

Nuno Pedro Garcia Fernandes Bento Borges

**INFLUÊNCIAS ADRENÉRGICAS
NO EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO
ESTUDO EXPERIMENTAL**

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

Porto 1994

Nuno Pedro Garcia Fernandes Bento Borges

INFLUÊNCIAS ADRENÉRGICAS
NO EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO
ESTUDO EXPERIMENTAL

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

Porto 1994

Art.º 48º, § 3º

"A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação"

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 19337)

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

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

**CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO**

Professores Efectivos

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

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

Professores Jubilados

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

Aos Professores

Maria Isabel Amorim Azevedo

Walter Friedrich Alfred Osswald

António Carlos Megre Eugénio Sarmiento

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos:

- BORGES N, SHI F, AZEVEDO I, AUDUS KL (1994) Changes in brain microvessel endothelial cell monolayer permeability induced by adrenergic drugs. Aceite para publicação na revista *European Journal of Pharmacology (Molecular Pharmacology Section)*
- BORGES N, SARMENTO A, AZEVEDO I (1994) Dynamics of experimental vasogenic brain edema in the rat: changes induced by adrenergic drugs. Submetido para publicação na revista *Acta Neuropathologica (Berlin)*
- BORGES N, SARMENTO A, AZEVEDO I (1994) Adrenergic influences in brain edema formation and resolution. *J Auton Pharmacol* (abst.) 14:13
- BORGES N, AZEVEDO I, SHI F, AUDUS KL (1994) Adrenergic modulation of sodium fluorescein transport across bovine brain microvessel endothelial cells. *Br J Pharmacol* (abst.) (submetido)

O trabalho experimental que consta desta dissertação de doutoramento foi iniciado em Janeiro de 1991, altura em que me foi atribuída uma Bolsa de Estudo com essa finalidade. Foi, no entanto, em 1989, ano do meu ingresso no então denominado Laboratório de Farmacologia, que comecei a dar os primeiros passos na investigação científica, trazendo na bagagem pouco mais do que uma grande vontade em fazer algo que sempre exerceu sobre mim um fascínio muito especial. A alegria que senti no dia em que iniciei aí o meu trabalho foi, por isso, enorme e apenas o receio de não corresponder aos que em mim confiaram me causava alguma preocupação. Essa alegria inicial, quase infantil, foi sendo progressivamente substituída por outra, quiçá ainda maior e certamente mais adulta. De facto, poder conviver diariamente num local que podemos considerar como uma verdadeira Escola, onde, de forma sabiamente cultivada ao longo de muitos anos, a actividade científica encontra igual excelência no relacionamento entre os seus membros, é para mim uma honra e uma felicidade todos os dias renovada.

O meu interesse pelos mecanismos adrenérgicos centrais e suas influências na barreira hematoencefálica resultou da colaboração inicial com o Prof. Doutor António Sarmento, na altura a concluir o trabalho experimental que conduziu à sua dissertação de doutoramento. Logo aqui fui bafejado pela sorte, pois não só me foi dado a conhecer um tema que considero apaixonante, como as pessoas que mais directamente vieram a estar envolvidas na minha própria dissertação, os Profs Doutores António Sarmento, Isabel Azevedo e Walter Osswald. A eles devo tudo o que de bom poderá ter o trabalho que realizei ao longo destes anos.

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para a minha orientadora, Prof. Doutora Isabel Azevedo. Não imagino poder ter contado com melhor orientador ou com melhor orientação. O encanto que consegue transmitir à investigação científica, a sua sensatez e o seu carácter são algumas das suas muitas qualidades, que se traduziram sempre num profundo interesse por todos os assuntos relativos ao meu trabalho. O cunho da sua invulgar inteligência é facilmente reconhecível em muitas das hipóteses que levantei nesta dissertação. Não esquecerei ainda a confiança que sempre me incutiu nos inevitáveis momentos de desalento.

Agradecer, por palavras, ao Prof. Doutor Walter Osswald é para mim uma tarefa ingrata, pois estou certo que nunca o conseguirei fazer condignamente. Conviver com alguém com tão superior formação científica e humanística é um raro privilégio; ser distinguido pela sua amizade franca e leal, pelo seu

encorajamento sincero e oportuno ou pelas suas críticas sensatas e rigorosas é uma grande honra e motivo de uma imensa gratidão.

Este trabalho seria bastante pior, ou não existiria mesmo, sem o permanente acompanhamento com que fui distinguido pelo Prof. Doutor António Sarmento. Mas, mais importante ainda, estou certo que o longo convívio que me proporcionou todos estes anos fizeram de mim uma pessoa melhor. Creio ser este o melhor agradecimento a tão grande Amigo.

A estas três pessoas tão notáveis, que tanto me melhoraram e a quem tanto devo, muitos outros encómos se aplicariam com justiça. Opto, porém, por lhes seguir o exemplo da simplicidade e da discrição, esperando poder continuar a agradecer-lhes por atitudes ao longo da minha vida.

Como já referi, o hoje chamado Instituto de Farmacologia e Terapêutica é um local de trabalho onde tive a felicidade de encontrar pessoas excepcionais, que orgulhosamente considero meus amigos.

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Serafim Guimarães a possibilidade que me deu de poder conviver com um verdadeiro Mestre de Farmacologia, bem como a amizade com que sempre me distinguiu.

Aos Prof. Doutores Eduardo Rodrigues Pereira, Jorge Tavares e Fernando Brandão agradeço os muitos ensinamentos recebidos, que tanto contribuíram para a minha formação científica e humana.

Ao Prof. Doutor Patrício Soares-da-Silva um muito obrigado pela disponibilidade com que sempre me ouviu e pela honra que me concedeu ao convidar-me para colaboração em trabalhos científicos. A ele também devo o ter-me proporcionado uma experiência pedagógica.

Ao Prof. Doutor Daniel Moura uma palavra de grande apreço pelo exemplo de devoção à ciência, pela ilimitada paciência em discutir com tão ignorante candidato a "Farmacologista" e ainda pelos preciosos ensinamentos de estatística.

Ao Prof. Doutor Jorge Polónia agradeço a sua amizade e superior orientação científica, frutos de um trato agradável e de uma inteligência arguta.

O excelente ambiente do Instituto deve-se também à colaboração, amizade e espírito de entreatajuda do Prof. António Albino-Teixeira, da Doutora Maria Quitéria Paiva e dos Drs. Alberto Mota, Alexandra Matias, Augusta Vieira Coelho, Domingos Araújo, Fátima Martel, Manuel Pestana, Manuel Vaz da Silva, Pedro Nunes, Perpétua Pinto-do-Ó, Rosa Begonha, Sofia Magina e Tiago Guimarães.

Gostaria de salientar o meu agradecimento à Dr^a Alexandra Matias pela amizade de há longos anos e que um dia motivou a minha entrada neste Instituto e à Dr^a Fátima Martel, pelo enriquecedor convívio que me proporcionou.

Do Instituto de Farmacologia e Terapêutica fazem parte outras pessoas cujo correcto desempenho das suas funções em muito contribuiu para este trabalho e a quem não posso deixar de agradecer.

Gostaria de destacar a Sr^a D. Luisa Vasques, amiga do primeiro dia, a cujo bom gosto se deve os desenhos constantes nesta dissertação. A sua total disponibilidade e entusiasmo para auxiliar no trabalho experimental bem como a preciosa ajuda na obtenção das fotografias de microscopia óptica e electrónica, são alguns dos motivos para este sincero agradecimento.

À Sr^a D. Manuela Moura e à Eng^a Paula Serrão agradeço o competente auxílio técnico e a amizade sempre presente.

Encontrei na Sr^a D. Aida Santos, na Sr^a D. Fernanda Melo Adrião e no Sr. José Martins o auxílio sempre pronto no trabalho de secretariado, que muito agradeço. Na preparação dos animais de experiência, contei sempre com a ajuda dos Srs Aldovino Sousa e Abílio Nunes, e para as Sras D. Mabilde Gomes, Deolinda Ramos e Conceição Martins vai também o meu obrigado.

As experiências efectuadas com o modelo *in vitro* foram inteiramente realizadas no Departamento de Química Farmacêutica da Universidade do Kansas, sob a orientação do Prof. Doutor Kenneth Audus. A ele muito agradeço a forma desinteressada como me abriu as portas do seu Laboratório bem como a óptima orientação científica. Ainda deste Departamento, gostaria de agradecer à Dr^a Fenglin Shi, que me ensinou de forma competente (e sobretudo paciente!) as para mim desconhecidas e quase misteriosas técnicas de isolamento, cultura e utilização de células.

Gostaria ainda de agradecer ao Prof. Doutor Norberto Teixeira Santos pelo encorajamento e confiança que em mim depositou.

Para o Dr. José Fernandes vai um agradecimento muito especial, pela amizade de sempre e pelo exemplo de competência.

A ajuda material que me permitiu a necessária disponibilidade para elaborar este trabalho foi-me concedida pela Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, a quem dirijo o meu agradecimento. Gostaria de destacar a forma sempre pronta e competente com que fui atendido e ainda as ajudas adicionais que me foram concedidas para uma deslocação a Amesterdão e para a minha estadia nos Estados Unidos da América.

Por fim, dedico esta dissertação aos meus Pais, aos meus Irmãos e à Susana, pela vida tão feliz que me proporcionaram.

I - INTRODUÇÃO	17
II - MATERIAL E MÉTODOS	23
1. MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO INDUZIDO PELO FRIO	23
1.1. Avaliação do edema cerebral	24
1.1.1. Medição do conteúdo de água cerebral	24
1.1.2. Doseamento do azul de Evans	25
1.2. Estudo das acções de alguns fármacos no edema cerebral vasogénico induzido pelo frio	26
1.2.1. Estudo das acções de alguns fármacos no conteúdo de água cerebral	26
1.2.2. Estudo das acções de alguns fármacos no conteúdo de azul de Evans	27
1.3. Injecção estereotáxica intracerebroventricular	28
1.4. Estudo morfológico	28
1.4.1. Estudo morfológico das acções de alguns fármacos	29
2. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CAPILARES CEREBRAIS CULTIVADAS EM MONOCAMADA POLARIZADA	29
2.1. Isolamento de células endoteliais de capilares cerebrais	30
2.2. Cultura em monocamada polarizada de células endoteliais de capilares cerebrais	31
2.3. Estudo do transporte de fluoresceína sódica através de monocamadas polarizadas de células endoteliais de capilares cerebrais	32
2.3.1. Estudo das acções de alguns fármacos no transporte de fluoresceína sódica através de monocamadas polarizadas de células endoteliais de capilares cerebrais	34
2.3.2. Doseamento da fluoresceína sódica	35
2.3.3. Método de apresentação de resultados	36
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	37
4. FÁRMACOS E OUTRAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADOS	37
III - RESULTADOS	39
1. MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO INDUZIDO PELO FRIO	39
1.1. Conteúdo de água cerebral ao longo do tempo	39
1.2. Efeitos dos fármacos no conteúdo de água cerebral	40
1.2.1. Fenoxibenzamina	41
1.2.2. Clenbuterol	41

1.2.3. Isoprenalina	42
1.2.4. Dexametasona	42
1.2.5. Vimblastina	42
1.3. Conteúdo do azul de Evans ao longo do tempo	42
1.4. Efeitos dos fármacos no conteúdo de azul de Evans	44
1.4.1. Fenoxibenzamina	45
1.4.2. Clenbuterol	45
1.4.3. Isoprenalina	46
1.4.4. Dexametasona	47
1.4.5. Vimblastina	47
1.5. Estudo morfológico por microscopia óptica e ultraestrutural	47
1.5.1. Animais controlo: hemisfério direito e esquerdo	48
1.5.2. Efeitos dos fármacos	48
1.6. Avaliação semi-quantitativa do edema e actividade pinocitótica nos capilares cerebrais	54
2. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CAPILARES CEREBRAIS CULTIVADAS EM MONOCAMADA POLARIZADA	55
2.1. Isolamento e cultura de células endoteliais de capilares cerebrais	56
2.2. Transporte da fluoresceína sódica através das monocamadas polarizadas de células endoteliais	57
2.2.1. Transporte no sentido apical-basal	57
2.2.2. Efeitos dos fármacos	57
2.2.2.1. Noradrenalina	58
2.2.2.2. Adrenalina	58
2.2.2.3. Fenilefrina	59
2.2.2.4. Clenbuterol	59
2.2.2.5. Vincristina	59
2.2.2.6. Efeito da omissão da glicose	59
2.2.3. Transporte no sentido basal-apical	60
2.2.4. Efeitos dos fármacos	61
2.2.4.1. Noradrenalina	61
2.2.4.2. Adrenalina	61
2.2.4.3. Clenbuterol	61
IV - DISCUSSÃO	63
V - COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES	85
VI - RESUMO	89
VII - SUMMARY	93
VIII - BIBLIOGRAFIA	97

I - INTRODUÇÃO

Remonta aos primórdios da moderna Neurologia o reconhecimento da existência do edema cerebral como uma complicação capaz de agravar processos patológicos primários.

Foi desde logo constatado que o edema cerebral parecia não ser igual em todas as situações patológicas que o causavam, tendo REICHARDT (1905) proposto a primeira classificação de edema cerebral, distinguindo-o em *Hirnödem* (edema cerebral) e *Hirnschwellung* (turgescência ou "inchaço" cerebral). A esta primeira tentativa de classificação, baseada no aspecto da superfície cerebral na autópsia, seguiram-se outras mais adequadas, inevitável consequência dos prodigiosos avanços científicos e tecnológicos do nosso século (ver KLATZO 1994).

Parece hoje consensual classificar o edema cerebral em três tipos fundamentais: o edema vasogénico, o edema citotóxico e o edema intersticial (KLATZO 1967, BETZ *et al.* 1989, MILHORAT 1992, KLATZO 1994). Esta distinção é feita com base na origem do excesso de fluido no tecido cerebral: assim, enquanto o edema citotóxico resulta de uma captação anormal de água (do fluido extracelular) por células cerebrais, o edema vasogénico está associado a uma disfunção da barreira hematoencefálica, com conseqüente aumento da passagem de água e proteínas de origem plasmática para o tecido cerebral. O edema intersticial é resultante de uma drenagem insuficiente do líquido cefalorraquidiano (por obstrução mecânica), o que se traduz num aumento da pressão nos ventrículos cerebrais e posterior extravasamento de água para o parênquima cerebral.

Foram muitos os trabalhos que confirmaram a origem plasmática do excesso de fluido no tecido cerebral, quer em modelos experimentais quer em doentes cujas patologias se associavam à existência de edema cerebral, entre as quais a isquemia cerebral, traumatismos crânio-encefálicos, processos inflamatórios e infecciosos, tumores cerebrais, convulsões e hipertensão arterial (ver BETZ *et al.* 1989). Deles se concluiu que a formação de edema resultava de um "insulto" às células endoteliais dos capilares cerebrais, fazendo-as perder as suas características de permeabilidade altamente selectiva, permitindo assim uma passagem anormalmente elevada de água e solutos para o parênquima cerebral.

A tentativa de caracterização do referido "insulto", ou seja, quais os processos envolvidos na perda de funções da barreira hematoencefálica, tem fornecido importante manancial bibliográfico. Se é verdade que já foi possível descobrir alguns dos mecanismos implicados no controle do transporte de substâncias na interface cérebro-sangue, o mau prognóstico frequentemente associado a edema

cerebral, fruto da inexistência de terapias eficazes, relembra-nos constantemente o muito que ainda há por esclarecer sobre este assunto.

Não foi, obviamente, nosso objectivo ao elaborar este trabalho tentar descobrir uma terapêutica "universal" para o edema cerebral, nem tão pouco uma terapêutica sequer. Pretendemos apenas caracterizar um dos mecanismos que julgámos à partida poder ter alguma importância no desenvolvimento dos processos patológicos conducentes à formação e/ou resolução do edema cerebral.

A hipótese de que os neurónios adrenérgicos de origem central pudessem de alguma forma modular as características de permeabilidade da barreira hematoencefálica em situações de edema cerebral vasogénico surgiu da constatação de alguns dados da nossa experiência e da de outros, dados esses que passamos a enumerar:

- 1 - Foi possível demonstrar que quer a administração de fármacos com acção sobre receptores adrenérgicos quer a estimulação ou destruição de neurónios adrenérgicos centrais (com origem no núcleo *locus coeruleus*, RENNELS e NELSON 1975) podem modificar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (RAICHLE *et al.* 1975, SARMENTO *et al.* 1990, 1991, 1994);
- 2 - Foi igualmente demonstrada a existência de adrenoceptores alfa e beta nas células endoteliais dos capilares cerebrais (PEROUTKA *et al.* 1980, KARNUSHINA *et al.* 1982, HERBST *et al.* 1979, NATHANSON e GLASER 1979, KOBAYASHI *et al.* 1981a,b), bem como de terminais adrenérgicos em íntimo contacto com células endoteliais dos capilares cerebrais (HARTMAN 1973, EDVINSSON *et al.* 1973);
- 3 - Alguns autores verificaram que situações que cursam normalmente com a presença de edema cerebral se acompanham de alterações no *turnover* da noradrenalina no cérebro (MEYER *et al.* 1974, PAUSESCU *et al.* 1970, 1973, HARIK *et al.* 1982, INOUE *et al.* 1991).

Pareceram-nos assim reunidas algumas importantes premissas necessárias para justificar o nosso estudo.

Pretendemos que os modelos experimentais a utilizar fossem não só o mais representativos possível do problema que nos propusemos estudar (o edema cerebral vasogénico) como também que a sua utilização fosse o mais consensual possível.

O modelo de edema cerebral vasogénico induzido pelo frio, inicialmente descrito por KLATZO *et al.* (1958) e LUSE e HARRIS (1960), tem sido amplamente utilizado por vários autores na tentativa de esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos implicados na formação e na resolução deste tipo de edema. Em 1967, KLATZO *et al.* esclareceram alguns mecanismos básicos da progressão do excesso de fluido através do parênquima cerebral e posteriormente foi descoberta a importância da presença de proteínas no líquido extravasado para a formação do edema (KUROIWA *et al.* 1985). Com a utilização da microscopia electrónica associada a técnicas de citoquímica e imuno-histoquímica, VORBRÖDT *et al.* (1985) procederam a um estudo exaustivo da morfologia das células endoteliais dos capilares cerebrais, mostrando que, neste modelo, a formação de edema se acompanha de aumento marcado da actividade vesicular e de alteração das características de polaridade enzimática dessas células. É hoje considerado como um modelo que, na prática, exhibe exclusivamente a componente vasogénica do edema cerebral.

Escolhemos assim este modelo para avaliarmos as possíveis influências adrenérgicas na formação e resolução do edema cerebral vasogénico, utilizando como animal de experiência o Rato.

A escolha da forma de medição do edema cerebral, definido por KLATZO (1994) como sendo "...uma acumulação anormal de fluido dentro do parênquima cerebral, que produz um aumento volumétrico do tecido cerebral", recaiu sobre duas técnicas: a primeira decorre da própria definição e consiste na medição do conteúdo de água no tecido cerebral; a segunda avalia o transporte de um marcador (azul de Evans) do sangue para o mesmo tecido, marcador esse que, pelas suas características, funciona como um índice de passagem de proteínas plasmáticas para o cérebro.

A conjugação destas duas formas de avaliação permite obter conclusões mais seguras quer quanto à origem plasmática do excesso de água no parênquima cerebral quer quanto às influências dos fármacos que pretendemos estudar sobre a formação/resolução do edema. A utilização de um marcador de elevado peso molecular (como é o complexo azul de Evans/proteínas) permite-nos ainda afirmar com razoável segurança que no endotélio capilar é a pinocitose o mecanismo responsável por eventuais alterações no transporte desse marcador.

O envolvimento do transporte vesicular no desenvolvimento do edema cerebral vasogénico e nas possíveis influências dos fármacos com acção adrenérgica foi um assunto que desde o início pretendemos estudar. Como já foi referido, estão descritas alterações da actividade pinocitótica nas células endoteliais dos capilares

cerebrais em modelos de edema cerebral induzido pelo frio (BODSCH *et al.* 1982, VORBRDIT *et al.* 1985, TROUT *et al.* 1986), contrastando com o baixíssimo número de vesículas observadas em condições normais (CERVÓS-NAVARRO 1963, REESE e KARNOVSKY 1967, GOLDSTEIN e BETZ 1986, CERVÓS-NAVARRO *et al.* 1988). A possibilidade das catecolaminas exercerem acções sobre a actividade pinocitótica havia sido já descrita por AZEVEDO *et al.* (1984) em células endoteliais vasculares periféricas. SARMENTO *et al.* (1988, 1990, 1991) mostraram que este tipo de acções pode também ocorrer na barreira hematoencefálica.

Deste modo, decidimos fazer um estudo morfológico, com recurso à microscopia electrónica, no tecido cerebral sujeito à aplicação de frio, na tentativa de melhor esclarecermos o papel da pinocitose quer na formação quer na resolução do edema, bem como as influências dos fármacos a esse nível.

Pretendemos que os fármacos a utilizar possuíssem não só a maior selectividade possível para o(s) receptor(es) que queríamos estudar, como também que fossem fármacos com facilidade de penetração no sistema nervoso central, de modo a que a sua administração por via sistémica permitisse o acesso do fármaco ao lado abluminal do capilar, onde parecem estar localizados os receptores adrenérgicos.

Não obstante dispormos da técnica de administração intracerebroventricular, esta via implica um trauma adicional para o animal, pelo que passaríamos a ter provavelmente um edema de etiologia mista, que não nos interessava. Apenas para um antagonista dos adrenoceptores alfa não encontramos um fármaco que preenchesse aqueles dois requisitos. Desta forma, optámos pela fenoxibenzamina, fármaco com outras acções além da que pretendíamos estudar (antagonismo alfa) mas com grande penetração no sistema nervoso central quando administrado por via intraperitoneal. Sacrificámos desta forma a selectividade em favor da possibilidade de compararmos os resultados obtidos com os outros fármacos administrados pela mesma via.

Conscientes das limitações desta opção, bem como do facto de um modelo *in vivo*, como o que pretendemos utilizar, tornar extremamente moroso um estudo exaustivo de vários fármacos e várias doses, procurámos um outro modelo que pudesse completar as informações obtidas *in vivo*, esclarecendo algumas questões deixadas em aberto.

O modelo *in vitro* de células endoteliais de capilares cerebrais cultivadas em monocamada polarizada possui características que o tornam especialmente adequado para estudo do transporte através da barreira hematoencefálica. Este modelo, inicialmente descrito por BOWMAN *et al.* (1981), foi posteriormente desenvolvido por AUDUS e BORCHARDT (1986a,b, 1987) de forma a permitir o estudo

do transporte de marcadores através da monocamada polarizada de células endoteliais dos capilares cerebrais. Esta metodologia permite a utilização de fármacos independentemente das suas características de solubilidade e capacidade de atravessar membranas biológicas (inexistência de variáveis farmacocinéticas), a utilização de concentrações conhecidas em qualquer das faces da monocamada e o estudo do transporte de substâncias num ou noutro sentido (apical-basal ou vice-versa) de forma independente. Poderemos, desta forma, atribuir as acções dos fármacos a estudar à sua capacidade de modular as funções da célula endotelial capilar, substrato anatómico e funcional da barreira hematoencefálica. As características de selectividade da monocamada à passagem de vários marcadores e substâncias são muito semelhantes às observadas na barreira hematoencefálica *in vivo*.

Sendo, como já foi referido, o edema cerebral vasogénico resultante de uma disfunção da barreira hematoencefálica, julgamos que a utilização deste modelo se revela útil especialmente para uma melhor caracterização das acções de fármacos que *in vivo* demonstraram poder alterar o curso do desenvolvimento do edema cerebral.

Creemos que a utilização conjunta de um modelo *in vivo*, bastante aproximado do edema cerebral que ocorre em algumas patologias mas com as dificuldades da existência de um sem-número de variáveis de difícil controlo, e de um modelo *in vitro* que permite um mais rigoroso estudo farmacológico mas que se encontra distante de qualquer situação patológica, pode fornecer um conjunto de resultados cuja complementaridade tornará mais sólidas as conclusões que deles inferiremos.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO INDUZIDO PELO FRIO

Neste modelo, utilizou-se na totalidade das experiências o Rato Wistar, macho (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal), com peso compreendido entre 280 e 320g. O acondicionamento dos animais foi feito conforme as normas estabelecidas pela Directiva 86/609/CEE do Conselho.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/kg, administrado por via intraperitoneal.

A aplicação do frio ao cérebro dos animais foi feita da forma que a seguir se descreve.

O animal anestesiado foi colocado numa mesa de estereotaxia (David Kopf Instruments, E.U.A.). Após este procedimento foi feita uma incisão no escalpe, com cerca de 2 cm, no sentido rostro-caudal de modo a expôr a superfície do crâneo. Uma vez exposta, foi feita, na superfície direita do crâneo, a marcação de um ponto com as seguintes coordenadas, obtidas do atlas de estereotaxia de PAXINOS e WATSON (1986): lateromedial -5mm e rostrocaudal +5mm (Fig 1).

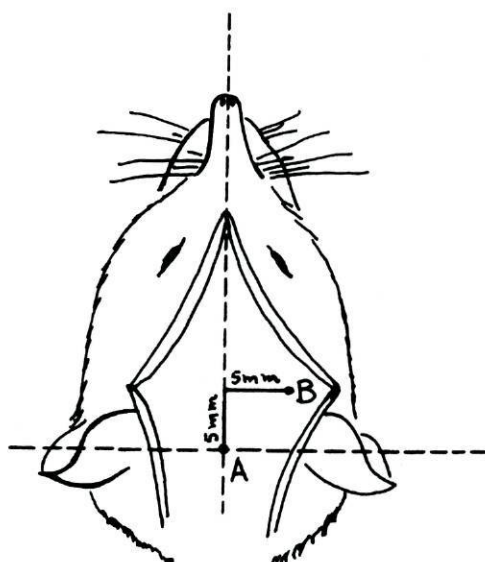


Figura 1 - Ponto de aplicação da peça metálica arrefecida (B). Este ponto dista 5mm no sentido antero-posterior e 5mm no sentido latero-medial do ponto de referência (A).

A este ponto da calote foi encostada, durante um minuto, uma peça metálica, com uma superfície de contacto de 2mm², previamente arrefecida por imersão em azoto líquido (-192 °C).

1.1. Avaliação do edema cerebral

Avaliou-se quantitativamente o edema cerebral por dois métodos diferentes: medição do conteúdo de água e do conteúdo de azul de Evans no córtex cerebral.

A adequação de qualquer um destes métodos ao estudo do edema cerebral vasogénico será debatida no capítulo da discussão.

1.1.1. Medição do conteúdo de água cerebral

Determinou-se o conteúdo de água em fragmentos de córtex cerebral direito e esquerdo 5, 30, 60, 120 e 180 minutos e 24 horas após aplicação do frio. Sob anestesia, os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros imediatamente retirados. Utilizando um bisturi, obteve-se dois fragmentos de córtex parietal, um do lado direito (lado de aplicação do frio) e outro do lado esquerdo.

De igual modo, estudou-se o conteúdo de água no hemisfério esquerdo e direito de animais não submetidos a aplicação de frio (protocolo idêntico ao da aplicação do frio com a excepção da peça metálica não se encontrar arrefecida).

Na Figura 2 encontram-se esquematicamente representados os cortes efectuados para obtenção dos fragmentos.

