"**

Analisando os resultados obtidos quanto à potência relativa das diferentes aminas no útero de Rato e na traqueia de Cobaia, verificamos que o maior grau de potenciação de efeitos, por inibição da COMT, se verificou

com as aminas que apresentaram valores de  $CI_{50}$  mais baixos, portanto para aquelas que possuíam maior afinidade para o local de perda. Contudo, verificamos também que os valores de  $CE_{50}$  das aminas são claramente diferentes uns dos outros. Para a isoprenalina a  $CE_{50}$  é da ordem dos nmol/l, enquanto que para a dobutamina é substancialmente mais alta sendo da ordem dos  $\mu\text{mol/l}$ .

Como foi referido e é actualmente aceite, são pelo menos três os factores que determinam ou influenciam o grau de supersensibilidade para as catecolaminas causado pela inibição de um local de perda; a) características cinéticas do local de perda; b) distância do local de perda e aos receptores em estudo e; c) potência da catecolamina relativamente ao receptor em estudo. Para catecolaminas actuando num mesmo tecido e sobre um mesmo tipo de receptor, o grau de potenciação obtido, por inibição de um local de perda pode ser caracterizado pela razão "HSOC do local de perda/ $CE_{50}$ ", (Trendelenburg *et al.*, 1971; Trendelenburg, 1972; Paiva e Guimarães, 1984; Guimarães e Trendelenburg, 1985; Guimarães *et al.*, 1985).

Aplicando esta "lei" aos resultados que obtivemos, isto é determinando as relações  $Km/CE_{50}$  (ou  $HSOC/CE_{50}$  para as diferentes aminas nas duas preparações até aqui consideradas, verifica-se que, na traqueia de Cobaia os valores daquela razão são de 552 para a isoprenalina, 319 para a adrenalina, 2,4 para a dobutamina e finalmente 1,5 para a dopamina. Reportando-nos aos trabalhos em que se definiram aqueles princípios (Paiva e Guimarães, 1984; Guimarães e Paiva, 1984; Guimarães e Trendelenburg, 1985; Guimarães *et al.*, 1985), seria de esperar uma maior potenciação dos efeitos da isoprenalina e da adrenalina (relação  $>10$ ) e uma menor potenciação da dopamina e da dobutamina (relação  $>1$ ). Esta previsão é verdadeira para a isoprenalina mas não para a dobutamina (potenciação igual à da isoprenalina) nem para a adrenalina (potenciação mais baixa e mesmo idêntica à da dopamina).

Da mesma forma, no útero de Rato e segundo a referida relação o factor foi  $>10$  (32.090) para a isoprenalina, isto é um valor surpreendentemente alto e do qual se esperaria uma elevada potenciação. Para a adrenalina foi de 3.816 e de 4,1 e 8,8 para a dopamina e dobutamina, respectivamente. Nesta preparação, a ordem de potenciação esperada, era em princípio, a mesma que na traqueia de Cobaia, facto que não se verificou. Em nenhuma das situações se determinou um valor de relação  $< 0,1$ , o que revelaria um considerável saturação do local de perda com as concentrações de agonistas correspondentes ao  $CE_{50}$ .

Quando comparamos os valores das relações obtidas por Guimarães *et al.*(1985), determinadas em diferentes tecidos, nomeadamente na traqueia de Cobaia e na veia safena de Cão (valores determinados na ausência de propranolol), verifica-se que seria de prever uma maior potenciação para a traqueia de Cobaia (razão  $Km/CE_{50}= 2.307$ ) do que na veia safena de Cão (razão  $Km/CE_{50}=35,3$ ). No entanto, os valores de  $Km$  nas duas preparações são diferentes ( $0,6 \mu\text{mol/l}$  para a veia safena e  $6,0 \mu\text{mol/l}$  para a traqueia) o que pode explicar em parte a diferença obtida na potenciação pelo U-0521. Se por outro lado os valores do  $Km$  forem idênticos para as diferentes aminas numa mesma preparação, estaremos na presença de um local em que só pode variar o  $CE_{50}$ . É o caso da traqueia de Cobaia em presença da isoprenalina e dobutamina. Os seus valores do  $CI_{50}$  (ou HSOC) são idênticos, sendo francamente diferentes os  $CE_{50}$ .

Para estas duas aminas, os valores da relação  $Km/CE_{50}$  foram perfeitamente diferentes, o que fazia admintir uma potenciação da dobutamina menor do que a da isoprenalina. Contudo a potenciação foi idêntica para as duas aminas. Este facto mostra que o tema não está de modo algum esgotado, e que dele poderão surgir novas propostas de trabalho.

## **Experiências "in vivo"**

Complementando o estudo da influência exercida pela inibição da captação extraneuronal e da COMT, nas respostas mediadas por receptores do tipo beta em tecidos isolados "in vitro", analisamos também, a importância da inibição dos referidos locais de perda sobre um parâmetro biológico, a glicemia do Rato.

No presente estudo, as experiências foram feitas em ratos pancreatectomizados (com o fim de evitar a influência da insulina e da glicagina, apesar da remoção aguda do pâncreas induzir um aumento de produção de glicose pelo fígado e diminuição da utilização periférica pelos tecidos). Todos os ensaios foram realizados na presença de cocaina para inibir a captação neuronal.

Assim pela primeira vez se transferiu para animal inteiro, a verificação de um facto já observado em numerosos órgãos isolados: a potenciação do efeito de catecolaminas pela inibição do sistema O-metilante.

## **Potência das aminas**

Exactamente como nas experiências realizadas com o útero de Rato e a traqueia de Cobaia, a potência das quatro aminas simpaticomiméticas utilizadas para condicionar hiperglicemia no Rato, foi diferente. Duas das

aminas utilizadas, a dopamina e a dobutamina exerceram ações pouco uniformes sobre a glicemia, não havendo qualquer relação entre a dose e os efeitos provocados.

A isoprenalina e a adrenalina causaram hiperglicemia dependente da dose, sendo a isoprenalina a amina mais potente e a adrenalina a menos potente.

É sabido que na hiperglicemia induzida por aminas simpaticomiméticas estão envolvidos receptores adrenérgicos do tipo alfa e receptores adrenérgicos do tipo beta (Nash e Smith, 1972 ; Lundquist, 1972; Al-Jibouri *et al.*, 1980 ; Moratinos *et al.*, 1984, 1988; Angel e Langer; 1988). No entanto, e porque o que desejávamos estudar era a influência exercida pelo bloqueio das O-metilação nas respostas mediadas por receptores beta, realizamos as nossas experiências na presença de fentolamina.

