
DANIEL MOURA

LIBERTAÇÃO, POR DIFERENTES ESTÍMULOS, DA NORADRENALINA
ENDÓGENA E DE AMINAS EXÓGENAS INCORPORADAS
PELO TERMINAL SIMPÁTICO

PORTO 1988

DANIEL FILIPE DE LIMA MOURA

LIBERTAÇÃO, POR DIFERENTES ESTÍMULOS, DA NORADRENALINA
ENDÓGENA E DE AMINAS EXÓGENAS INCORPORADAS
PELO TERMINAL SIMPÁTICO

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO 1988

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

Art.º 48.º, § 3.º—A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(*Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto*, 29 de Janeiro de 1931
—Decreto n.º 19337)

CORPO CATEDRÁTICO
DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Doutor Alexandre Alberto Guerra 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 da Fonseca
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio Araújo Teixeira
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia
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 Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Fonseca Pinheiro Coelho Hargreaves
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Norberto Teixeira Santos

Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Professores Jubilados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor António Martins Gonçalves de Azevedo
Doutor Carlos Ribeiro da Silva Lopes
Doutor Eduardo Esteves Pinto
Doutor João Costa
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Sobrinho Rodrigues Simões

Professores Honorários

Doutor Maurice Mercadier
Doutor Ullrich Georg Trendelenburg
Doutor Victor António Augusto Nunes de Sá Machado

Aos Professores

JOSÉ RUÍZ DE ALMEIDA GARRETT

*Je me suis assez vite aperçue que (c'était)
la vie d'un grand homme. De là, plus de respect de la
vérité, plus d'attention, et, de ma part, plus de silence.*

MARGUERITE YOURCENAR, *Memoires d'Hadrien*

WALTER FRIEDRICH ALFRED OSSWALD

A man for all seasons

ROBERT WHITTINTON, *Vulgaria*

SERAFIM CORREIA PINTO GUIMARÃES

*O sonho é ver as formas invisíveis
Da distância imprecisa, e, com sensíveis
Movimentos da esp'rança e da vontade,
Buscar na linha fria do horizonte...
Os beijos merecidos da Verdade*

FERNANDO PESSOA, *Mensagem*

ÍNDICE

Introdução

Métodos

- Preparação dos órgãos isolados
- Carregamento com aminas exógenas
- Perifusão
- Estimulação do nervo hipogástrico
- Extracção das catecolaminas dos tecidos e líquidos
- Doseamento cromatográfico
- Doseamento cintilométrico
- Auto-radiografias de luz
- Descrição e análise estatística dos resultados
- Fármacos utilizados

Resultados

- Acumulação de adrenalina no canal deferente
- Acumulação de adrenalina na veia safena
- Acumulação de noradrenalina tritiada
- Libertação de adrenalina por estimulação transmural do canal deferente
- Libertação de noradrenalina tritiada por estimulação transmural do canal deferente
- Libertação de adrenalina por estimulação do nervo hipogástrico
- Libertação de adrenalina pelo ião potássio
- Libertação de adrenalina pela tiramina
- Influência da inibição dos receptores pré-sinápticos α_2 na libertação de noradrenalina endógena e tritiada do canal deferente por estimulação transmural
- Auto-radiografias

Discussão

O "efeito isótopo"

Libertação de aminas exógenas diferentes utilizando o mesmo estímulo libertador

Libertação da mesma amina exógena utilizando diferentes agentes libertadores

Relação entre a acumulação tecidual de uma amina exógena e a sua libertação

Relação entre a acumulação tecidual de uma amina exógena e o teor em noradrenalina endógena

Localização da noradrenalina tritiada por auto-radiografia

Efeito do bloqueio α sobre a libertação da noradrenalina exógena e da noradrenalina endógena

Efeito da libertação da adrenalina recentemente incorporada sobre a libertação de noradrenalina endógena

Resumo

Summary

Bibliografia

Agradecimentos

Introdução

A curiosidade torna-se Ciência quando aceita uma regra: só vale a pena colocar perguntas quando for possível planejar experiências que lhes dêem resposta. Os surtos de progresso farmacológico que vêm habitualmente na esteira dos métodos ou modelos experimentais novos, mostram bem que a imaginação é um recurso abundante dos farmacologistas e que, em cada época, o desenvolvimento dos conhecimentos é sobretudo dificultado pelos limites dos métodos. O que se sabe da libertação do mediador endógeno nos terminais adrenérgicos ilustra bem este fenómeno.

Um facto científico reconhecido há vários decénios é o de que a noradrenalina é uma substância responsável pelas respostas obtidas com a estimulação dos nervos simpáticos. A sua identificação como neurotransmissor foi conseguida pela análise das acções farmacológicas da noradrenalina que se mostraram coincidentes com as do produto de libertação dos nervos simpáticos (Euler 1946; Holtz *et al.* 1947). Caracterizado o mediador procurou-se medir a quantidade dele libertada utilizando o mesmo método. A aferição biológica serviu a Peart (1949) para medir pela primeira vez a quantidade de noradrenalina libertada durante a estimulação de nervos simpáticos. Estes métodos, embora muito sensíveis, são de execução muito morosa e, por isso, o número de trabalhos dedicados à medição da libertação do mediador adrenérgico endógeno foi pequeno (Mann e West 1950; Brown e Gillespie 1957).

Em 1959 chegou à fisiofarmacologia a técnica da utilização de isótopos radioactivos da adrenalina (Axelrod *et al.* 1959) e da noradrenalina (Whitby *et al.* 1961) e com ela surge um novo e dos mais explosivos surtos de informação nesta área dando inteira razão a Julius Axelrod: *"Major breakthroughs always seem to depend on developing ways of measuring body constituents that are sensitive, specific and perhaps most importantly, simple and reproducible"* (citado por Snyder e Taylor 1972).

O procedimento experimental nestes trabalhos consiste basicamente na oferta aos tecidos de um isótopo radioactivo de noradrenalina ou outras substâncias captadas pelo terminal adrenérgico, esperar o tempo considerado necessário para que esses marcadores sejam incorporados pelos neurónios e estudar, depois, a sua libertação espontânea e induzida mediante a contagem de cintilações emitidas pelo material recolhido. O método é assim sensível porque as cintilações que é necessário contar são emitidas por um número muito pequeno de moléculas, é específico porque toda a radioactividade medida só pode resultar do marcador usado e dos seus metabolitos e simples porque o processo analítico está normalizado e largamente automatizado, permitindo leituras rápidas de muitas amostras.

É bem claro que a validade dos estudos com isótopos radioactivos como indicadores da libertação de substâncias endógenas, depende de uma forma crítica, da demonstração de que a noradrenalina tritiada administrada do exterior se vai acumular nos depósitos onde existe a noradrenalina endógena e ficar aí sujeita a iguais influências libertadoras. As provas reunidas, quanto a esta exigência, não

deixam dúvidas: as catecolaminas radioactivas acumulam-se, de maneira estável, nos tecidos ricamente inervados pelo sistema simpático (Whitby *et al.* 1961), desaparecem nos animais desnervados (Hertting *et al.* 1961a), são mobilizadas pela estimulação nervosa (Hertting e Axelrod 1961; Chidsey e Harrison 1963; Rosell *et al.* 1963) e pelos fármacos simpaticomiméticos de acção indirecta (Burn e Burn 1961; Hertting *et al.* 1961b; Axelrod *et al.* 1962) e são sensíveis ao efeito inibidor da captação neuronal da cocaína (Hertting *et al.* 1961b) e ao efeito depletor da reserpina (Hertting *et al.* 1961b).

Apesar disto, o método não pode dar indicações directas da libertação do mediador endógeno mas sim indicações sobre uma substância exógena que captada do exterior se acumula na estrutura em estudo e para a qual se admitiu um comportamento semelhante ao da substância endógena. As deduções feitas a partir destes resultados para a noradrenalina endógena baseiam-se na presunção aceitável, mas não demonstrada, de que as substâncias recentemente incorporadas do exterior pelo terminal simpático se misturam de uma forma rigorosamente homogénea com a noradrenalina endógena e com ela se libertam nas mesmas proporções. Para que tal suceda é necessário que a amina exógena recentemente incorporada atinja todos os locais de armazenamento da noradrenalina endógena já formada, se misture continuamente com a que vai sendo sintetizada, não altere a distribuição intracelular da amina endógena, seja igualmente sensível ao mecanismo promotor da libertação e não tenha ela própria a capacidade de modificar os processos de regulação da libertação do mediador. A amina exógena, partida do exterior e forçada a seguir um trajecto diferente, dificilmente poderá corresponder às exigências. Mesmo que tal sucedesse é necessário definir qual é o tempo de contacto mínimo do marcador com os tecidos, a partir do qual se não diferenciam os depósitos e entre que concentrações da substância exógena acumulada se mantem essa homogeneidade.

A estas reservas feitas à coincidência do comportamento da noradrenalina biogénica — sintetizada e arrumada dentro do neurónio — e do seu isótopo radioactivo — fabricado e incorporado de fora — vem acrescentar-se, por um lado, a demonstração feita por Trendelenburg (1961) de que a noradrenalina endógena se apresenta normalmente acumulada nos terminais adrenérgicos em depósitos separados com diferente significado funcional e, por outro, a caracterização anatómica de diferentes locais de acumulação de noradrenalina (ver Grillo 1966).

Todavia, muito poucos trabalhos (Chidsey e Harrison 1963; Hughes 1973a) se fizeram para comparar a libertação dos dois tipos de amina.

O desenvolvimento recente de dois métodos de doseamento não radioactivos (o doseamento radioenzimático e a cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica) com um limite de detecção suficientemente baixo para medir as pequenas quantidades de noradrenalina libertadas para o líquido nutritivo veio permitir colocar à prova aquela presunção.