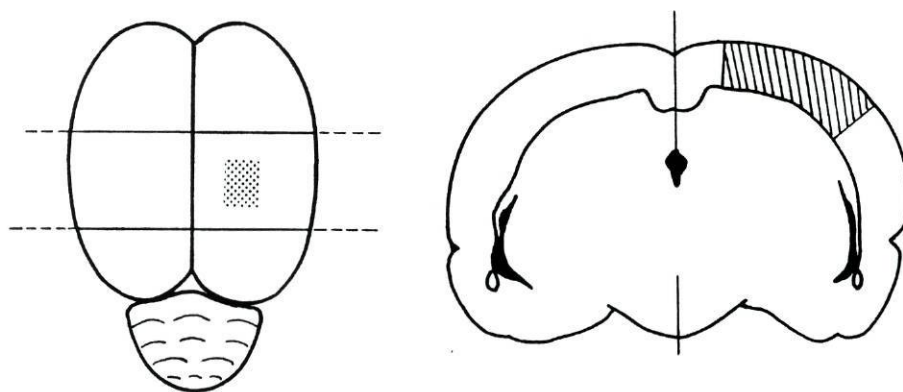


Figura 2 - Representação esquemática dos cortes efectuados para obtenção dos fragmentos de córtex parietal. Estes cortes foram utilizados para medição do conteúdo de água, do conteúdo de azul de Evans ou para o estudo morfológico.

A determinação do conteúdo de água no tecido cerebral foi feita pelo método de secagem (STEWART-WALLACE, 1939). Imediatamente após a sua obtenção, estes fragmentos foram pesados e colocados numa estufa à temperatura de 90 °C durante 72 horas para evaporação da água. No final deste período, os fragmentos foram de novo pesados. O valor da percentagem de água no tecido foi determinado pela fórmula:

$$\left(1 - \frac{\text{peso após secagem}}{\text{peso antes de secagem}} \right) \times 100\%$$

1.1.2. Doseamento do azul de Evans

Determinou-se os teores de azul de Evans em fragmentos de córtex parietal e em amostras de sangue 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a aplicação de frio. Tal como para o conteúdo de água, foi também estudado um grupo de animais não submetidos a aplicação de frio (protocolo idêntico ao da aplicação do frio com a excepção da peça metálica não se encontrar arrefecida).

No animal anestesiado foi injectada na veia jugular externa esquerda 1 hora antes da aplicação do frio uma dose de 100 mg/kg de azul de Evans (5 ml/kg de uma solução de azul de Evans a 2% (peso/volume)). Um minuto antes do sacrifício do animal, sob anestesia, foi recolhida uma amostra de sangue da veia jugular externa direita. Completada esta operação, foi feita uma lavagem do compartimento intravascular cerebral com 50 ml de uma solução de cloreto de sódio a 0,9%, a uma pressão de 110 mmHg, através de uma cânula inserida na artéria aorta. Após a lavagem, o cérebro foi imediatamente retirado e obteve-se dois fragmentos, um do córtex parietal direito (lado da aplicação do frio) e outro do lado esquerdo, seguindo o esquema aplicado para o doseamento do conteúdo de água (ver 1.1.1.). Após a sua obtenção, os fragmentos obtidos foram imediatamente pesados.

O doseamento do azul de Evans nas amostras de sangue e nos fragmentos de córtex parietal fez-se por espectrofotofluorimetria, segundo o protocolo de UYAMA *et al.* (1988).

Os fragmentos de córtex parietal foram homogeneizados em 2 ml de uma solução de ácido tricloroacético a 50% (peso/volume). As amostras de sangue foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200xg e do sobrenadante foram retirados 100 µl que foram posteriormente diluídos em 2 ml de ácido tricloroacético a 50% (peso/volume). As amostras assim obtidas e os homogeneizados de córtex parietal foram centrifugados durante 20 minutos a

12500xg. De cada um dos sobrenadantes retirou-se 1 ml, que foi diluído em 3 ml de etanol absoluto. Nestas amostras doseou-se o azul de Evans, utilizando um espectrofotofluorímetro Aminco Bowman, American Instrument Co., Inc. (E.U.A.). Os comprimentos de onda utilizados foram de 620 nm para a excitação e de 680 nm para a emissão.

Os valores das concentrações de azul de Evans nas amostras foram calculados através de interpolação gráfica na recta padrão, recta esta obtida com amostras de concentração conhecida.

Este protocolo de doseamento dispensou a correcção do valor do ensaio a branco, dado este ser nulo nas nossas condições.

1.2. Estudo das acções de alguns fármacos no edema cerebral vasogénico induzido pelo frio

Estudou-se o efeito de diversos fármacos sobre o edema cerebral vasogénico induzido pelo frio pelos dois processos acima descritos, *i.e.*, conteúdo de água, e conteúdo de azul de Evans.

1.2.1. Estudo das acções de alguns fármacos no conteúdo de água cerebral

Estudou-se os efeitos dos fármacos apresentados na Tabela 1, sobre o conteúdo de água cerebral. A observação foi feita duas horas após aplicação do frio. Desta tabela constam ainda as doses utilizadas, a via de administração e o tempo, antes da aplicação do frio, em que foram administrados.

Tabela 1 - Fármacos utilizados no estudo do conteúdo de água cerebral e suas doses, vias e tempos de administração.

<i>Fármaco</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de administração</i>	<i>Tempo antes da aplicação de frio</i>
Fenoxibenzamina	10 mg/kg	intraperitoneal	24 horas
Clembuterol	1 mg/kg	intraperitoneal	15 minutos
Timolol	1 mg/kg	intraperitoneal	1 hora
Isoprenalina	0,25 mg/kg	intraperitoneal	15 minutos
Dexametasona	2,5 mg/kg	endovenosa	1 hora
Vimblastina	0,8 mg/kg	endovenosa	48 horas

Estudou-se ainda o efeito de uma dose de 1 mg/kg de clembuterol, administrado por via intraperitoneal, duas horas após aplicação do frio. Após administração do

fármaco, os animais esperou-se uma hora, ao fim da qual os animais foram sacrificados.

Todos os fármacos referidos foram dissolvidos numa solução de cloreto de sódio a 0,9%.

1.2.2. Estudo das acções de alguns fármacos no conteúdo de azul de Evans

Utilizando como modelo de avaliação de edema cerebral o doseamento de azul de Evans no tecido cerebral (córtex parietal), estudou-se os efeitos dos fármacos apresentados na Tabela 2. Desta tabela constam ainda as doses utilizadas, a via de administração e o tempo, antes da aplicação do frio, em que foram administrados. A observação foi feita duas horas após aplicação do frio.

Tabela 2 - Fármacos utilizados no estudo do conteúdo de azul de Evans e suas doses, vias e tempos de administração.

<i>Fármaco</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de administração</i>	<i>Tempo antes da aplicação de frio</i>
Fenoxibenzamina	10 mg/kg	intraperitoneal	24 horas
Clembuterol	1 mg/kg	intraperitoneal	15 minutos
Timolol	1 mg/kg	intraperitoneal	1 hora
Metoprolol	10 mg/kg	intraperitoneal	1 hora
Isoprenalina	0,25 mg/kg	intraperitoneal	15 minutos
Dexametasona	2,5 mg/kg	endovenosa	1 hora
Vimblastina	0,8 mg/kg	endovenosa	48 horas

Estudou-se também o efeito do clembuterol (1 mg/kg, intraperitoneal) administrado 2 horas após aplicação do frio. Após administração do fármaco, esperou-se 1 hora, ao fim da qual os animais foram sacrificados.

Estudou-se ainda o efeito da isoprenalina (100 µg em 10 µl), administrada por via intracerebroventricular (ver 1.3., injeção estereotáxica intracerebroventricular) no ventrículo cerebral lateral esquerdo, 10 minutos antes da aplicação do frio. Após a aplicação do frio, esperou-se 1 hora, ao fim da qual os animais foram sacrificados. Os resultados são apresentados em taxa de extracção, valor este obtido pela fórmula:

$$\frac{\mu\text{g} / \text{g azul de Evans no cérebro}}{\mu\text{g} / \text{ml de azul de Evans no sangue}} \times 100\%$$

1.3. Injecção estereotáxica intracerebroventricular

Para o estudo dos efeitos da isoprenalina, molécula que pelas suas características não atravessa a barreira hematoencefálica, procedemos à sua administração no ventrículo cerebral lateral esquerdo. Para tal, utilizou-se uma mesa de estereotaxia David Kopf Instruments (E.U.A.). Após colocação do animal na mesa de estereotaxia, procedeu-se à abertura de um orifício no crâneo, com recurso a uma broca de dentista, tendo sempre o cuidado de não atingir com a broca a *dura mater*, de forma a não danificar o parênquima cerebral. A isoprenalina, ou igual volume de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% no caso dos animais controlo, foi então injectada no ventrículo cerebral lateral esquerdo utilizando as seguintes coordenadas: dorsoventral +6,4 mm, lateromedial + 1,4 mm e rostrocaudal +8,2 mm. Estas coordenadas foram obtidas do atlas de estereotaxia de PAXINOS e WATSON (1986).

1.4. Estudo morfológico

Foi efectuado um estudo morfológico de luz e ultrastrutural, do córtex parietal, quer do lado direito (lado da aplicação do frio) quer do lado esquerdo, em animais nos quais foi induzido edema cerebral vasogénico pelo frio.

O protocolo de aplicação do frio foi idêntico ao já referido anteriormente (Ver 1. Modelo de edema cerebral vasogénico induzido pelo frio).

Duas horas após aplicação do frio, foi feita uma toracotomia, inserida uma cânula na artéria aorta e iniciada uma perfusão do compartimento intravascular cerebral com 500 ml de fixador de Karnovsky (1,25% de glutaraldeído e 1% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,12M, pH 7,4, KARNOVSKY 1965), a uma pressão de 110 mmHg. No fim desta, foi retirado o cérebro e obtidos fragmentos de córtex parietal direito e esquerdo, conforme descrito na Figura 2. Estes fragmentos foram cortados em fragmentos mais pequenos (cerca de 1 mm³) e imersos durante 120 minutos em fixador de Karnovsky. Após esta imersão, os fragmentos de córtex foram lavados por 4 mudanças (a 7 minutos de intervalo) com soluções frescas do mesmo tampão adicionado de sacarose (0,6 M), pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,3, a 4 °C, durante 2 horas, desidratados por passagem por soluções de etanol progressivamente mais concentradas, passados por óxido de propileno e incluídos em Epon 812 (AZEVEDO *et al.* 1981).

Cortes semi-finos (1 μm), preparados num ultramicrotomo Ultrotome III (LKB, Suécia) e corados com azul de toluidina (1%) em borax (1%), foram observados num microscópio óptico Leitz Laborlux K (Portugal).

Cortes ultrafinos (600 a 700 Å), preparados no mesmo ultramicrotomo e corados com acetato de uranilo (2%) e citrato de chumbo (2,6%), foram observados num microscópio electrónico Jeol JEM 100 cxII (a 80 kV). Todos os capilares observados foram fotografados a uma ampliação constante (x8000). Preparou-se provas em papel (ampliação final de x24000) às quais foi atribuído um número de código. Estas provas foram analisadas para avaliação semi-quantitativa da actividade pinocitótica (densidade de vesículas) em células endoteliais de capilares cerebrais e do edema cerebral. Na Tabela 3 indica-se os graus considerados e o seu significado em relação aos dois parâmetros.

Tabela 3 - Classificação da actividade pinocitótica e do edema cerebral.

	<i>Actividade pinocitótica</i>	<i>Edema cerebral</i>
Grau 0	Inexistente	Inexistente
Grau 1	Ligeira	Ligeiro
Grau 2	Moderada	Moderado
Grau 3	Acentuada	Acentuado

1.4.1. Estudo morfológico das acções de alguns fármacos

Os fármacos, doses utilizadas, a via de administração e o tempo antes da aplicação do frio em que foram administrados encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Fármacos utilizados no estudo morfológico e suas doses, vias e tempos de administração.

<i>Fármaco</i>	<i>Dose</i>	<i>Via de administração</i>	<i>Tempo antes da aplicação de frio</i>
Fenoxibenzamina	10 mg/kg	intraperitoneal	24 horas
Clembuterol	1 mg/kg	intraperitoneal	15 minutos
Vimblastina	0,8 mg/kg	endovenosa	48 horas

2. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CAPILARES CEREBRAIS CULTIVADAS EM MONOCAMADA POLARIZADA

Neste modelo foram utilizados encéfalos de Boi obtidos imediatamente após abate no matadouro (Steve's Meat Market, DeSoto, Kansas, E.U.A.).

2.1 Isolamento de células endoteliais de capilares cerebrais

Após a sua remoção, os encéfalos (2 a 3) dos animais abatidos foram imediatamente colocados em 300 ml de uma solução estéril e arrefecida em gelo de MEM (minimum essential medium/Eagle's modified) a 9,5 mg/ml e contendo ainda 11,92 mg/ml de HEPES, 50 μ g/ml de polimixina B e de gentamicina e 2,5 μ g/ml de anfotericina B, com o pH ajustado a 7,4.

Uma vez no laboratório, colocou-se os encéfalos numa câmara de fluxo laminar. Retirou-se em seguida os cerebelos e os troncos cerebrais e colocou-se o cérebro numa solução de tampão fosfato salino (solução contendo cloreto de sódio 129 mM, cloreto de potássio 2,5 mM, hidrogenofosfato de sódio 7,4 mM e di-hidrogenofosfato de potássio 1,3 mM) arrefecida a 4 °C e contendo 300 μ g/ml de penicilina G e de estreptomicina (TFS3x). Utilizando material esterilizado, retirou-se as meninges e os vasos sanguíneos da superfície do cérebro, colocando o restante cérebro numa solução de TFS3x. Com uma lâmina esterilizada, separou-se a substância cinzenta do restante cérebro e cortou-se este material em fragmentos com cerca de 1 mm³. A cada 50 g de substância cinzenta assim obtida adicionou-se 4 ml de uma solução de dispase esterilizada (125 mg de dispase por ml de MEM). Esta mistura foi colocada num banho de agitação à temperatura de 37 °C durante 30 minutos e foi agitada a uma frequência de 100 oscilações por minuto. Após esta agitação, adicionou-se um volume de MEM esterilizado (9,5 mg/ml, contendo ainda 6,05 mg/ml de TRIS base, 50 μ g/ml de polimixina B e de gentamicina e 2,5 μ g/ml de anfotericina B, com o pH ajustado a 9,4) idêntico ao volume total de substância cinzenta obtida e colocou-se esta mistura no banho de agitação (37 °C, 100 oscilações/minuto) durante 120 minutos.

Após esta digestão, centrifugou-se a mistura a 1000xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e ressuspendeu-se o sedimento em 500 ml de uma solução esterilizada de dextrano (peso molecular médio de 70000) a 13 % (peso/volume) contendo 40 μ g/ml de gentamicina, 50 μ g/ml de polimixina B, 2,5 μ g/ml de anfotericina B, 10 % (volume/volume) de MEM e 5 % (volume/volume) de HEPES 1M). A solução obtida foi centrifugada a 5800xg durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 20 ml de uma solução esterilizada de collagenase/dispase (1 mg/ml de collagenase e dispase em MEM a pH 7,4). Esta solução foi colocada no banho de agitação (37 °C, 100 oscilações/minuto) durante 4,5 horas.

Efectuou-se nova centrifugação durante 10 minutos a 1000xg. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspendido em 8 ml de uma solução de MEM (pH

7,4). Colocou-se cuidadosamente esta mistura em cima de uma solução de Percoll esterilizada e previamente centrifugada (gradiente de Percoll) (para preparar o gradiente de Percoll, centrifugou-se uma solução contendo 15 ml de solução de MEM, 7,5 ml de HEPES 1M, 75 ml de Percoll e 52 ml de água desionizada durante 1 hora a 4 °C a 26000xg). Centrifugou-se esta mistura durante 10 minutos a 1000xg, no fim do que se obteve três camadas distintas. Com o auxílio de uma seringa esterilizada, retirou-se a camada intermédia, correspondente à fracção contendo as células endoteliais dos capilares. Dissolveu-se esta fracção em 50 ml de meio de cultura. Este meio era constituído por uma mistura dos meios MEM e HAM's F12 na proporção de 1:1, contendo ainda 10 mM de HEPES pH 7,4, 13 mM de bicarbonato de sódio, 100 µg/ml de estreptomicina e 100 µg/ml de penicilina G. Centrifugou-se esta solução durante 10 minutos a 1000xg, ressuspendeu-se o sedimento em 50 ml de meio de cultura e voltou-se a centrifugar durante 10 minutos a 1000xg. O sedimento obtido foi ressuspendido em 40 ml de uma solução contendo 70 % de meio de cultura, 20 % de soro equino e 10 % de dimetilsulfóxido. Desta solução, retirou-se alíquotas de 1,8 ml que foram colocadas em criotubos. Colocou-se os criotubos em arca congeladora a -70 °C, temperatura suficiente para manter viáveis as células endoteliais por um período de cerca de dois meses.

2.2. Cultura em monocamada polarizada de células endoteliais de capilares cerebrais

As células endoteliais dos capilares cerebrais isoladas pelo processo acima descrito foram utilizadas para produzir uma cultura em monocamada polarizada.

Antes do início do processo de cultura propriamente dito, foi feita uma contagem de células de um dos criotubos previamente obtidos. As células foram contadas após a congelação para que as células mortas pelo processo de congelação fossem excluídas. A contagem foi feita num hemocitómetro após adição de 250 µl da suspensão de células a 400 µl do corante violeta cristal.

Após a contagem do número de células por criotubo, utilizou-se um número de criotubos suficiente para que a sementeira fosse feita com uma densidade de 50000 células por cm² de superfície a semear. O conteúdo desses criotubos foi vertido para um tubo e completado com meio de cultura de células esterilizado até 8 ml. Este meio era composto por 90% de meio de cultura MEM:HAM's F12 (ver 2.1.) e 10% de soro equino, contendo ainda 50 µg/ml de polimixina B e 2,5 µg/ml de anfotericina B, pH 7,4.

Centrifugou-se estes 8 ml de suspensão de células durante 10 minutos a 1000xg. Ressuspendeu-se o sedimento em 8 ml de meio de cultura de células e voltou-se a centrifugar sob as mesmas condições. Esta operação foi repetida mais uma vez (três centrifugações no total).

Efectuou-se a última ressuspensão num volume de meio de células acrescentado de heparina ($3\mu\text{l/l}$). O volume de meio de cultura utilizado foi de 15 ml multiplicado pelo número de placas de Petri a semear.

Semeou-se cada placa de Petri com um volume de 15 ml de suspensão de células. Todas as operações acima descritas, com a excepção das centrifugações, foram efectuadas em câmara de fluxo laminar utilizando material esterilizado.

As placas de Petri onde foi feita a sementeira das células endoteliais foram previamente sujeitas ao tratamento que a seguir se descreve.

Usou-se placas de Petri (Corning, E.U.A.) de plástico, com diâmetro interno de 8,7 cm. Cobriu-se as placas com uma quantidade de 0,1 ml por cm^2 de uma solução de colagénio da cauda de Rato (3 mg/ml numa solução de ácido acético a 0,1%). Em cada placa, colocou-se 14 a 16 membranas de policarbonato (Costar, E.U.A.) com 13 mm de diâmetro e com um tamanho de poro de $3\mu\text{m}$. Removeu-se o excesso de colagénio das placas de maneira a que estas ficassem totalmente cobertas com a mínima quantidade possível. Colocou-se as placas durante 30 minutos em *hotte* numa atmosfera rica em amónia. Após esta operação, esterilizou-se as placas em câmara de fluxo laminar debaixo de luz ultravioleta durante 60 a 90 minutos. Ao fim deste período de tempo, cada placa foi coberta com 0,1 ml por cm^2 de uma solução esterilizada de fibronectina ($50\mu\text{g/ml}$ em tampão fosfato salino). Removeu-se a fibronectina em excesso 30 minutos após a sua adição às placas.

Após a sementeira, colocou-se as placas numa incubadora (Forma Scientific, Inc., Model 3033, Marietta, Ohio, EUA) a 37°C , sob uma atmosfera com 99% de saturação de humidade e 5% de dióxido de carbono. Ao fim dos 3 primeiros dias na incubadora, mudou-se o meio de cultura das placas. A mudança foi efectuada em câmara de fluxo laminar, e o meio utilizado foi o meio de cultura de células (ver acima) sem polimixina B. Este meio foi mudado cada 2 dias. Sob estas condições, desenvolveu-se em cada placa uma monocamada confluenta de células endoteliais polarizadas ao fim de 10 a 12 dias.

2.3. Estudo do transporte de fluoresceína sódica através de monocamadas polarizadas de células endoteliais de capilares cerebrais

Estudou-se o transporte da fluoresceína sódica através das monocamadas polarizadas anteriormente obtidas (ver 2.1.). Após estabelecimento de confluência

Definiu-se o momento do começo da agitação como o tempo zero da experiência. Retirou-se uma amostra de 200 μ l da câmara receptora nos tempos 2, 10, 20, 30, 40, 55 e 70 minutos após o tempo zero. Este volume foi repostado com 200 μ l de tampão fosfato salino modificado após a colecção de cada amostra. Colocou-se cada amostra recolhida numa cuvete de plástico e acrescentou-se 1,8 ml de tampão fosfato salino modificado.

Doseou-se a fluoresceína sódica nas amostras assim diluídas (ver 2.3.2.). Em algumas experiências, substituiu-se a glicose do tampão fosfato salino modificado por 6-desoxi-d-glicose, numa concentração de 50 mM. Nestas experiências, usou-se exclusivamente este tampão, quer para adição às câmaras quer para dissolução da fluoresceína sódica e dos fármacos utilizados.

Foram feitos dois tipos de experiências: para estudo do transporte no sentido apical-basal e para estudo do transporte no sentido inverso, *i.e.*, basal-apical. Os protocolos são absolutamente idênticos, excepto na orientação da membrana contendo a monocamada, dado que nas condições de cultura das células, estas desenvolvem polaridade (GUILLOT *et al.*, 1990), ficando o seu polo basal (correspondente ao lado abluminal ou cerebral) aderente à membrana e o seu polo apical (correspondente ao lado luminal ou do sangue) do lado oposto. Assim, no estudo do transporte no sentido apical-basal as membranas foram colocadas de forma a que o lado contendo as células ficasse virado para a câmara dadora e, inversamente, no estudo do transporte no sentido basal-apical as membranas foram colocadas de forma a que o lado contendo as células ficasse virado para a câmara receptora.

2.3.1. Estudo das acções de alguns fármacos no transporte de fluoresceína sódica através de monocamadas polarizadas de células endoteliais de capilares cerebrais.

Estudou-se o efeito de diversos fármacos no transporte da fluoresceína sódica através das monocamadas polarizadas de células endoteliais. Este estudo foi feito no transporte em ambos os sentidos, *i.e.*, no sentido apical-basal e no sentido basal-apical. Os fármacos utilizados em cada tipo de experiência, as suas doses, o tempo em que foram administrados, a câmara onde foram adicionados e o tipo de tampão utilizado estão descritos nas tabelas 5a e 5b. Todos os fármacos utilizados foram dissolvidos numa solução de tampão idêntica à utilizada nas câmaras numa concentração tal que a adição de um volume de 50 μ l à câmara resultou na concentração final descrita.

Tabela 5a - Fármacos utilizados no estudo do transporte no sentido apical-basal. São também indicadas as concentrações utilizadas, o tempo de administração, a câmara na qual se administrou o fármaco e o tipo de tampão utilizado (TFSM - Tampão fosfato salino modificado; TFSM+6dG - Tampão fosfato salino modificado em que os 5,3 mM de glicose foram substituídos por 50 mM de 6-desoxi-d-glicose).

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração</i>	<i>Tempo</i>	<i>Câmara</i>	<i>Tampão</i>
Noradrenalina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM
	10 ⁻⁶ M	30 minutos	Receptora	TFSM
	10 ⁻⁵ M	30 minutos	Receptora	TFSM
	10 ⁻⁶ M	30 minutos	Receptora	TFSM+6dG
	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Dadora	TFSM
Adrenalina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM
	10 ⁻⁶ M	30 minutos	Receptora	TFSM
Clembuterol	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM
	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM+6dG
Fenilefrina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM
Prazosina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Receptora	TFSM
Vincristina	10 ⁻⁶ M	0 minutos	Receptora	TFSM

Tabela 5b - Fármacos utilizados no estudo do transporte no sentido basal-apical. São também indicadas as concentrações utilizadas, o tempo de administração, a câmara na qual se administrou o fármaco e o tipo de tampão utilizado (TFSM - Tampão fosfato salino modificado).

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração</i>	<i>Tempo</i>	<i>Câmara</i>	<i>Tampão</i>
Noradrenalina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Dadora	TFSM
Adrenalina	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Dadora	TFSM
Clembuterol	10 ⁻⁷ M	30 minutos	Dadora	TFSM

Nota: os fármacos adicionados aos 30 minutos foram-no imediatamente após a colecção da amostra do minuto 30 e a respectiva reposição do volume.

2.3.2. Doseamento da fluoresceína sódica

Doseou-se a fluoresceína sódica nas amostras recolhidas ao longo da experiência e posteriormente acrescentadas de 1,8 ml do tampão respectivo (volume final de 2 ml, ver 2.2.). O doseamento foi feito por espectrofotofluorimetria, utilizando um espectrofotofluorímetro SLM-AMINCO Model 4800 (E.U.A.). Os comprimentos

de onda de excitação e de emissão utilizados foram de, respectivamente, 490 e 520 nm. A concentração das amostras foi obtida por interpolação gráfica numa recta padrão, recta esta obtida com amostras de concentração conhecida.

Para o cálculo do valor da concentração de fluoresceína sódica em cada amostra foi levada em conta a diluição induzida pela reposição do volume de tampão na câmara receptora no fim de cada colecção de amostra.

2.3.3. Método de apresentação dos resultados

O valor absoluto do transporte de fluoresceína sódica através da monocamada polarizada foi calculado segundo o método de AUDUS *et al.* (1988). Como medida de permeabilidade da monocamada determinou-se o "coeficiente de permeabilidade aparente" (P), expresso em cm/s, que é calculado pela fórmula:

$$P = \frac{X}{A \cdot t \cdot C_D}$$

em que X representa a quantidade de fluoresceína sódica, em moles, na câmara receptora ao fim do tempo t (em segundos), A representa a área de difusão ($0,636 \text{ cm}^2$) e C_D representa a concentração de fluoresceína sódica na câmara dadora (em moles/ cm^3). O cálculo deste coeficiente destina-se a comparar o valor absoluto do transporte no sentido apical-basal com o mesmo valor no sentido basal-apical.

Após obtenção dos valores das concentrações de cada amostra em cada experiência, construiu-se uma recta representando essas concentrações ao longo do tempo (Figura 4).

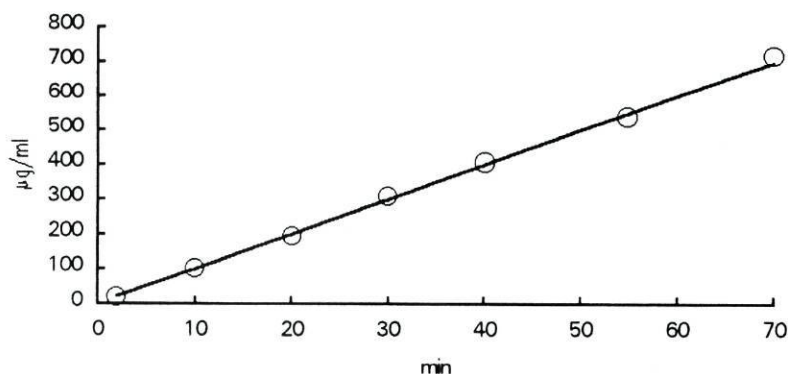


Figura 4 - Gráfico representando a concentração de fluoresceína sódica na câmara receptora ao longo do tempo (pontos) e respectiva recta de regressão (recta).