#### **Influência dos bloqueadores dos locais de perda, na hiperglicemia condicionada por aminas simpaticomiméticas.**

A hiperglicemia provocada por ação dos agonistas usados (adrenalina e isoprenalina) aumentou de forma significativa na presença dos inibidores dos locais de perda em estudo (U-0521 e hidrocortisona). Verificou-se também que, o aumento da hiperglicemia causada pela infusão dos agonistas, na presença do bloqueador da COMT aparece mais cedo e de forma mais acentuada, do que o verificado na presença do bloqueador da captação extraneuronal (ver resultados).

É evidente que, "in vivo", não é tão fácil interpretar os resultados, uma vez que há vários órgãos eventualmente implicados na gênese desses resultados e há fenômenos de interinfluência reflexa, inexistentes "in

vitro", que tornam mais complexa a sua interpretação (ver Himms-Hagen, 1967). Contudo venham de onde vierem as influências e sejam quais forem os órgãos preponderantemente intervenientes, os resultados finais são flagrantemente semelhantes, apontando para uma causa comum. Quer tenha sido devido à COMT hepática (Axelrod e Tomchic, 1958; Bertocci *et al.*, 1990), como provavelmente foi, quer tenha sido pela COMT parenquimatosa, ou dos vasos, a verdade é que o bloqueio da COMT causa uma potenciação da hiperglicemia induzida pela isoprenalina e pela adrenalina, exactamente como o bloqueio da COMT uterina, traqueal ou das glândulas submaxilares, potenciou a acção relaxante e secretória das mesmas aminas.

Esta semelhança torna legítimo que se estabeleça um paralelismo entre os resultados. Assim, se é provável, a analisar pelos nossos resultados, que haja mais do que um compartimento O-metilante no útero de Rato, na traqueia de Cobaia, ou nas glândulas salivares, muito mais provável é que os vários compartimentos O-metilantes contribuam num organismo inteiro para a O-metilação das aminas que usamos, ocasionando uma potenciação de resposta às aminas, como de facto se verificou.

Os resultados obtidos mostram, também, que a adrenalina sendo menos potente do que a isoprenalina como condicionadora da hiperglicemia no Rato, é mais potenciada do que a da isoprenalina. Isto pode ser explicado pela menor capacidade demonstrada pela isoprenalina como agente libertador de glicose das células hepáticas ("in vitro"), quando comparado com a adrenalina. Poderemos também admitir uma acção da adrenalina sobre receptores alfa, caso estes não estejam completamente bloqueados pela fentolamina, provocando assim hiperglicemia que no final seria o somatório da acção sobre os receptores beta e receptores alfa. Por outro lado para a fentolamina, que usamos como bloqueador de efeitos alfa, está descrita uma acção redutora da hiperglicemia induzida pela adrenalina (Al-Jibouri *et al.*, 1980), e uma acção causadora dada libertação de insulina

pelas células pancreáticas no Ratinho (Shulz e Hasselblatt, 1989), não achamos no entanto, que qualquer um destes efeitos influencie significativamente os resultados obtidos.

Assim, em qualquer uma das situações o efeito da inibição da COMT, manifestou-se mais cedo e de forma mais acentuada, (a partir dos 5 e 10 minutos de infusão da adrenalina e isoprenalina respectivamente) do que o efeito da hidrocortisona (a partir dos 10 e 15 minutos de infusão da adrenalina e isoprenalina respectivamente). Mais uma vez se verifica, que a inibição da actividade O-metilante da COMT ocasiona uma rápida potenciação de efeitos, sugerindo a localização da COMT nas membranas das células extraneuronais.

A interpretação dos resultados encontrados parece permitir a apresentação das seguintes conclusões:

1 -A ordem de potência dos agonistas usados foi a mesma nas três preparações utilizadas "in vitro", sendo a isoprenalina a amina mais potente, seguindo-se por ordem decrescente a adrenalina, dobutamina e por último a dopamina.

2 -Nos ensaios "in vivo", a potência das aminas (relativamente à acção hiperglicemiante das mesmas) foi diferente. A isoprenalina e adrenalina, produziram efeitos dependentes da dose, sendo a isoprenalina a amina mais potente, enquanto que a dopamina e a dobutamina não produziram efeitos dependentes da dose.

3 -Em qualquer uma das situações ("in vitro" e "in vivo"), a inibição da COMT pelo U-0521, produziu uma potenciação maior do que a produzida pela inibição da captação extraneuronal pela hidrocortisona.

4 -A inibição dos locais de perda originou uma diferente ordem de potenciação das quatro aminas em estudo, na traqueia de Cobaia e no útero de Rato .

5 -Nas glândulas submaxilares de Ratinho, mostrou-se o envolvimento dos receptores beta, na secreção de alfa-amílase. Verificou-se também que o bloqueio da COMT ocasiona uma maior potenciação da resposta secretória de alfa-amílase às aminas, do que a inibição da captação extraneuronal

6 -A incubação do útero de Rato e da traqueia de Cobaia com Iso-<sup>3</sup>H, na presença do inibidor da COMT e do inibidor da captação extraneuronal, permitiu verificar a existência de um compartimento O-metilante resistente à hidrocortisona, particularmente evidenciado no útero de Rato.

7 -A incubação da traqueia de Cobaia e do útero de Rato, com Iso-<sup>3</sup>H, na presença de concentrações crescentes de aminas, permitiu determinar os CI<sub>50</sub> (que foram diferentes) para as diferentes aminas, e mostrar que a afinidade da isoprenalina para o sistema O-metilante dos dois tecidos é diferente.

8 -A maior e mais rápida potenciação dos efeitos obtidos por acção do inibidor da COMT, é compatível com a existência de uma COMT localizada nas membranas das células extraneuronais, estranha ao arranjo proposto por Trendelenburg (1984) para o sistema O-metilante (bomba-enzima, associados em série). Além disso foi demonstrado que a isoprenalina tem uma fraca afinidade para a COMT do tecido uterino de Rato, facto não verificado para esta mesma amina na traqueia de Cobaia, confirmando-se uma heterogeneidade do sistema O-metilante para os diferente tecidos.

## V-Resumo

No presente trabalho, estudou-se a influência pelo bloqueio da O-metilação na acção de quatro aminas catecólicas simpaticomiméticas, todas elas substrato dessa O-metilação. Este estudo foi realizado em órgãos isolados "in vitro" e em animal inteiro. Relativamente aos órgãos isolados foram usadas três preparações : traqueia de Cobaia, o útero de Rato e as glândulas submaxilares de Ratinho. O primeiro caracterizado por possuir uma população de receptores adrenérgicos predominantemente beta e os dois últimos possuidores de receptores alfa e beta. No animal inteiro o parâmetro escolhido como teste para o estudo da acção das aminas, foi a glicemia, uma vez que o seu valor depende fundamentalmente de adrenoceptores beta<sub>2</sub>

Como inibidor da O-metil transferase (COMT) usou-se o U-0521 (3',4'-di-hidroxi-2-metil propiofenona) e como bloqueador da captação extraneuronal, a hidrocortisona.