Os objectivos directos deste trabalho foram assim:

— Verificar se a noradrenalina endógena se liberta na mesma quantidade, com a mesma velocidade e dos mesmos locais que as aminas utilizadas como marcadores.

- Observar se a presença de aminas exógenas no neurónio altera a libertação da noradrenalina endógena.
- Verificar se as aminas incorporadas deslocam a noradrenalina endógena.
- Estudar se a regulação da libertação dependente de receptores pré-sinápticos se faz sentir da mesma maneira sobre os mediadores endógenos e os marcadores.

Métodos

Todas as experiências para medição da libertação dos transmissores foram executadas em órgãos isolados montados em pequenas câmaras de perfusão percorridas por um líquido nutritivo que era continuamente recolhido para análise. No decurso da perfusão, a preparação isolada era submetida a diferentes estímulos libertadores e procedia-se ao doseamento das aminas no líquido de perfusão em amostras colhidas antes e durante a intervenção dos processos indutores de libertação.

A acumulação tecidual das aminas exógenas foi estudada pelo seu doseamento nos canais deferentes retirados da câmara de perfusão no fim da experiência e por auto-radiografias de luz preparadas com tecidos incubados em presença de isótopos radioactivos dessas aminas.

Preparação dos órgãos isolados

Utilizaram-se três preparações diferentes: a veia safena de Cão isolada, o canal deferente de Cobaia isolado e a preparação de nervo hipogástrico-canal deferente de Cobaia *in vitro*.

Para obtenção de fragmentos de veia safena, os cães (raça indeterminada, sexo masculino ou feminino, peso entre 6 e 20 Kg) eram anestesiados com pentobarbital sódico administrado por via endovenosa numa veia superficial da pata anterior na dose de 30 mg/Kg. Isolava-se a veia safena lateral na zona de confluência dos seus ramos dorsal e plantar e removia-se o segmento que ocupava 3-5 cm em sentido proximal a partir daquela confluência. Este segmento era cortado helicoidalmente em tiras com cerca de 2,5 x 25 mm que eram libertadas de todos os tecidos envolventes, colocadas em pequenos recipientes de 5 ml de capacidade com Krebs-Henseleit (NaCl 6,94; KCl 0,35; CaCl₂ 0,28; KH₂PO₄ 0,16; MgSO₄ 7H₂O 0,29; NaHCO₃ 2,10; glicose 1,81 g/l) a que se adicionava EDTA (10 µg/ml) para evitar a oxidação não enzimática das catecolaminas (omitiu-se a adição de ácido ascórbico correntemente utilizado também para aquele fim porque a sua presença no detector electroquímico empregue no doseamento das catecolaminas — ver

adiante—interfere com o processo analítico) e posteriormente suspensas na câmara de perfusão (Guimarães e Osswald 1969; Guimarães e Paiva 1977).

Os canais deferentes de Cobaia eram removidos em toda a sua extensão desde o topo epididimal até ao prostático e montados para perfusão sem abertura prévia. Para obtenção de preparações em que os canais eram removidos com a inserção do nervo hipogástrico seguiu-se o método descrito por Huković (1961) e algumas indicações práticas de Holman (1975).

O canal deferente era seccionado no seu topo epididimário e liberto da sua fixação ao testículo. Procedia-se depois à identificação do nervo hipogástrico puxando para diante o mesocolon sigmóide até que esse meso ficasse na posição de uma membrana inserida na parede abdominal posterior e colocada no plano sagital. A identificação dos dois nervos hipogástricos fazia-se observando o mesocolon à transparência e numa incidência lateral. Os trajectos nervosos eram libertos das suas aderências peritoneais, primeiro em sentido proximal até à sua origem nos gânglios mesentéricos inferiores e, em seguida, no sentido oposto até cerca de 5 mm do canal deferente. A este nível o nervo hipogástrico ramifica-se num leque de fibras nervosas que penetram no tecido um pouco acima da terminação prostática. Esta zona era removida com o peritoneu que a revestia depois de dissecção cuidadosa para separação da terminação prostática, da parede lateral da bexiga e das vesículas seminais. Esta manobra era facilitada pelo rebatimento para diante e para baixo da bexiga com auxílio de uma pinça que prendia o vértice vesical.

Depois de isolado, o conjunto nervo-canal deferente era mergulhado numa placa de Petri com Krebs já oxigenado e a integridade da transmissão nervosa testada pela aplicação de um estímulo eléctrico (25 Hz, 5 a 10 V, 2 mseg, durante 5 seg) através de dois eléctrodos de prata ou platina encostados ao nervo. A preservação da preparação neuromuscular era comprovada pela verificação de que a uma estimulação do nervo correspondia uma resposta de contracção do órgão efector. A preparação nervo-canal deferente era depois montada numa câmara de perfusão cujo cilindro interno tinha 6 mm de diâmetro e 50 mm de altura.

A extremidade proximal do canal deferente era fixada à porção inferior da câmara de perfusão e a extremidade distal era suspensa numa alavanca isotónica de inscrição frontal submetida a uma tensão de 1 g e a contracção registada com uma ampliação de 6 vezes.

Carregamento com aminas exógenas

Utilizaram-se como aminas exógenas a incorporar nas preparações a ^3H -(-)-7-noradrenalina e a (-)-adrenalina que eram adicionadas a um líquido de incubação em concentrações que variaram entre 0,6 e 160 $\mu\text{mol/l}$. Veias, canais deferentes ou preparações nervo hipogástrico-canal deferente eram colocados, logo que fossem retirados do animal de experiência em pequenos recipientes com solução de Krebs contendo 41 $\mu\text{mol/l}$ de hidrocortisona e 1 mmol/l de pargilina,

onde permaneciam 30 min a 37°C e com oxigenação mantida. Ao fim deste primeiro tratamento os tecidos eram transferidos para outro líquido de incubação que já não continha pargilina e ao qual tinha sido adicionada uma das aminas exógenas. Depois de uma incubação de 60 min, as preparações eram montadas nas câmaras de perfusão (Fig. 1).

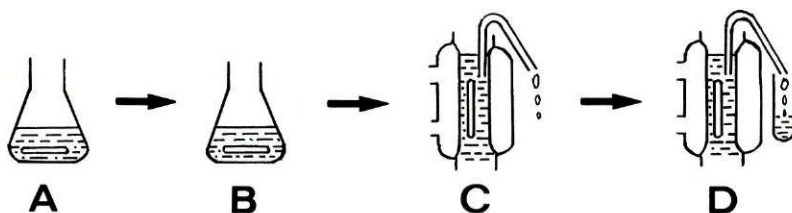


Fig. 1. Representação esquemática da sequência experimental habitualmente seguida. A: incubação da preparação em solução de Krebs-Henseleit contendo 1 mmol/l de pargilina durante 30 min; B: incubação em solução de Krebs-Henseleit contendo (-)-adrenalina ou ³H-(-)-noradrenalina durante 60 min; C: perfusão durante 120 min para remoção das catecolaminas dos compartimentos extraneuronais; D: início das colheitas dos líquidos de perfusão.

Perifusão

Os tecidos eram perfundidos a um fluxo de 0,8 ml/min com a solução nutritiva atrás indicada e que continha sempre e até ao fim das experiências 41 µmol/l de hidrocortisona. Ao fim de 120 min de lavagem iniciava-se a colheita contínua das amostras de líquido de perfusão antes, durante e após a aplicação de diferentes processos libertadores de aminas do terminal simpático.

Nas experiências de estimulação eléctrica transmural usou-se um estímulo de 100V, 2 mseg, 1 Hz, durante 25 min (Stimulator II X, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, FRG). As colheitas de líquido eram feitas de 30 em 30 min e 20 min antes da aplicação da corrente adicionava-se ao meio de perfusão cocaína (7,5 µmol/l) e fentolamina (3 µmol/l) com o objectivo de aumentar tanto quanto possível a quantidade de catecolaminas libertadas no líquido a recolher para análise. Nas experiências destinadas a medir a influência do bloqueio pré-sináptico sobre a libertação da noradrenalina endógena e das aminas de carga, executavam-se duas séries de estímulos e a fentolamina era apenas adicionada entre os dois períodos de estimulação.

Nas experiências de libertação por altas concentrações de potássio as colheitas de líquido eram feitas de 10 em 10 min. O período de contacto com o potássio (KCl 50 mmol/l) era também de 10 min e era antecedido, tal como se descreveu para a estimulação eléctrica, do acrescento de cocaína e fentolamina ao líquido nutritivo.

Nas experiências em que o agente libertador era a tiramina (40 ou 160 $\mu\text{mol/l}$, 15 min) recolhia-se o líquido de 15 em 15 min e não se adicionavam outros fármacos à solução de Krebs além da hidrocortisona.

Quando se utilizou a preparação de nervo-canal deferente o protocolo foi igual ao da estimulação transmural com excepção das características da corrente eléctrica aplicada (estímulos de 25 Hz, 2 mseg, 5 ou 10 V, aplicados em salvas com a duração de 5 seg em cada min, durante 30 min).

Estimulação do nervo hipogástrico

A estimulação do nervo hipogástrico era feita através de um eléctrodo de "Burn e Rand" (Burn e Rand 1960a). O eléctrodo era fabricado com 2 fios de prata cujas extremidades eram enroladas à volta de um tubo de silicone de diâmetro externo ligeiramente superior ao do nervo. Cada fio era passado 3 vezes em torno do tubo de silicone e os dois enrolamentos ficavam à distância de 1 a 2 mm um do outro. O conjunto era envolvido com cola (Araldite) não aderente ao silicone. Assim, depois de seca, era possível remover o tubo, criando-se um pequeno orifício onde cabia o tronco nervoso. Os anéis do fio de prata ficavam embebidos na cola que os isolava do meio líquido em toda a extensão excepto no seu perímetro interno que ficava em contacto com o nervo. O eléctrodo era colocado no interior da câmara de perfusão através de um orifício aberto na parede de vidro e ligado ao estimulador (Fig. 2).