Para o estudo dos efeitos dos fármacos, optou-se por fazer uma comparação entre o declive da recta obtida antes da adição do fármaco (*i.e.*, com os tempos 2, 10, 20 e 30 minutos) e da recta obtida depois da adição do fármaco (*i.e.*, com os tempos 40, 55 e 70 minutos). Os resultados são calculados segundo a fórmula:

$$\left(1 - \frac{\text{declive após o fármaco}}{\text{declive antes do fármaco}} \right) \times 100\%$$

As rectas foram calculadas através de uma regressão linear. Apenas se considerou as experiências cujas rectas apresentaram um coeficiente de correlação superior a 0,95.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados de todas as experiências em que se mediu variáveis contínuas são expressos pelas médias aritméticas e erros padrão da média.

Para inferência estatística das diferenças entre dois grupos utilizou-se o teste t de Student para valores emparelhados ou independentes. Para comparações múltiplas utilizou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls (HAYS 1988).

Os resultados das experiências onde se mediu variáveis ordinais (quantificação, por graus, da pinocitose e do edema cerebral em microfotografias) são expressos pelas medianas e distribuição de frequências. Utilizou-se para inferência estatística da diferença entre grupos o teste do χ quadrado aplicado a tabelas de K colunas por J linhas.

O nível de significância estatística foi colocado em 5%.

4. FÁRMACOS E OUTRAS SUBSTÂNCIAS UTILIZADOS

Azul de Evans (Merck, Darmstadt, Alemanha); Cloridrato de fenoxibenzamina (Smith, Klein and French, Filadélfia, PA, E.U.A.); Heparina (Solupharm, Melsungen, Alemanha); Tartarato de Metoprolol (Ciba-Geigy SA, Basileia, Suíça); Soro equino (HyClone Laboratories, Logan, UT, E.U.A.); Pentobarbital sódico (Abbot, Lisboa, Portugal); F12 Ham's Nutrient Mix; Minimum Essential Medium Eagle's modified (MEM) (Hazelton Biologics Inc., Lenexa, KS, E.U.A.); Bitartarato de (-)-adrenalina; Anfotericina B; Hidroclorato de clenbuterol; Colagenase; Colagéio da cauda de Rato; Dexametasona; Dextrano (p.m. aprox. 70000); Dispase; Sulfato de estreptomicina; Hidroclorato de fenilefrina; Fibronectina de

plasma bovino; Fluoresceína sódica; Sulfato de gentamicina; HEPES; Bitartarato de (-)-isoprenalina; (-)-noradrenalina; Penicilina G; Sulfato de polimixina B; Hidroclorato de prazosina; Maleato de timolol; TRIS; Sulfato de vimblastina; Sulfato de vincristina (Sigma Chemical Company, S. Luís, MO, E.U.A.)

III - RESULTADOS

1. MODELO EXPERIMENTAL DE EDEMA CEREBRAL VASOGÊNICO INDUZIDO PELO FRIO

1.1. Conteúdo de água cerebral ao longo do tempo

Estudou-se o conteúdo de água nos hemisférios direito e esquerdo de Ratos submetidos a aplicação de frio. Verificou-se que, em relação aos valores do conteúdo de água em hemisférios de Ratos não submetidos a aplicação de frio ($79,17 \pm 0,21\%$, $n=6$), houve um aumento significativo nos tempos de 60 ($80,90 \pm 0,48\%$, $n=4$), 120 ($82,19 \pm 0,28\%$, $n=5$) e 180 ($84,42 \pm 0,50\%$, $n=4$) minutos após aplicação do frio, não havendo diferença estatisticamente significativa nos tempos de 5 ($79,87 \pm 0,44\%$, $n=4$) e 30 minutos ($80,29 \pm 0,16\%$, $n=4$) e 24 horas ($77,94 \pm 0,63\%$, $n=4$). A curva de conteúdo de água no hemisfério direito ao longo do tempo assim obtida encontra-se representada na Figura 1.

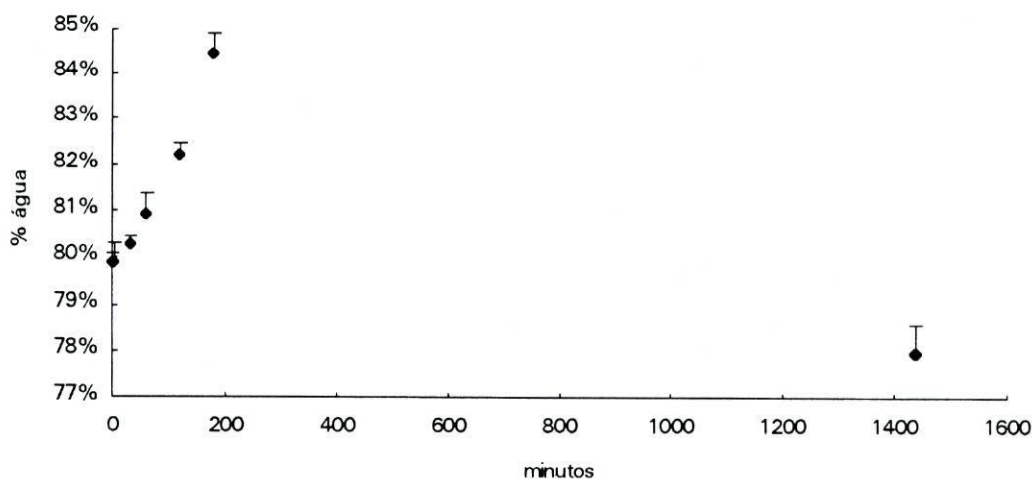


Figura 1 - Conteúdo de água no hemisfério lateral direito 5, 30, 60, 120, 180 minutos e 24 horas após aplicação do frio. O valor no tempo zero representa o valor dos animais não submetidos a aplicação de frio. Os pontos e os traços representam as médias aritméticas e os erros padrão da taxa do conteúdo de água.

Em nenhum dos tempos estudados se verificou qualquer diferença entre o conteúdo de água no hemisfério esquerdo e o mesmo conteúdo, em ambos os hemisférios, em animais não submetidos a aplicação do frio.

Em face destes resultados decidiu-se adoptar o tempo de 120 minutos de espera para o estudo dos efeitos de fármacos. As razões para esta escolha estão também relacionadas com os resultados obtidos com os doseamentos de azul de Evans, pelo que serão descritas em conjunto mais adiante.

1.2. Efeitos dos fármacos no conteúdo de água cerebral

As doses e tempos utilizados na administração dos fármacos encontram-se descritas no capítulo Material e Métodos.

A análise estatística dos valores do conteúdo de água nos hemisférios esquerdos dos grupos estudados revelou não existir diferença significativa entre eles. Os valores apresentados referem-se ao hemisfério direito, e foram comparados com o valor de controlo ($82,19 \pm 0,28\%$, $n=5$).

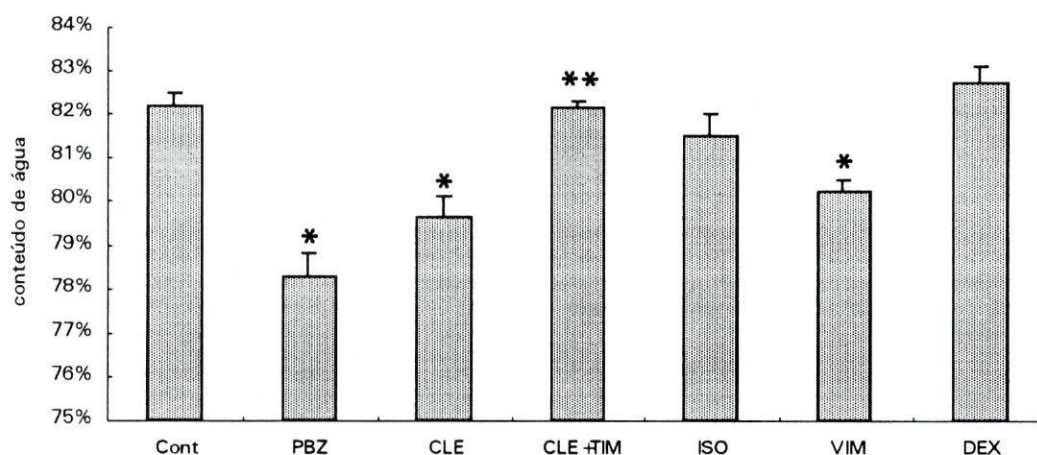


Figura 2 - Conteúdo de água no hemisfério lateral direito 120 minutos após aplicação do frio em animais controlo (Cont), ou tratados com fenoxibenzamina (10 mg/kg, PBZ), clenbuterol (1 mg/kg, CLE), clenbuterol (1 mg/kg) na presença de timolol (1 mg/kg, CLE+TIM), isoprenalina (0,25 mg/kg, ISO), vimblastina (0,8 mg/kg, VIM) ou dexametasona (2,5 mg/kg, DEX). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão do conteúdo de água.

* Significativamente diferente do controlo (Newman Keuls)

** Significativamente diferente do clenbuterol (Newman Keuls)

1.2.1. Fenoxibenzamina

A administração prévia do antagonista irreversível dos adrenoceptores alfa fenoxibenzamina, reduziu significativamente o conteúdo de água cerebral no hemisfério direito ($78,3 \pm 0,50\%$, $n=4$) em relação ao controlo (Figura 2).

1.2.2. Clenbuterol

A administração prévia do agonista selectivo dos adrenoceptores beta₂ clenbuterol, reduziu significativamente o conteúdo de água cerebral no hemisfério direito ($79,64 \pm 0,47\%$, $n=4$) em relação ao controlo (Figura 2).

Para esclarecermos se o efeito obtido com o clenbuterol era efectivamente mediado pela sua acção sobre os receptores adrenérgicos beta, estudámos o efeito do clenbuterol em ratos previamente injectados com um bloqueador adrenérgico beta não selectivo, o timolol. Nestes animais, o conteúdo de água no hemisfério direito foi de $82,13 \pm 0,19\%$, $n=3$, valor este significativamente diferente do dos animais injectados apenas com o clenbuterol ($79,64 \pm 0,47\%$, $n=4$) e não significativamente diferente do valor do controlo (Figura 2).

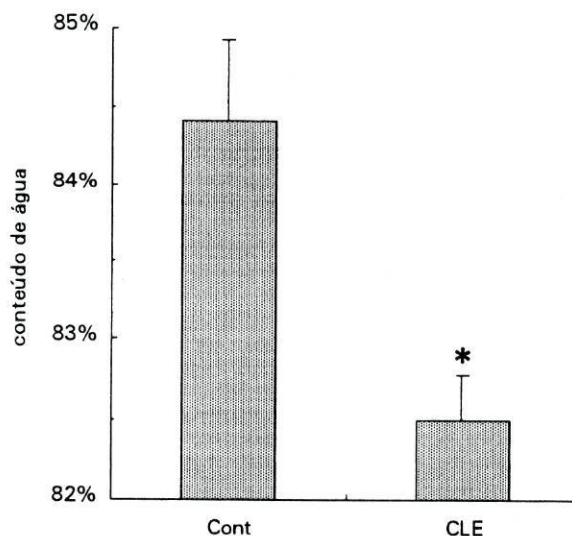


Figura 3 - Conteúdo de água no hemisfério lateral direito 180 minutos após aplicação do frio em animais controlo (Cont) e animais tratados com o clenbuterol 120 minutos após aplicação do frio (CLE). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão do conteúdo de água.

* Significativamente diferente do controlo ($p=0,015$, t independente)

No sentido de esclarecer se o clenbuterol exibe algum efeito de redução do edema cerebral após a instalação deste, estudou-se o efeito do clenbuterol administrado 2 horas após a aplicação do frio.

Verificou-se uma redução estatisticamente significativa ($p=0,015$, t independente) no conteúdo de água do hemisfério direito nos animais tratados com o clenbuterol ($82,50 \pm 0,27$, $n=4$) em relação aos controles ($84,42 \pm 0,50$, $n=4$) (Figura 3). Não se verificou diferenças significativas nos teores de água do hemisfério esquerdo entre os animais tratados e os respectivos controles.

1.2.3. Isoprenalina

A administração intraperitoneal do agonista não selectivo dos adrenoceptores beta isoprenalina não modificou de forma estatisticamente significativa o conteúdo de água no hemisfério direito ($81,50 \pm 0,50\%$, $n=4$) em relação ao controlo (Figura 2).

1.2.4. Dexametasona

Estudou-se o efeito da dexametasona, uma vez que foi demonstrada a sua eficácia na redução do conteúdo de água em alguns modelos de edema cerebral, nomeadamente o edema cerebral induzido por tumores. No nosso modelo experimental, a dexametasona não alterou significativamente o conteúdo de água no hemisfério direito ($82,76 \pm 0,37$, $n=4$) em relação ao controlo (Figura 2).

1.2.5. Vimblastina

Para esclarecermos o papel da pinocitose na formação do edema cerebral neste modelo, estudou-se o efeito da vimblastina, fármaco descrito como inibidor da formação de microtúbulos, impedindo por este meio a formação de vesículas de pinocitose (LARSSON *et al.* 1979, ROGALSKY *et al.* 1984, KELLY 1990). A vimblastina reduziu significativamente o conteúdo de água no hemisfério direito ($80,23 \pm 0,27$, $n=6$) em relação ao controlo (Figura 2).

1.3. Conteúdo de azul de Evans ao longo do tempo

Estudámos a passagem de azul de Evans para os hemisférios direito e esquerdo de animais submetidos a aplicação de frio. Todos os animais que utilizámos neste tipo de experiências apresentavam, na zona do cérebro subjacente ao local de aplicação do frio, uma marcada coloração azul, indicando extravasamento de azul de Evans para essa região (hemisfério direito). Esta primeira observação

macroscópica foi confirmada pelos dados quantitativos, já que verificámos que, em relação aos valores do conteúdo de azul de Evans em hemicórtices de ratos não submetidos a aplicação de frio ($2,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=4$), houve um aumento significativo em todos os tempos estudados, *i.e.*, 60 ($29,75 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$), 120 ($45,40 \pm 3,78 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=7$), 180 ($59,96 \pm 7,93 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=4$) e 240 ($26,03 \pm 7,26 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=4$) minutos e 24 horas ($23,05 \pm 2,55 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$) após aplicação do frio.

A curva de conteúdo de azul de Evans no hemicórtex direito ao longo do tempo assim obtida encontra-se representada na Figura 4. Escolheu-se neste caso como medida da passagem do azul de Evans o seu valor absoluto no tecido cerebral (expresso em μg de azul de Evans por mg de tecido) e não a taxa de extracção, visto que ao fim das 24 horas (maior tempo de espera utilizado), as concentrações plasmáticas do marcador eram muito baixas, impossibilitando a comparação com tempos onde essas concentrações são bastante superiores.

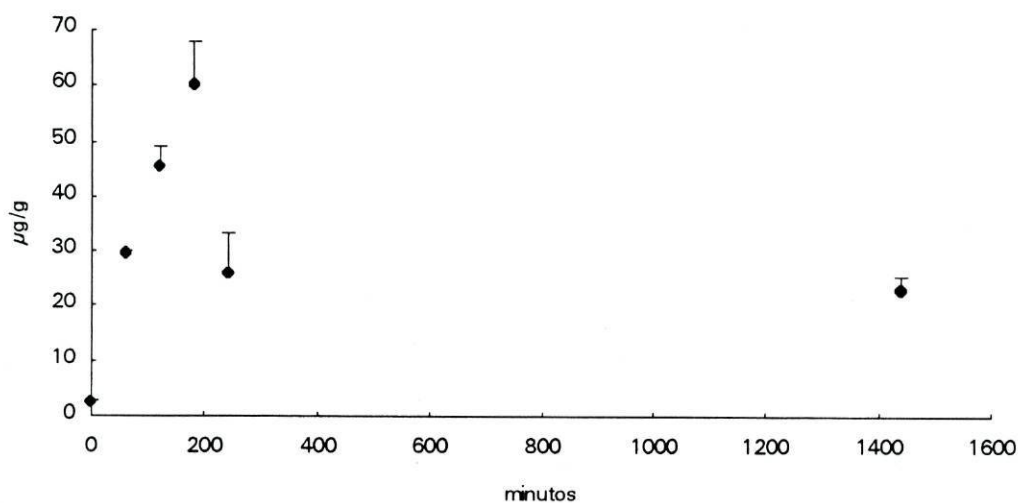


Figura 4 - Valor absoluto de azul de Evans (em μg de azul de Evans por g de tecido) no hemicórtex lateral direito 60, 120, 180, 240 minutos e 24 horas após aplicação do frio. O valor no tempo zero representa o valor dos animais não submetidos a aplicação de frio. Os pontos e os traços representam as médias aritméticas e os erros padrão da taxa de extracção do azul de Evans.

Em nenhum dos tempos estudados se verificou qualquer diferença entre o conteúdo de azul de Evans no hemicórtex esquerdo e o mesmo conteúdo em animais não submetidos a aplicação do frio.

Escolheu-se o tempo de espera de 120 minutos após aplicação do frio (tal como para o conteúdo de água) para se testar os efeitos dos fármacos administrados antes da citada aplicação pelos motivos seguintes:

- 1 - Ao fim de 120 minutos verifica-se já um aumento significativo quer do teor de água quer do conteúdo de azul de Evans, o que torna este tempo apropriado para estudo de eventuais alterações (principalmente reduções) mediadas por fármacos;
- 2 - O raciocínio anterior é também válido para os tempos de 180 ou 240 minutos, mas estes apresentam os inconvenientes práticos quer do maior tempo despendido com cada experiência quer da necessidade de nova administração de anestésico na maioria dos animais. Na generalidade, tempos mais longos implicam também uma diminuição das concentrações plasmáticas dos fármacos a estudar, com a consequente e indesejável diminuição do seu efeito.

1.4. Efeitos dos fármacos no conteúdo de azul de Evans

As doses e tempos utilizados na administração dos fármacos encontram-se descritas no capítulo Material e Métodos.

A análise estatística dos valores da taxa de extracção do azul de Evans nos hemisférios esquerdos dos grupos estudados revelou não existir diferença significativa entre eles. Os valores apresentados referem-se à taxa de extracção no hemisfério direito, e foram comparados com o valor de controlo de $3,73 \pm 0,42\%$, $n=6$ (Figura 5).

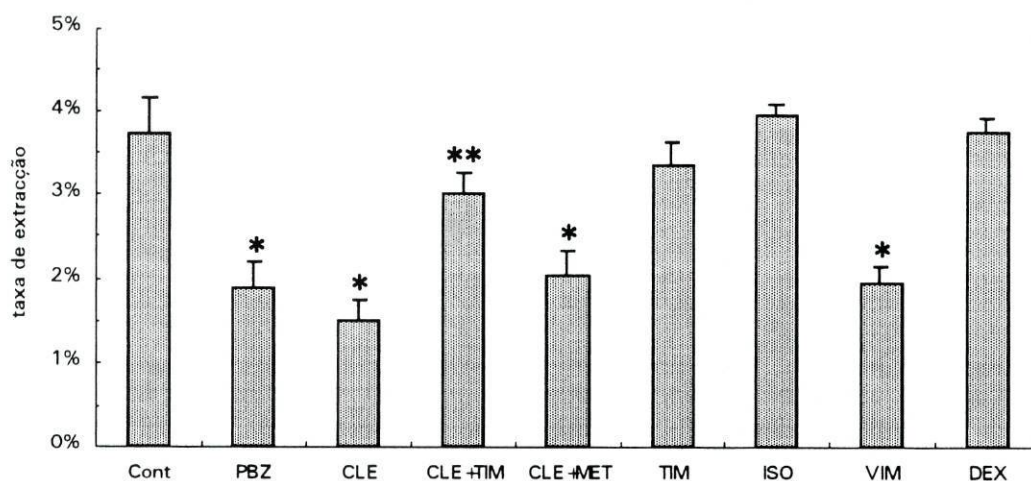


Figura 5 - Taxa de extracção do azul de Evans no hemicórtex lateral direito 120 minutos após aplicação do frio em animais controlo (Cont), ou tratados com fenoxibenzamina (10 mg/kg, PBZ), clembuterol (1 mg/kg, CLE), clembuterol (1 mg/kg) na presença de timolol (1 mg/kg, CLE+TIM), clembuterol (1 mg/kg) na presença de metoprolol (10 mg/kg, CLE+MET), timolol (1mg/kg, TIM) isoprenalina (0,25 mg/kg, ISO), vimblastina (0,8 mg/kg, VIM) ou dexametasona (2,5 mg/kg, DEX). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da taxa de extracção do azul de Evans.

* Significativamente diferente do controlo (Newman Keuls)

** Significativamente diferente do clembuterol (Newman Keuls)

1.4.1. Fenoxibenzamina

A administração de fenoxibenzamina reduziu significativamente a taxa de extracção do azul de Evans no hemicórtex direito ($1,88 \pm 0,32\%$, $n=5$) em relação ao controlo (Figura 5).

1.4.2. Clembuterol

A administração de clembuterol reduziu significativamente a taxa de extracção do azul de Evans no hemicórtex direito ($1,50 \pm 0,25\%$, $n=5$) em relação ao controlo (Figura 5).

O efeito redutor da taxa de extracção do azul de Evans no hemicórtex direito verificado com o clembuterol foi revertido de forma estatisticamente significativa pela administração prévia do timolol ($3,01 \pm 0,25\%$, $n=4$). A taxa de extracção obtida não é significativamente diferente da obtida nos animais controlo (Figura 5).

Administrado isoladamente, o timolol não modificou de forma significativa a taxa de extracção do azul de Evans ($3,33 \pm 0,30\%$, $n=4$) (Figura 5).

Para esclarecermos se o efeito mediado pelo clembuterol era efectivamente mediado por receptores adrenérgicos do subtipo β_2 , estudámos o efeito do clembuterol em animais previamente injectados com o antagonista selectivo dos adrenoceptores do subtipo β_1 , metoprolol. Nestes animais, a taxa de extracção do azul de Evans no hemicórtex direito foi de $2,04 \pm 0,30\%$, $n=4$, valor que não é significativamente diferente do dos animais tratados apenas com o clembuterol, mas é significativamente diferente da dos animais controlo (Figura 5).

Nos animais injectados com clenbuterol 2 horas após aplicação do frio, a taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério direito ($2,59 \pm 0,28\%$, $n=4$) foi significativamente menor ($p=0,0011$, t independente) que a dos respectivos controlos ($4,99 \pm 0,49\%$, $n=5$) (Figura 6). Não se verificou diferença estatisticamente significativa na taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério esquerdo entre os animais tratados e os controlos .

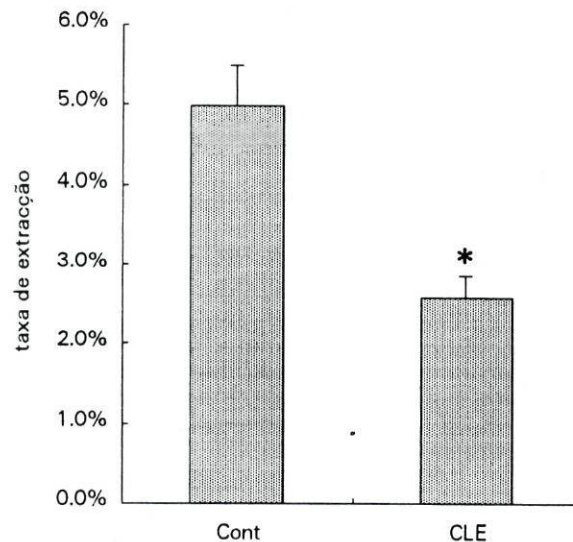


Figura 6 - Taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério lateral direito 180 minutos após aplicação do frio em animais controlo (Cont) e animais tratados com o clenbuterol (1 mg/kg) 120 minutos após aplicação do frio (CLE). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da taxa de extracção do azul de Evans.

* Significativamente diferente do controlo ($p=0,0011$, t independente)

1.4.3. Isoprenalina

A administração intraperitoneal de isoprenalina não modificou de forma estatisticamente significativa a taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério direito ($3,95 \pm 0,13\%$, $n=3$) em relação ao controlo (Figura 5).

Dado que a isoprenalina é uma molécula que não atravessa a barreira hematoencefálica (GORMAN *et al.* 1987), procedemos à sua administração por via intracerebroventricular (ver Material e Métodos, 1.3.). Utilizámos neste caso o tempo de espera de 1 hora (e não de 2 horas como na maioria das experiências), dado que a isoprenalina está sujeita a metabolização no tecido cerebral (pela enzima catecol-o-metil-transferase), com a consequente perda rápida de efeito.

Os animais injectados com este fármaco apresentaram uma taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério direito de $1,86 \pm 0,06\%$ ($n=5$), valor este que é significativamente menor ($p=0,0001$, t independente) que o dos respectivos controlos ($3,75 \pm 0,22\%$, $n=4$). (Figura 7). Não se verificou diferença estatisticamente significativa na taxa de extracção no hemisfério esquerdo entre os animais tratados e os controlos.

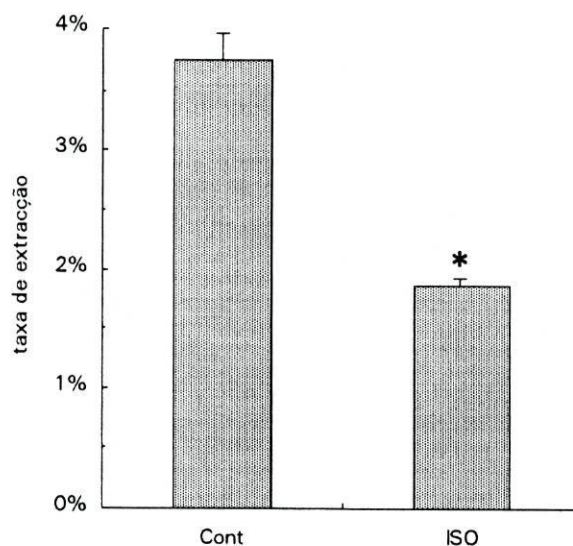


Figura 7 - Taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério lateral direito 60 minutos após aplicação do frio em animais controlo (Cont) e animais injectados com isoprenalina por via intracerebroventricular ($100 \mu\text{g}/10\mu\text{l}$) 10 minutos antes da aplicação do frio (ISO). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da taxa de extracção do azul de Evans.

* Significativamente diferente do controlo ($p=0,0001$, t independente)

1.4.4. Dexametasona

Os animais injectados com dexametasona apresentaram uma taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério direito de $3,74 \pm 0,19\%$ ($n=4$), valor que não é significativamente diferente do verificado nos animais controlo (Figura 5).

1.4.5. Vimblastina

A administração de vimblastina reduziu significativamente a taxa de extracção do azul de Evans no hemisfério direito ($1,96 \pm 0,19\%$, $n=6$) em relação ao controlo (Figura 5).

1.5. Estudo morfológico por microscopia óptica e ultrastrutural

1.5.1. Animais com aplicação de frio: hemicórtex direito e esquerdo

No hemicórtex esquerdo (controle, não exposto ao frio) o tecido cerebral está muito bem conservado, mostrando a sua grande riqueza em capilares (Figura 8a). A nível ultrastrutural os capilares mostravam perfeita confluência com o tecido circundante, sem espaços vazios, sem sinais de edema nos podócitos, e com a conhecida escassez de vesículas de micropinocitose e presença de junções apertadas íntegras entre as células endoteliais dos capilares (Figura 8b).

No hemicórtex direito, o tecido subjacente à aplicação do frio mostrava abundante edema com disrupção e apagamento das estruturas pericapilares (Figura 9). Estes aspectos eram também observáveis na microscopia electrónica, podendo ainda ver-se irregularidades no contorno das membranas das células endoteliais e uma maior frequência de vesículas de pinocitose. Não se observou abertura das junções apertadas (Figura 9b).