Na traqueia de Cobaia e no útero de Rato, (após bloqueio dos receptores alfa pela fentolamina) todas as aminas causaram relaxamento, sendo a isoprenalina a amina mais potente, seguindo-se por ordem decrescente a adrenalina, a dobutamina e por último a dopamina

Nas glândulas submaxilares de Ratinho a acção das aminas sobre a secreção de alfa-amilase a amina mais potente foi a isoprenalina, seguiu-se a adrenalina, a dobutamina e por último a dopamina, por ordem decrescente de potência.

Quanto à ordem de potência verificou-se que ela foi sempre a mesma para as três preparações, o que está de acordo com o conhecimento que se possui de serem idênticos os receptores envolvidos nas respectivas respostas.

Na traqueia de Cobaia verificou-se que a inibição da COMT pelo U-0521, potenciou as respostas de todas as aminas, sendo a isoprenalina e a dobutamina as aminas mais potenciadas (3,9 vezes), seguindo-se a adrenalina e dopamina com o mesmo grau de potenciação (2,2 vezes).

No útero de Rato, a inibição da COMT potenciou também todas as aminas, sendo a dobutamina a amina mais potenciada (4,2 vezes), seguindo-se a adrenalina (2,4 vezes), a dopamina (2,1 vezes) e por último a isoprenalina (2,0 vezes).

Nas glândulas submaxilares de Ratinho, a inibição da COMT pelo U-0521, potenciou também a acção das aminas simpaticomiméticas, sendo neste caso a amina mais potenciada a dobutamina (4,9 vezes), seguida da isoprenalina (2,8 vezes), da dopamina (2,7 vezes) e por último da adrenalina (2,3 vezes).

Por outro lado, o bloqueio da captação extraneuronal pela hidrocortisona provocou também, na traqueia de Cobaia, uma potenciação da acção da isoprenalina de 1,9 vezes, da adrenalina de 1,8 vezes, da dopamina de 1,5 vezes e por último da dobutamina com uma potenciação de 1,4 vezes.

No útero de Rato a inibição da captação extraneuronal pela hidrocortisona, também provocou uma potenciação de resposta a todas as aminas, sendo a amina mais potenciada a dobutamina (2,4 vezes), a dopamina (1,7 vezes) a adrenalina (1,4 vezes) e por último a isoprenalina (1,3 vezes).

A inibição da captação extraneuronal nas glândulas submaxilares de Ratinho, não produziu potenciação da acção das aminas simpaticomiméticas usadas sobre a secreção de alfa-amilase.

O bloqueio da captação extraneuronal potenciou sempre menos a acção das aminas usadas, do que a inibição da COMT. Além disso a ordem dos

valores da potenciações obtidas nos diferentes órgãos foi diferente.

Os estudos de incubação feitos com anéis de traqueia de Cobaia ou fragmentos de tecido uterino e 0,1  $\mu\text{mol/l}$  de Iso- $^3\text{H}$ , permitiu verificar que a inibição da COMT pelo U-0521 reduz a O-metilação em igual percentagem (87,5%) nas duas preparações, enquanto que a inibição da captação extraneuronal pela hidrocortisona reduz a O-metilação em apenas 12,2% no útero de Rato e 41,8% na traqueia de Cobaia. Estes resultados mostram, não só uma eficácia maior da inibição da COMT (redução da produção de derivados O-metilados (OMI- $^3\text{H}$ ) do que da inibição da captação extraneuronal, mas mostram, também, a existência de uma O-metilação amplamente resistente à hidrocortisona no útero de Rato.

A incubação dos tecidos (traqueia de Cobaia e útero de Rato) com 0,1  $\mu\text{mol/l}$  de Iso- $^3\text{H}$  na presença de concentrações crescentes de aminas frias, permitiu verificar que estas competem para o mesmo sistema de transporte e de metabolização de forma dependente da dose, havendo uma redução da formação de OMI- $^3\text{H}$  a partir da Iso- $^3\text{H}$ . Para a traqueia de Cobaia obtiveram-se os seguintes  $\text{CI}_{50}$ : 5,5  $\mu\text{mol/l}$  para a dobutamina, 5,8  $\mu\text{mol/l}$  para a isoprenalina, 11,6  $\mu\text{mol/l}$  para a adrenalina e 44,1  $\mu\text{mol/l}$  para a dobutamina. No tecido uterino de Rato, os  $\text{CI}_{50}$  foram os seguintes: 9,7  $\mu\text{mol/l}$  para a dobutamina, 45,8  $\mu\text{mol/l}$  para a adrenalina, 49,3  $\mu\text{mol/l}$  para a dopamina e por último 70,6  $\mu\text{mol/l}$  para a isoprenalina. Estes resultados mostram a existência de uma diferente afinidade das aminas para o sistema O-metilante nas duas preparações, evidenciando-se a fraca afinidade da isoprenalina para o referido sistema no músculo uterino ao contrário do que se verificou na traqueia.

Nunca a influência do bloqueio da COMT e da captação extraneuronal tinha sido estudada "in vivo", sobre um parâmetro biológico. Por isso, e porque este efeito de potenciação poderá ter mesmo repercussões no caso da aplicação de determinados medicamentos, nomeadamente dos que incluem os derivados da cortisona, decidimos alargar o nosso estudo ao animal inteiro.

A aminas mostraram um comportamento diferente sobre a glicemia no Rato. A dopamina e a dobutamina, não produziram efeito sobre a glicemia dependente da dose. No entanto a isoprenalina e a adrenalina produziram hiperglicemia no Rato, de forma dependente da dose, sendo a isoprenalina a amina mais potente.

A inibição da COMT potenciou a hiperglicemia provocada, quer pela isoprenalina, quer pela adrenalina. Por sua vez, a hidrocortisona aumentou também a hiperglicemia causada pelas duas aminas simpaticomiméticas. No entanto, este aumento foi maior no grupo que recebeu o U-0521 do que no grupo que recebeu a hidrocortisona, e tornou-se evidente mais cedo e de forma mais acentuada para a adrenalina do que para a isoprenalina. Portanto, os resultados "in vivo" corroboram os resultados "in vitro", resultados que tinham mostrado uma maior potenciação após a inibição da COMT do que após a inibição da captação extraneuronal.