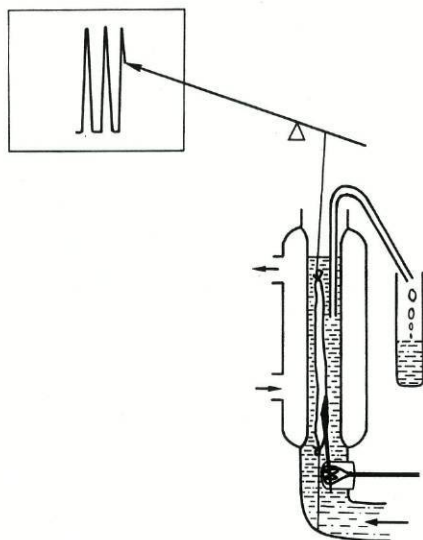


Fig. 2. Representação do dispositivo experimental para colheita do líquido de perfusão durante a estimulação nervosa da preparação nervo hipogástrico-canal deferente. O registro das contrações foi utilizado para verificar se a condução nervosa e a transmissão neuroefectora estavam funcionantes.

Extracção das catecolaminas dos tecidos e líquidos

O processo extractivo baseou-se no conhecido princípio da adsorção das catecolaminas à alumina a pH alcalino e à sua remoção pela acidificação do meio (ver, por exemplo, Anton e Sayre 1962).

Os líquidos de perfusão eram recolhidos em ácido perclórico 0,1 N. A cada amostra adicionava-se 20 mg de alumina e o pH era elevado para 8,5 com solução TRIS. Os recipientes eram agitados durante 30 min, o sobrenadante rejeitado e a alumina recolhida para a parte superior de um sistema de 2 tubos separados por uma membrana microporosa. A alumina era posta em contacto com 500 μ l de ácido perclórico 0,1 N e o sistema era rapidamente centrifugado. O líquido sem alumina recolhido na parte inferior era utilizado para injeção no cromatógrafo ou para leitura cintilométrica.

Os tecidos retirados no fim da experiência ficavam mergulhados em 3 ml de ácido durante pelo menos 24 h. O líquido sobrenadante era submetido a um processo extractivo semelhante ao já indicado.

Doseamento cromatográfico

Na análise das catecolaminas libertadas para os líquidos de perfusão utilizou-se uma modificação das técnicas já consagradas para doseamento das pequenas concentrações de noradrenalina e adrenalina que se encontram no plasma (Hjemdahl *et al.* 1979; Hjemdahl 1984; para revisão dos princípios gerais da técnica ver Kissinger 1983).

A separação das catecolaminas fez-se num sistema de cromatografia líquida de alta pressão de fase inversa formado por uma fase fixa de partículas de octadecilsilano com 5 μ m de diâmetro que preenchem uma coluna de aço inoxidável de 4,6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA) atravessada por uma fase móvel constituída por uma solução em água tridestilada contendo 0,1 mol/l de acetato de sódio, 0,1 mol/l de ácido cítrico, 0,5 μ mol/l de octilsulfato de sódio e 10% (volume/volume) de metanol (Warnhoff 1984). A fase móvel tinha um pH de 3,7, encontrava-se à temperatura ambiente e circulava com um fluxo de 1 ml/min criado por uma bomba de alta pressão (modelo M-45, Waters, Milford, MA, USA ou modelo 302, Gilson, Middleton, WI, USA). A fase móvel era filtrada por uma membrana com poros de 0,22 μ m (GSWP 04700, Millipore, Bedford, MA, USA) e desgaseificada sob vácuo com agitação constante durante 10 min antes de ser colocada no cromatógrafo.

A quantificação das catecolaminas fez-se, à saída da coluna de cromatografia, por amperometria com o uso de um detector electroquímico e de uma célula de fluxo em camada fina com um eléctrodo de pasta de carvão colocado a um potencial de +0,7 V em relação a um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, todos obtidos através de Bioanalytical Systems.

Nalguns ensaios utilizou-se outra fase móvel constituída por uma solução amortecedora de ácido monocloroacético 0,15 mol/l a pH 3,0, contendo Na₂EDTA (2 mmol/l) e octilsulfato de sódio (25 mg/l) (Bioanalytical Systems 1981; Davis *et al.* 1981). O fluxo utilizado era de 2 ml/min e as restantes condições de cromatografia e detecção amperométrica eram iguais às acima indicadas.

Para o cálculo da quantidade de amina injectada no cromatógrafo (50-200 µl) media-se a relação das alturas dos picos correspondentes à substância em estudo e ao padrão interno constituído por uma quantidade fixa de diidroxibenzilamina adicionada a todas as amostras antes de iniciado o processo extractivo. Conhecida a relação de alturas obtida com a injeção de uma amostra padrão que continha quantidades pré-determinadas de aminas aplicava-se a fórmula seguinte em que "amina" e "DHBA" significam a altura dos picos da catecolamina em estudo e da diidroxibenzilamina.

$$(\text{conc. amina}) \text{ amostra} = \frac{(\text{amina: DHBA}) \text{ amostra}}{(\text{amina: DHBA}) \text{ padrão}} \times (\text{conc. amina}) \text{ padrão}$$

A forma habitual dos registos cromatográficos obtidos com o uso de cada uma das fases móveis atrás mencionadas está desenhada na Fig. 3.

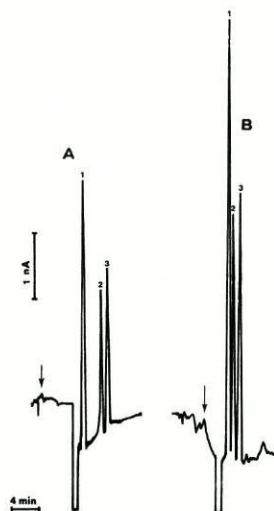


Fig. 3. Desenho da forma habitual dos registos cromatográficos de uma solução padrão contendo noradrenalina (pico 1), adrenalina (pico 2) e diidroxibenzilamina (pico 3). A seta indica o momento em que a amostra foi introduzida na fase móvel. Todas as substâncias foram injectadas na quantidade de 2 ng. A: traçado obtido com uma fase móvel de monocloroacetato (0,15 mol/l) a pH 3,0, a que se adicionou Na² EDTA (2 mmol/l) e octilsulfato de sódio (25 mg/l); B: cromatograma obtido com uma fase móvel de acetato de sódio (0,1 mol/l) e ácido cítrico (0,1 mol/l), a pH 3,7, a que se adicionou octilsulfato de sódio (0,5 µmol/l) e metanol (10% do volume).

Doseamento cintilométrico

A radioactividade foi medida em amostras do eluído da alumina por cintilometria líquida (Graefe *et al.* 1973) num contador de cintilações (Tri-Carb Scintillation Spectrometer modelo 3320, Packard, Warrenville, ILL, USA ou Liquid Scintillation Counter BF500, Berthold, Wildbad, FRG) usando como líquido de cintilação uma mistura de 300 ml de Triton X-100, 5,5 ml de Permablend III (Packard) e 1 l de tolueno (ver Brandão 1977).

Auto-radiografias de luz

Utilizaram-se canais deferentes de Cabaia que foram incubados na presença de 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de ^3H -noradrenalina em condições iguais às descritas para as experiências de efluxo.

Após 1 h de incubação, os tecidos foram fixados numa solução a 3% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 mol/l, pH 7,3 à temperatura de 4°C. Depois de 1 h de permanência no fixador, os fragmentos foram submetidos a desidratação através da passagem por soluções com concentrações crescentes de etanol. Incluíram-se as amostras de tecido em Epon e os blocos foram seccionados num ultramicrotomo em cortes semi-finos com 2 μm de espessura. Estes cortes foram colados em lâminas de vidro com cola de albumina, cobertos com ácido perclórico, reagente de Schiff e hematoxilina e cobertos com uma emulsão fotográfica (Ilford K-5 diluída em água na proporção de 1/1). As lâminas permaneceram numa câmara escura durante 90 dias ao fim dos quais se fez a revelação (Kodak D-170). As auto-radiografias foram observadas e fotografadas num microscópio de luz para localizar os grãos de prata correspondentes às zonas de emissão radioactiva (Azevedo 1982).

Descrição e análise estatística dos resultados

Se não for referido de outra maneira, os resultados das experiências são expressos pelas médias aritméticas e erros padrão. Os valores calculados como quocientes de duas variáveis são descritos estatisticamente pela sua média geométrica e a sua dispersão pelos intervalos fiduciários de 95%.

Para dedução estatística das diferenças entre os vários grupos de valores experimentais utilizou-se o teste *t* de Student para valores emparelhados ou independentes. A análise foi sempre bilateral e o nível de significância estatística colocado em 5%.

Fármacos utilizados

(-)-[7-³H(N)]-noradrenalina (18,8-23,1 Ci/mmol, New England Nuclear, Dreieich, FRG), bitartrato de noradrenalina (Sigma, St. Louis, MO, USA), (-)-adrenalina (Sigma), cloridrato de cocaína (Uquipa, Lisboa), cloridrato de fentolamina (Ciba Geigy, Basileia, Suíça), cloridrato de pargilina (Sigma), hemisuccinato de hidrocortisona (Sigma), cloridrato de propranolol (Sigma), cloridrato de tiramina (Sigma), pentobarbital sódico (Siegfried Zofingen, Suíça).