1.5.2. Efeito dos fármacos

No hemicórtex direito de ratos tratados com fenoxibenzamina (Figura 10) ou vimblastina (Figura 11) previamente à exposição ao frio, o edema era discreto ou mesmo invisível, observando-se um reduzido número de vesículas de pinocitose (Figura 10b e 11b).

Nos ratos tratados com clenbuterol previamente à exposição ao frio, o edema visível era substancialmente menor que nos ratos controle, salientando-se o menor grau de disrupção e apagamento de estruturas pericapilares (Figura 12). A nível ultrastrutural observava-se uma grande densidade de vesículas de pinocitose (Figura 12b).

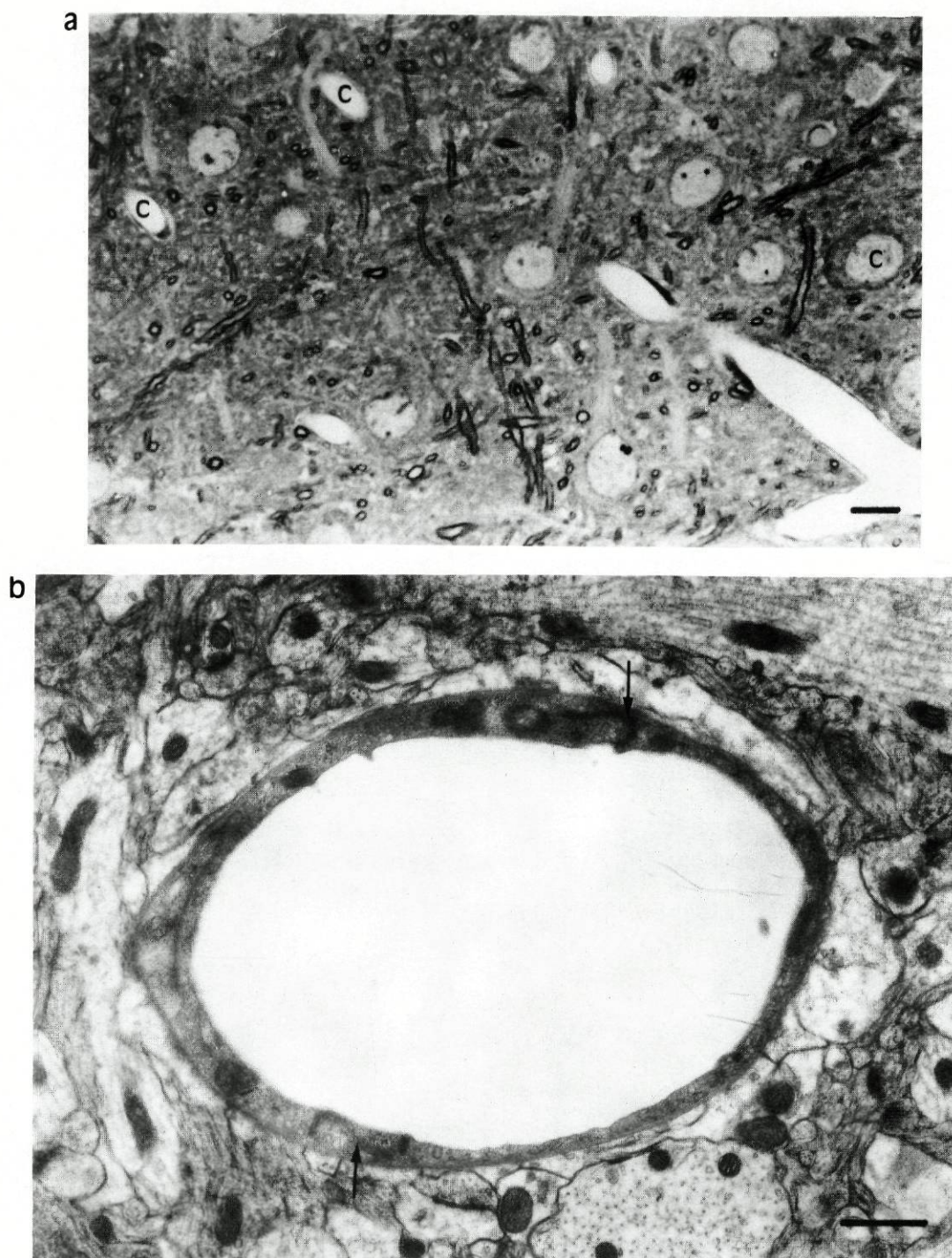


Figura 8 - Capilar do hemicórtex esquerdo (controle, não exposto ao frio). a - Fotografia de microscopia óptica, onde se observa a integridade do tecido e vários capilares (c). Barra=10 μm . b - Fotografia de microscopia electrónica. Não há sinais de edema, as vesículas de pinocitose são escassas e pode observar-se junções apertadas íntegras (setas). Barra=1 μm .

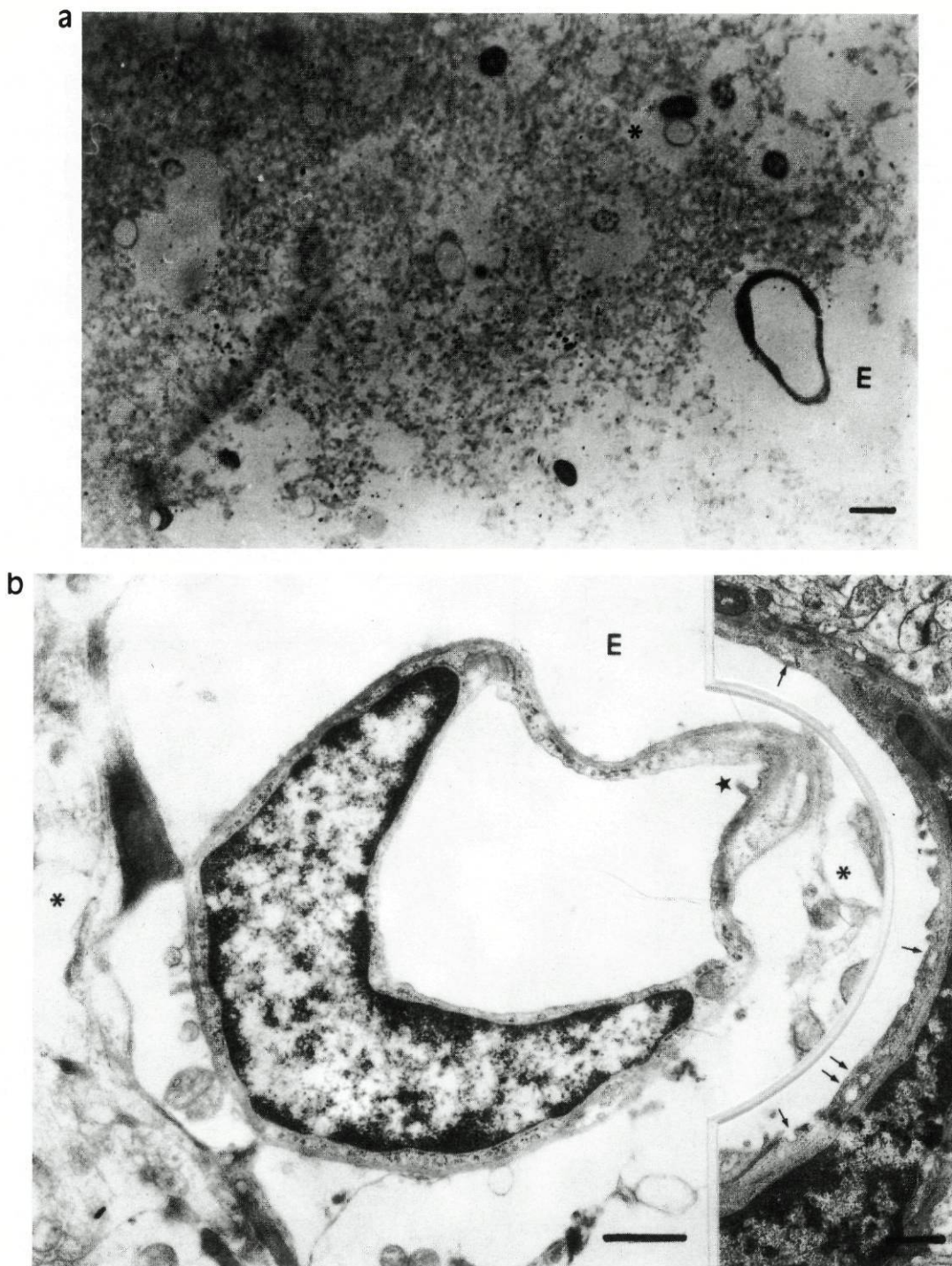


Figura 9 - Cortes de hemicórtex direito de um animal submetido ao frio, onde se observa abundante edema (E) com disrupção das estruturas pericapilares (*). a - Fotografia de microscopia óptica. Barra = 10 μ m. b - Fotografias de microscopia electrónica. Note-se a irregularidade no contorno das membranas das células endoteliais (\star), as abundantes vesículas de pinocitose (setas pequenas) e a integridade da junção apertada. Barra = 1 μ m.

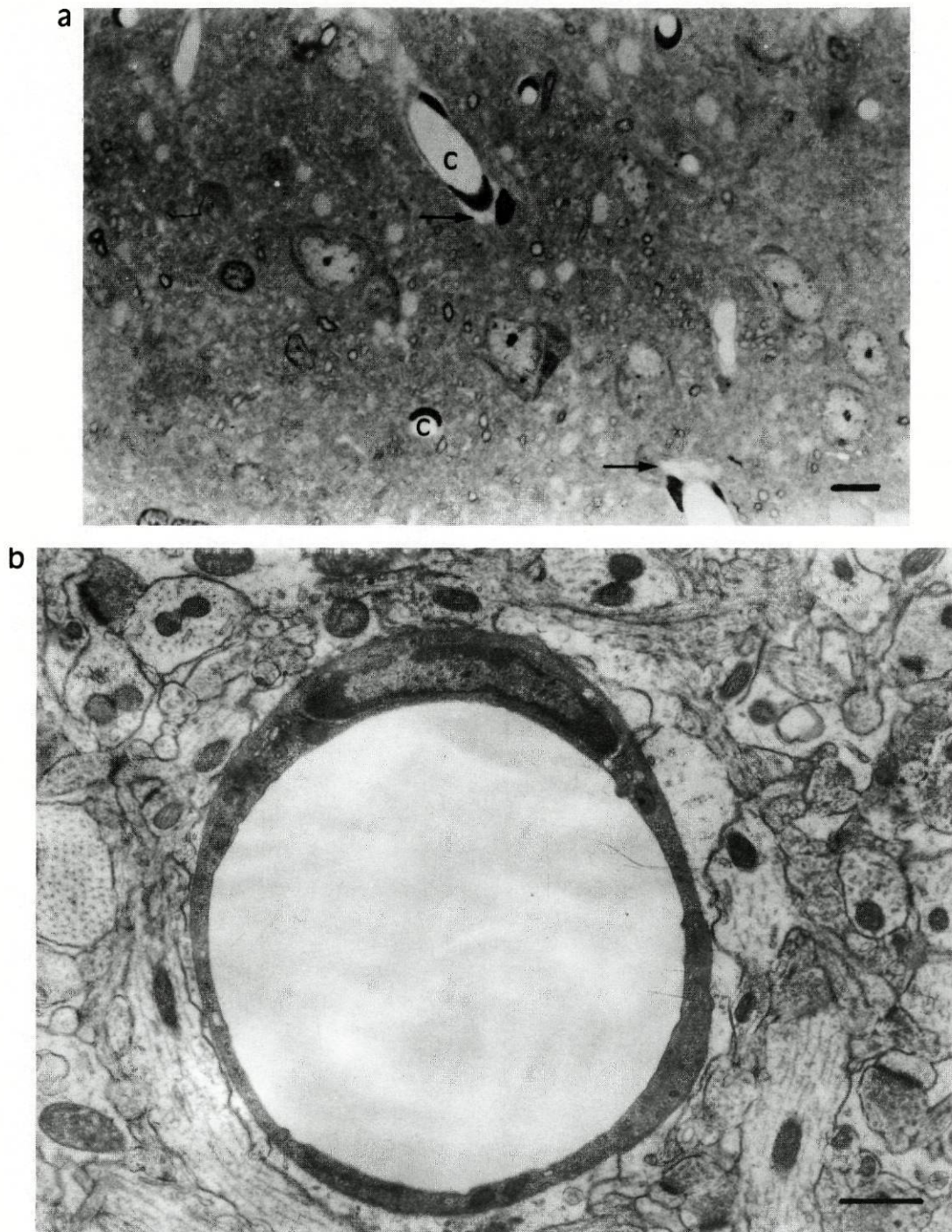


Figura 10 - Cortes de hemicórtex direito de um animal tratado com fenoxibenzamina 24 h antes da aplicação do frio. a - fotografia de microscopia óptica onde se observa sinais de edema muito ligeiro (setas). c-capilares. Barra=10 μ m. b - fotografia de microscopia electrónica. Note-se a ausência de edema e a escassez de vesículas de pinocitose. Barra=1 μ m.

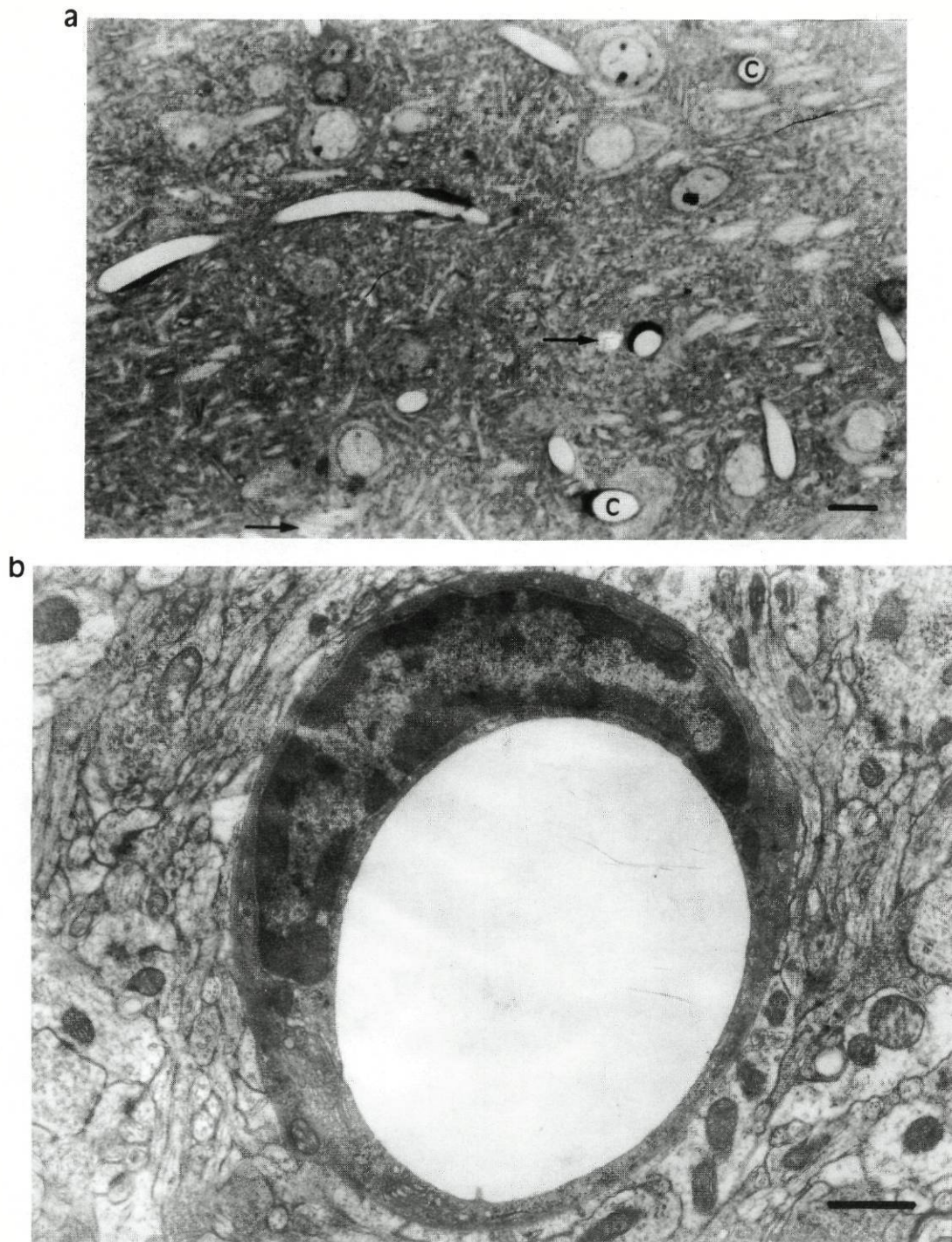


Figura 11 - Cortes de hemicórtex direito de um animal tratado com vimblastina 48 h antes da aplicação do frio. **a** - fotografia de microscopia óptica onde se observa sinais de edema muito ligeiro (setas). c-capilares. Barra=10 μ m. **b** - fotografia de microscopia electrónica. Note-se a ausência de edema e a escassez de vesículas de pinocitose. Barra=1 μ m.

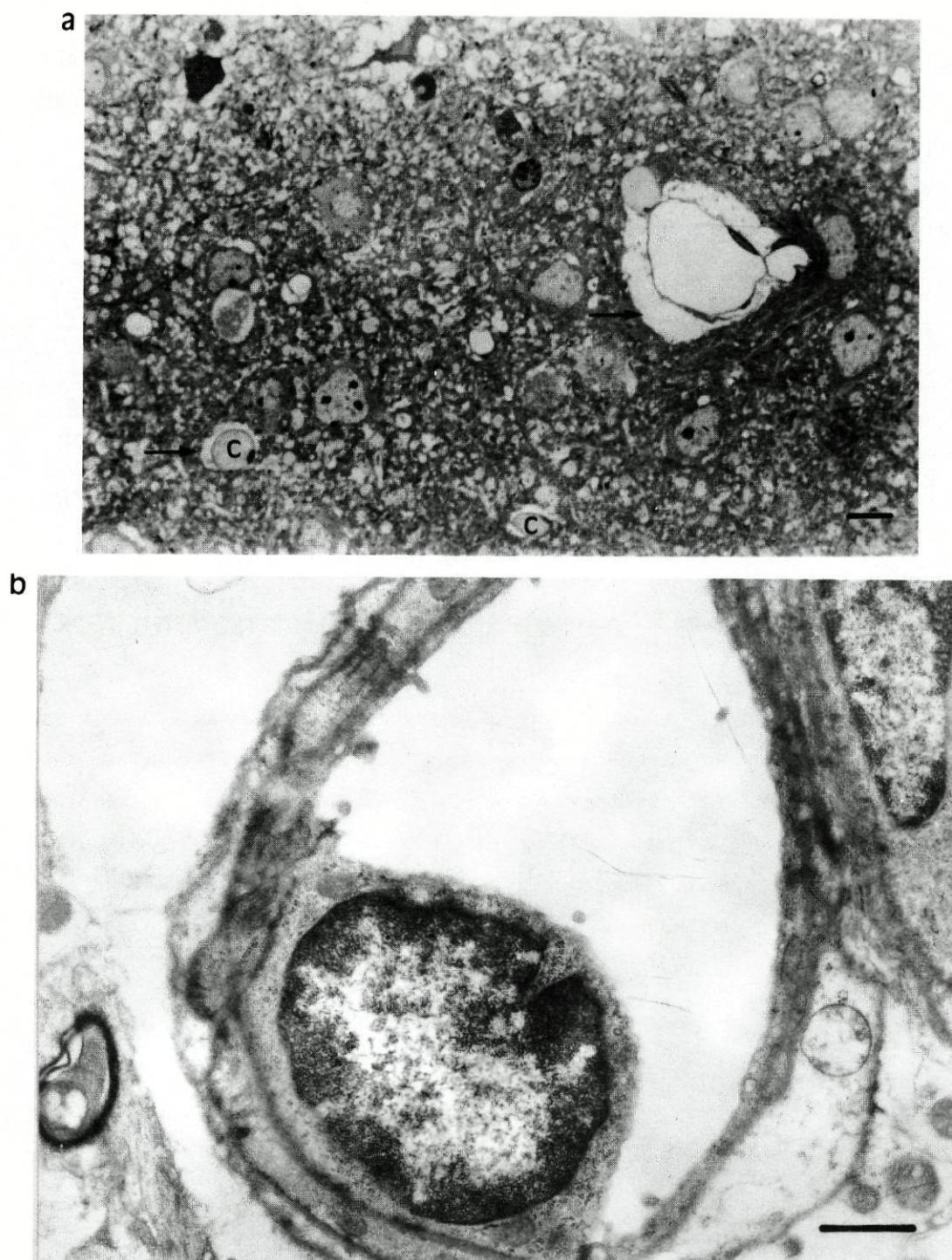


Figura 12 - Cortes de hemicórtex direito de um animal tratado com clenbuterol 15 min antes da aplicação do frio. a - fotografia de microscopia óptica onde se observa sinais de edema ligeiro (setas). c-capilares. Barra=10 μ m. b - fotografia de microscopia electrónica. Note-se o edema ligeiro e a abundância de vesículas de pinocitose. Barra=1 μ m.

1.6. Avaliação semi-quantitativa do edema e actividade pinocitótica nos capilares cerebrais

Os resultados da avaliação semi-quantitativa, em 4 graus, do edema cerebral e frequência de vesículas de micropinocitose nas fotografias ultraestruturais de todos os capilares observados estão referidos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Avaliação, por graus, do edema cerebral em fotografias ultraestruturais.

		<i>Grau de edema</i>					
			<i>Distribuição por graus (%)</i>				
<i>Grupos</i>	<i>mediana</i>	<i>grau 0</i>	<i>grau 1</i>	<i>grau 2</i>	<i>grau 3</i>	<i>n</i>	
Frio	Controlo Esquerdo *	0	95,0	5,0	0,0	0,0	20
	Controlo Direito	3	0,0	3,6	25,0	71,4	28
	Fenoxibenzamina *	0	58,6	31,0	6,9	3,5	29
	Clembuterol *	1	10,3	48,3	34,5	6,9	58
	Vimblastina *	0	82,1	17,9	0,0	0,0	28

Avaliação semi-quantitativa do edema cerebral em fotografias ultraestruturais de córtex parietal esquerdo de animais controlo (Controlo Esquerdo) e córtex parietal direito (lado de aplicação do frio) de animais controlo (Controlo Direito) e de córtex parietal direito de animais tratados com fenoxibenzamina (10 mg/kg,), clembuterol (1 mg/kg,) e vimblastina (0,8 mg/kg,).

Graus: 0 - inexistente; 1- ligeiro; 2 - moderado; 3 - marcado

* - diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Controlo Direito ($p < 0,00001$, teste do χ quadrado para tabelas de K colunas por J linhas)

Tabela 2 - Avaliação, por graus, da actividade pinocitótica das células endoteliais dos capilares cerebrais em fotografias ultraestruturais.

		<i>Grau de actividade pinocitótica</i>					
		<i>Distribuição por graus (%)</i>					
<i>Grupos</i>	<i>mediana</i>	<i>grau 0</i>	<i>grau 1</i>	<i>grau 2</i>	<i>grau 3</i>	<i>n</i>	
	Controlo Esquerdo *	0	65,0	20,0	15,0	0,0	20
Frio	Controlo Direito	3	0,0	0,0	39,3	60,7	28
	Fenoxibenzamina *	2	24,1	34,5	37,9	3,5	29
	Clembuterol	3	1,7	15,5	26,6	55,2	58
	Vimblastina #	2	17,9	28,6	35,7	17,8	28

Avaliação semi-quantitativa da actividade pinocitótica das células endoteliais de capilares cerebrais em fotografias ultraestruturais de córtex parietal esquerdo de animais controlo (Controlo Esquerdo) e córtex parietal direito (lado de aplicação do frio) de animais controlo (Controlo Direito) e de córtex parietal direito de animais tratados com fenoxibenzamina (10 mg/kg.), clembuterol (1 mg/kg.) e vimblastina (0,8 mg/kg.).

Graus: 0 - inexistente; 1- ligeiro; 2 - moderado; 3 - marcado

* e # - diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o Controlo Direito ($p < 0,00001$ e $p < 0,0005$, respectivamente, teste do χ quadrado para tabelas de K colunas por J linhas)

2. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CAPILARES CEREBRAIS CULTIVADAS EM MONOCAMADA POLARIZADA

2.1. Isolamento e cultura de células endoteliais de capilares cerebrais

Obteve-se culturas primárias em monocamada polarizada de células endoteliais de capilares cerebrais de Boi, que desenvolveram confluência ao fim de 10 a 12 dias depois da sementeira.

Na Figura 8 apresenta-se o aspecto de placas onde se procedeu à cultura destas células ao fim de 4 dias (A) e ao fim de 10 dias (B), verificando-se o desenvolvimento de confluência. Em nenhuma das placas com culturas se verificou qualquer contaminação bacteriana ou fúngica. De igual modo, não se observou, em nenhuma das placas, desenvolvimento de qualquer outro tipo de célula com origem no próprio animal (resultantes de um processo de isolamento deficiente).

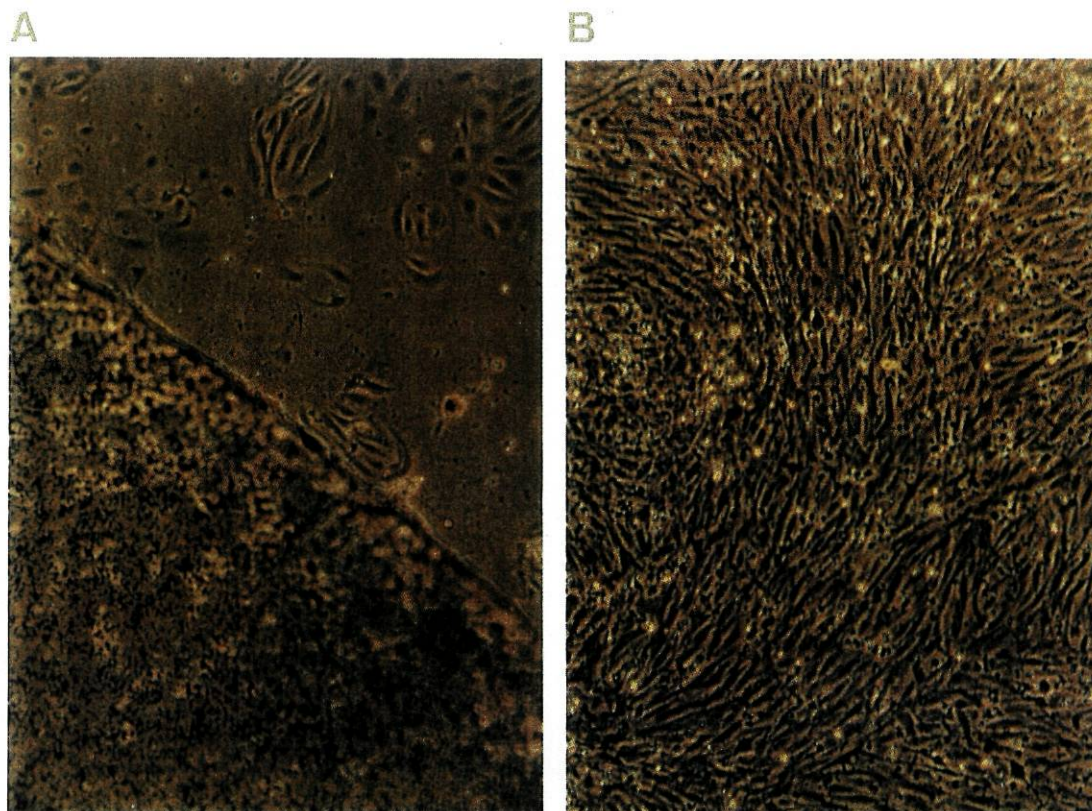


Figura 13 - Microfotografias de células endoteliais de capilares cerebrais em cultura ao fim de 4 dias (A) e ao fim de 10 dias (B), onde já se verifica o desenvolvimento de confluência.