Pelos resultados obtidos, a mais rápida potenciação dos efeitos das aminas simpaticomiméticas (relaxamento da musculatura lisa da traqueia de Cobaia e útero de Rato e aumento de alfa-amilase segregada pelas glândulas submaxilares de Ratinho) obtida por inibição da COMT, do que pela inibição da captação extraneuronal, é compatível com a presença de uma COMT localizada na membrana das células extraneuronais, com um arranjo independente do sistema O-metilante (bomba-enzima, associados em série) proposto por Trendelenburg (1984). Além disso foi demonstrado a existência de um compartimento O-metilante fortemente resistente à hidrocortisona, particularmente no tecido uterino de Rato. Os resultados obtidos mostram também que a isoprenalina tem uma fraca afinidade para o sistema O-metilante, facto não verificado na traqueia de Cobaia, confirmando a existência de uma heterogeneidade do sistema O-metilante nos diferentes tecidos.

## VI - SUMMARY

In the present study the influence of inhibition of uptake<sub>2</sub> and O-methylation on  $\beta$ -adrenoceptor-mediated responses elicited by four sympathomimetic amines was compared.

the guinea-pig trachea, the rat uterus and mouse submaxillary glands were used. These tissues were chosen because they possess  $\beta_2$ -adrenoceptors, and because it was shown that  $\beta_2$ -adrenoceptors-mediated responses are much more under control of O-methylating system than any other type of response. Relaxation of the trachea is mediated by a mixed population of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenoceptors,  $\beta_2$  being largely predominant, whereas relaxation of the rat uterus is due to the stimulation of  $\beta_2$ -adrenoceptors and the release of alpha-amylase from mouse submaxillary glands is mediated by a  $\beta_1$ -adrenoceptor population. We also compared the influence of inhibition of the O-methylating system, on a metabolic effect of catecholamines - the hyperglycaemia induced on the rat.

The results show that the potency of each sympathomimetic amine was the same in all the tissues (trachea, uterus and glands) and the ranking order being: isoprenaline > adrenaline > dobutamine > dopamine.

Both inhibition of extraneuronal uptake, by hydrocortisone and O-methylation, by U-0521 (3,4-dihydroxy-2-methyl propiophenone) caused supersensitivity to the catecholamines under study, although the supersensitivity caused by inhibition of O-methylation was higher than that caused by inhibition of uptake<sub>2</sub>. The degree of supersensitivity caused by the

inhibition of either uptake<sub>2</sub> or O-methylation depended on the amine. The ranking order for the degree of supersensitivity caused by either U-0521 or hydrocortisone was different in the different tissues. In the guinea-pig trachea, the degree of supersensitivity caused by U-0521 was isoprenaline = dobutamine > adrenaline = dopamine, whereas in the rat uterus the ranking order was: dobutamine > adrenaline > dopamine > isoprenaline. On the other hand, the ranking order for the degree of supersensitivity caused by hydrocortisone was: isoprenaline > adrenaline > dopamine > dobutamine in the guinea-pig trachea and dobutamine > dopamine > adrenaline > isoprenaline in the rat uterus.

In the mouse submaxillary gland, the alpha-amylase secretion caused by the amines was more markedly enhanced by inhibition of COMT (the ranking order for the enhancement being: dobutamine > isoprenaline > dopamine > adrenaline), than by the inhibition of extraneuronal uptake (no effect of hydrocortisone).

In the guinea-pig trachea the influence of the inhibition of uptake<sub>2</sub> and O-methylation on the metabolism of isoprenaline-<sup>3</sup>H (Iso-<sup>3</sup>H) was also compared. While inhibition of uptake<sub>2</sub> by hydrocortisone reduced by 41.8% the amount of O-methylated isoprenaline-<sup>3</sup>H (OMI-<sup>3</sup>H) formed during 30 min from 0.1 μmol/l of Iso-<sup>3</sup>H, inhibition of O-methylation by U-0521 reduced the OMI-<sup>3</sup>H formation by 87.5%. Accordingly, in rat uterus, the inhibition of uptake<sub>2</sub> by hydrocortisone only reduced by 12% the amount of OMI-<sup>3</sup>H, formed during 30 min. from 0.1 μmol/l of Iso-<sup>3</sup>H, while the inhibition of O-methylation by U-0521 reduced by 87.5% the OMI-<sup>3</sup>H formation.

These results obtained with isoprenaline explain why β-adrenoceptor-mediated effects caused by this amine (and probably those caused by other amines used on those tissues) were enhanced more markedly by inhibition of COMT than by inhibition of uptake<sub>2</sub>. On the other hand these results reveals a large O-methylating compartement in the rat uterus which is resistant to hydrocortisone.

The IC<sub>50</sub> (outside concentration of unlabeled catecholamine that half-saturates the intracellular COMT of extraneuronal O-methylating system), was determined by incubation of guinea-pig tracheal rings and slices of rat uterus, with Iso-<sup>3</sup>H 0.1 μmol/l during 30 min (MAO and neuronal uptake inhibited) in the absence or in the presence of different concentrations of unlabeled amines.

In the guinea-pig trachea the IC<sub>50</sub> were 5.5 μmol/l for dobutamine, 5.8 μmol/l for isoprenaline, 11.6 μmol/l for adrenaline and 44.1 for dopamine. In the rat uterus the IC<sub>50</sub> was 9.7 μmol/l for dobutamine, 45.8 μmol/l for adrenaline, 49.3 μmol/l for dopamine and 70.6 μmol/l for isoprenaline. These results show that, there are differences in the affinity of these catecholamines to the extraneuronal O-methylating system, which may justify the differences above referred to for the ranking order of the degrees of supersensitivity. This interesting variability is probably due to the heterogeneity of extraneuronal system in different tissues.

On the other hand, the influence of inhibition of COMT and of extraneuronal uptake on metabolic responses, like hyperglycaemia induced by sympathomimetic amines, was never studied "in vivo". So, we decided to extend this study to the whole animal.

The results show that, the potency of catecholamines (under study) at inducing hyperglycaemia in anaesthetized rats, was different. Only isoprenaline and adrenaline caused dose-dependent hyperglycaemia, and isoprenaline was more potent than adrenaline. The inhibition of COMT (by U-0521) and the inhibition of extraneuronal uptake (by hydrocortisone), enhanced the hyperglycemic response induced by either isoprenaline or adrenaline. On the other hand, the enhancement of hyperglycaemia by inhibition of COMT developed faster and was more marked than that caused by the inhibition of extraneuronal uptake.

The results in this study agree with the existence of an membrane-bound COMT, thus denying, at least in part, the model proposed by

Trendelenburg (1984) for the extraneuronal O-methylating system. On the other hand an "hydrocortisone resistant" extraneuronal O-methylating is shown in all the tissues, particularly, in the rat uterus.