Resultados

As experiências foram realizadas em 3 preparações diferentes (veia safena lateral de Cão, canal deferente de Cobaia e preparação do nervo hipogástrico-canal deferente de Cobaia) que foram carregadas com adrenalina não radioactiva ou noradrenalina tritiada e expostas a 4 tipos diferentes de estímulo libertador (estimulação eléctrica transmural, ião potássio, tiramina e estimulação eléctrica dos nervos) na ausência ou na presença de bloqueio dos receptores α_2 . Para facilidade de exposição, os resultados serão agrupados em valores de acumulação e de libertação e apresentados na seguinte ordem: acumulação tecidual de adrenalina no canal deferente e na veia safena, e acumulação de noradrenalina tritiada no canal deferente seguindo-se a libertação pela estimulação transmural, libertação pela estimulação dos nervos, libertação pela despolarização induzida pelo aumento da concentração de potássio no meio e libertação provocada pela tiramina. Por último descrevem-se os resultados do bloqueio dos receptores α_2 na libertação do mediador adrenérgico e da amina artificialmente incorporada e, no fim do capítulo, mostram-se os resultados morfológicos conseguidos com as autoradiografias de luz dos cortes de canais deferentes incubados com amina radioactiva.

Acumulação de adrenalina no canal deferente

Quando o canal deferente é incubado durante 60 min com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina e após uma lavagem de 120 min para arrastar toda a amina presente nos espaços intercelular e extraneuronal verifica-se que o teor em adrenalina do tecido é de cerca de 10% do teor em noradrenalina (Fig. 4).

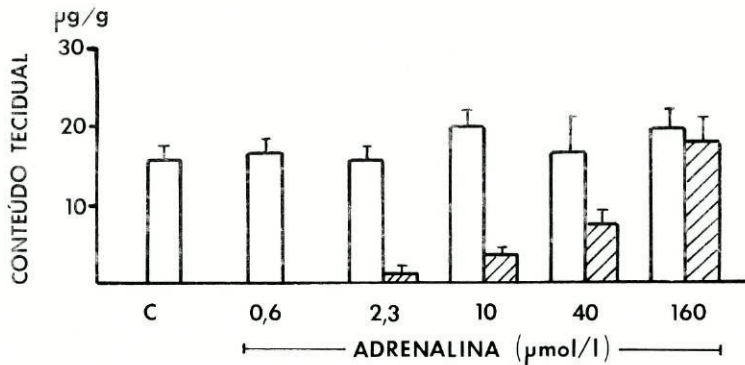


Fig. 4. Acumulação de adrenalina no canal deferente em comparação com a quantidade de noradrenalina endógena já existente. A altura das colunas representa a concentração tecidual de amina ($\mu\text{g/g}$). Colunas em branco: noradrenalina; colunas com traços: adrenalina. Os números indicados abaixo das colunas são as concentrações de adrenalina adicionadas ao líquido de incubação ($\mu\text{mol/l}$). Mostra-se a média aritmética e o erro padrão da média de 4 a 8 experiências.

Como se vê na figura 4, só após incubação com $2,3\mu\text{mol/l}$ é possível detectar a acumulação de adrenalina. Essa quantidade acumulada é proporcional à concentração de adrenalina no meio de incubação e iguala o teor de noradrenalina nas experiências com $160\mu\text{mol/l}$.

Acumulação de adrenalina na veia safena

Na veia safena, a acumulação de adrenalina faz-se parcialmente à custa de uma certa redução de teor em noradrenalina (Fig. 5). Contudo, a quantidade de adrenalina exógena acumulada é superior à quantidade de noradrenalina que desaparece pois que a quantidade final total de amina é superior ao controle e a de noradrenalina menor. Tal facto torna-se evidente quando se incubam as veias na presença de uma concentração cerca de 4 vezes superior ($10\mu\text{mol/l}$).

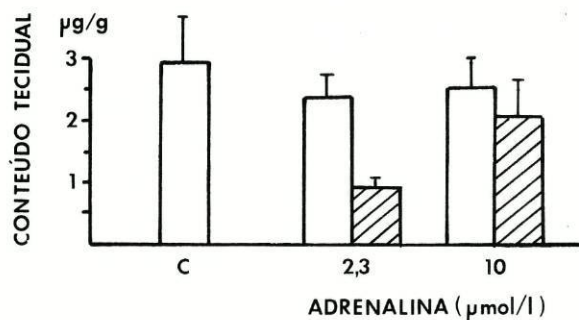


Fig. 5. Acumulação de adrenalina na veia safena em comparação com a quantidade de noradrenalina endógena já existente. A altura das colunas representa a concentração tecidual de amina ($\mu\text{g/g}$). Colunas em branco: noradrenalina; colunas com traços: adrenalina. Os números indicados abaixo das colunas são as concentrações de adrenalina adicionadas ao líquido de incubação ($\mu\text{mol/l}$). Mostra-se a média aritmética e o erro padrão da média de 3 a 7 experiências.

Acumulação de noradrenalina tritiada

O contacto de 1 h do canal deferente com um meio de incubação contendo $2,3 \mu\text{mol/l}$ de (-)-noradrenalina radioactiva ($18,8\text{-}23,1 \text{ Ci}/\mu\text{mol}$) com marcação pelo trítio em posição predominante no carbono 7, seguida de perfusão de 120 min, leva a um teor tecidual de amina exógena de $1,13 \pm 0,29 \mu\text{g/g}$ (ou $6,69 \pm 1,72 \mu\text{mol/kg}$) semelhante ao que se obtém nas experiências com concentrações equimolares de adrenalina no líquido de incubação ($1,50 \pm 0,70 \mu\text{g/g}$ ou $8,20 \pm 3,83 \mu\text{mol/kg}$).

Libertação de adrenalina por estimulação transmural do canal deferente

Os resultados expressos na tabela 1 mostram a libertação de adrenalina a partir das preparações incubadas com a concentração de $2,3 \mu\text{mol/l}$ de adrenalina.

Verifica-se que o aumento de efluxo (diferença entre os valores de efluxo espontâneo e de efluxo nos 30 min de colheita a partir do início da estimulação) da noradrenalina endógena é maior do que o da adrenalina. Também a noradrenalina é a amina predominante no tecido mas a comparação dos resultados expressos em fracção de libertação (Luchelli-Fortis e Langer 1975), isto é, pelo quociente entre a quantidade de amina libertada e a quantidade armazenada no tecido, mostra um valor significativamente mais elevado para a adrenalina (cerca de 5 vezes superior).

A comparação dos efluxos de noradrenalina endógena induzidos pela estimulação eléctrica de preparações de controlo, isto é, não sujeitas a carregamento com adrenalina, com o efluxo induzido nas preparações incubadas com adrenalina não mostrou diferenças significativas.

Tabela 1. Canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina e de adrenalina após incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Libertação por estimulação eléctrica transmural (1Hz, 2 mseg, 100 V, durante 25 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$		Efluxo de aminas no líquido de perfusão			
			ng/30 min		fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)	
	A	B	A	B	A	B
Noradrenalina	15,60 $\pm 1,40$	15,80 $\pm 1,50$	10,12 $\pm 2,14$	9,92 $\pm 2,68$	9,60 a $\pm 2,50$	6,80 $\pm 1,22$
Adrenalina	1,50 $\pm 0,70$		3,82 $\pm 0,67$		48,40 b $\pm 3,01$	

Resultados expressos em médias aritméticas \pm erro padrão ($n=5$). Em A apresentam-se os resultados referentes ao tecido incubado com adrenalina e em B, os respeitantes ao canal deferente contralateral incubado sem adrenalina (controlo). A diferença entre a e b é estatisticamente significativa.

Numa série de experiências em que se provocou uma impregnação variável dos tecidos com adrenalina exógena através da incubação dos canais deferentes em presença de concentrações de adrenalina entre 0,6 e 160 $\mu\text{mol/l}$ verificou-se que o efluxo de adrenalina induzido pela estimulação transmural foi tanto maior quanto maior foi a concentração de incubação (Fig. 6). Nas experiências em que se utilizou a concentração de 0,6 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina o seu efluxo induzido electricamente não foi detectável mas naquelas em que se empregou 160 $\mu\text{mol/l}$ já esse efluxo de adrenalina tornou-se duplo do da noradrenalina endógena.

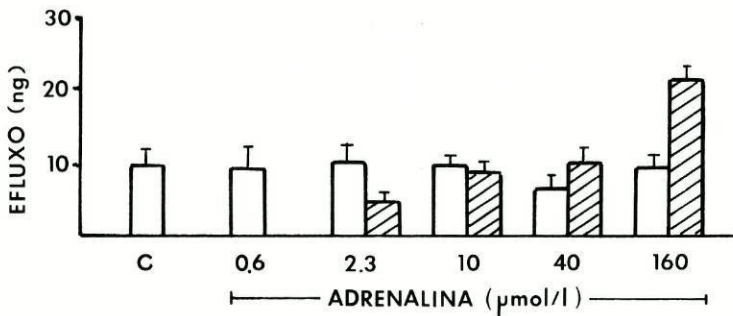


Fig. 6. Libertação de noradrenalina e de adrenalina por estimulação eléctrica transmural do canal deferente de Cobaia após incubação com concentrações crescentes de adrenalina. A altura das colunas representa o efluxo induzido pelo estímulo eléctrico para o líquido de perfusão (ng/30 min) Colunas em branco: noradrenalina; colunas com traços: adrenalina. Os números indicados abaixo das colunas são as concentrações de adrenalina adicionadas ao líquido de incubação (µmol/l). Mostram-se médias aritméticas e erros padrão de 4 a 8 experiências.