2.2. Transporte da fluoresceína sódica através das monocamadas polarizadas de células endoteliais

2.2.1. Transporte no sentido apical-basal

Procedeu-se ao estudo do transporte de fluoresceína sódica através de monocamadas de células endoteliais em situação controlo, *i.e.*, sem a adição de qualquer fármaco às câmaras, no sentido apical-basal. Pretendeu-se assim verificar se o transporte deste marcador se mantinha constante ao longo dos 70 minutos de tempo de estudo, premissa fundamental para podermos avaliar o efeito de fármacos da forma que nos propusemos (ver Material e Métodos, 2.3.3.).

Verificou-se que o transporte da fluoresceína sódica apresentou algumas variações entre as várias experiências realizadas, mas em cada uma delas esse valor manteve-se extremamente constante ao longo dos 70 minutos estudados. Estes resultados confirmam a adequação da forma de avaliação dos efeitos dos fármacos utilizados.

O transporte neste sentido (apical-basal) mimetiza *in vitro* o transporte no sentido sangue-cérebro em estudos *in vivo*, dado que neste tipo de cultura as células desenvolvem polaridade, ficando o seu polo basal aderente à membrana de policarbonato e o seu polo apical livre, no lado oposto (GUILLOT e AUDUS 1990).

O valor do "coeficiente aparente de permeabilidade" (ver Material e Métodos, 2.3.3.), medido aos 10 minutos, foi de $10,12 \pm 0,40 \times 10^{-5}$ cm/s (n=10).

2.2.2. Efeitos dos fármacos

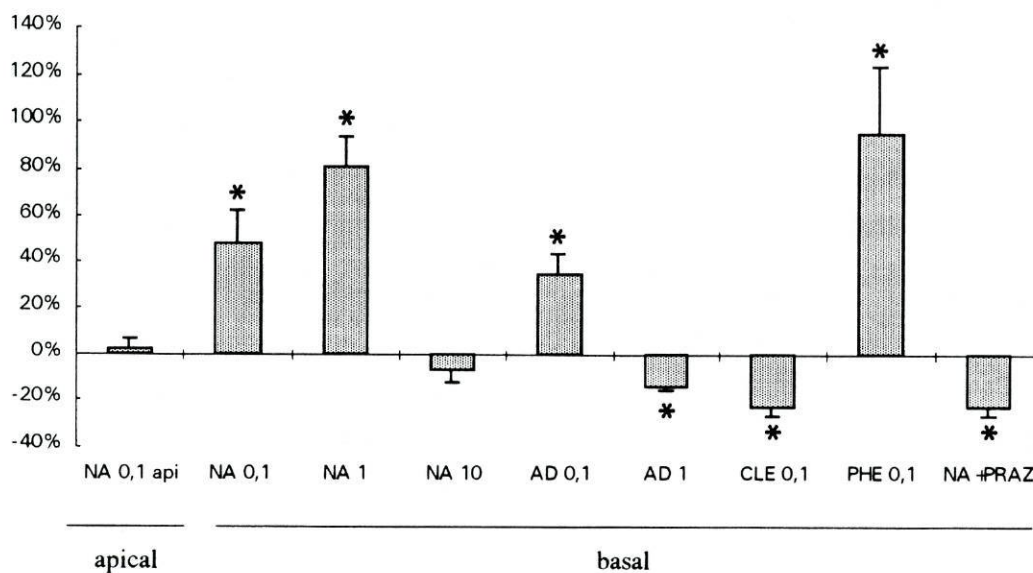


Figura 14 - Efeito da noradrenalina 10^{-7} M fornecida pelo lado apical (NA 0,1 api), da noradrenalina nas concentrações de 10^{-7} M (NA 0,1), 10^{-6} M (NA 1) e 10^{-5} M (NA 10), da adrenalina nas concentrações de 10^{-7} M (AD 0,1) e 10^{-6} M (AD 1), do clenbuterol 10^{-7} M (CLE 0,1), da fenilefrina 10^{-7} M (PHE 0,1) e da noradrenalina 10^{-7} M em presença da prazosina 10^{-7} M (NA+PRAZ). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da variação percentual do declive das rectas das concentrações de fluoresceína sódica na câmara receptora ao longo do tempo obtidas na ausência (controlo) e na presença do fármaco.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo respectivo (t emparelhado)

2.2.2.1. Noradrenalina

Com as três concentrações de noradrenalina utilizadas (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M) obteve-se os seguintes resultados no transporte da fluoresceína sódica: as concentrações de 10^{-7} e 10^{-6} M aumentaram significativamente o transporte de fluoresceína sódica ($47,4 \pm 14,8\%$, $n=4$, $p < 0,05$ e $81,1 \pm 12,9\%$, $n=7$, $p < 0,0001$, respectivamente), ao passo que a concentração mais elevada (10^{-5} M) não provocou alteração significativa ($-6,9 \pm 5,7\%$, $n=5$, $p=0,3$) (Figura 14).

Aplicou-se o bloqueador alfa adrenérgico prazosina juntamente com a noradrenalina (10^{-7} M) com o objectivo de esclarecer se o aumento no transporte induzido por esta dose de noradrenalina era devido a acção sobre os adrenoceptores alfa.

Nestas condições, o transporte de fluoresceína sódica sofreu uma redução significativa ($-22,7 \pm 4,3\%$, $n=4$, $p < 0,02$) (Figura 14).

Aplicou-se a noradrenalina (10^{-7} M) na câmara dadora, *i.e.*, pelo lado apical, com o objectivo de esclarecermos se também nesta aplicação a noradrenalina era capaz de exercer os efeitos já demonstrados quando fornecida pelo lado basal (ver 2.2.2.1). Nestas condições, a noradrenalina não provocou uma variação estatisticamente significativa no transporte da fluoresceína sódica ($2,4 \pm 3,5\%$, $n=4$, $p > 0,05$) (Figura 14).

2.2.2.2. Adrenalina

Com as duas concentrações de adrenalina usadas (10^{-7} e 10^{-6} M) obteve-se os seguintes resultados: a concentração de 10^{-7} M aumentou significativamente o transporte da fluoresceína sódica ($34,4 \pm 9,3\%$, $n=5$, $p < 0,025$) ao passo que a

concentração mais alta (10^{-6} M) reduziu, também de forma estatisticamente significativa, esse mesmo transporte ($-14,3 \pm 1,3\%$, $n=5$, $p < 0,001$) (Figura 14).

2.2.2.3. Fenilefrina

Usou-se o agonista adrenérgico alfa fenilefrina, no sentido de se obter efeitos mediados apenas por este tipo de receptor. Verificou-se com a concentração utilizada (10^{-7} M) um aumento estatisticamente significativo do transporte da fluoresceína sódica ($95,4 \pm 28,3\%$, $n=5$, $p < 0,025$) (Figura 14).

2.2.2.4. Clembuterol

Usou-se o agonista adrenérgico selectivo beta₂ clembuterol, com o objectivo de se obter efeitos mediados apenas por este subtipo de receptor. A concentração utilizada (10^{-7} M) induziu uma redução estatisticamente significativa do transporte da fluoresceína sódica ($-22,7 \pm 4,3\%$, $n=4$, $p < 0,02$) (Figura 14).

2.2.2.5. Vincristina

Com o objectivo de esclarecermos o mecanismo envolvido nas variações no transporte da fluoresceína sódica induzidas quer pela noradrenalina (10^{-6} M) quer pelo clembuterol (10^{-7} M), repetiu-se essas experiências na presença de vincristina (10^{-6} M). Este fármaco possui características muito semelhante às da vimblastina, por nós usada nos estudos *in vivo*, inibindo a formação de vesículas de pinocitose (LARSSON *et al.* 1979).

Na presença de vincristina, as concentrações de noradrenalina e clembuterol utilizadas não produziram variações estatisticamente significativas do transporte de fluoresceína sódica ($2,3 \pm 9\%$, $n=5$, para a noradrenalina e $-6,3 \pm 15,8\%$, $n=5$, para o clembuterol) (Figura 15).

2.2.2.6. Efeito da omissão da glicose

Com o mesmo objectivo com que se usou a vincristina, *i.e.*, esclarecer o mecanismo de transporte através da inibição da formação de vesículas de pinocitose, substituiu-se a glicose do tampão pela 6-desoxi-d-glicose. Esta substituição impede a utilização de glicose pelas células, inibindo desta forma processos celulares dependentes da energia, como é o caso da pinocitose (GUILLOT *et al.* 1990).

Testou-se as mesmas concentrações de noradrenalina e clembuterol utilizadas no estudo da vincristina e, tal como nesse caso, não se verificou alterações

estatisticamente significativas no transporte da fluoresceína sódica. Os valores obtidos foram de $-12,6 \pm 3,7\%$, $n=5$, para a noradrenalina e de $1,6 \pm 6,2\%$, $n=5$, para o clenbuterol (Figura 15).

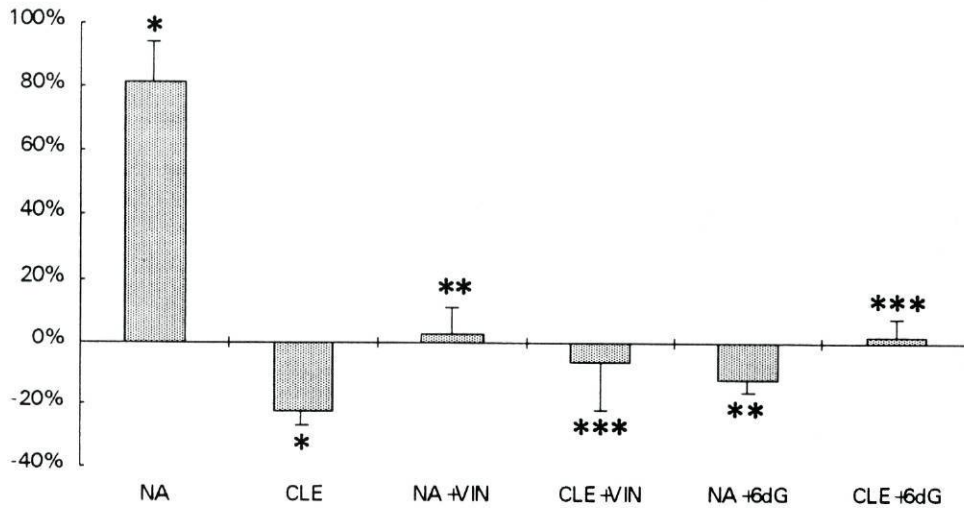


Figura 15 - Efeito da vincristina 10^{-6} M (VIN) e da substituição da glicose por 6-desoxi-d-glicose (6dG) sobre os efeitos induzidos pela noradrenalina 10^{-6} M (NA) e pelo clenbuterol 10^{-7} M (CLE). A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da variação percentual do declive das rectas das concentrações de fluoresceína sódica na câmara receptora ao longo do tempo obtidas na ausência (controlo) e na presença do fármaco.

- * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo respectivo (t emparelhado)
- ** Significativamente diferente da noradrenalina (Newman-Keuls)
- *** Significativamente diferente do clenbuterol (Newman-Keuls)

2.2.3. Transporte no sentido basal-apical

Procedeu-se a um estudo prévio do transporte de fluoresceína sódica no sentido basal-apical em monocamadas de células endoteliais em situação controlo, *i.e.*, sem a adição de qualquer fármaco às câmaras. Tal como para o transporte no sentido oposto (apical-basal) verificou-se existir uma grande constância no transporte da fluoresceína sódica ao longo dos 70 minutos em cada experiência.

Com este tipo de experiências pretendeu-se mimetizar *in vitro* o transporte no sentido cérebro-sangue que ocorre *in vivo*.

O valor do "coeficiente aparente de permeabilidade" (ver Material e Métodos, 2.3.3.), medido aos 10 minutos, foi de $10,31 \pm 0,38 \times 10^{-5}$ cm/s ($n=10$). Este valor não é significativamente diferente do obtido no sentido apical-basal (t independente).

2.2.4. Efeitos dos fármacos

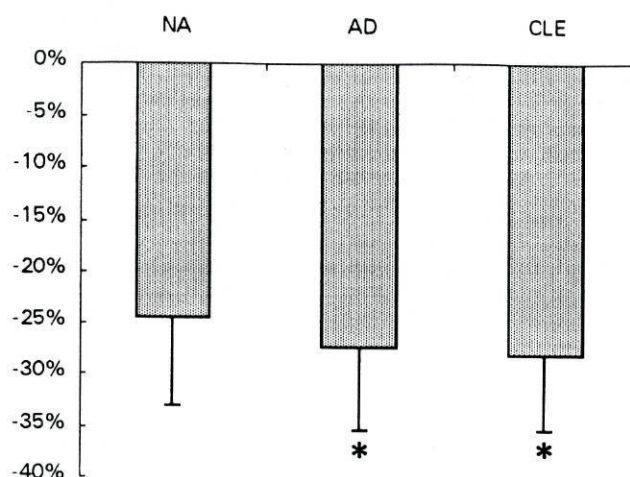


Figura 16 - Efeito da noradrenalina 10^{-7} M (NA), adrenalina 10^{-7} M (AD) e clembuterol 10^{-7} M (CLE) no transporte da fluoresceína sódica através de monocamadas de células endoteliais. A altura das colunas representa as médias aritméticas e os erros padrão da variação percentual do declive das rectas das concentrações de fluoresceína sódica na câmara receptora ao longo do tempo obtidas na ausência (controlo) e na presença do fármaco.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo respectivo (t emparelhado)

2.2.4.1. Noradrenalina

A noradrenalina, na concentração de 10^{-7} M, não alterou significativamente o transporte de fluoresceína sódica ($-24,6 \pm 8,6\%$, $n=3$, $p=0,1$) (Figura 16).

2.2.4.2. Adrenalina

A adrenalina, na concentração de 10^{-7} M, provocou uma redução pequena, mas estatisticamente significativa no transporte de fluoresceína sódica ($-27,4 \pm 8,0\%$, $n=4$, $p < 0,05$) (Figura 16).

2.2.4.3. Clembuterol

O clembuterol, na concentração de 10^{-7} M, provocou uma redução estatisticamente significativa, embora de pequena magnitude, no transporte de fluoresceína sódica ($-28,2 \pm 7,2\%$, $n=4$, $p < 0,05$) (Figura 16).

IV - DISCUSSÃO

INTRODUÇÃO

Foi objectivo deste trabalho fazer uso de protocolos que nos permitissem da forma mais directa possível abordar o assunto que nos propusemos estudar, *i.e.*, o edema cerebral vasogénico e as possíveis influências adrenérgicas na sua génese e na sua resolução. O modelo *in vivo* do edema cerebral vasogénico induzido pelo frio apresenta características que nos levaram a adoptá-lo em detrimento de outros, como o modelo de edema cerebral traumático ou o isquémico. As vantagens são a simplicidade de execução (contrariamente ao modelo de edema isquémico, de difícil execução em animais com circulação cerebral colateral muito eficaz, como o Rato), o seu baixo custo, bem como a possibilidade de obtermos uma forma quase "pura" do tipo de edema cerebral que nos interessava estudar, o edema vasogénico, ao contrário, por exemplo, do edema traumático, cujas componentes vasogénica e citotóxica parecem assumir importância semelhante no respectivo desenvolvimento.

Não estando isentos de correr o risco de perpetuar um erro metodológico, o extenso número de trabalhos já publicados fazendo uso deste modelo para esclarecimento de questões semelhantes, não só fornece uma sólida base de legitimação do mesmo como cria um espaço alargado para posterior discussão dos resultados.

Para a avaliação quantitativa do edema cerebral, utilizámos a medição do conteúdo de água e a determinação do conteúdo de azul de Evans no córtex cerebral. Sendo o edema cerebral, por definição, um aumento da quantidade de água no tecido cerebral (BETZ *et al.* 1989, MILHORAT 1992, KLATZO 1994), a escolha do teor de água como medida de edema cerebral parece-nos óbvia. No entanto, esta metodologia não permite esclarecer de forma segura quer a origem do eventual excesso de água quer a sua via de entrada no parênquima cerebral.

A origem da água em excesso pode ser atribuída com razoável segurança ao plasma sanguíneo, dado que, como já foi referido, este modelo de edema cerebral tem quase exclusivamente a componente vasogénica (ver Introdução). Todavia, o esclarecimento da via de passagem desse fluido através da barreira hematoencefálica requer o uso de outro tipo de protocolo experimental. Assim, utilizámos a técnica da passagem de um marcador do sangue para o tecido cerebral. Dado que pretendíamos estudar o papel da pinocitose no aumento do transporte transendotelial em situações em que este se encontra aumentado, escolhemos como

marcador o azul de Evans. Esta escolha deve-se ao facto deste marcador se ligar extensamente às proteínas plasmáticas (cerca de 99,5% ao fim de uma hora de circulação, RAWSON 1942), passando desta forma a funcionar como marcador da passagem de proteínas, que pelo seu elevado peso molecular apenas atravessam a barreira hematoencefálica por pinocitose ou eventualmente por disrupção das junções apertadas. Adicionalmente, este marcador tem ainda a vantagem da baixa toxicidade, baixo custo e da facilidade de doseamento, por espectrofotofluorimetria (UYAMA *et al.* 1988). Como medida de passagem do azul de Evans escolhemos, sempre que possível, a taxa de extracção (ver Material e Métodos), para assim eliminarmos a influência de variações na concentração plasmática do marcador.

Fizemos ainda um estudo morfológico do córtex cerebral de animais submetidos ao mesmo protocolo de aplicação de frio. Embora não permita uma avaliação quantitativa do edema cerebral, a microscopia permite a visualização da localização do excesso de água (por exemplo, localização intra ou extracelular) bem como de eventuais modificações na estrutura das várias células que constituem a zona a estudar, com especial destaque para as células endoteliais dos capilares cerebrais. Nestas dedicámos a nossa atenção especialmente à actividade pinocitótica e ao estado das junções apertadas (*tight junctions*), já que apenas um aumento do transporte vesicular ou disrupções das junções apertadas podem servir de via de acesso ao complexo azul de Evans/proteínas.

Ainda relativamente a este modelo, resta referir que utilizámos em todas as experiências uma aplicação de frio unilateral bem como a medição do edema e observação morfológica no córtex parietal.

Com a aplicação unilateral do frio pretendemos que o córtex contralateral funcionasse como controlo intraindividual, permitindo assim diminuir o peso de influências sistémicas, como a pressão arterial ou as pressões parciais de O₂ e CO₂.

A escolha do córtex parietal deveu-se ao facto de nesta zona os capilares possuírem inervação adrenérgica de origem central (os corpos celulares destes neurónios têm origem no *locus coeruleus*, HARTMAN 1973, EDVINSSON 1973, RENNELS e NELSON 1975). Estes capilares possuem ainda receptores adrenérgicos alfa e beta (PEROUTKA *et al.* 1980, HARIK *et al.* 1980, KOBAYASHI *et al.* 1981a,b, 1982a,b, 1985b). Estes receptores encontram-se por sua vez acoplados aos mecanismos de transdução intracelulares classicamente referidos para cada um dos tipos, *i.e.*, activação da adenilciclase (com aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico) por activação de receptores beta (NATHANSON e GLASER 1979), inibição da mesma enzima (com diminuição dos níveis intracelulares de AMP cíclico) por activação de

receptores do subtipo alfa₂ (KARNUSHINA *et al.* 1982) e activação da via dos fosfatos de inositol por activação de receptores do subtipo alfa₁ (ZELEZNIKAR *et al.* 1983).

A escolha de um tecido com estas características não só possibilita atribuir especificidade de efeitos aos fármacos com acção adrenérgica como sugere que os efeitos de tal manipulação farmacológica podem reflectir modulações de um sistema com importância fisiológica e fisiopatológica.

Por último, utilizámos um modelo *in vitro*, o modelo de células endoteliais de capilares cerebrais cultivadas em monocamada polarizada. Pela sua natureza (ver Material e Métodos), este modelo permite, em relação a modelos *in vivo*, o estudo de fármacos independentemente da sua lipossolubilidade, a utilização de concentrações conhecidas dos fármacos, a eliminação de variáveis sistémicas, o controlo rigoroso da composição dos meios nutritivos em ambos as faces da monocamada e a possibilidade de estudo do transporte nos dois sentidos de forma independente (BOWMAN *et al.* 1981, AUDUS e BORCHARDT 1986a,b, 1987, LATERRA e GOLDSTEIN 1993). Desta forma pretendemos fundamentar melhor algumas das hipóteses interpretativas elaboradas a partir dos resultados obtidos *in vivo*.

QUANTIDADE DE ÁGUA E AZUL DE EVANS NO CÓRTEX CEREBRAL AO LONGO DO TEMPO APÓS APLICAÇÃO DO FRIO

A análise de variados trabalhos que utilizam o modelo de edema cerebral vasogénico induzido pelo frio mostra-nos que não existe uniformidade na técnica de aplicação do frio, variando o tempo de aplicação, a temperatura a que é sujeito o tecido cerebral e a área submetida a lesão. Regista-se ainda o facto de alguns autores procederem a trepanação do crânio (aplicação do frio directamente sobre a *dura mater*) enquanto outros fazem a aplicação sobre o crânio intacto.

Tal disparidade metodológica traduz-se em variações significativas nos tempos de instalação, duração e resolução do edema cerebral. Afigurou-se-nos desta forma imprescindível fazer previamente a avaliação do nosso modelo no que respeita ao conteúdo de água e azul de Evans ao longo do tempo, com vista a determinar um tempo adequado para o estudo das acções dos fármacos. A análise das curvas obtidas permite ainda estabelecer quais os tempos de predomínio da componente de formação do edema ou de remoção do mesmo (PAPPIUS 1989).

Verificámos que a instalação do edema, medida pelos dois processos, é rápida e atinge o seu máximo três horas após aplicação do frio. Dos tempos estudados, podemos concluir que existe um bom paralelismo entre a entrada de água e de azul de Evans até às três horas, onde, como já foi referido, é atingido o maior grau de edema cerebral. Estes resultados reforçam a adequação do azul de Evans como

marcador de permeabilidade da barreira hematoencefálica e confirmam a origem plasmática do fluido em excesso no córtex cerebral, fornecendo desta forma mais uma prova de ser este um modelo de edema cerebral vasogénico. Adicionalmente, o facto do complexo azul de Evans-albumina possuir elevado peso molecular e como tal apenas poder atravessar a barreira hematoencefálica através de "canais" de diâmetro elevado, sugere ser a pinocitose o mecanismo transendotelial envolvido no aumento do transporte deste marcador e da água para o sistema nervoso central. A ausência de receptores específicos para a albumina nos capilares cerebrais (PARDRIDGE *et al.* 1985) parece afastar a hipótese desta pinocitose ser mediada por receptores (*receptor-mediated*), implicando assim a pinocitose inespecífica ou de fase fluida (*fluid-phase*).

Os dados obtidos para o conteúdo de água e azul de Evans às 24 horas, *i.e.*, normalização do conteúdo de água e persistência de uma quantidade apreciável de azul de Evans, poderiam à primeira vista desfazer a ideia atrás referida dum paralelismo entre o transporte de água e do referido marcador. Contudo, e porque ao fim deste tempo a remoção do edema é mais importante que a sua formação (como é atestado pelo conteúdo de água) somos levados a supor que o azul de Evans não foi tão eficientemente removido como a água. De facto, dados da literatura referem a existência de uma captação activa de proteínas por parte de células constituintes do tecido cerebral, como as células gliais e os próprios neurónios (CANCILLA *et al.* 1972, TENGVAR e OLSSON 1982, SHINOHARA *et al.* 1990). Desta forma, o complexo azul de Evans-albumina ficaria "retido" num compartimento menos acessível à sua remoção quer pelas células endoteliais dos capilares quer pela própria difusão do líquido intersticial, mecanismos julgados como os mais importantes na resolução do edema cerebral (WAGNER *et al.* 1974, VAN DEURS 1977, KLATZO *et al.* 1980, RENNELS *et al.* 1985, VORBRODT *et al.* 1985, QUAGLIARELLO *et al.* 1991, OHATA e MARMAROU 1992).

Pelas razões já apontadas na secção dos Resultados (pág. 44) escolhemos o tempo de 2 horas para estudo das acções da maioria dos fármacos.

EFEITOS DOS FÁRMACOS NO CONTEÚDO DE ÁGUA E AZUL DE EVANS NO CÓRTEX CEREBRAL

Para esclarecermos o papel dos mecanismos adrenérgicos na formação do edema cerebral no nosso modelo, procedemos à administração de fármacos que pudessem evidenciar alguns efeitos mediados pelos receptores adrenérgicos alfa ou beta.

Convirá antes de mais referir que, apesar da nossa hipótese inicial pretender implicar os receptores adrenérgicos localizados no endotélio dos capilares

cerebrais, a administração sistémica dos fármacos não permite, *a priori*, atribuir tal especificidade às suas acções. De entre os possíveis efeitos de fármacos com acção sobre receptores adrenérgicos, destacamos pela sua eventual importância na permeabilidade da barreira hematoencefálica, as exercidas sobre o aparelho cardiovascular, mais concretamente sobre a pressão arterial. Com efeito, é sabido que, no Rato, os mecanismos responsáveis pela manutenção do fluxo sanguíneo cerebral tornam-se incapazes de o fazer para valores de pressão arterial média fora dos limites de 60 mmHg (inferior) e 180-200 mmHg (superior) (RAPOPORT e THOMPSON 1975, EDVINSSON *et al.* 1976). No entanto, variações do fluxo sanguíneo cerebral afectam sobretudo a permeabilidade a substâncias que penetram muito facilmente a barreira hematoencefálica, (FENSTERMACHER 1989, SMITH 1989) o que não é o caso do azul de Evans. Em estudo recente, UNTERBERG *et al.* (1994) mostraram que com um protocolo de aplicação de frio onde se provocam aumentos da quantidade de água cerebral semelhantes aos por nós obtidos, não se verificam quaisquer variações na tensão arterial.

Podemos ainda socorrer-nos dos nossos dados experimentais para refutarmos a hipótese da importância das acções cardiovasculares dos fármacos utilizados no transporte de água e azul de Evans para o parênquima cerebral. Esses dados são os respeitantes aos valores do edema cerebral no córtex contralateral à aplicação de frio, onde verificámos não existir qualquer diferença significativa entre os vários grupos estudados.

Pareceu-nos assim estarem reunidas as condições necessárias para atribuímos os efeitos dos fármacos às suas acções sobre os receptores adrenérgicos localizados nas células endoteliais dos capilares cerebrais.