## VII-BIBLIOGRAFIA

Acevedo C, Masana M I, Tcheransky D, Rubic M C (1990) Accumulation of  $^3\text{H}$ -(+)-noradrenaline by isolated rat liver cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 40-44

Al-Jibouri L M, Furman BL, Parrat JR (1980) Blockade of adrenaline-induced hyperglycaemia in the anaesthetized cat by continuous infusion of phentolamine and propranolol. *Br J Pharmacol* 68: 461-466

Almgren O, Jonason J (1971) Relative importance of neuronal and extraneuronal mechanisms for the uptake and retention of noradrenaline in different tissues of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 270: 289-309.

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

Almgren O, Jonason J (1974a) Functional significance of neuronal and extraneuronal transmitter uptake in rat salivary glands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 283: 1-20

- Almgren O, Jonason J (1974b) On the role of the adrenergic receptors for the extraneuronal amine uptake and retention in rat salivary glands "in vitro". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 283: 21-35
- Almgren O, Jonason J (1976) Extraneuronal amine transport in glandular tissue . In Paton DM (ed) *The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines*. Reven Press, New York, pp 299-311
- Angel I, Langer S (1988) Adrenergic-induced hyperglycaemia in anaesthetized rats: involvement of peripheral  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 154: 191-196
- Andén NE, Carlsson A, Waldeck B (1963) Reserpine - resistant uptake mechanisms of noradrenaline in tissues. *Life Science* 2 : 889-894
- Andén NE, Norberg KA, Olson L (1966) The adrenergic nerves of the rat salivary glands after duct ligation. *Acta Physiol Scand*. 66: 501-506
- Anning EN, O'Donnell, SR, Wanstall JC (1978) Extraneuronal accumulation of isoprenaline in guinea-pig trachea, atria and uterus: a histochemical and pharmacological study. *Br J Pharmacol* 62: 472P
- Anning EN, Bryan LJ, O'Donnell SR (1979) Extraneuronal accumulation of isoprenaline in trachea and atria of guinea-pig and cat: a fluorescence histochemical study. *Br J Pharmacol* 65: 175-182
- Arnett CD, Davis JN (1979) Denervation-induced changes in alpha and beta adrenergic receptors of the rat submandibular gland. *J Pharmacol Exp Ther* 211: 394-400

Ariëns EJ (1981) The classification of beta-adrenoceptors. *TIPS* 2: 170-172

Assicot M, Bohuon C (1971) Presence of two distinct catechol-O-methyltransferase activities in red blood cells. *Biochimie* 53: 871-874

Axelrod J, Tomchick R (1958) O-methylation of epinephrine and other catecols. *J Biol Chem* 233 :702-705

Axelrod J, Meil-Malherbe H, Tomchick R (1959) The physiological disposition of  $^3\text{H}$ -epinephrine and its metabolite metanephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 221: 251-256

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

Azevedo I, Bönisch H, Osswald W, Trendelenburg U (1983) Autoradiographic study of rat hearts perfused with  $^3\text{H}$ -isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 322: 1-5

Barnes Pj, Nadel JA, Skoogh B-E, Roberts JM (1983) Characterization of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in canine airway smooth muscle by radioligand binding and physiological responses. *J Pharmacol Exp Ther* 225: 456-461

Barone S, Stitzel E, Head RJ (1983) The vascular extraneuronal uptake (ENU) and O-methylation of isoproterenol (ISO) is a stereoselective process *Pharmacologist* 25: 267

Barone S, Stitzel E, Head RJ(1985) The stereoselective O-methylation of isoprenaline in the isolated rabbit thoracic aorta. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 329: 9-17

Barone S, Panek D, Bennett L, Stitzel E, Head RJ (1987) The influence of oestrogen and oestrogen metabolites on the sensitivity of the isolated rabbit aorta to catecholamines. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 335: 513-520

Bertocci B, Garotta G, Zürcher G, Miggiano, Da Prada M (1990) Monoclonal antibodies recognizing both soluble and membrane bound catechol-O-methyltransferase. J Neural Transm [suppl] 32: 369-374.

Bönisch H, Trendelenburg U (1973) Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 283: 191-218.

Bönisch H, Uhlig W, Trendelenburg U (1974) Analysis of the compartment involved in the extraneuronal storage and the metabolism of isoprenaline in the perfused heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 283: 223-244

Bönisch H (1978) Further studies on the extraneuronal uptake and metabolism of isoprenaline in the perfused rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 303: 121-131

Bönisch H, Bryan LJ, Henseling M, O'Donnell SR, Stockmann P, Trendelenburg U (1985) The effect of various ions on uptake<sub>2</sub> of catecholamines Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 328: 407-416

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

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

Broadley KJ, Chess-Williams RG, Grassby PF (1984) Responses mediated via  $\beta_1$  but not  $\beta_2$ -Adrenoceptors exhibit supersensitivity after 6-hydroxydopamine pretreatment. *Br J Pharmacol Proceedings supplement* 82: 224P

Broadley JK, Paton MD (1990) Comparison of the uptake and O-methylation of isoprenaline by cardiac and respiratory tissues of guinea-pig. *Pharmacol Res* 22: 573-585

Broch OJ (1974) Effect of reserpine on catechol-O-methyl transferase in rat submaxillary gland. *J Pharm Pharmacol* 26: 375-377

Bryan LJ, Cole JJ, O'Donnell SR (1980) Kinetics of extraneuronal uptake of isoprenaline in trachealis smooth muscle cells: comparison of rat and guinea-pig. *J Pharm Pharmacol* 32 : 793-794

Bryan LJ, Cole JJ, O'Donnell SR, Wanstall JC (1981) A study designed to explore the hypothesis that  $\beta_1$  adrenoceptors are "innervated" receptors and  $\beta_2$  adrenoceptors are "hormonal" receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 216: 395-400

Bryan LJ, O'Donnell SR (1980) Affinities of catecholamines for extraneuronal uptake in smooth muscle cells trachealis muscle of guinea-pig. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311 : 139-146

Bryan LJ, O'Donnell SR (1984) Stereoselectivity of extraneuronal uptake of catecholamines in guinea-pig trachealis smooth muscle cells. Br J Pharmacol 82: 757-762

Bryan LJ, O'Donnell SR, Westwood NN (1988) The uptake process for catecholamines in endothelial cells in rat perfused lungs is the same as uptake<sub>1</sub> in noradrenergic neurons. Br J Pharmacol 95: 539 P

Burgen ASV, Inersen LL (1965) The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart. Br J Pharmacol 25 : 34-39

Callingham BA, Burgen ASN (1966) The uptake of isoprenaline and noradrenaline by perfused rat heart. Mol Pharmacol 2: 32-42

Carlsöö B, Danielsson A, Henriksson R (1978) Effects of a new selective  $\beta_1$ -adrenoceptor agonist on amylase gland secretion. Br J Pharmacol 62 : 364-366

Carswell H, Nahorski SR (1983)  $\beta$ -adrenoceptor heterogeneity in guinea-pig airways: comparison of functional and receptor labelling studies. Br J Pharmacol 79 : 965-971