No entanto, quando se exprime o efluxo das aminas em fracção de libertação, isto é, dividindo a quantidade que é libertada pela quantidade presente no tecido que é submetido ao estímulo eléctrico, obtém-se um quadro inverso (Fig. 7) ao que se mostrou na figura anterior. A fracção de libertação de adrenalina reduziu-se com o aumento da impregnação tecidual com aquela amina.

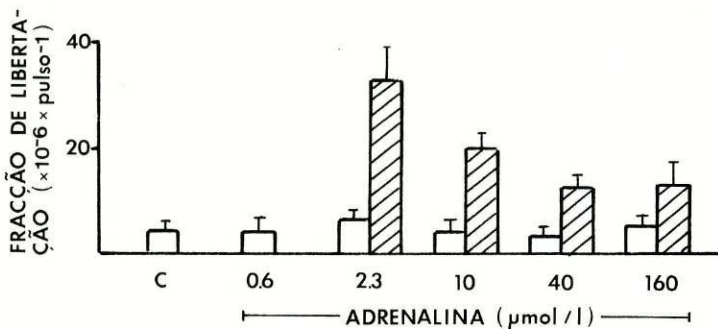


Fig. 7. Fracção de libertação por pulso da noradrenalina e da adrenalina nas experiências de estimulação eléctrica transmural (1Hz, 2 msec, 100 V, executando-se um total de 1500 estímulos) do canal deferente de Cobaia após incubação com concentrações crescentes de adrenalina. A altura das colunas representa o efluxo induzido pelo estímulo eléctrico para o líquido de perfusão expresso em proporção do conteúdo tecidual de cada uma das aminas e dividido pelo número de pulsos aplicados. Colunas em branco: noradrenalina; colunas com traços: adrenalina. Os números indicados abaixo das colunas são as concentrações de adrenalina adicionada ao líquido de incubação (µmol/l). Mostram-se médias aritméticas e erros padrão de 4 a 8 experiências.

Na figura 8 mostra-se que quanto maior for o teor tecidual de adrenalina menor é a diferença entre as fracções de libertação da amina exógena e da noradrenalina. Os valores do efluxo da noradrenalina não sofrem variação com a crescente impregnação da preparação com adrenalina mas os valores do efluxo da adrenalina vão-se aproximando dos da amina endógena.

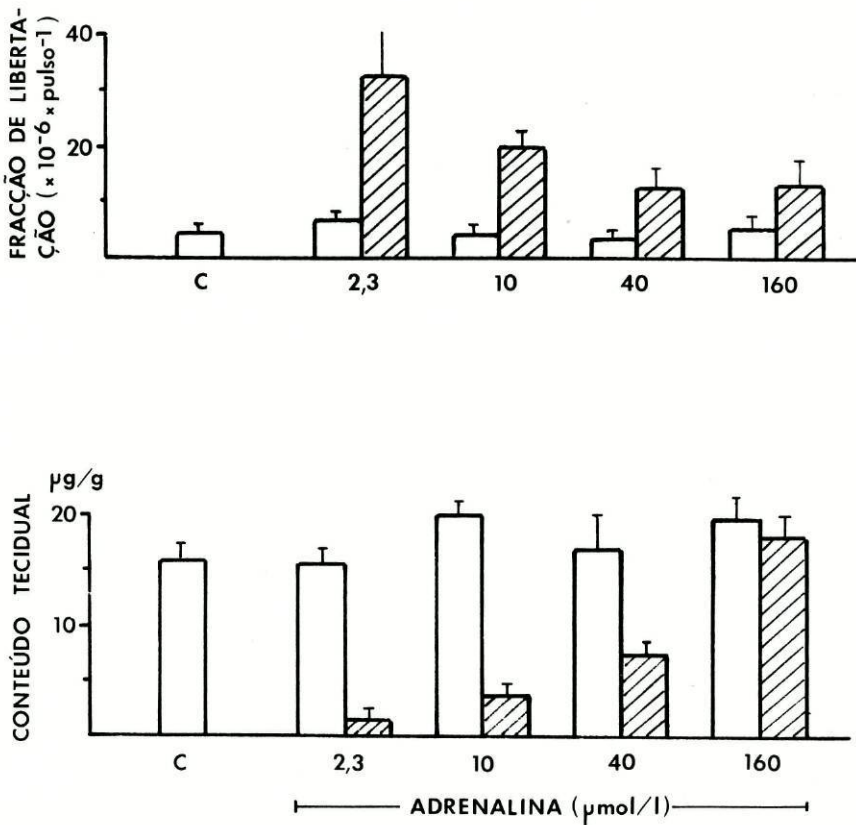


Fig. 8. Relação entre fracção de libertação e teores teciduais de amina nas experiências em que os canais deferentes de *Cobaia* incubados com concentrações crescentes de adrenalina foram submetidos a estimulação eléctrica transmurais (1Hz, 2mseg, 100 V, executando-se um total de 1500 estímulos). A parte superior da figura mostra o efluxo induzido pelo estímulo eléctrico para o líquido de perfusão expresso em fracção de libertação (10^{-6} x pulso $^{-1}$). A parte inferior da figura mostra o teor tecidual de cada uma das aminas ($\mu\text{g/g}$). Colunas em branco: noradrenalina; colunas com traços: adrenalina. Os números indicados abaixo das colunas são as concentrações de adrenalina adicionada ao líquido de incubação ($\mu\text{mol/l}$). Mostram-se médias aritméticas e erros padrão da média de 4 a 8 experiências.

Libertação de noradrenalina tritiada por estimulação transmural do canal deferente

As experiências referidas na secção precedente, em que se submeteram a estímulo transmural canais deferentes contendo adrenalina como amina exógena incorporada do meio de incubação, foram reproduzidas com o uso de preparações submetidas a carregamento com ^3H (-)- noradrenalina. A concentração utilizada foi a mesma (2,3 mmol/l) e a incorporação tecidual conseguida foi semelhante.

Os valores da tabela 2 mostram que, tal como no tecido, também no efluxo induzido electricamente a noradrenalina endógena predomina sobre a noradrenalina radioactiva. No entanto, há uma diferença marcada entre os valores da fracção de libertação: tal como se observou nas experiências com adrenalina, também a fracção de libertação da noradrenalina exógena é maior do que a da noradrenalina endógena.

Tabela 2. Canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina endógena e de noradrenalina tritiada após incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ ^3H (-)- noradrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Libertação por estimulação eléctrica transmural (1Hz, 2 mseg, 100 V, durante 25 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$	Efluxo de aminas no líquido de perfusão	
		ng/30 min	fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)
Endógena	20,84 $\pm 2,04$	10,11 $\pm 1,62$	6,45 a $\pm 2,27$
Tritiada	1,13 $\pm 0,29$	3,91 $\pm 2,10$	38,28 b $\pm 11,31$

Resultados expressos em médias aritméticas e erro padrão (n=5). A diferença entre a e b é estatisticamente significativa.

Libertação de adrenalina por estimulação do nervo hipogástrico

A estimulação transmural não se pode considerar uma estimulação fisiológica, já que *in vivo*, nunca se realiza este tipo de estimulação. Por isso, fizeram-se algumas experiências para verificar o que se passa quando a preparação é atingida por um estímulo aplicado sobre o nervo que a inerva.

Como se mostra na tabela 3, o teor total de aminas na preparação nervo hipogástrico-canal deferente de controlo ou na que foi incubada com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min é significativamente maior do que o que se regista no canal deferente isolado. Este facto deve-se à técnica diferente de remoção dos tecidos porque a preparação do nervo hipogástrico-canal deferente exige a conservação do plexo nervoso muito rico existente no folheto de peritoneu que envolve o canal deferente enquanto que na técnica habitualmente usada no isolamento apenas do canal deferente se faz a libertação das camadas mais externas deste órgão.

O conteúdo de adrenalina representa cerca de 6,8% do total. Quanto ao teor em noradrenalina endógena, não há diferença significativa entre o das preparações incubadas com adrenalina e o das que foram incubadas sem adrenalina (controlo). A comparação das fracções de libertação mostra que a diferença entre a da adrenalina e a da noradrenalina é significativa sendo maior a da amina incorporada do exterior do que a da amina endógena. Esta diferença da fracção de libertação (que é cerca de 3 vezes mais elevada para a amina exógena) é do mesmo grau da verificada para a estimulação transmural podendo depender, portanto, dos mesmos fenómenos.

Tabela 3. Preparação nervo hipogástrico-canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina e de adrenalina após incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Libertação por estimulação do nervo hipogástrico (25 Hz, 2 mseg, 5 ou 10 V, 5 seg/min durante 30 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$		Efluxo de aminas no líquido de perfusão			
			ng/30 min.		fracção de libertação (x 10 ⁻³)	
	A	B	A	B	A	B
Noradrelina	30,57 $\pm 3,96$	31,84 $\pm 1,94$	3,79 $\pm 1,29$	3,87 $\pm 1,66$	0,58 <i>a</i> $\pm 0,17$	0,75 $\pm 0,30$
Adrenalina	2,23 $\pm 0,51$		0,64 $\pm 0,18$		1,83 <i>b</i> $\pm 0,59$	

Resultados expressos em médias aritméticas \pm erro padrão ($n=4$). Em A apresentam-se os resultados referentes ao tecido incubado com adrenalina e em B, os respeitantes ao canal deferente contralateral incubado sem adrenalina (controlo). A diferença entre *a* e *b* é estatisticamente significativa.