Iniciámos o nosso estudo pela administração de fenoxibenzamina, com o intuito de esclarecermos o papel dos receptores alfa no aumento do transporte de água e de azul de Evans. Verificámos que este fármaco reduziu de forma significativa aqueles dois parâmetros, o que sugere o envolvimento dos receptores alfa na instalação do edema cerebral. A demonstração de um efeito com a administração de um antagonista é compatível com a existência de acções mediadas por um agonista endógeno ao nível do receptor alfa. O candidato natural para este tipo de receptor é a noradrenalina, existente em terminais de neurónios adrenérgicos de origem central (*locus coeruleus*) localizados em íntimo contacto com a membrana basal de capilares cerebrais (HARTMAN 1973, EDVINSSON *et al.* 1973, RENNELS e NELSON 1975) e com capacidade de activar receptores alfa. A hipótese de ser a noradrenalina ou a adrenalina plasmática a exercer acções sobre estes receptores pode afastar-se, já

que a barreira hematoencefálica é praticamente impermeável às catecolaminas circulantes (WEIL-MALHERBE *et al.* 1959, 1961, MACKENZIE *et al.* 1976).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, que verificaram que o bloqueio alfa é capaz de reduzir aumentos de permeabilidade da barreira hematoencefálica resultantes da estimulação farmacológica (RAICHLE *et al.* 1975) ou eléctrica (SARMENTO *et al.* 1994) do *locus coeruleus*, da administração intracerebroventricular de noradrenalina (SARMENTO *et al.* 1991) ou da administração sistémica de amitriptilina (PRESKORN *et al.* 1982). INOUE *et al.* (1991) descrevem que o bloqueio dos receptores alfa é capaz de prevenir lesões neurológicas associadas à lesão pelo frio. KOBAYASHI *et al.* (1985b) referem um número aumentado de receptores alfa (subtipo alfa₁) no Rato espontaneamente hipertenso em relação ao Rato Wistar-Kyoto e sugerem que esse aumento é responsável por algumas das alterações morfológicas e funcionais dos microvasos cerebrais observadas na hipertensão arterial. Compatível com a nossa hipótese do envolvimento dos receptores alfa no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica em situações patológicas é ainda o trabalho de Joó *et al.* (1989), onde são observadas reduções na formação do edema cerebral isquémico com a administração do composto H-7, inibidor da enzima proteína cínase C. Esta enzima intervém no mecanismo de transdução intracelular do receptor alfa₁.

A fenoxibenzamina apresenta, no entanto, problemas de especificidade, tendo-lhe sido atribuídos outros efeitos tais como o bloqueio de receptores da dopamina (LEHMANN e LANGER 1981, HALL *et al.* 1983), da acetilcolina (BLAZSO e MINKER 1980), do ácido gama-aminobutírico (SMOCKUM 1983) e dos opióides (ROBSON e KOSTERLITZ 1979). Todavia, é o único antagonista dos receptores adrenérgicos alfa de que dispomos capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, podendo desta forma agir sobre os receptores localizados do lado abluminal das células endoteliais dos capilares cerebrais. Face a esta limitação, remetemos para o modelo *in vitro* o estudo dos efeitos mediados por receptores alfa através da utilização de fármacos de maior especificidade.

O envolvimento de adrenoceptores beta no transporte de substâncias através da barreira hematoencefálica tem sido apontado por alguns autores (HERBST *et al.* 1979, NATHANSON e GLASER 1979, NATHANSON 1980, PEROUTKA *et al.* 1980, GRAMMAS *et al.* 1985, KOBAYASHI *et al.* 1983, 1985a,b, SARMENTO *et al.* 1991, 1994, MOORADIAN e SCARPACE 1992) como um mecanismo importante na manutenção do volume e da composição do meio extracelular do cérebro. No entanto, à excepção de SARMENTO *et al.* (1991, 1994), em nenhum destes estudos é feita uma quantificação do transporte de água ou macromoléculas através de capilares

cerebrais em situações de manipulação destes receptores. As inferências quanto à influência dos receptores beta no transporte transendotelial são baseadas na capacidade de agonistas ou antagonistas beta serem capazes de alterar os níveis intracelulares de AMP cíclico em células endoteliais de microvasos cerebrais. Este mensageiro intracelular modifica as características de permeabilidade da barreira hematoencefálica, (Joó 1972, 1986, Joó *et al.* 1975, 1984, ÁDÁM *et al.* 1987) bem como a actividade pinocitótica das células endoteliais (Joó 1972) (revisão por Joó 1993).

Face aos resultados de KOBAYASHI *et al.* (1981a), que referem haver um predomínio do subtipo beta₂ na população total de adrenoceptores beta nas células endoteliais de capilares cerebrais (cerca de 80% do subtipo beta₂ e 20% do subtipo beta₁), iniciámos o nosso estudo pela administração de clenbuterol. Este fármaco atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (VON KOPITAR e ZIMMER 1976) e possui selectividade para receptores do subtipo beta₂ (COHEN *et al.* 1982, ORDWAY *et al.* 1987).

Os resultados mostram que a administração de clenbuterol reduziu a formação do edema cerebral. Esta redução verificou-se quer no conteúdo de água quer na taxa de extracção do azul de Evans. Verificámos ainda um efeito semelhante quando administrámos o clenbuterol 2 horas após aplicação do frio.

Estes resultados são compatíveis com a hipótese da existência de um controlo da permeabilidade da barreira hematoencefálica mediado por receptores beta em situações de edema cerebral vasogénico. Mais ainda, o clenbuterol foi capaz de normalizar o conteúdo de água e reduzir a taxa de extracção do azul de Evans no córtex cerebral após instalação do edema, resultado que sugere que este fármaco actua de forma a acelerar o processo de remoção da água e do azul de Evans.

A incapacidade do clenbuterol em reduzir a taxa de extracção do azul de Evans para os níveis do controlo apesar de o conseguir fazer para a água, pode ser explicada com os mesmos argumentos utilizados para explicar a diferença entre estes parâmetros observada às 24 horas em situação de controlo (ver pág. 66), o que vem reforçar, ainda que de forma indirecta, a hipótese deste efeito do clenbuterol ser exercido principalmente sobre a remoção do edema.

Este papel aparentemente favorável da estimulação de receptores beta na resolução do edema cerebral é também avançado por MAGNONI *et al.* (1983), que observaram uma diminuição deste tipo de receptores em microvasos cerebrais de Ratos hipertensos, situação em que estes animais evidenciavam uma permeabilidade aumentada da barreira hematoencefálica. A nossa hipótese é ainda coerente com os resultados de SARMENTO *et al.* (1994) que verificaram um aumento da taxa de

extracção de fluoresceína sódica induzido por bloqueio beta em animais submetidos a estimulação eléctrica do *locus coeruleus*.

Os resultados obtidos com a administração de dois antagonistas beta, o metoprolol (antagonista selectivo beta₁) e o timolol (antagonista beta₁ e beta₂) fornecem evidência adicional de que o efeito do clembuterol seja de facto mediado por receptores do subtipo beta₂, já que apenas o timolol foi capaz de antagonizar as acções do clembuterol, ao contrário do metoprolol.

É ainda de referir os resultados obtidos com a administração de isoprenalina por via sistémica ou por via intracerebroventricular na taxa de extracção do azul de Evans. Sendo as características de polaridade deste fármaco incompatíveis com a sua passagem para o parênquima cerebral (GORMAN *et al.* 1987), os resultados obtidos sugerem que a localização dos receptores beta responsáveis pela redução do edema seja do lado abluminal dos capilares, pois apenas a isoprenalina fornecida intracerebralmente foi capaz de demonstrar um efeito de redução da permeabilidade ao azul de Evans.

A diferença verificada na taxa de extracção na situação controlo (3,75%) quando comparada com a verificada ao fim do mesmo tempo (1 hora) em situação controlo nas experiências em que não foi feita a injeção intracerebroventricular (29,75 µg/mg, correspondentes a uma taxa de extracção de 2,25%) pode explicar-se pelo trauma adicional causado pela perfuração do crânio e colocação da agulha, necessários à administração da isoprenalina por esta via.

Para esclarecermos o papel da pinocitose no aumento do conteúdo cerebral de água e azul de Evans no nosso modelo, estudámos o efeito da vimblastina, fármaco capaz de reduzir a formação de vesículas pinocitóticas através da inibição da formação de microtúbulos (LARSSON *et al.* 1979, SHARMA *et al.* 1990).

A redução na formação do edema cerebral verificada com a administração de vimblastina está de acordo com a nossa hipótese de ser o aumento da actividade vesicular nas células endoteliais dos microvasos cerebrais um dos mecanismos responsáveis pela formação do edema induzido pela aplicação de frio. A ausência de efeito da vimblastina no córtex contralateral (esquerdo), além de eliminar a hipótese de um possível efeito sistémico deste fármaco ser o responsável pelo seu efeito redutor do edema, confirma que a pinocitose não constitui via de acesso importante de substâncias ao parênquima cerebral em condições normais.

O envolvimento da pinocitose na formação do edema cerebral induzido pelo frio é também apontado por BODSCH *et al.* (1982) e TROUT *et al.* (1986).

Os resultados obtidos com a administração de dexametasona, ausência de efeito redutor do edema cerebral, medido quer pelo conteúdo de água quer com a taxa de

extracção do azul de Evans, sugerem que a corticoterapia não é eficaz neste tipo de edema. Outros autores demonstraram que, em modelos experimentais de edema cerebral, este fármaco não exhibe qualquer efeito redutor do referido edema (SHAPIRA *et al.* 1988, SCHÜRER *et al.* 1989, GOTTI *et al.* 1990, UNTERBERG *et al.* 1990).

A dexametasona é clinicamente usada em situações de edema vasogénico, mas a sua eficácia apenas se restringe ao edema induzido por tumores cerebrais. Não obstante a base farmacológica para a utilização de corticoesteróides neste tipo de patologia ser eminentemente empírica (FISHMAN 1982), estudos recentes apontam para que as acções deste tipo de fármacos se devam à sua capacidade de inibir os efeitos do denominado factor de permeabilidade vascular, que é produzido pelo próprio tumor (BRUCE *et al.* 1987).

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO CÓRTEX E MICROVASOS CEREBRAIS: EFEITOS DA APLICAÇÃO DO FRIO E DA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

Como já foi referido, o edema cerebral vasogénico resulta dum aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, com conseqüente aumento da passagem de água e solutos para o parênquima cerebral. Entre estes solutos incluem-se proteínas plasmáticas, que pelo seu elevado peso molecular apenas passam através dos capilares cerebrais por pinocitose ou eventualmente por canais formados pela disrupção das junções apertadas. A passagem de proteínas de origem plasmática para o sistema nervoso central em situações de edema cerebral vasogénico é tida como contribuindo para o aumento do conteúdo de água cerebral verificado nesta situação (KUROIWA *et al.* 1985). Procurámos assim esclarecer o papel da pinocitose no edema cerebral verificado no nosso modelo, bem como as influências exercidas pelos fármacos a este nível.

Os resultados obtidos nas nossas experiências mostram que duas horas após a aplicação do frio, as células endoteliais dos microvasos do córtex cerebral ipsilateral à lesão mostram um marcado aumento do número de vesículas pinocitóticas, bem como a formação de microvilosidades na sua face luminal. A acumulação de água no tecido cerebral é muito marcada, inundando os espaços perivascularares. Algumas células da glia apresentam-se edemaciadas, o que leva a supor uma passagem de água do espaço extra para o intracelular como mecanismo de remoção do excesso de fluido no parênquima cerebral. Estes dados estão de acordo com os conteúdos de água e azul de Evans por nós verificados duas horas após aplicação do frio. Em todos os cortes observados as junções apertadas mantiveram-se íntegras.

O córtex contralateral apresenta um aspecto normal, idêntico ao de animais não submetidos à aplicação de frio, ou seja, muito baixa actividade vesicular e escassez de microvilosidades nos capilares, bem como a inexistência de qualquer acumulação anormal de água no parênquima cerebral. Também nesta região cerebral, os dados morfológicos são concordantes com os dados quantitativos do conteúdo de água. Este foi um achado constante em todas as situações experimentais (tal como se verificou na análise quantitativa), o que reitera a nossa hipótese da reduzida importância de factores sistémicos no desenvolvimento do edema cerebral vasogénico induzido pelo frio.

Para além das características morfológicas dos capilares cerebrais classicamente descritas como essenciais para a manutenção da baixa permeabilidade verificada na rede vascular cerebral (ausência de fenestrações e baixíssima actividade vesicular, CERVÓS-NAVARRO 1963, REESE e KARNOVSKY 1967, GOLDSTEIN e BETZ 1986, CERVÓS-NAVARRO *et al.* 1988), as células endoteliais dos capilares cerebrais possuem ainda outras características funcionais de selectividade à passagem de substâncias. São elas a existência de transportadores específicos para determinados nutrientes essenciais ao funcionamento do cérebro (p. ex. glicose e aminoácidos, CRONE 1965, OLDENDORF 1971) e a existência de vários sistemas de metabolização (revisão por MINN *et al.* 1991). Mais recentemente, tem sido apontada como também contribuindo para as características de permeabilidade da barreira hematoencefálica a existência de locais de polaridade negativa (*anionic sites*) no lado luminal da célula endotelial (NAGY *et al.* 1981, HARDEBO e KÄHRLSTRÖM 1985).

Este conjunto de características não é obviamente visível por microscopia, pelo que se poderia atribuir a modificações em qualquer destes sistemas o aumento do transporte de água e azul de Evans através da barreira hematoencefálica. No entanto existem dados na literatura que nos permitem rejeitar qualquer das hipóteses:

- 1 - A albumina plasmática não é substrato de nenhum transportador específico (PARDRIDGE *et al.* 1985), pelo que a entrada do complexo azul de Evans/proteínas não pode ser atribuída a este tipo de mecanismo de transporte;
- 2 - O hipotético mecanismo pelo qual a albumina plasmática poderia ser metabolizada na célula endotelial seria por incorporação e posterior degradação nos lisossomas. No entanto, o conteúdo em lisossomas das células endoteliais dos capilares cerebrais é baixo, assim como é baixa a capacidade de degradação da albumina pelos lisossomas (AUDUS e RAUB 1993). Em situações de aumento do transporte transendotelial no cérebro, os dados da

literatura apontam para um aumento do número destes organelos no endotélio capilar (LOSSINSKY *et al.* 1981, TAGAMI *et al.* 1983). Este aumento poderia explicar diminuições e não aumentos no transporte;

- 3 - A perda dos locais de polaridade negativa (*anionic sites*) permite apenas a entrada de moléculas de baixo peso molecular (HART *et al.* 1987), o que não é o caso do complexo azul de Evans-albumina.

Deste modo, as nossas observações fornecem evidência adicional para que seja o aumento do transporte vesicular o principal responsável pelo aumento da acumulação de água e azul de Evans neste modelo, o que está de acordo com os dados de BODSCH *et al.* (1982) e TROUT *et al.* (1986). O aumento do número de vesículas de pinocitose como única alteração morfológica visível em células endoteliais de capilares cerebrais está também descrito noutros modelos de edema cerebral, como o pós-traumático (BEGGS e WAGGENER 1976, POVLISHOCK *et al.* 1978) e o pós-isquémico (PETITO 1979, WESTERGAARD 1977, LIU 1988, HATASHITA e HOFF 1990) e ainda em situações patológicas como as convulsões (LORENZO *et al.* 1972) e meningites (QUAGLIARELLO *et al.* 1991).

Em revisão recente, BROADWELL e BANKS (1993) questionam a importância do transporte vesicular através da barreira hematoencefálica em situações de aumento de permeabilidade desta. Advogam estes autores que as observações feitas por microscopia electrónica, sendo estáticas no tempo e bidimensionais no espaço, não permitem obter conclusões seguras quanto a mecanismos celulares dinâmicos como a pinocitose. Contudo, foi possível demonstrar em tecidos periféricos que as macromoléculas atravessam os capilares por pinocitose (PALADE 1960, 1961, MILICI *et al.* 1987), ou seja, que este é um mecanismo capaz de transportar substâncias de uma face para a outra de uma célula endotelial. Através da constatação que a ausência de pinocitose é concomitante com baixo transporte e que o aumento da pinocitose é concomitante com um aumento do transporte, parece-nos razoável admitir que, sob determinadas condições (incluindo as do nosso modelo), a pinocitose pode constituir via de acesso de macromoléculas para o tecido cerebral.

Os resultados obtidos com a administração de fenoxibenzamina mostram uma clara diminuição da actividade vesicular no endotélio dos capilares bem como uma redução na acumulação de água no parênquima cerebral. Estes dados corroboram os obtidos com o transporte de azul de Evans e conteúdo de água e reforçam a hipótese da existência de um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica mediado por receptores alfa em situações de edema cerebral vasogénico. Este aumento parece ser devido principalmente a activação da

pinocitose nos capilares cerebrais, já que a fenoxibenzamina diminui marcadamente a actividade vesicular sem evidenciar outros efeitos morfológicos nestas células.

Também no estudo morfológico se põem os mesmos problemas de especificidade da fenoxibenzamina. O estudo de fármacos com maior especificidade para os receptores alfa quanto à sua capacidade de modificar o transporte através da barreira hematoencefálica, bem como o envolvimento da pinocitose, foi feito com o auxílio do modelo *in vitro*.

A administração de clenbuterol ou a administração intracerebroventricular de isoprenalina resultou em marcada redução da acumulação de água mas teve pouco ou nenhum efeito sobre a elevada actividade vesicular no endotélio capilar. Estes dados apontam para que sejam diferentes os mecanismos envolvidos na redução do edema verificada com os agonistas beta e com a fenoxibenzamina. A activação dos receptores beta parece fazer com que alguma da actividade vesicular verificada nas células endoteliais dos capilares não constitua via de transporte de água e macromoléculas do lume capilar para o tecido cerebral. Se levarmos em linha de conta os resultados obtidos com a administração do clenbuterol após instalação do edema (redução no conteúdo de água e do transporte de azul de Evans), podemos ir um pouco mais além e sugerir que a activação dos receptores beta₂ pode, nestas condições, induzir um transporte vesicular em sentido inverso, *i.e.*, do cérebro para o sangue.

Este tipo de transporte reverso é apontado na literatura como constituindo um mecanismo importante na resolução do edema cerebral (LORENZO *et al.* 1972, VAN DEURS 1977, VORBRODT *et al.* 1985, QUAGLIARELLO *et al.* 1991).

A capacidade das catecolaminas modularem a actividade vesicular foi demonstrada em vasos periféricos (nomeadamente no endotélio) por AZEVEDO *et al.* (1984), favorecendo deste modo a ideia de que estas aminas poderão exibir o mesmo efeito no endotélio capilar cerebral.

O possível envolvimento das junções apertadas na diminuição do edema cerebral mediada por agonistas beta pode ser refutado por duas razões:

- 1 - Não se observaram disrupções das junções apertadas em nenhum dos cortes observados;
- 2 - Mesmo havendo abertura das junções apertadas não detectadas nas nossas observações, os canais assim formados apenas permitem a passagem de substâncias a favor de um gradiente de concentração, o que não explica a redução obtida no transporte de azul de Evans com a administração de clenbuterol duas horas após a aplicação do frio.

As observações de cortes de animais tratados com a vimblastina, fármaco com capacidade de reduzir a formação de vesículas pinocitóticas (LARSSON *et al.* 1979, SHARMA *et al.* 1990), mostraram uma diminuição da actividade vesicular nas células endoteliais dos capilares cerebrais com concomitante redução da acumulação de água no parênquima cerebral. Estes dados fornecem mais uma evidência para que seja o aumento de pinocitose o responsável pelo transporte aumentado de água e azul de Evans no nosso modelo de edema cerebral vasogénico.

TRANSPORTE DA FLUORESCEÍNA SÓDICA ATRAVÉS DE UMA MONOCAMADA POLARIZADA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE CAPILARES CEREBRAIS

A utilização de um modelo de barreira hematoencefálica *in vitro* para o estudo do transporte de substâncias através dos capilares cerebrais tem permitido esclarecer vários pontos que se revelaram difíceis ou mesmo impossíveis de resolver com os modelos *in vivo* (BOWMAN *et al.* 1981, AUDUS e BORCHARDT 1986a,b, 1987, MILLER *et al.* 1992, revisão por LATERRA e GOLDSTEIN 1993).

O efeito das catecolaminas endógenas adrenalina e noradrenalina sobre o transporte da fluoresceína sódica no sentido apical-basal (correspondente ao sentido sangue-cérebro) pode resumir-se da seguinte forma: as concentrações mais baixas aumentaram o transporte, ao passo que as concentrações mais altas não alteraram (10^{-5} M de noradrenalina) ou reduziram mesmo (10^{-6} M de adrenalina) a passagem da fluoresceína sódica através da monocamada.

A demonstração de efeitos destas duas aminas para as doses de 10^{-7} M fornece sólida evidência para a existência de uma modulação adrenérgica do transporte através dos capilares cerebrais. A inversão no aumento do transporte verificada para as concentrações mais elevadas é compatível com a hipótese das catecolaminas poderem produzir efeitos contrários nas células endoteliais dos capilares cerebrais, o que é fortemente sugestivo da presença de dois tipos diferentes de adrenoceptores. A diferença entre as doses de adrenalina e noradrenalina necessárias para produzir diminuição do transporte sugerem que o receptor envolvido nesta redução seja o β_2 , já que a adrenalina é mais potente que a noradrenalina como agonista deste subtipo de receptor beta (HOFFMAN e LEFKOWITZ 1990).

A administração de um agonista alfa ou de um agonista β_2 (fenilefrina ou clenbuterol, respectivamente) produziu variações de sentido oposto na passagem da fluoresceína sódica através da monocamada (sentido apical-basal). A fenilefrina aumentou de forma significativa o transporte, reforçando a ideia de que a estimulação alfa induz aumentos no transporte transendotelial nos capilares

cerebrais. A selectividade deste fármaco para os adrenoceptores alfa na dose utilizada permite tirar conclusões seguras quanto ao envolvimento deste tipo de receptores.

Os resultados obtidos com o clenbuterol também são concordantes com os obtidos *in vivo*, pois este fármaco reduziu a passagem do marcador através das células endoteliais. Estes dados fortalecem a hipótese de que a estimulação do receptor beta₂ reduz a permeabilidade da barreira hematoencefálica. No entanto, a redução no transporte obtida com o clenbuterol neste modelo foi de magnitude inferior (22,7%) à obtida *in vivo* (cerca de 2,5 vezes para o azul de Evans), o que faz supor que em condições de disrupção da barreira hematoencefálica, a activação dos receptores beta₂ tem um efeito mais pronunciado sobre a redução do transporte através das células endoteliais dos capilares cerebrais. Voltaremos a este assunto mais adiante.

O efeito oposto da estimulação alfa e beta obtido com fármacos selectivos para estes receptores está de acordo com a dualidade de efeitos das catecolaminas endógenas noradrenalina e adrenalina verificadas no transporte da fluoresceína sódica. Compatível com a hipótese de dois efeitos opostos sobre o transporte transendotelial mediados pelas catecolaminas é também o resultado obtido com a noradrenalina após bloqueio dos receptores alfa pela prazosina. Este antagonista foi capaz de inverter o aumento do transporte induzido pela noradrenalina, ou seja, com os receptores alfa bloqueados a noradrenalina passa a exibir um efeito semelhante ao de um agonista beta, como o clenbuterol.

Este resultado obtido com a prazosina reforça ainda a ideia de que o efeito da fenoxibenzamina *in vivo* se deve de facto às suas acções bloqueadoras de adrenoceptores alfa.

A ausência de efeito da noradrenalina quando fornecida pelo lado apical (sanguíneo) sugere que os receptores se encontram localizados no polo basal (cerebral) das células endoteliais. Este resultado mostra ainda que a monocamada é pouco permeável à noradrenalina, tal como se verifica na barreira hematoencefálica *in vivo*.

Os nossos resultados mostram que doses baixas (10^{-7} M) de noradrenalina aumentam o transporte através do endotélio capilar. Este dado pode parecer incompatível com o que se passa em condições fisiológicas no animal, em que o transporte de substâncias do tipo da fluoresceína sódica através da barreira hematoencefálica é muito reduzido, apesar de muito provavelmente existir uma libertação basal de noradrenalina pelos terminais adrenérgicos localizados em

íntimo contacto com a membrana basal dos capilares cerebrais. Algumas hipóteses podem explicar esta aparente contradição:

- 1 - A libertação basal de noradrenalina por estes terminais em condições fisiológicas pode não ser suficiente para activar os receptores alfa, seja pela sua quantidade ser escassa ou pelo facto do receptor alfa não se encontrar suficientemente perto do terminal para poder ser activado pela amina libertada;
- 2 - Não podemos excluir a existência de efeito de outros mediadores no transporte transendotelial cujos efeitos sejam contrários ao da estimulação alfa. Em condições normais, a (baixa) permeabilidade da barreira hematoencefálica é a resultante das acções dos múltiplos mediadores envolvidos no seu controlo (WAHL *et al.* 1988, FENSTERMACHER 1989, ABBOTT e REVEST 1991, FRELIN e VIGNE 1993).

A inibição da formação de vesículas de pinocitose pela vincristina ou pela substituição da glicose no meio nutritivo (LARSSON *et al.* 1979, GUILLOT *et al.* 1990) resultou na abolição dos efeitos da noradrenalina e do clenbuterol. Estes resultados são sugestivos de que também no modelo *in vitro*, a modulação do transporte transcelular verificada com estes fármacos se deve a modificações na actividade pinocitótica das células endoteliais.

Foram também descritas modificações no transporte de substâncias através de monocamadas de células endoteliais de capilares cerebrais devidas a alteração do transporte vesicular para outros agentes como o alumínio (AUDUS *et al.* 1988), a histamina (DUX e Joó 1982) e a angiotensina II (GUILLOT e AUDUS 1990), bem como para os mediadores intracelulares AMP cíclico (Joó *et al.* 1975) e GMP cíclico (Joó *et al.* 1983).

Em face dos resultados obtidos com os fármacos por nós utilizados no transporte da fluoresceína sódica no sentido apical-basal (sangue-cérebro), seria legítimo pensar que os resultados dos mesmos fármacos no transporte do mesmo marcador no sentido inverso, ou seja, o sentido basal-apical (cérebro-sangue), constituíssem uma imagem "em espelho" dos primeiros.

De facto, a adrenalina, que na dose de 10^{-7} M aumentou o transporte da fluoresceína sódica no sentido apical-basal, teve um efeito redutor do transporte no sentido inverso. No entanto, os resultados obtidos com a noradrenalina (ausência de efeito estatisticamente significativo) e com o clenbuterol (diminuição do transporte), ambos na dose de 10^{-7} M, não se enquadram nesta teoria. Mais ainda, a redução no transporte da fluoresceína sódica verificada com o clenbuterol é

aparentemente contrária à hipótese que levantámos anteriormente de que a estimulação de receptores beta₂ nas células endoteliais dos capilares cerebrais aumenta o transporte no sentido cérebro-sangue.

Esta contradição entre os resultados obtidos com o modelo *in vivo* e o modelo *in vitro* não pode ser explicada apenas com o recurso aos nossos dados experimentais, e não encontramos quaisquer evidências na bibliografia para atribuímos as diferenças obtidas ao facto de termos utilizado o Rato no modelo *in vivo* e células de Boi no modelo *in vitro*. Contudo, existe outro tipo de dados na literatura que permitem formular uma hipótese explicativa para estes resultados.

Parece ser hoje consensual atribuir ao endotélio dos capilares cerebrais algumas das mais importantes características de um epitélio especializado em complexas tarefas de manutenção de diferentes composições dos meios por ele separados (BETZ e GOLDSTEIN 1986, GOLDSTEIN e BETZ 1986, CRONE 1986, VORBRÖDT 1993). A verificação por BETZ e colaboradores (1980) de que as células endoteliais dos capilares cerebrais evidenciam assimetria na distribuição das enzimas ATPase-Na⁺,K⁺, fosfatase alcalina e gama-glutamil transpeptidase, constituiu ponto de partida para o desenvolvimento da teoria que atribui à polaridade destas células uma das suas mais importantes características. Foi então postulado que essa polaridade é determinante para manter a composição do líquido intersticial cerebral, condição essencial para o correcto desempenho das complexas e delicadas funções neuronais no sistema nervoso central.