Cheng HC, Woodward JK (1984) Mouse uterine muscle as a model for studying  $\beta_2$ -adrenoceptor mediated relaxation. J Auton Pharmacol 4: 17-25

Constantine J.W. (1965) The spirally cut tracheal strip preparation. J Pharm Pharmacol 17: 385

Cornish EJ, Goldie RG (1980) Metabolism of [<sup>3</sup>H]-(+)-isoprenaline by isolated atria and coronary arteries of the kitten. Br J Pharmacol 68 : 499-504

Da Prada M, Zürcher G (1976) Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within femtomole range. *Life Science* 19 : 1161-1174

Digges KG (1982) Adrenoceptors in uterus. *J Auton Pharmacol* 2 : 53-67

Draskóczy PR, Trendelenburg U (1970) Intraneuronal and extraneuronal accumulation of sympathomimetic amines in the isolated nictitating membrane of the Cat. *J Pharmacol Exp Ther* 174 : 290-306

Everitt BJ, Cairncross KD (1969) Adrenergic receptors in the guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol* 21 : 97-102

Fiebig ER, Trendelenburg U (1978) The kinetics constants for the extraneuronal uptake and metabolism of  $^3\text{H}(-)$ -noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303: 37-45

Fisher P, Burger A, Graefe KH, Trendelenburg U (1989) The effect of ( $\pm$ )-dobutamine on adrenergic nerve endings. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 339 : 79-84

Fleming W (1975) Supersensitivity in smooth muscle. *Fed Proceedings* 34

Foster RW (1966) The nature of the adrenergic receptors of the trachea of the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol* 18 : 1-12

Foster RW (1967) The potentiation of the responses to noradrenaline and isoprenaline of the guinea-pig isolated tracheal chain preparation by desipramine, cocaine, phentolamine, phenoxibenzamine, guanethidine, metanephrine and cooling. *Br J Pharmacol* 31: 466-482

Foster RW (1969) An uptake of radioactivity from ( $\pm$ )- $^3\text{H}$ -isoprenaline and its inhibition by drugs which potentiate the responses to (-)-isoprenaline in the guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 35 : 418-427

Foster PS, Goldie RG, Paterson JW (1983) Effect of steroids on  $\beta$ -adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br J Pharmacol* 78 : 441-445

Furchgott RF, Sanchez Garcia P (1968) Effects of inhibition of monoamine oxidase on the actions and interactions of norepinephrine, tyramine and other drugs on guinea-pig left atrium. *J Pharmacol Exp Ther* 163: 98-122

Fujiwara M, Tanaka CH, Honjo T, Okegawa T (1965) Histochemical demonstration of noradrenaline in rat salivary glands. *Jap J Pharmacol* 15: 369-377. \*

Garland LG, Marrison NV, Martin GR (1981) The extraneuronal O-methylation of  $^3\text{H}$ -( $\pm$ )-isoprenaline by guinea-pig tracheal rings in vitro. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 318 : 88-93

Garrett J, Branco D (1977) Uptake and metabolism of noradrenaline by the mesenteric arteries of the dog. *Blood Vessels* 14 : 43-54.

Giles ER, Miller JW (1967) The catechol-O-methyl transferase activity, endogenous catecholamine content of various tissues in the Rat and the effect of administration of U-0521 (3',4'-dihydroxy-2-methyl propiophenone). *J Pharmacol Exper Ther* 158: 189-194

Goldie RG, Paterson JW, Wale JL (1982) A comparative study of  $\beta$ -adrenoceptors in human and porcine lung parenchyma strip. *Br J Pharmacol* 76: 532-526

Graefe HK (1981) The disposition of  $^3\text{H}$ -noradrenaline in the perfused cat and rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 318: 71-82

Graefe HK, Trendelenburg U (1974) The effect of hydrocortisone on the sensitivity of isolated nictitating membrane to catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 286: 1-48

Green RD, Miller JW (1965) Evidence for the active transport of epinephrine and norepinephrine by the uterus of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 152: 42-50

Grohmann M, Trendelenburg U (1984) The substrate specificity of uptake<sub>2</sub> in the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328: 164-173

Grohmann M, Trendelenburg U (1985) The handling of five catecholamines by extraneuronal O-methylating system of the rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329: 264-270

Guimarães S, Azevedo I, Cardoso W, Oliveira M C (1975) Relation between the amount of smooth muscle of venous tissue and the degree of supersensitivity to isoprenaline caused by inhibition of catechol-O-methyl transferase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 286: 401-412

Guimarães S, Paiva MQ (1977) Differential influence of block of catechol-O-methyl transferase (COMT) activity and of neuronal uptake on alpha- and beta-adrenergic effects. *J Pharm Pharmacol* 29: 502-503

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

Guimarães S, Paiva MQ (1981) Two distinct adrenoceptor-biophases in the vasculature: one for alpha and other for beta-agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 195-199

Guimarães S, Paiva MQ (1981) Two different biophases for adrenaline released by electrical stimulation or tyramine from the sympathetic nerve endings of dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 200-204

Guimarães S (1982) Two adrenergic biophases in blood vessels *TIPS* 3: 159-161

Guimarães S, Paiva MQ, Moura D (1982) Evidence for the existence of distinct biophases for alfa and beta-adrenoceptors in the vascular tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: S 58-S 62

Guimarães S (1983) The distribution of adrenoceptors in relation to nerve endings and catechol-O-methyl transferase (COMT) in vascular tissue. *Intern Angio* 2: 16-18.

Guimarães S, Paiva MQ (1984) Kinetics of extraneuronal O-methylating systems of the dog saphenous vein. *Neuronal and Extraneuronal Events in Autonomic Pharmacology*, edited by W W Fleming, *et al* Raven Press, New York pp 131-137

Guimarães S (1984) The distribution of alfa and beta-adrenoceptors in relation to nerve endings and catechol-O-methyl transferase. *Intern Angio* 3 : 47-48

Guimarães S, Trendelenburg U (1985) Deviation supersensitivity and inhibition of saturable sites of loss. *TIPS* 6: 371-374

Guimarães S, Paiva MQ, Moura D, Proença J (1985) The saturability of a site of loss and degree of supersensitivity to agonists which are substrates of this site of loss. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329: 30-35

Gulati OD, Sivaramakrishna (1975) Kinetics and some characteristics of uptake of noradrenaline by the human umbilical artery. *Br J Pharmacol* 53 :152-154

Gulberg HC, Marsden CA (1975) Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol Rev* 27: 135-206

Hamberger B, Norberg K-A, Olson L (1967) Extraneuronal binding of catecholamines and 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa). *Acta Physiol Scand* 69 : 1-12