Libertação de adrenalina pelo ião potássio

Outro dos agentes usados no nosso estudo para induzir a libertação de aminas a partir de terminais adrenérgicos foi o ião potássio. Segundo Thoa *et al.* (1975), o mecanismo pelo qual se faz a libertação provocada pelo potássio do canal deferente de Cobaia é muito semelhante ao que está na base da libertação induzida pela estimulação eléctrica. Neste conjunto de experiências procedeu-se, também, previamente à incorporação de adrenalina nos terminais mediante a incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min. No fim da incubação o teor em adrenalina e noradrenalina era respectivamente de 2,38 e 19,14 $\mu\text{g/g}$ (tabela 4). O teor de noradrenalina não foi significativamente diferente do do canal de controlo. Após a lavagem de 120 min que se seguiu à incubação, a adição de 50 mmol/l de KCl ao líquido de perfusão causou uma libertação de ambas as aminas. Mais uma vez, o teor em aminas do efluxo mostrou que a quantidade de adrenalina é proporcionalmente maior do que a de noradrenalina. Enquanto que no tecido o teor de noradrenalina é cerca de 8 vezes maior do que o de adrenalina, no efluxo a noradrenalina só aparece numa quantidade 2 a 4 vezes superior.

Tabela 4. Canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina e de adrenalina após a incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Sua libertação pelo potássio (50 mmol/l durante 10 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$		Efluxo de aminas no líquido de perfusão			
			ng/10 min		fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)	
	A	B	A	B	A	B
Noradrenalina	19,14 $\pm 1,50$	19,31 $\pm 1,71$	9,89 $\pm 1,62$	9,84 $\pm 0,60$	6,38 a $\pm 1,40$	7,28 $\pm 0,52$
Adrenalina	2,38 $\pm 0,90$		3,47 $\pm 0,82$		18,00 b $\pm 3,26$	

Resultados expressos em médias aritméticas \pm erro padrão ($n=5$). Em A apresentam-se os resultados referentes ao tecido incubado com adrenalina e em B, os respeitantes ao canal deferente contralateral incubado sem adrenalina (controlo). A diferença entre a e b é estatisticamente significativa.

Libertação de adrenalina pela tiramina

Apesar de se tratar de um estímulo que actua por um mecanismo diferente, também a adição de tiramina nas concentrações de 40 a 160 $\mu\text{mol/l}$ mostrou uma capacidade de induzir uma libertação com uma fracção de libertação que é superior no caso da adrenalina (tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina e de adrenalina após incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Liberação pela tiramina (40 $\mu\text{mol/l}$ durante 15 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$		Efluxo de aminas no líquido de perfusão			
			ng/15 min		fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)	
	A	B	A	B	A	B
Noradrenalina	16,99 $\pm 2,74$	16,31 $\pm 3,32$	30,82 $\pm 3,27$	18,70 $\pm 0,68$	35,11 <i>a</i> $\pm 1,71$	22,36 $\pm 0,91$
Adrenalina	2,14 $\pm 0,72$		10,04 $\pm 3,42$		89,88 <i>b</i> $\pm 5,71$	

Resultados expressos em médias aritméticas \pm erro padrão ($n=5$). Em A apresentam-se os resultados referentes ao tecido incubado com adrenalina e em B, os respeitantes ao canal deferente contralateral incubado sem adrenalina (controlo). A diferença entre *a* e *b* é estatisticamente significativa.

Tabela 6. Canal deferente: conteúdo tecidual de noradrenalina e de adrenalina após incubação com 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina durante 60 min seguida de 120 min de lavagem. Liberação pela tiramina (160 $\mu\text{mol/l}$ durante 15 min).

	Teor tecidual $\mu\text{g/g}$		Efluxo de aminas no líquido de perfusão			
			ng/15 min		fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)	
	A	B	A	B	A	B
Noradrenalina	19,14 $\pm 1,50$	19,31 $\pm 1,71$	9,89 $\pm 1,62$	9,84 $\pm 0,60$	6,38 <i>a</i> $\pm 1,40$	7,28 $\pm 0,52$
Adrenalina	2,38 $\pm 0,90$		3,47 $\pm 0,82$		18,00 <i>b</i> $\pm 3,26$	

Resultados expressos em médias aritméticas \pm erro padrão ($n=3$). Em A apresentam-se os resultados referentes ao tecido incubado com adrenalina e em B, os respeitantes ao canal deferente contralateral incubado sem adrenalina (controlo). A diferença entre *a* e *b* é estatisticamente significativa.

Influência da inibição dos receptores pré-sinápticos α_2 na libertação da noradrenalina endógena e tritiada do canal deferente por estimulação transmural.

Outra forma de comparar o comportamento do mediador fisiológico com o de aminas exógenas incorporadas do exterior nos terminais adrenérgicos é estudar a influência pré-sináptica exercida sobre a libertação de ambas. Como se vê na tabela 7, o bloqueio dos receptores pré-sinápticos pela fentolamina provoca um factor de aumento de cerca de 1,9 vezes quer para a noradrenalina endógena quer para a tritiada.

Tabela 7. Canal deferente: efeito da fentolamina ($3 \mu\text{mol/l}$) sobre o efluxo de noradrenalina endógena e tritiada induzido por estimulação transmural (1 Hz, 2 msec, 100 V durante 25 min). A preparação foi incubada com $2,3 \mu\text{mol/l}$ de ^3H -(-)-noradrenalina durante 60 min, lavada durante 120 min e submetida a estimulação 50 min (S1) e 140 min (S2) depois. A fentolamina foi introduzida entre S1 e S2.

	Fracção de libertação ($\times 10^{-3}$)		
	S1	S2	S2/S1
Endógena	4,63 (3,38 6,33) a	8,55 (5,92 12,35) c	1,85 e (1,42 2,40)
Tritiada	13,64 (9,71 19,16) b	25,93 (21,54 31,21) d	1,90 f (1,44 2,52)

Resultados expressos em médias geométricas e intervalos de 95% de confiança ($n=5$). As diferenças entre a e b e entre c e d são estatisticamente significativas. A diferença entre e e f não é significativa.

Auto-radiografias

A distribuição dos grãos de prata pelas diferentes camadas do canal deferente não foi quantificada através da determinação da sua densidade, mas a observação das lâminas ao microscópio mostrou um padrão constante com uma assimetria marcada. Os grãos de prata não têm uma distribuição uniforme mas, em corte transversal pode verificar-se que a sua concentração se faz de forma evidente nas camadas mais externas do tecido enquanto que as porções mais profundas do canal deferente apresentam uma marcação muito mais rarefeita.

As fotografias reproduzidas nas figuras 9 e 10 mostram diferentes aspectos desta concentração preferencial dos grãos de prata nas camadas mais externas da preparação.

Como acontece noutras preparações as artérias e veias de pequeno calibre existentes na espessura do parênquima apresentam-se intensamente marcadas (Fig. 11 e 12). As imagens lineares correspondem a trajectos nervosos.

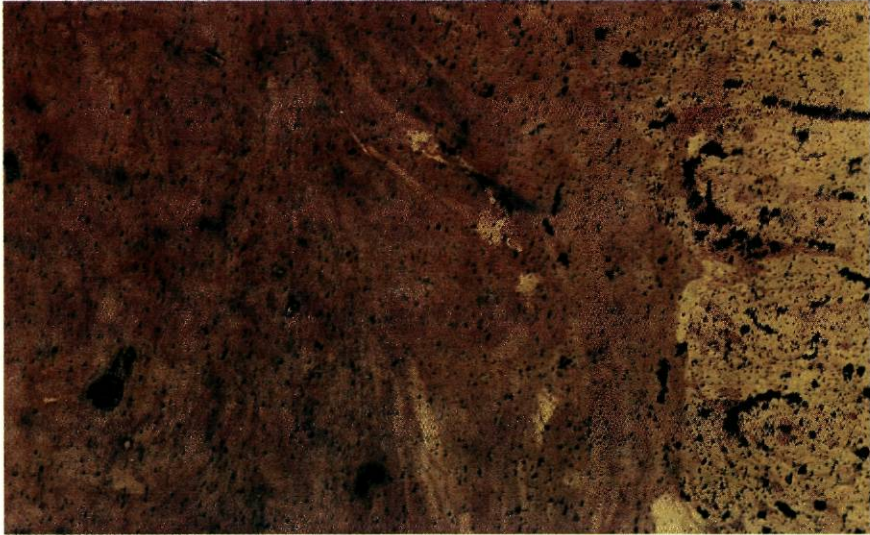


Fig. 9 e 10. Auto-radiografias de luz de cortes transversais de canal deferente de Cobaia incubado em Krebs-Henseleit contendo $2,3 \mu\text{mol/l}$ de ^3H -(-)-noradrenalina durante 60 min. O meio contém $41 \mu\text{mol/l}$ de hidrocortisona e a preparação foi previamente tratada com pargilina (1 mmol/l). Os grãos de prata acumulam-se preferencialmente nas camadas mais externas do canal deferente. Imagens obtidas com 30 dias de exposição. Zona mais periférica do órgão.