Esta hipótese foi posteriormente reiterada por outros autores, que verificaram haver perda de polaridade das células endoteliais dos capilares cerebrais em situações de disrupção da barreira hematoencefálica, como a infecção do sistema nervoso central do Ratinho por um vírus lento (*scrapie-infected mice*, VORBRÖDT *et al.* 1981), a encefalomielite alérgica na Cobaia (KATO e NAKAMURA 1989), a administração de soluções hiperosmolares na artéria carótida do Rato (VORBRÖDT 1993) e a lesão pelo frio no Gato (VORBRÖDT *et al.* 1985) e no Ratinho (VORBRÖDT 1993). Foi então sugerido que o deslocamento da enzima fosfatase alcalina do polo apical para o polo basal da célula endotelial observado nestas situações, constitui um mecanismo através do qual estas células passam a transportar substâncias do cérebro para o lúmen capilar (VORBRÖDT *et al.* 1985). Ou seja, o sentido do transporte através do capilar cerebral parece depender da polaridade das células que o constituem.

Estando descrito para modelos de edema cerebral induzido pelo frio semelhantes ao nosso uma inversão na polaridade da célula endotelial quanto a algumas enzimas (VORBRÖDT *et al.* 1985, VORBRÖDT 1993), podemos sugerir a seguinte hipótese:

- 1 - A modificação da polaridade da célula endotelial capilar, com translocação de algumas enzimas do polo apical para o polo basal, faz com que a face voltada para o tecido cerebral passe a dispor dos mecanismos necessários para que haja transporte no sentido cérebro-sangue;
- 2 - A estimulação dos receptores beta₂ pelo clenbuterol activa esses mecanismos, facilitando a remoção do edema através dos capilares;
- 3 - No modelo *in vitro*, o clenbuterol não exhibe efeito de aumento do transporte no sentido basal-apical pelo facto destas células se encontrarem em condições normais quanto à sua polaridade (GUILLOT e AUDUS 1990).

A ausência de efeito do clenbuterol por nós verificada, quer no conteúdo de água e de azul de Evans, quer na actividade pinocitótica no córtex contralateral à aplicação do frio, é também compatível com a hipótese de a activação dos receptores beta₂ apenas se traduzir em modificações no transporte através da barreira hematoencefálica em situações de disrupção desta.

A diferença na amplitude dos efeitos sobre o transporte exercidos pelo clenbuterol *in vivo* (redução marcada da taxa de extracção do azul de Evans e normalização do conteúdo de água ao fim de duas horas) e *in vitro* (ligeira redução do transporte da fluoresceína sódica) é também sugestiva de que a resposta mediada por receptores beta₂ difere consoante o estado funcional da célula endotelial.

As ligeiras reduções (sempre entre 20 a 25%) no transporte da fluoresceína sódica através da monocamada por nós observadas sempre que existe um predomínio da estimulação beta₂ (clenbuterol, dose mais elevada de adrenalina e ainda noradrenalina em presença da prazosina) podem ser devidas a alterações de um transporte vesicular existente em situação basal nestas células (SMITH e BORCHARDT 1989, RAUB e NEWTON 1991).

Esse transporte é quantitativamente pouco importante e, em condições basais, parece ocorrer em ambos os sentidos (RAUB e NEWTON 1991), o que está de acordo com os nossos dados, que mostram que o transporte da fluoresceína sódica em situação controlo é quantitativamente semelhante no sentido basal-apical e no sentido apical-basal. A pequena amplitude das reduções no transporte da fluoresceína sódica obtidas com a estimulação dos receptores beta₂ é concordante com o facto, já referido, de esta actividade vesicular ser baixa neste tipo de modelo *in vitro*.

Do que acima se descreveu, podemos formular a hipótese de que a estimulação dos receptores beta₂ nestas condições pode inibir este tipo de transporte

bidireccional, contribuindo desta forma para uma ulterior redução da permeabilidade da monocamada.

PAPEL DOS MECANISMOS ADRENÉRGICOS CENTRAIS NO DESENVOLVIMENTO DO EDEMA CEREBRAL VASOGÉNICO

Para atribuímos com segurança uma importância fisiológica ou fisiopatológica aos mecanismos adrenérgicos centrais na formação e/ou resolução do edema cerebral vasogénico, creio ser necessário reunir sólida evidência quanto aos seguintes pontos:

- 1 - Existência de receptores para as catecolaminas e dos seus mecanismos de transdução intracelulares na interface que controla o transporte de água e solutos para o sistema nervoso central, ou seja, nas células endoteliais dos capilares cerebrais;
- 2 - Existência de inervação adrenérgica dessas mesmas células, já que, pelo menos em condições normais, o endotélio capilar não evidencia respostas às catecolaminas circulantes (MACKENZIE *et al.* 1976);
- 3 - Existência de activação dos mecanismos adrenérgicos centrais em situações de edema cerebral vasogénico;
- 4 - Demonstração de efeitos sobre a formação/resolução do edema cerebral vasogénico através da manipulação farmacológica de neurónios adrenérgicos de origem central e/ou dos adrenoceptores localizados no endotélio capilar.

A demonstração da presença de adrenoceptores em células endoteliais de capilares cerebrais tem sido feita por vários autores utilizando fundamentalmente dois tipos de metodologia: os estudos com radioligandos e estudos bioquímicos de quantificação da produção de determinado mensageiro intracelular após estimulação com fármacos com acção adrenérgica. Foi assim possível identificar nestas células receptores alfa₁, alfa₂, beta₁ e beta₂.

A presença de receptores alfa₁ foi pela primeira vez demonstrada por PEROUTKA *et al.* (1980), tendo sido confirmada posteriormente por KOBAYASHI *et al.* (1982a). Mais tarde, ZELEZNIKAR *et al.* (1983) descreveram que a activação dos adrenoceptores alfa₁ induz aumento da incorporação do fósforo radioactivo em microvasos cerebrais isolados do Cão, sugerindo que a via dos fosfatos de inositol constitui o mecanismo de transdução intracelular deste receptor.

O adrenoceptor alfa₂ foi identificado por KARNUSHINA *et al.* (1982) em células endoteliais de capilares cerebrais do Rato. Estes autores determinaram

simultaneamente que a activação deste receptor diminui a formação de AMP cíclico nestas células.

Os primeiros estudos que referem a presença de adrenoceptores beta₁ e beta₂ em microvasos cerebrais foram efectuados por HERBST *et al.* (1979) e NATHANSON e GLASER (1979). A posterior caracterização destes receptores em várias espécies animais (incluindo o Homem) foi feita essencialmente por KOBAYASHI e colaboradores (KOBAYASHI *et al.* 1981a,b, 1982a,b).

Concluiu-se que as células endoteliais dos capilares cerebrais possuem os dois subtipos de receptor beta, com predominância do subtipo beta₂ (cerca de 80% do total da população beta). A activação destes adrenoceptores traduz-se por um aumento das concentrações intracelulares do AMP cíclico (HERBST *et al.* 1979, NATHANSON e GLASER 1979, KARNUSHINA *et al.* 1982, PALMER e PALMER 1983).

A inervação dos capilares cerebrais no córtex e outras regiões do cérebro por fibras adrenérgicas de origem central foi inicialmente demonstrada por HARTMAN (1973) e EDVINSSON *et al.* (1973). Esta demonstração foi feita com base em estudos morfológicos em que foram utilizadas técnicas de imunohistoquímica. A origem desta inervação foi atribuída ao *locus coeruleus*, principal núcleo adrenérgico central em várias espécies, entre as quais o Rato, núcleo este donde partem neurónios aferentes noradrenérgicos para várias regiões do cérebro (DAHLSTROM e FUXE 1964, LOIZOU 1969, UNGERSTEDT 1971). Estudos posteriores confirmaram a existência de terminais adrenérgicos localizados em íntimo contacto com a membrana basal dos capilares cerebrais bem como a localização dos corpos celulares desses neurónios no *locus coeruleus* (RENNELS e NELSON 1975, SWANSSON *et al.* 1977).

Em vários modelos de edema cerebral em que a componente vasogénica contribui de forma significativa para o aumento da quantidade de água foi possível demonstrar variações no *turnover* da noradrenalina no sistema nervoso central. São exemplos a isquemia cerebral (MEYER *et al.* 1974), a hipotermia (PAUSESCU *et al.* 1970), a aplicação de radiação gama ao cérebro (PAUSESCU *et al.* 1973), as convulsões (HARIK *et al.* 1982) e a aplicação de frio (INOUE *et al.* 1991).

Após revisão exaustiva da extensa bibliografia existente, não nos foi possível encontrar nenhum estudo onde tenha sido feita uma tentativa de demonstração de influências adrenérgicas centrais na formação e/ou resolução do edema cerebral vasogénico através de manipulações farmacológicas deste sistema e utilizando um modelo adequado.

Contudo, existem alguns trabalhos onde se demonstrou haver influências adrenérgicas centrais sobre a permeabilidade da barreira hematoencefálica, que,

como já foi referido, constitui a interface que controla o transporte de água e outras substâncias entre o sangue e o tecido cerebral. A perda da capacidade de controlar esse transporte está na origem do influxo anormalmente elevado de água e solutos para o sistema nervoso central, com conseqüente formação de edema.

Assim, RAICHLE *et al.* (1975) descreveram que a estimulação do *locus coeruleus* pelo carbacol faz aumentar a passagem de água radioactiva para o cérebro, sem contudo provocar quaisquer variações do fluxo sanguíneo cerebral. PRESKORN *et al.* (1980, 1982) atribuíram ao efeito inibidor sobre a recaptação neuronal da noradrenalina exercida pelos antidepressores tricíclicos a sua capacidade de aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Este efeito dos antidepressores tricíclicos foi confirmado por SARMENTO *et al.* (1988) com a utilização da amitriptilina. Sarmiento e colaboradores descreveram também aumentos do transporte de fluoresceína sódica para o córtex de Rato, quer pela administração intracerebroventricular de noradrenalina e fenilefrina (SARMENTO *et al.* 1991) quer pela estimulação eléctrica do *locus coeruleus* (SARMENTO *et al.* 1994). Destes estudos, ressalta ainda a ideia de que a estimulação dos receptores alfa e beta das células endoteliais dos capilares cerebrais pode provocar efeitos opostos no transporte de substâncias para o sistema nervoso central, e que as catecolaminas exercem os seus efeitos através de modificações da pinocitose nos microvasos cerebrais (SARMENTO *et al.* 1988, 1990, 1991).

Com base em alguns dos resultados apresentados, KOBAYASHI *et al.* (1985) e WEINAND (1988) avançaram com a hipótese de que, se as catecolaminas de origem central podem influenciar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, então a manipulação farmacológica dos mecanismos adrenérgicos centrais poderá constituir uma nova alternativa para a terapêutica do edema cerebral vasogénico.

O conjunto dos nossos resultados fornece evidência experimental que sustenta a existência de influências adrenérgicas centrais na formação/resolução do edema cerebral vasogénico, ao demonstrar que o bloqueio dos adrenoceptores alfa e a estimulação dos adrenoceptores beta₂ altera de forma significativa a evolução do edema cerebral num modelo que apresenta quase exclusivamente a componente vasogénica.

O significado fisiológico e fisiopatológico da existência de um controlo da permeabilidade da barreira hematoencefálica mediado por receptores do subtipo beta₂ quando o agonista endógeno é a noradrenalina (amina com afinidade baixa para este receptor) é um ponto que nos merece atenção.

A ausência de efeito sobre a taxa de extracção do azul de Evans verificada com a administração do timolol sugere que, pelo menos ao fim deste tempo (2 horas),

as catecolaminas endógenas não exercem influência sobre os receptores beta de forma a diminuir a formação de edema. Parece, pois, que na fase inicial do desenvolvimento do edema cerebral neste modelo, a resposta do endotélio capilar à noradrenalina é principalmente mediada por receptores alfa, tal como é sugerido pela redução nos conteúdos de água e azul de Evans observados com a administração de fenoxibenzamina. Não podemos, no entanto, excluir a hipótese de as catecolaminas de origem central poderem ter um papel facilitador da resolução do edema cerebral em fases mais tardias do seu desenvolvimento. HARIK e MCGUNIGAL (1984) sugerem que o *locus coeruleus* exerce um efeito protector sobre a barreira hematoencefálica em situações patológicas que exibem edema cerebral, como a hipertensão.

As concentrações de noradrenalina necessárias para activar receptores do subtipo beta₂, ainda que relativamente elevadas (da ordem dos 10⁻⁵ M), poderão ser atingidas na superfície da célula endotelial capilar. BEVAN e SU (1974) descrevem que, para fendas sinápticas entre terminais simpáticos e a musculatura lisa vascular com largura igual ou inferior a 1000 Å, uma estimulação de 10 Hz pode produzir concentrações de noradrenalina de 10⁻⁵ M junto da célula efectora. A largura da fenda sináptica observada por RENNELS e NELSON (1975) entre os terminais noradrenérgicos de origem central e as células endoteliais dos capilares cerebrais é inferior ao valor acima descrito de 1000 Å, pelo que as concentrações de noradrenalina que podem ser atingidas junto do endotélio capilar em situações de aumento de actividade adrenérgica central são provavelmente suficientes para estimularem receptores beta₂.

O desconhecimento dos mecanismos reguladores da permeabilidade da barreira hematoencefálica em condições normais e patológicas tem-se reflectido na inexistência de terapêuticas eficazes para tratamento do edema cerebral vasogénico. Com a excepção do edema induzido por tumores, onde a administração de corticosteróides tem revelado alguma utilidade, em todas as outras patologias cuja principal complicação é a presença de edema cerebral o controlo do excesso de água no parênquima cerebral pode considerar-se como bastante ineficaz, tal como é atestado pelos elevados índices de morbilidade e mortalidade a ele associados (BETZ *et al.* 1989).

Em face dos nossos resultados, a manipulação de mecanismos adrenérgicos centrais parece-nos poder constituir uma hipótese plausível para a terapêutica do edema cerebral vasogénico. De entre as manipulações possíveis, a administração de agonistas dos adrenoceptores beta₂ com capacidade de atravessarem a barreira

hematoencefálica surge como particularmente interessante, dado ter sido possível reduzir, no nosso modelo experimental, o grau de edema após a sua instalação.

Pela sua importância, destacaria como patologias em que este tipo de intervenção se poderia revestir de grande interesse, a isquemia cerebral (acidentes vasculares cerebrais), os traumatismos crânio-encefálicos, a meningite bacteriana e a encefalopatia hipertensiva.

V - COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

Pretendemos com este estudo avaliar a influência dos mecanismos adrenérgicos centrais na formação e resolução do edema cerebral vasogénico.

Iniciámos a nossa abordagem experimental pela utilização de um modelo de edema cerebral descrito como sendo representativo do edema de tipo vasogénico, o modelo de edema induzido pela aplicação de frio. Com esta metodologia estudámos a acumulação de água e a passagem de um marcador, o azul de Evans, no córtex cerebral. Procedemos também a um estudo morfológico deste mesmo tecido, por forma a melhor esclarecermos quais os mecanismos endoteliais envolvidos no transporte de água e solutos para o sistema nervoso central. Fizemos ainda uso de um modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica com o objectivo de melhor caracterizarmos as influências adrenérgicas sobre o transporte de substâncias através de células endoteliais de capilares cerebrais.

Dos resultados obtidos, extraímos as seguintes conclusões:

- 1 - O modelo de edema cerebral induzido pelo frio por nós delineado e sistematicamente aplicado revelou-se adequado para o estudo do edema cerebral vasogénico.
- 2 - A formação de edema foi acompanhado de um aumento da actividade pinocitótica nos capilares cerebrais.
- 3 - Neste modelo, o bloqueio dos adrenoceptores alfa pela administração prévia de fenoxibenzamina resultou na diminuição da acumulação de água e do transporte do azul de Evans para o córtex cerebral. A redução do edema verificada com a fenoxibenzamina acompanhou-se de redução da actividade vesicular no endotélio capilar.
- 4 - A administração prévia ou duas horas após aplicação do frio de um agonista dos adrenoceptores beta₂, o clenbuterol, diminuiu a acumulação de água e o transporte do azul de Evans. O clenbuterol, embora tenha reduzido a formação de edema, não diminuiu a actividade pinocitótica nas células endoteliais dos capilares cerebrais.
- 5 - O efeito do clenbuterol sobre o transporte de azul de Evans foi bloqueado pelo timolol mas não pelo metoprolol. Administrado isoladamente, o timolol não provocou alterações no transporte de azul de Evans.

- 6 - O inibidor da pinocitose, vimblastina, foi capaz de reduzir a formação de edema e, concomitantemente, a actividade vesicular no endotélio capilar cerebral. A dexametasona não exibiu qualquer efeito redutor do edema cerebral.
- 7 - No modelo *in vitro*, a estimulação de adrenoceptores alfa pela noradrenalina, adrenalina ou fenilefrina aumentou o transporte de fluoresceína sódica através da monocamada de células endoteliais no sentido apical-basal. O bloqueio alfa pela prazosina inverteu o aumento induzido pela noradrenalina.
- 8 - O efeito da adrenalina e da noradrenalina foi dependente da dose.
- 9 - O aumento do transporte mediado por receptores alfa foi anulado por processos que inibem a formação de vesículas de pinocitose.
- 10 - A estimulação de adrenoceptores beta reduziu ligeiramente a permeabilidade da monocamada à fluoresceína sódica no sentido apical-basal.
- 11 - De igual modo, a inibição do transporte vesicular anulou o efeito mediado por receptores beta.
- 12 - O transporte da fluoresceína sódica no sentido oposto, *i.e.*, basal-apical, foi ligeiramente reduzido pelo clenbuterol e pela adrenalina.

Com base nas conclusões acima expostas e em algumas ideias e resultados de outros autores, formulei a hipótese de interpretação que passo a descrever.

O edema cerebral vasogénico é uma complicação observada em numerosas patologias primariamente neurológicas ou não e que tem a sua origem numa incapacidade da barreira hematoencefálica em manter íntegras as suas funções de controlo do transporte de água e solutos para o sistema nervoso central.

Esta perda de funções não se deve a uma agressão inespecífica à célula endotelial, mas é resultante da soma das acções moduladoras sobre ela exercidas por uma grande variedade de substâncias. De entre estas substâncias com capacidade de modular o transporte através da barreira hematoencefálica, as catecolaminas de origem central teriam um papel importante quer na formação quer na resolução do edema cerebral.

O aumento do transporte mediado por adrenoceptores alfa constituiria uma exacerbação patológica de um mecanismo que, em condições fisiológicas, se destina a aumentar o aporte de substâncias de origem plasmática a zonas particularmente activas do cérebro.

A activação de adrenoceptores beta (mais concretamente do subtipo beta₂) seria uma forma de acelerar o processo de remoção do excesso de água verificado em situações de edema cerebral. Este processo seria favorecido pela modificação das características de polaridade da célula endotelial, reforçando a importância deste mecanismo em situações patológicas.

As modulações no transporte através da barreira hematoencefálica operadas pelas catecolaminas resultariam de modificações na actividade pinocitótica das células endoteliais dos capilares cerebrais.

A utilização de fármacos agonistas dos adrenoceptores beta₂ com capacidade de penetrarem facilmente no sistema nervoso central poderia constituir uma boa hipótese terapêutica em patologias cuja principal complicação seja a existência de edema cerebral vasogénico.

VI - RESUMO

São ainda mal conhecidos os mecanismos implicados no aparecimento do edema cerebral vasogénico em algumas patologias ou modelos experimentais. O edema de tipo vasogénico resulta de uma disfunção da barreira hematoencefálica, com consequente aumento da passagem de água e proteínas para o parênquima cerebral.

Estão descritos receptores adrenérgicos e seus mecanismos de transdução nas células que constituem o substrato anatómico da barreira hematoencefálica (as células endoteliais dos capilares cerebrais), bem como terminais de neurónios adrenérgicos de origem central em íntimo contacto com essas células.

Foi objectivo deste trabalho o esclarecimento do papel dos mecanismos adrenérgicos centrais na formação e/ou resolução do edema cerebral vasogénico.

Para a abordagem experimental deste problema, utilizámos basicamente duas metodologias: o modelo *in vivo* de edema cerebral induzido pelo frio e o modelo *in vitro* de células endoteliais de capilares cerebrais cultivadas em monocamada polarizada.

Dentro do modelo de edema induzido pelo frio, estudámos a formação de edema através da determinação do conteúdo de água e da taxa de extracção do azul de Evans. Foi ainda feito um estudo morfológico por microscopia de luz e por microscopia electrónica, tendo-se observado e quantificado por graus a actividade pinocitótica nas células endoteliais dos capilares cerebrais e a magnitude do extravasamento de água para o parênquima cerebral. Estudámos os efeitos de alguns fármacos (a maioria com acção adrenérgica) sobre a formação e/ou resolução do edema utilizando estas três abordagens experimentais.

No modelo *in vitro* procedemos ao estudo do transporte em ambos os sentidos de um marcador (fluoresceína sódica) através da monocamada polarizada e a influência de fármacos com acção adrenérgica nesse mesmo transporte.

Com o protocolo de aplicação de frio por nós usado, a formação de edema, medida pelo conteúdo cerebral de água e pela taxa de extracção de azul de Evans, foi máxima ao fim de três horas. O paralelismo entre as curvas de evolução no tempo destes dois parâmetros de avaliação do edema verificou-se até esse ponto.

A administração de fenoxibenzamina (10 mg/kg, i.p.) reduziu a formação do edema observado duas horas após a aplicação de frio, redução esta que se acompanhou de diminuição da actividade pinocitótica no endotélio capilar e de redução do conteúdo de água cerebral observado por microscopia. O clenbuterol (1 mg/kg, i.p.) reduziu também o conteúdo de água, a taxa de extracção do azul de

Evans e a extensão de edema observável por microscopia, sem contudo alterar o número de vesículas de pinocitose nos capilares cerebrais. Os efeitos do clenbuterol foram anulados pelo timolol (1 mg/kg, i.p.) mas não pelo metoprolol (10 mg/kg, i.p.). O timolol administrado isoladamente não produziu alteração na taxa de extracção do azul de Evans.

O clenbuterol, na mesma dose, foi capaz de reduzir a formação de edema quando administrado intraperitonealmente duas horas após aplicação do frio.

A isoprenalina injectada intraperitonealmente (0,25 mg/kg) não diminuiu a formação do edema (conteúdo de água e taxa de extracção do azul de Evans) mas foi capaz de reduzir a taxa de extracção quando administrada por via intracerebroventricular na dose de 100 µg.

A dexametasona (2,5 mg/kg, i.v.) não exibiu qualquer efeito redutor do edema. A vimblastina (0,8 mg/kg, i.v.), por seu turno, reduziu a formação de edema (conteúdo de água, taxa de extracção de azul de Evans e magnitude do edema em microfotografias) e a actividade pinocitótica no endotélio capilar cerebral.

No modelo *in vitro*, a noradrenalina (10^{-7} M e 10^{-6} M) e a adrenalina (10^{-7} M) aumentaram o transporte da fluoresceína sódica no sentido apical-basal (correspondente ao sentido sangue-cérebro), ao passo que as doses mais elevadas não evidenciaram qualquer efeito (10^{-5} M de noradrenalina) ou reduziram mesmo o transporte (10^{-6} M de adrenalina). O efeito de 10^{-6} M de noradrenalina foi invertido pela prazosina (10^{-7} M). A fenilefrina (10^{-7} M) aumentou também o transporte da fluoresceína sódica através da monocamada de células endoteliais. O clenbuterol (10^{-7} M) reduziu a passagem de fluoresceína sódica. A noradrenalina (10^{-7} M) não exibiu qualquer efeito quando aplicada ao lado apical das células endoteliais (todos os fármacos até aqui referidos foram fornecidos pelo lado basal, ou cerebral).

A inibição da formação de vesículas de pinocitose pela vincristina (10^{-6} M) ou pela substituição da glicose no meio nutritivo por 6-desoxi-d-glicose, anulou os efeitos da noradrenalina (10^{-6} M) e do clenbuterol (10^{-7} M).

O transporte da fluoresceína sódica no sentido basal-apical (correspondente ao sentido cérebro-sangue) foi reduzido pela adrenalina (10^{-7} M) e pelo clenbuterol (10^{-7} M) mas não pela noradrenalina (10^{-7} M). Estes fármacos foram também fornecidos à face basal, ou cerebral, das células endoteliais.

Deste conjunto de resultados concluímos o seguinte:

- 1 - A estimulação dos adrenoceptores alfa ou beta existentes no lado abluminal do endotélio capilar cerebral poderá ter efeitos opostos sobre a passagem de água e solutos através da barreira hematoencefálica em condições de disrupção desta.
- 2 - A estimulação de adrenoceptores alfa por noradrenalina libertada de terminais de neurónios adrenérgicos com origem no *locus coeruleus* poderá contribuir para a formação de edema vasogénico. Por outro lado, os mecanismos desencadeados pela estimulação de adrenoceptores beta (subtipo beta₂) poderão constituir uma forma de resolução do edema (remoção de água do parênquima cerebral através dos capilares) numa fase posterior do seu desenvolvimento.
- 3 - Os efeitos acima descritos são muito provavelmente devidos à capacidade de quer a estimulação alfa quer a beta modificarem a actividade pinocitótica das células endoteliais dos capilares cerebrais.
- 4 - A administração de fármacos agonistas dos adrenoceptores beta₂ com capacidade de penetrarem facilmente no sistema nervoso central poderá ter um efeito terapêutico em patologias em que o edema cerebral vasogénico surge como complicação grave.

VII - SUMMARY

The mechanisms underlying vasogenic brain edema formation are still poorly understood. The vasogenic type of edema results from a disruption of the blood-brain barrier, leading to an increased transfer of water and solutes to the brain parenchyma.

The presence of adrenoceptors and their transduction mechanisms were described in the cells that form the anatomical substrate of the blood-brain barrier, the brain capillary endothelial cells. Adrenergic terminals were also described in close contact with these cells.

Our aim was to characterize the role of central adrenergic mechanisms in the formation and/or resolution of vasogenic brain edema.

For this purpose, two different experimental approaches were used: an *in vivo* vasogenic brain edema model (the cold-induced edema) and an *in vitro* model, consisting of a culture of polarized monolayers of brain capillary endothelial cells.

Using the *in vivo* model, edema formation was studied by measuring the brain water content and the extraction ratio of Evans blue. We have also done a morphological study, using light and electron microscopy, to observe and measure (semi-quantitatively) the pinocytotic activity of capillary cells and the extent of water extravasation to the brain parenchyma. We studied the effects of some drugs (most of them adrenergic) on the formation and/or resolution of brain edema using these three experimental approaches.

In the *in vitro* model, we studied the transport (in both directions) of a marker, sodium fluorescein, through the polarized monolayer, and the influence of adrenergic drugs on that transport.

The maximal increase of brain water content and Evans blue extraction ratio was reached three hours after cold application and the time course curves of these two parameters of edema formation were parallel until then.

Phenoxylbenzamine (10 mg/kg, i.p.) reduced the edema formation observed two hours after the cold application. This reduction was concomitant with a diminished pinocytotic activity in brain capillary endothelial cells and water extravasation observed by microscopy. Clenbuterol (1 mg/kg, i.p.) also reduced all these parameters, except the pinocytotic activity, which remained high. The effects of clenbuterol were blocked by timolol (1 mg/kg, i.p.) but not by metoprolol (10 mg/kg, i.p.). Timolol alone did not show any effect.

The same dose of clenbuterol was able to reduce edema formation when i.p. given two hours after cold application.

Intraperitoneally administered isoprenaline (0.25 mg/kg) did not reduce the edema formation (water content and Evans blue extraction ratio) but was able to reduce Evans blue extraction ratio when administered by intracerebroventricular route, in a dose of 100 μ g.