Hawtorn MH, Broadley KJ (1982) Evidence from use of neuronal uptake inhibition that  $\beta_1$ -adrenoceptors, but not  $\beta_2$ -adrenoceptors, are innervated. *J Pharm Pharmacol* 34: 664-666

Head RJ, de la Lande S, Rodney JJ, Johnson SM (1980) Uptake and O-methylation of isoprenaline in the rabbit ear artery. *Blood Vessels* 17: 229-245

Head RJ, Irvine RJ, Barone S Stitzel RE, de la Lande IS (1985) Nonintracellular, cell-associated O-methylation of isoproterenol in the isolated rabbit thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 234 1: 184-189

Henseling M (1984) Stereoselectivity of extraneuronal uptake of catecholamines in rabbit aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328: 219-220

Hertting G, Axelrod J, Whitby G (1961) Effect of drugs on the uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 134: 146-153

Hertting G (1964) The fate of  $^3\text{H}$ -isoproterenol in rat. *Biochem Pharmacol* 13: 1119-1128

Himms-Hagen J (1967) Sympathetic regulation of metabolism. *Pharmacol Rev* 19: 367-461

Iakovidis D, Malta E, Mcpherson GA, Raper C. (1980) In vitro activity of RO363, a  $\beta_1$  adrenoceptor selective agonist. *Br J Pharmacol* 68: 677-685

Iversen LL (1965a) The uptake of adrenaline by rat isolated heart. *Br J Pharmacol* 24: 387-394

Iversen LL (1965b) The uptake of catechol amines at high perfusion concentrations in the rat isolated heart: a novel catecholamine uptake process. *Br J Pharmacol* 25: 18-33

Iversen LL, Salt PJ (1970) Inhibition of catecholamines uptake by steroids in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 40: 528-530

Iversen LL, Salt PJ, Wilson HA (1972) Inhibition of catecholamines uptake in the isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxibenzamine. *Br J Pharmacol* 46: 647-657

Kalsner S (1969) Steroid potentiation of responses to sympathomimetic amines in aortic strips. *Br J Pharmacol* 36 : 582-593

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

Karlsson JA, Persson CGA (1981) Influence of tracheal contraction on relaxant effects in vitro of theophylline and isoprenaline. *Br J Pharmacol* 74 : 73-79

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

Kaumann AJ (1972) Potentiation of the effects of isoprenaline and noradrenaline by hydrocortisone in cat heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 273 : 135-153

Kennedy JA, de la Lande IS, Morris RG (1984) Effect of ovarian steroids on metabolism of noradrenaline in rabbit uterus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326: 132-142

Kennedy J, de la Lande IS (1986) Effect of progesterone on the metabolism of noradrenaline in rabbit uterine endometrium and myometrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333: 368 - 376

Kennedy JA, de la Lande IS (1987) Characteristics of the cocaine-sensitive accumulation and O-methylation of  $^3\text{H}$ (-)-noradrenaline by rabbit endometrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336: 148-154

Kurahashi K, Rawlow A, Trendelenburg U (1980) A mathematical model representing the extraneuronal O-methylating system of the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311: 17-32

Leslie BA, Putney JW Jr., Sherman JM (1976) alpha-adrenergic, beta-adrenergic and cholinergic mechanisms for amylase secretion by rat parotid gland in vitro. *J Physiol* 260: 351-370

Levin JA, Furchgott RF (1970) Interactions between potentiating agents of adrenergic amines in rabbit aortic strips. *J Pharmacol Exp Ther* 172: 320-331

Levin JA, Silson SE (1981) The effects of 6-hydroxydopamine on the disposition of norepinephrine in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 217: 162-169

Levy B, Tozzi A (1963) The adrenergic receptive mechanism of the rat uterus. *J Pharmacol Exp Ther* 142: 178-184

Ludwig J, Grohmann M, Trendelenburg U. (1986) Inhibition by  $\text{K}^+$  of uptake<sub>2</sub> of  $^3\text{H}$ ( $\pm$ )-isoprenaline in the perfused rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 334: 393-396

Lundquist I. (1972) Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation. I Beta-adrenergic blockade. *Eur J Pharmacol* 18: 213-224

Lundquist I (1972) Interaction of amines and aminergic blocking agents with blood glucose regulation. II Alpha-adrenergic blockade. *Eur J Pharmacol* 18: 225-235

Mack F, Bönisch H (1979) Dissociation constants and lipophilicity of catecholamines and related compounds. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 310: 1-9

Magaribuchi T, Hama T, Kurahashi K, Fujiwara M. (1987) Effects of extraneuronal uptake inhibitors on the positive chronotropic response to isoprenaline and on the accumulation of isoprenaline in perfused rat heart after inhibition of catechol-O-methyl transferase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335: 123-128

Major H, Sauerwein I, Graefe K H (1978) Kinetics of the uptake and metabolism of  $^3\text{H}$ -( $\pm$ ) isoprenaline in the rat submaxillary gland. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305 : 51-63

Marsden CA, Broch OJ, Guldberg HC (1971) Catechol-O-methyl transferase and monoamine oxidase activities in rat submaxillary gland: effects of ligation, sympathectomy and some drugs. *Eur J Pharmacol* 15: 335-342

Mireylees SE, Foster RW (1973) 3-Methoxyisoprenaline: a potent selective uptake<sub>2</sub> inhibitor. *J Pharm Pharmacol* 25: 833-835

Michell PD, Smith GW, West PA (1987) Inhibition of uptake<sub>1</sub> by dopexamine hydrochloride (in vitro). *Br J Pharmacol* 92: 265-270

Moratinos J, Olmedilla B, Pablos I, Viguera MD (1984) Alpha-adrenoceptor involvement in catecholamine-induced hyperglycaemia in conscious fasted rabbits. *Br J Pharmacol [Suppl]* 82: 220P

Moratinos J, Carpeno C, Pablos I de, Reverte M (1988) Role of  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the catecholamine induced hyperglycaemia, lipolysis and insulin secretion in conscious fasted rabbits. *Br J Pharmacol* 94: 299-310

Nash C.B, Smith R.D. (1972) Blood sugar responses to epinephrine in the dog in the presence of dual adrenergic blockade. *Eur J Pharmacol* 17: 34-38

Norberg NE, Olson L (1965) Adrenergic innervation of the salivary glands of the rat. *Z Zellforsch* 68: 183-189 \*

O'Donnell SR, Wanstall JC (1967) The contribution of extraneuronal uptake to the trachea-blood vessel selectivity of  $\beta$ -adrenoceptor stimulants "in vitro" in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 57: 369-373

O'Donnell SR, Saar N (1978) The uptake kinetics and metabolism of extraneuronal noradrenaline in guinea-pig trachea as studied with quantitative fluorescence microphotometry. *Br J Pharmacol* 62: 235-239