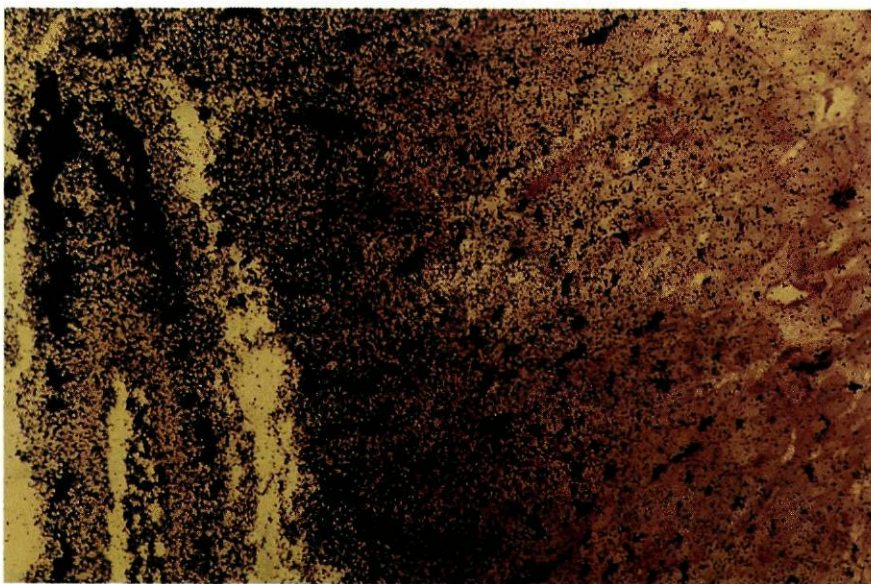
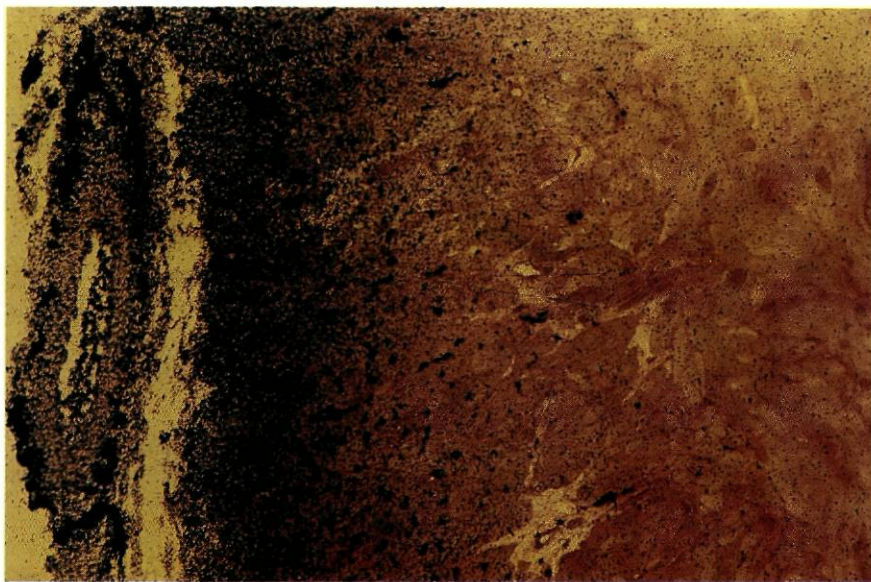


Fig. 11 e 12. Auto-radiografias de luz de cortes transversais de canal deferente de Cobaia incubado em Krebs-Henseleit contendo $2,3 \mu\text{mol/l}$ de ^3H -(-)-noradrenalina durante 60 min. O meio contém $41 \mu\text{mol/l}$ de hidrocortisona e a preparação foi exposta previamente a pargilina (1 mmol/l), durante 30 min. Observam-se trajectos lineares com o aspecto habitualmente produzido pela acumulação de aminas marcadas em nervos adrenérgicos. Na zona entre a camada média e a adventícia da parede de um vaso de pequeno calibre pode observar-se também uma deposição de grãos de prata muito típica das estruturas vasculares com uma inervação simpática de predomínio adventício-medial. Imagens obtidas com 30 dias de exposição.

Discussão

O objectivo directo das experiências realizadas foi quantificar, ao mesmo tempo, a libertação a partir de terminais neuroniais de noradrenalina endógena e de substâncias exógenas incorporadas do exterior nesses terminais neuroniais, com o fim de serem utilizadas como marcadores da libertação da noradrenalina endógena. A medição do efluxo provocado de noradrenalina endógena e dos marcadores (adrenalina ou ^3H -noradrenalina) por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica e por cintilometria líquida mostrou que, no canal deferente de *Cobaia* isolado ou na preparação de nervo hipogástrico-canal deferente da mesma espécie, as substâncias recentemente incorporadas são armazenadas, em percentagem maior do que a amina endógena, em depósitos mais facilmente mobilizáveis por diversos agentes indutores da libertação.

O “efeito isótopo”

O problema que foi abordado neste trabalho pode estar sujeito à discussão mais geral sobre o emprego de substâncias exógenas que, pela facilidade com que são detectadas e quantificadas, se introduzem experimentalmente em sistemas biológicos para identificar e medir os processos de transporte, de fixação ou de metabolização que ocorrem com substâncias difíceis de isolar ou dosear. Não é objectivo do trabalho discutir os critérios gerais de definição de um marcador e procurar em seguida aplicá-los, em particular, ao estudo da fisiologia do sistema adrenérgico. Importa, no entanto, que a interpretação dos resultados se inicie a partir dum princípio óbvio que por descuido de linguagem é demasiadas vezes esquecido: os compostos, radioactivos ou não, usados experimentalmente como “marcadores” (palavra aqui entendida no sentido restrito do termo “*tracers*” em expressão inglesa) **não marcam a presença** de nenhuma substância endógena com a qual possam ser mais ou menos parecidos; **detectam, sim, a presença de enzimas ou de transportadores** que provavelmente têm afinidade também para substâncias endógenas. Prolongando o risco de crítica por exercício inútil de linguagem — veja-se, a este propósito, o apelo feito por Trendelenburg (1983), para que se minimizem os efeitos laterais da linguagem imprecisa em Farmacologia — pode dar-se o exemplo de que o isótopo radioactivo da (–)-noradrenalina obtido por introdução de um átomo de trítio no carbono β não tem a propriedade de marcar os locais onde está presente a noradrenalina fisiológica. De maneira restrita, as experiências com noradrenalina tritiada permitem apenas concluir se há ou não sistemas de transporte ou metabolização saturáveis e selectivos para a noradrenalina tritiada e medir as constantes cinéticas (K_m e V_{max}) do transporte ou da biotransformação desse isótopo radioactivo. Do conhecimento geral que se tem do uso de isótopos radioactivos presume-se que esses enzimas ou esses transportadores têm igualmente afinidade para a molécula não radioactiva do transmissor endógeno. Conhecida a cinética da substância radioactiva “traça-se”, assim, o modelo da cinética da substância endógena.

Deve reconhecer-se que a situação extrema de falta de afinidade de um transportador ou de um enzima para a substância endógena quando se demonstra uma alta afinidade do sistema para um isótopo radioactivo dessa mesma substância é um fenómeno insólito. No entanto, não se podem transpôr os valores do Vmax ou do Km obtidos com o substrato radioactivo para o substrato biológico. O método radioquímico é excelente para indicar a presença de sistemas de transporte ou de biotransformação num determinado órgão mas não pode medir directamente as constantes cinéticas para outros compostos que não sejam o próprio isótopo usado.

O protocolo experimental seguido neste trabalho não permite a determinação de constantes cinéticas. No entanto, os valores da acumulação obtidos no presente trabalho são uma consequência directa das constantes de proporcionalidade (Km) e da capacidade (Vmax) da captação neuronal e da fixação intraneuronal (captação vesicular) a locais de armazenamento estável. Se existirem valores diferentes para essas características cinéticas entre a(-)- noradrenalina e a ^3H (-)-noradrenalina os resultados da acumulação poderão só por isso ser diferentes. Existem resultados publicados que mostram a validade deste argumento.

O "efeito isótopo" do deutério introduzido em aminas simpaticomiméticas ficou conhecido bastante cedo (Belleau *et al.* 1961) com a descrição de uma redução da desaminação da tiramina pela MAO quando se colocava um átomo de deutério em posição 8. O trítio é um substituto ainda mais "volumoso" do que o deutério e teria à partida uma maior possibilidade de interferir na afinidade da molécula para sistemas biológicos activos. No entanto o "efeito isótopo" do trítio na noradrenalina só foi estudado em 1983 (Trendelenburg *et al.*), motivado por dificuldades na interpretação de resultados experimentais obtidos com o uso de preparações comercialmente disponíveis de ^3H - noradrenalina (Starke *et al.* 1980). O estudo sistematizado (Trendelenburg *et al.* 1983; Grohmann *et al.* 1986; Henseling 1987) de diversos isótopos radioactivos contendo trítio em diferentes posições e em diferente número em cada molécula de catecolamina mostrou diferenças quantitativas que nalguns casos eram muito marcadas. Assim, a (-)-adrenalina de alta actividade específica marcada com trítio no anel catecólico tem uma constante de proporcionalidade inicial para a captação extraneuronal no coração de Rato que é 5,6 vezes menor do que a da (-)-adrenalina não radioactiva (Grohmann e Trendelenburg 1983).

É bem claro que nas condições experimentais do presente trabalho, não é possível definir e comparar constantes cinéticas para a noradrenalina endógena e para a ^3H - noradrenalina. Uma preparação não homogeneizada tem diferentes processos de transporte e metabolização a funcionar em simultâneo, por vezes mesmo em série e em vicariância. Por isso só se pode estudar a cinética de um sistema quando os restantes estão bloqueados. No protocolo experimental seguido (ver métodos) procurou-se apenas inibir a desaminação oxidativa (intra e extraneuronal) e a captação extraneuronal sensível aos corticosteróides. Ficam assim activas, pelo menos, a captação vesicular (sensível à reserpina), a captação neuronal (sensível à cocaína) e parte da O-metilação não dependente do transporte corticosteróide-sensível. No entanto, a análise dos valores das fracções de libertação mostrou diferenças de comportamento muito marcado entre a ^3H - noradrenalina e a noradrenalina endógena.