Dexamethasone (2.5 mg/kg, i.v.) did not produce any edema reducing effect. Vinblastine (0.8 mg/kg, i.v.) reduced both edema formation (water content, Evans blue extraction ratio and water extravasation observed by microscopy) and the pinocytotic activity in capillary endothelium.

In the *in vitro* model, noradrenaline (10^{-7} M and 10^{-6} M) and adrenaline (10^{-7} M) increased sodium fluorescein apical-to-basal transport (corresponding to the blood-to-brain transport), whereas higher doses did not produce any effect (noradrenaline 10^{-5} M) or even reduced the transport (adrenaline 10^{-6} M). The 10^{-7} M noradrenaline effect was reverted by prazosin (10^{-7} M). Phenylephrine (10^{-7} M) increased and clenbuterol (10^{-7} M) decreased sodium fluorescein transport across the monolayer. Noradrenaline (10^{-7} M) did not show any effect when given to the apical side (*i.e.*, blood side) of the monolayer (all other drugs were given to the basal, *i.e.* cerebral side of the endothelial cells).

Inhibition of pinocytotic vesicle formation, either by vincristine (10^{-6} M) or by glucose replacement in the buffer by 6-deoxy-d-glucose, abolished both the noradrenaline (10^{-6} M) induced increase and the clenbuterol (10^{-6} M) induced decrease in sodium fluorescein transport. All drugs were given to the basal, *i.e.* cerebral side of the endothelial cells.

Basal-to-apical (corresponding to the brain-to-blood) sodium fluorescein transport across the polarized monolayers was reduced by adrenaline (10^{-7} M) and clenbuterol (10^{-7} M), but not by noradrenaline (10^{-7} M). All drugs were given to the basal, *i.e.* cerebral side of the endothelial cells.

From this set of data we conclude the following:

- 1 - Stimulation of abluminal alpha or beta-adrenoceptors of capillary endothelial cells has opposite effects upon water and solute transport across the disrupted blood-brain barrier.
- 2 - Alpha-adrenoceptor stimulation by noradrenaline, released from adrenergic terminals having their origin in the *locus coeruleus*, may contribute to

vasogenic edema formation. On the other hand, the mechanisms triggered by beta-adrenoceptor (most probably of the beta₂ subtype) stimulation may constitute an edema resolution way in later stages of edema development (water removal through the capillaries).

- 3 - The above mentioned effects are most likely due to the ability of alpha- and beta-adrenoceptor stimulation to modulate pinocytotic activity in brain capillary endothelial cells.
- 4 - The administration of selective beta₂-adrenoceptor agonists with a good capacity of penetrating the brain tissue may have therapeutical effects in pathological situations in which brain edema is a serious complication.

VIII - BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT NJ, REVEST PA (1991) Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 3:39-72
- ÁDÁM G, JOÓ F, TEMESVÁRI P, DUX E, SZERDAHELYI P (1983) Effects of acute hypoxia on the adenylate cyclase and Evans blue transport of brain microvessels. *Neurochem Int* 10:529-532
- AUDUS KL, BORCHARDT RT (1986a) Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm Res* 3:81-87
- AUDUS KL, BORCHARDT RT (1986b) Characteristics of large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J Neurochem* 47:484-488
- AUDUS KL, BORCHARDT RT (1987) Bovine brain endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier. *Ann NY Acad Sci* 507:9-18
- AUDUS KL, SHINOGLA JA, GUILLOT FL, HOLTHAUS SR (1988) Aluminum effects on brain microvessel endothelial cell monolayer permeability. *Int J Pharm* 45:249-257
- AUDUS KL, RAUB TJ (1993) Lysosomes of brain and other vascular endothelia. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 201-227
- AZEVEDO I, CASTRO-TAVARES J, GARRETT J (1981) Ultrastructural changes of blood vessels of perinephritic hypertensive dogs. *Blood Vessels* 18:110-119
- AZEVEDO I, CASTRO-TAVARES J, SARMENTO A (1984) Effects of catecholamines on the pinocytotic activity of endothelium, smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood Vessels* 21:132-133
- BEGGS JL, WAGGENER JD (1976) Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury of the spinal cord. *Lab Invest* 34:428-439
- BETZ AL, FIRTH JA, GOLDSTEIN GW (1980) Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 192:17-28

- BETZ AL, GOLDSTEIN GW (1986) Specialized properties and solute transport in brain capillaries. *Ann Rev Physiol* 48:241-250
- BETZ AL, IANNOTTI F, HOFF JT (1989) Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:133-154
- BEVAN JA, SU C (1974) Variation of intra- and perisynaptic adrenergic transmitter concentrations with width of synaptic cleft in vascular tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 190:30-38
- BLAZSO G, MINKER E (1980) Alkylation of ganglionic cholinergic receptors with haloalkyl amines. *Acta Pharm Hung* 50:137-144
- BODSCH W, HÜRTER T, HOSSMANN K-A (1982) Immunochemical method for quantitative evaluation of vasogenic brain edema following cold injury of rat brain. *Brain Res* 249:111-121
- BOWMAN PD, BETZ AL, AR D, WOLINSKY JS, PENNEY JB, SHIVERS RR, GOLDSTEIN GW (1981) Primary cultures of capillary endothelium from rat brain. *In vitro* 17:353-362
- BROADWELL RD, BANKS WA (1993) Cell biological perspective for the transcytosis of peptides and proteins through the mammalian blood-brain fluid barriers. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 165-199
- BRUCE JN, CRISCUOLO GR, MERRILL MJ, MOQUIN RR, BLACKLOCK B, OLDFIELD EH (1987) Vascular permeability induced by protein product of malignant brain tumors: inhibition by dexamethasone. *J Neurosurg* 67:880-884
- CANCILLA PA, BAKER RN, POLLOCK PS, FROMMES SP (1972) The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein. *Lab Invest* 26:376-383
- CERVÓS-NAVARRO J (1963) Elektromikroskopische Befunde an den Capillaren der Hirnrinde. *Arch Psychia Nervenkr* 204:484-504
- CERVÓS-NAVARRO J, KANNUKI S, NAKAGAWA Y (1988) Blood-brain barrier. Review from morphological aspect. *Histol Histopath* 3:203-213

- COHEN ML, WILEY KS, BEMIS KG (1982) Analysis of the beta₁ and beta₂ adrenoceptor interactions of the partial agonist, clenbuterol (NAB365), in the rat jugular vein and atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 320:145-151
- CRONE C (1965) Facilitated transport of glucose from blood into brain tissue. *J Physiol* 181:103-113
- CRONE C (1986) The blood-brain barrier: a modified tight epithelium. In: Suckling AJ, Rumsby MG, Bradbury MWB (eds) *Blood-brain barrier in health and disease*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, pp 17-40
- DAHLSTROM A, FUXE K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* [Suppl 232]:1-55
- DUX E, JOÓ F (1982) Effects of histamine on brain capillaries: fine structural and immunohistochemical studies after intracarotid infusion. *Exp Brain Res* 47:252-258
- EDVINSSON L, LINDVALL O, NIELSEN K, OWMAN C (1973) Are brain vessels innervated by central (non-sympathetic) adrenergic neurons? *Brain Res* 63:496-499
- EDVINSSON L, OWMAN CH, SIESJO B (1976) Physiological role of cerebrovascular sympathetic nerves in the autorregulation of cerebral blood-flow. *Brain Res* 117:519-523
- FENSTERMACHER JD (1989) Pharmacology of the blood-brain barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation* Vol I, Plenum Medical Book Company, New York, pp 383-404
- FISHMAN RA (1982) Steroids in the treatment of brain edema. *N Engl J Med* 306:359-360
- FRELIN C, VIGNE P (1993) Brain microvascular vasoactive agents: receptors and mechanisms of action. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 249-265
- GOLDSTEIN GW, BETZ AL (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am* 255:70-79

- GORMAN JM, FYER MR, LIEBOWITZ MR, KLEIN DF (1987) Pharmacological provocation of panic attacks. In: Meltzer HY (ed) *Psychopharmacology. The third generation of progress*. Raven Press, New York, pp985-993
- GOTTI B, BENAVIDES J, MACKENZIE ET, SCATTON B (1990) The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res* 522:290-307
- GRAMMAS P, DIGLIO CA, GIACOMELLI F, WIENER J (1985) Cholinergic-adrenergic receptor interactions in cerebral microvessels. *J Neurochem* 44:1732-1735.
- GUILLOT FL, AUDUS KL (1990) Angiotensin peptide regulation of fluid phase endocytosis in brain microvessel endothelial cell monolayer. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:827-834
- GUILLOT FL, AUDUS KL, RAUB TJ (1990) Fluid-phase endocytosis by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Microvasc Res* 39:1-14
- HALL MD, JENNER P, MARSDEN CD (1983) Turnover of specific [³H]spiperone and [³H]N,n-propylnorapomorphine binding sites in rat striatum following phenoxybenzamine administration. *Biochem Pharmacol* 32:2973-2977
- HARDEBO JE, KÄHRLSTRÖM J (1985) Endothelial negative surface charge areas and the blood-barrier function. *Acta Physiol Scand* 125:495-499
- HARIK SI, SHARMA VK, WEATHERBAE JR, WARREN RH, BANERGEE SP (1980) Adrenergic receptors of cerebral microvessels. *Eur J Pharmacol* 61:207-208
- HARIK SI, BUSTO R, MARTINEZ E (1982) Norepinephrine regulation of cerebral glycogen utilization during seizures and ischemia. *J Neurosci* 2:409-414
- HARIK SI, MCGUNIGAL T (1984) The protective influence of the *locus coeruleus* on the blood-brain barrier. *Ann Neurol* 15:568-574
- HART MN, VANDYK LF, MOORE SA, SHASBY DM, CANCELLA PA (1987) Differential opening of the brain endothelial barrier following neutralization of the endothelial luminal anionic charge in vitro. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:141-153
- HARTMAN BK (1973) The innervation of cerebral blood vessels by central adrenergic neurons. In: Usdin E, Snyder SH (eds) *Frontiers in catecholamine research*. Pergamon Press, New York, pp91-96

- HATASHITA S, HOFF JT (1990) Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* 21:582-588
- HAYS WL (1988) *Statistics*, 4th edn, Holt, Rinehart and Winston Inc., Fort Worth
- HERBST TJ, RAICHLER ME, FERRENDELLI JA (1979) β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate concentration in brain microvessels. *Science* 204:330-332
- HOFFMAN BB, LEFKOWITZ RJ (1990) Catecholamines and sympathomimetic drugs. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds) *Goodman and Gilman's Pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, New York, pp221-243
- INOUE M, MCHUGH M, PAPIUS HM (1991) The effect of α -adrenergic receptor blockers prazosin and yohimbine on cerebral metabolism and amine content in traumatized brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:242-252
- JOÓ F (1972) Effect of N_6O_2 -dibutyryl cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. *Experientia* 28:1470-1471
- JOÓ F (1986) New aspects to the function of cerebral endothelium. *Nature* 321:197-198
- JOÓ F (1993) Brain microvascular cyclic nucleotides and protein phosphorylation. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 267-287
- JOÓ F, RAKONCZAY Z, WOLLEMAN M (1975) cAMP mediated regulation of the permeability in brain capillaries. *Experientia* 31:582-584
- JOÓ F, TEMESVÁRI P, DUX E (1983) Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res* 278:265-274
- KARNOVSKY MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137a
- KARNUSHINA I, SPATZ M, BEMBRY J (1982) Cerebral endothelial cell culture. I. The presence of β_2 - and α_2 -adrenergic receptors linked to adenylate cyclase. *Life Sci* 30:849-858

- KATO S, NAKAMURA H (1989) Ultrastructural and ultracytochemical studies on the blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)* 77:455-464
- KAUFMANN AM, CARDOSO ER (1992) Aggravation of vasogenic brain edema by multiple-dose mannitol. *J Neurosurg* 77:584-589
- KELLY RB (1990) Microtubules, membrane traffic, and cell organization. *Cell* 61:5-7
- KLATZO I (1967) Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26:1-14
- KLATZO I (1994) Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir (Wien)* [Suppl 60]:3-6
- KLATZO I, CHUI E, FUJIWARA K, SPATZ M (1980) Resolution of vasogenic brain edema. In: Cervós-Navarro J, Ferszt R (eds) *Brain edema*. Raven Press, New York, pp 359-373
- KLATZO I, PIRAUX A, LASKOWSKI EJ (1958) The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 17:548-564
- KLATZO I, WISNIEWSKI HM, STEINWALL O, STREICHER E (1967) Dynamics of cold-injury edema. In: Klatzo I, Seitelberger F (eds) *Brain edema*. Springer, New York, pp 554-563
- KOBAYASHI H, MAORET T, FERRANTE M, SPANO PF, TRABUCCHI M (1981a) Subtypes of β -adrenergic receptors in cerebral microvessels. *Brain Res* 220:194-198
- KOBAYASHI H, MEMO M, TRABUCCHI M (1981b) Identification of β -adrenergic binding sites in brain microvessels, using [125 I]iodohydroxybenzylpindolol. *J Neurochem* 36:1383-1388
- KOBAYASHI H, FRATTOLA L, FERRARESE C, SPANO PF, TRABUCCHI M (1982a) Characterization of β -adrenergic receptors on human cerebral microvessels. *Neurology* 32:1384-1387
- KOBAYASHI H, CAZZANIGA A, SPANO PF, TRABUCCHI M (1982b) Ontogenesis of α - and β -adrenergic receptors on cerebral microvessels. *Brain Res* 242:358-360

- KOBAYASHI H, MAGNONI MS, GOVONI S, IZUMI F, WADA A, TRABUCCHI M (1985a) Neuronal control of brain microvessel function. *Experientia* 41:427-433
- KOBAYASHI H, WADA A, IZUMI F, MAGNONI MS, TRABUCCHI M (1985b) α -adrenergic receptors in cerebral microvessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 56:402-409
- KOPITAR VON Z, ZIMMER A (1976) Pharmakokinetik und metaboliten muster von clenbuterol bei der ratte. *Arzneimittel-Forsch* 26:1435-1441
- KUROIWA T, CAHN R, JUHLER M, GOPING G, CAMPBELL G, KLATZO I (1985) Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)* 66:3-11
- LATERRA J, GOLDSTEIN GW (1993) Brain microvessels and microvascular cells in vitro. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 1-24
- LARSSON B, SKARBY T, EDVINSSON L, HARDEBO JE, OWMAN CH (1979) Evidence for involvement of microtubules in the enhanced trans-endothelial pinocytosis in the blood-brain barrier induced by high intravascular pressure. *Acta Neurol Scand [Suppl 72]* 60:80-81
- LEHMANN J, LANGER SZ (1981) Phenoxybenzamine blocks dopamine autoreceptors irreversibly: implications for multiple dopamine receptor hypothesis. *Eur J Pharmacol* 75:247-254
- LIU HM (1988) Neovasculature and blood-brain barrier in ischemic brain infarct. *Acta Neuropathol (Berl)* 75:422-426
- LOIZOU LA (1969) Projections of the *locus coeruleus* in the albino rat. *Brain Res* 15:563-566
- LORENZO AV, SHIARAHIGE JA, LIANG M, BARLOW CF (1972) Temporary alterations of cerebrovascular permeability during drug-induced seizures. *Am J Physiol* 223:268-277
- LOSSINSKY AS, VORBRODT AW, WISNIEWSKI HM, IWANOWSKI L (1981) Ultracytochemical evidence for endothelial channel-lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 53:197-202

- LUSE SA, HARRIS B (1960) Electron microscopy of the brain in experimental edema. *J Neurosurg* 17:439-447
- MACKENZIE ET, MCCULLOCH J, O'KEANE M, PICKARD JD, HARPER AM (1976) Cerebral circulation and norepinephrine: relevance of the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 231:483-488
- MAGNONI MS, KOBAYASHI H, CAZZANIGA A, IZUMI F, SPANO PF, TRABUCCHI M (1983) Hypertension reduces the number of beta-adrenergic receptors in rat brain microvessels. *Circulation* 67:610-613
- MEYER JS, WELCH KMA, OKAMOTO S, SHIMAZU K (1974) Disordered neurotransmitter function. Demonstration by measurement of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine in CSF of patients with recent cerebral infarction. *Brain* 97:655-664
- MILHORAT TH (1992) Classification of the cerebral edemas with reference to hydrocephalus and pseudotumor cerebri. *Child's Nerv Syst* 8:301-306
- MILICI AJ, WATROUS NE, STUKENBROK H, PALADE GE (1987) Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105:2603-2612
- MILLER DW, AUDUS KL, BORCHARDT RT (1992) Application of cultured endothelial cells of the brain microvasculature in the study of the blood-brain barrier. *J Tiss Cult Meth* 14:217-224
- MINN A, GHERSI-EGEA JF, PERRIN R, LEININGER B, SIEST G (1991) Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Rev* 16:65-82
- MINNEMAN KP, DIBNER MD, WOLFE BB, MOLINOFF PB (1979) β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in cerebral cortex are independently regulated. *Science* 204:866-868
- MOORADIAN AD, SCARPACE PJ (1992) β -adrenergic receptor activity of cerebral microvessels in experimental diabetes mellitus. *Brain Res* 583:155-160
- NAGY Z, PETERS H, HUTTNER I (1981) Endothelial surface charge: Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase induced by the polycation protamine sulphate. *Acta Neuropath (Berl)* [Suppl VII]:7-9
- NATHANSON JA (1980) Cerebral microvessels contain β_2 adrenergic receptors. *Life Sci* 26:1793-1799

- NATHANSON JA, GLASER GH (1979) Identification of β_2 adrenergic sensitive adenylate cyclase in intracranial blood vessels. *Nature* 278:567-569
- OHATA K, MARMAROU A (1992) Clearance of brain edema and macromolecules through the cortical extracellular space. *J Neurosurg* 77:387-396
- OLDENDORF WH (1971) Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 221:1629-1639
- ORDWAY GA, O'DONNELL JM, FRAZER A (1987) Effects of clenbuterol on central β_1 and β_2 adrenergic receptors of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 241:187-195
- PALADE GE (1960) Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries. *Anat Rec* 136:254
- PALADE GE (1961) Blood capillaries of the heart and other organs. *Circulation* 24:368-384
- PALMER GC, PALMER SJ (1983) Adenylate cyclase sensitivity to catecholamines and forskolin in rat pia-arachnoid and cerebral microvessels. *Neuropharmacology* 22: 213-219
- PAPPIUS HM (1989) Cerebral edema and the blood-brain barrier. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation* Vol I, Plenum Medical Book Company, New York, pp 293-306
- PARDRIDGE WM, EISENBERG J, CEFALU WT (1985) Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 249:E264-267
- PAUSESCU E, LUGOJAN R, PAUSESCU M (1970) Cerebral catecholamine and serotonin metabolism in post hypothermic brain edema. *Brain* 93:31-36
- PAUSESCU E, CHIRVASIE R, TEODOSIU T, LUGOJAN R, MUNTIU M (1973) Early effects of ^{60}Co gamma-radiation on cerebral catecholamines, serotonin and related compounds. *Strahlentherapie* 145:76-82
- PAXINOS G, WATSON C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edn, Academic Press, Sidney
- PEROUTKA SJ, MOSKOWITZ MA, REINHARD JF, SNYDER SH (1980) Neurotransmitter receptor binding in bovine cerebral microvessels. *Science* 208:610-612

- PETITO CK (1979) Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 38:222-234
- POVLISHOCK JT, BECKER DP, SULLIVAN HG, MILLER JD (1978) Vascular permeability alterations to horseradish peroxidase in experimental brain injury. *Brain Res* 153:223-239
- PRESKORN SH, HARTMAN BK, RAICHLER ME, CLARK HB (1980) The effect of dibenzazepines (tricyclic antidepressants) on cerebral capillary permeability in the rat in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 213:313-320
- PRESKORN SH, HARTMAN BK, IRWIN GH, HUGHES CW (1982) Role of the central adrenergic system in mediating amitriptyline-induced alteration in the mammalian blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 223:388-395
- QUAGLIARELLO VJ, MA A, STUKENBROK H, PALADE GE (1991) Ultrastructural localization of albumin transport across the cerebral microvasculature during experimental meningitis in the rat. *J Exp Med* 174:657-672
- RAICHLER ME, HARTMAN BK, EICHLING JO, SHARPE LG (1975) Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Nat Acad Sci USA* 72:3726-3730
- RAPOPORT S, THOMPSON H (1975) Opening of the blood-brain barrier by a pulse of hydrostatic pressure. *Biophys J* 15:326a
- RAUB TJ, NEWTON CR (1991) Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 149:141-151
- RAWSON RA (1943) The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by plasma proteins. *Am J Physiol* 138:708-717
- REESE TS, KARNOVSKY MJ (1967) The structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217
- REICHARDT M (1905) Zur Entstehung des Hirndrucks. *Dtsch Z Nervenheilkunde* 28:306-355 (ver Klatzo 1994)

- RENNELS ML, NELSON E (1975) Capillary innervation in mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration. *Am J Anat* 144:233-241
- RENNELS ML, GREGORY TF, BLAUMANIS OR, FUJIMOTO K, GRADY PA (1985) Evidence for a "paravascular" fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from subarachnoid space. *Brain Res* 326:47-63
- ROBSON LE, KOSTERLITZ HW (1979) Specific protection of the binding sites of D-Ala²-D-Leu⁴-enkephalin (delta receptors) and dihydromorphine (mu receptors). *Proc R Soc London Ser B* 205:425-432
- ROGALSKI AA, BERGMANN JE, SINGER SJ (1984) Effect of microtubule assembly status on the intracellular processing and surface expression of an integral protein of the plasma membrane. *J Cell Biol* 99:1101-1109
- SARMENTO A, ALBINO-TEIXEIRA A, AZEVEDO I (1988) Increase in blood-brain barrier permeability due to amitriptyline is accompanied by augmented pinocytosis in brain capillaries. *Br J Pharmacol* 96:838 (abstract)
- SARMENTO A, ALBINO-TEIXEIRA A, AZEVEDO I (1990) Amitriptyline induced morphological alterations of the rat blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol* 176:69-74
- SARMENTO A, BORGES N, AZEVEDO I (1991) Adrenergic influences on the control of blood-brain barrier permeability. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343:633-637
- SARMENTO A, BORGES N, LIMA D (1994) Influence of electrical stimulation of locus coeruleus on the rat blood-brain barrier permeability to sodium fluorescein. *Acta Neurochir (Wien)* 127:215-219
- SHAPIRA Y, DAVIDSON E, WEIDENFELD Y, COTEV S, SHOHAMI E (1988) Dexamethasone and indomethacin do not affect brain edema following head injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:395-402
- SHARMA HS, OLSSON Y, DEY PK (1990) Changes in blood-brain barrier and cerebral blood flow following elevation of circulating serotonin level in anesthetized rats. *Brain Res* 517:215-223

- SHINOHARA Y, OHSUGA H, OHSUGA S, TAKIZAWA S, HAIDA M (1990) Routed protein migration after protein extravasation and water leakage caused by cold injury. *Acta Neurochir (Wien)* [Suppl 51]:90-92
- SCHÜRER L, TEMESVARI P, WAHL M, UNTERBERG A, BAETHMANN A (1989) Blood-brain barrier permeability and vascular reactivity to bradykinin after pretreatment with dexamethasone. *Acta Neuropathol (Berl)* 77:576-581
- SMITH KR, BORCHARDT RT (1989) Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharm Res* 6:466-473
- SMITH QR (1989) Quantitation of blood-brain barrier permeability. In: Neuwelt EA (ed) *Implications of blood-brain barrier and its manipulation* Vol I, Plenum Medical Book Company, New York, pp 85-118
- SMOCKUM RW (1983) Inactivation of GABA receptors by phenoxybenzamine: effects on GABA-stimulated benzodiazepine binding in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 86:259-264
- STEWART-WALLACE AM (1939) A biochemical study of cerebral tissue and of the changes in cerebral edema. *Brain* 62:426-438
- SWANSSON LW, CONNELLY MA, HARTMAN BK (1977) Ultrastructural evidence for monoaminergic innervation of blood vessels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 136:166-173
- TAGAMI M, KUBOTA A, SUNAGA T, FUJINO H, MAEZAWA H, KIHARA M, NARA Y, YAMORI Y (1983) Increased transendothelial channel transport of cerebral capillary endothelium in stroke-prone SHR. *Stroke* 14:591-596
- TENGVAR CH, OLSSON Y (1982) Uptake of macromolecules into neurons from a focal vasogenic cerebral edema and subsequent axonal spread to other brain regions. *Acta Neuropathol (Berl)* 57:33-235
- TROUT JJ, KOENIG H, GOLDSTONE AD, LU CY (1986) Blood-brain barrier breakdown by cold injury. Polyamine signals mediate acute stimulation of endocytosis, vesicular transport, and microvillus formation in rat cerebral capillaries. *Lab Invest* 55:622-631

- UNGERSTEDT U (1971) Mapping of the central dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine pathways. *Acta Physiol Scand* [Suppl 367]:1-48
- UNTERBERG A, SCHMIDT W, DAUTERMANN C, BAETHMANN A (1990) The effect of various steroid treatment regimens on cold-induced brain swelling. *Acta Neurochir (Wien)* [Suppl 51]:104-106
- UNTERBERG A, SCHNEIDER GH, GOTTSCHALK J, LANKSCH WR (1994) Development of traumatic brain edema in old versus young rats. *Acta Neurochir (Wien)* [Suppl 60]:431-433
- UYAMA O, OKAMURA N, YANASE M, NARITA M, KAWABATA K, SUGITA M (1988) Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:282-284
- VAN DEURS B (1977) Vesicular transport of horseradish peroxidase from brain to blood in segments of cerebral microvasculature in adult mice. *Brain Res* 124:1-8
- VORBRÖDT AW (1993) Morphological evidence of the functional polarization of brain microvascular endothelium. In: Pardridge WM (ed) *The blood-brain barrier. Cellular and molecular biology*. Raven Press, New York, pp 137-164
- VORBRÖDT AW, LOSSINSKY AS, WISNIEWSKI HM, MORETZ RC, IWANOWSKI L (1981) Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 53:203-211
- VORBRÖDT AW, LOSSINSKY AS, WISNIEWSKI HM, SUZUKI R, YAMAGUCHI T, MASAOKA H, KLATZO I (1985) Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)* 66:265-273
- WAGNER HJ, PILGRIM CH, BRANDL J (1974) Penetration and removal of horseradish peroxidase injected into the cerebrospinal fluid: role of cerebral perivascular spaces, endothelium and microglia. *Acta Neuropathol (Berl)* 27:299-315
- WAHL M, UNTERBERG A, BAETHMANN A, SCHILLING L (1988) Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:621-634

- WEIL-MALHERBE H, AXELROD J, TOMCHICK R (1959) Blood-brain barrier for adrenaline. *Science* 129:1226-1227
- WEIL-MALHERBE H, WHITBY LG, AXELROD J (1961) The blood-brain barrier for catecholamines in different regions of the brain. In: Ketty SS, Eldes J (eds) *Regional Neurochemistry*, Pergamon, Oxford, pp 284-292
- WEINAND ME (1988) Neuropharmacologic control of cerebral capillary permeability: current implications for therapy of vasogenic brain edema. *Med Hypothesis* 26:51-53
- WESTERGAARD E (1977) The blood brain barrier to horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. *Acta Neuropathol (Berl)* 39:181-187
- WOLMAN M, KLATZO I, CHUI E, WILMES F, NISHIMOTO K, FUJIWARA K, SPATZ M (1981) Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)* 54:55-61
- ZELEZNIKAR RJ, QUIST EE, DREWES LR (1983) An α_1 -adrenergic receptor-mediated phosphatidylinositol effect in canine cerebral microvessels. *Mol Pharmacol* 24:163-167