O'Donnell SR, Persson CGA, Wanstall JC (1978) An "in vitro" comparison of  $\beta$ -adrenoceptor stimulants on potassium-depolarized uterine preparations from guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 62 : 227 -233

O'Donnell SR, Wanstall JC (1979) The importance of choice of agonist in studies designed to predict  $\beta_2$ :  $\beta_1$  adrenoceptor selectivity antagonists from  $pA_2$  values on guinea-pig trachea and atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 308: 183-190

O'Donnell SR, Wanstall JC (1980) Are the  $pA_2$  values of selective  $\beta$ -adrenoceptor antagonists valid when obtained on guinea-pig tracheal preparations contracted with carbachol? *J Pharm Pharmacol* 32: 413-416

O'Donnell SR, Wanstall JC (1983) Relaxation of cat trachea by  $\beta$ -adrenoceptor agonists can be mediated by both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors and potentiated by inhibitors of extraneuronal uptake. *Br J Pharmacol* 78: 417-424

O'Donnell SR, Reid JJ (1984) Kinetics constants of isoprenaline and corticosterone for extraneuronal uptake in different cell types from various tissues. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 325: 54-61

Paiva MQ, Guimarães S (1976) Influence of the blockade of extraneuronal uptake on the affinity of some amines for the adrenergic receptors of guinea pig trachea and atria. *Arch Pharmacol y Toxicol*: 185-192

Paiva MQ, Guimarães S (1978) Comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303: 221-228

Paiva MQ, Guimarães S (1980) The oil immersion technique for studying the disposition of drugs inducing relaxation; influence of U-0521 and hydrocortisone on the disposition of isoprenaline. *J Pharm Pharmacol* 32: 868-869

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

Parker DAS, de la Lande IS, Proctor C, Lam NX, Parker I (1987) Cocaine-sensitive O-methylation of noradrenaline in dental pulp of the rabbit: comparison with the rabbit ear artery. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 335 : 32-39

Peusner ICW, Stefano FJE, Perec CJ (1979) Effects of sympathectomy on the "in vitro" alfa and beta-responses of parotid gland. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 308 : 211-216

Proença J, Paiva MQ,, Guimarães S (1988) The guinea-pig trachea O-methylating system is more effective in modulating  $\beta_2$ -than  $\beta_1$ -adrenoceptor-mediated responses to isoprenaline. J Pharm Pharmacol 40: 76-77

Raxworthy MJ, Gulliver PA, Hughes PJ (1982) The celular localization of catechol-O-methyltransferase in rat liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 320: 182-188

Reid JJ, Stitzel RE, Head RJ (1986) Characterization of the O-methylation of catechol oestrogens by intact rabbit thoracic aorta and subcellular fractions thereof. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 334: 17-28

Robie NW, Nutter DO, Moody C, McNay JL (1974) In vivo analysis of adrenergic receptor activity of dobutamine. Circ Res 34 : 663-671

Roque OLR (1971) Novo critério de apreciação de esfregaços vaginais em ratas castradas, após administração de estrogénios. Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra 31: 128-135

Russel MP, Moran N.C. (1980) Evidence for lack Innervation of  $\beta$ -2 adrenoceptors in the blood vessels of the gracilis muscle of the dog. *Circ Res* 46: 344-352

Salt PJ (1972) Inhibition of noradrenaline uptake<sub>2</sub> in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur J Pharmacol* 20: 329-340

Schömig E, Babin-Ebel J, Schönfeld CL, Russ H, Trendelenburg U (1990) Human caki-1 cells are the firsts model for extraneuronal transport of noradrenaline (uptake<sub>2</sub>) which is based on a clonal cell line. *J Neural Transm [suppl]* 32: 437-440.

Schulz A, Hasselblatt A (1989) An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block alpha-adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 321-327

Steinberg P, Acevedo C, Masana MI, Rubio MC (1988) Uptake and metabolism of <sup>3</sup>H-(±)-noradrenaline in the isolated perfused rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 392-396

Trendelenburg U (1963) Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines *Pharmacol Rev* 15: 225-276.

Trendelenburg U (1966) Mechanisms of supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines *Pharmacol Rev* 18 : 629-640

Trendelenburg U, Höhn D, Graefe HK (1971) The influence of block of catechol-O-methyl transferase on the sensitivity of isolated organs to catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 271: 59-92

Trendelenburg U (1972) Factors influencing the concentration of catecholamines at the receptors. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) Catecholamines. Springer Heidelberg New York (Handbook of Experimental Pharmacology) pp 726-761.

Trendelenburg U, Graefe KH (1975) Supersensitivity to catecholamines after impairment of extraneuronal uptake or catechol-O-methyl transferase. Fed Proc. 34: 1971-1974

Trendelenburg U (1978) Extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines as a site of loss. Life Sci 22: 1217-1222

Trendelenburg U (1979) Release induced by phenethylamines. In: Paton DM (ed) The release of catecholamines from adrenergic neurons - Pergamon, New York, pp 333-351

Trendelenburg U (1980) A kinetic analysis of the extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. Rev Physiol Biochem Pharmacol 87: 33-115

Trendelenburg U (1984) Metabolizing systems neuronal and extraneuronal events in autonomic pharmacology. Ed. WW Fleming *et al.* Raven Press, New York pp 93-109

Trendelenburg U (1985) The outward transport of catecholamines mediated by uptake<sub>2</sub> of the rat heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 330: 203-211

Trendelenburg U (1986) The metabolizing systems involved in the inactivation of catecholamines. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 332: 201-207

Trendelenburg U (1988) The extraneuronal uptake and metabolism of catecholamines. In Trendelenburg U, Weiner N (eds) Catecholamines I. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (Handbook of Experimental Pharmacology) vol 90. pp 279-319.

Tuttle RR, Milles J (1975) Development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility. *Circ Res*, 36 : 185-196

Uhlig W, Bonisch H, Trendelenburg U (1974) The O-methylation of extraneuronally stored isoprenaline in the perfused heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 283: 245-261

Van Phi L, Söling H (1982) Methyl group transfer from exogenous S-adenosine methionine on to plasma-membrane phospholipids without uptake in isolated hepatocytes. *Biochem J* 206: 481-487

Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47 1-9

Wilson VG, Grohmann M., Trendelenburg U (1985) The uptake and O-methylation of <sup>3</sup>H-(+)-isoprenaline in the rat cerebral cortex slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 397-405

Zaagsma J, Heidjen PJCM, Schaar MWG, Bank CMC (1983) Comparison of functional  $\beta$ -adrenoceptor heterogeneity in central and peripheral airway smooth muscle of guinea-pig and man. *J Receptor Res* 3: 89-106

\* Conhecidos por citação