Os valores encontrados para a libertação por pulso estão de acordo com os descritos na literatura para o canal deferente de Cobaia e para características semelhantes do estímulo eléctrico (Stjärne 1973a; Belis *et al.* 1982).

Os resultados da fracção de libertação da noradrenalina endógena são mais dificilmente confrontados com os referidos por outros autores porque se referem a métodos de doseamento diferentes e em regra menos sensíveis e específicos, a outras estruturas ou a experiências em que se utilizaram tratamentos farmacológicos diferentes. No entanto, o fenómeno descrito neste trabalho de que a fracção de libertação da noradrenalina endógena é menor do que a do isótopo radioactivo, está de acordo com diferentes autores. Assim, Hughes (1973) foi capaz de evidenciar no canal deferente, através do doseamento da noradrenalina por aferição biológica segundo um método anteriormente desenvolvido por esse mesmo autor (Hughes 1972), uma maior fracção de libertação para a ^3H - noradrenalina quando empregava pequenas concentrações na incubação (10 ng/l). Usando uma técnica de HPLC semelhante à que foi empregue por nós, Kahan *et al.* (1984) descreveram uma fracção de libertação da noradrenalina tritiada dupla da da noradrenalina endógena na circulação do músculo *gracilis* de Cão. Note-se ainda que o primeiro trabalho em que se estudou por HPLC a libertação da noradrenalina expressa em fracção é o de Wakade e Wakade (1981) que registaram claramente (figura 3 desse trabalho) uma diferença de cerca de 7 vezes entre a libertação da noradrenalina tritiada e a da noradrenalina total (coração de Cobaia, estimulação transmural) embora não tenham feito qualquer comentário a esse resultado no texto do seu trabalho.

Pode concluir-se, em resumo, que a ^3H - noradrenalina tem uma libertação por estimulação transmural do canal deferente de Cobaia superior à da noradrenalina biogénica. Este fenómeno pode ser a consequência de um efeito isótopo do trítio mas pode também resultar apenas da via de incorporação da amina e ser por isso independente da natureza radioactiva ou não da molécula em causa. Os resultados da libertação da adrenalina não radioactiva incorporada nos terminais simpáticos em condições idênticas às utilizadas para a ^3H - noradrenalina permitem responder a esta questão.

Libertação de aminas exógenas diferentes utilizando o mesmo estímulo libertador

Para se verificar se a libertação preferencial da ^3H -(-)- noradrenalina induzida pela estimulação eléctrica transmural é um fenómeno próprio dessa substância incorporada foi necessário escolher um outro composto que fosse captado pela terminação simpática, fosse acumulado no seu interior e fosse mobilizado pela estimulação eléctrica. A adrenalina preenche todos estes requisitos e foi utilizada em experiências feitas nas mesmas condições em que decorreram as experiências com noradrenalina tritiada. Esta catecolamina oferecia ainda a vantagem adicional de ser facilmente distinguida da noradrenalina endógena por cromatografia

líquida de alta pressão, ficando assim dispensado o uso de uma molécula radioactiva para a qual se poderia sempre invocar um "efeito isótopo".

A acumulação de adrenalina exógena em órgãos com inervação simpática é um facto bem provado e que curiosamente começou a ser descoberto antes de idêntica descrição para a própria noradrenalina. No clássico trabalho de 1959, Axelrod *et al.* verificaram que a ^3H -adrenalina injectada por via endovenosa no Gato desaparece rapidamente do plasma, sobretudo por acção da COMT, mas uma grande parte permanece intacta durante algumas horas em vários tecidos, sobretudo nos que têm inervação adrenérgica rica. Sem terem ainda proposto explicitamente a acumulação neuronal simpática de adrenalina, os autores descreviam já que *"It is possible that the bound form of epinephrine represents a local store from which epinephrine can be released"*. Estes resultados só dois anos mais tarde foram reproduzidos com a injeccção endovenosa de noradrenalina tritiada (Whitby *et al.* 1961). A prova definitiva da incorporação das catecolaminas exógenas nos terminais adrenérgicos foi estabelecida de forma inequívoca pela ausência de marcação radioactiva após desnervação experimental dos tecidos (Hertting *et al.* 1961a), pela abolição da captação dos compostos radioactivos por inibição da captação neuronal conseguida através da cocaína (Hertting *et al.* 1961b) pela mobilização do marcador pelos mesmos estímulos que se sabe mobilizarem a noradrenalina dos terminais como o estímulo eléctrico (Hertting e Axelrod 1961) ou a exposição à tiramina (Burn e Burn 1961; Hertting *et al.* 1961b; Kopin e Gordon 1962) e pela depleção simultânea dos depósitos marcados e não marcados pelo trítio causada pelo tratamento dos animais com reserpina (Hertting *et al.* 1961b; Kopin e Gordon 1962). A comprovação directa de que a adrenalina seguia o mesmo percurso, isto é, acumulação intraneuronal simpática em depósitos mobilizadas pela estimulação nervosa foi obtida pouco tempo depois (Andén 1964; Rosell *et al.* 1964).

A comparação directa da acumulação e libertação da adrenalina com a da noradrenalina exógena utilizando a mesma estrutura e o mesmo estímulo libertador foi realizada na veia safena de Cão por Guimarães *et al.* (1978) e Brandão *et al.* (1980b). Apesar da existência de diferenças na libertação das duas aminas que podem ser atribuídas a diferentes afinidades para locais de perda (Guimarães e Pavia 1977; Paiva e Guimarães 1978) e para os receptores presentes nas biófases da junção neuroefectora simpática (Guimarães e Paiva 1981a, 1981b; Guimarães 1982; Guimarães *et al.* 1982) os resultados dos dois trabalhos atrás citados mostram uma grande similitude entre o processo de libertação neuronal de adrenalina e o que ocorre com a libertação de noradrenalina tritiada por estimulação nervosa (Brandão e Guimarães 1974; Brandão 1977).

Estes conhecimentos tornam possível comparar os resultados das experiências realizadas no presente trabalho com noradrenalina radioactiva e com adrenalina não marcada. O facto posto em evidência para a ^3H -(-)-noradrenalina de que a amina exógena tem uma fracção de libertação maior do que a noradrenalina endógena foi também reproduzido nas experiências em que se incorporou adrenalina na preparação. Assim, para a concentração de adrenalina no líquido de incubação de 2,3 mmol/l o teor tecidual de amina exógena e a sua libertação induzida

pela estimulação transmural são muito semelhantes aos observados com a noradrenalina radioactiva. Este dado é um argumento importante a favor duma interpretação que favorece mais a via de acesso do que a natureza da amina captada para o terminal simpático: as aminas recentemente incorporadas, independentemente da sua estrutura química, depositam-se em locais mais periféricos de cada terminal e que são mais acessíveis à acção libertadora do estímulo eléctrico. Esta conclusão está de acordo com a hipótese já proposta por Crout (1964) para explicar a curva de desaparecimento da noradrenalina tritiada do coração de cobaias previamente injectadas com a amina radioactiva: "*It is postulated that "firmly-bound" ³H-norepinephrine released as a transmitter is derived largely from granules lying near the axonal membrane.*"

Libertação da mesma amina exógena utilizando diferentes agentes libertadores

Um argumento importante para distinguir se a elevada fracção de libertação das aminas exógenas está dependente de um tipo particular de mecanismo ou se pelo contrário, resulta apenas de uma localização mais periférica no nervo de qualquer marcador que nele seja incorporado do exterior, obtem-se com a análise dos resultados em que se utilizou sempre a incorporação de uma mesma amina (adrenalina) e em que a preparação que a continha era submetida a estímulos de natureza diferente. Como a fracção de libertação da adrenalina se manteve sempre mais elevada do que a fracção de libertação da noradrenalina endógena, independentemente do estímulo (estimulação eléctrica transmural, estimulação eléctrica do nervo hipogástrico, exposição a concentrações elevadas de potássio ou exposição à tiramina), conclui-se que a causa principal da maior libertação da amina recentemente incorporada é a sua localização mais próxima dos locais de libertação.

A libertação induzida pela tiramina tem muitas características adequadas à sua utilização como utensílio experimental para demonstrar que a incorporação recente de uma amina exógena se faz para locais próximos da membrana e que são, por isso, mais acessíveis a qualquer forma de estímulo libertador: por um lado, é possível discriminar, através do seu uso, a existência de diferentes compartimentos intraneuronais quanto à facilidade com que participam no efluxo provocado; por outro lado, o seu mecanismo de acção é inteiramente diferente do da estimulação eléctrica, embora possa existir uma coincidência topográfica entre áreas influenciadas por essas duas formas de estímulos promotores da libertação do transmissor adrenérgico.

Foi através da utilização de tiramina que Trendelenburg (1961) propôs, no seu trabalho pioneiro, a existência de diferentes locais de armazenamento intraneuronal da noradrenalina com significado funcional diferente: um pequeno depósito cuja mobilização permitia a manutenção das respostas simpaticomiméticas à tiramina ("*available*") e um segundo compartimento fixo ("*bound*") depletável pela reserpina. Neste mesmo artigo se oferecia também a interpretação de que a nora

drenalina circulante podia ser captada para o pequeno compartimento sensível à acção da tiramina o que explicaria os resultados de Muscholl (1960) que restabeleceu o efeito hipertensor da tiramina em ratos reserpinizados através da injeccção de pequenas doses de noradrenalina que não refizeram os depósitos tecidulares esgotados pela reserpina. Basta repôr, por exemplo, 2% do teor tecidual de noradrenalina para restabelecer 70% da resposta da aurícula de Cobaia reserpinizada à tiramina (Crout *et al.* 1962).

A segunda razão importante da escolha da tiramina no presente trabalho foi a possibilidade de induzir libertação por um mecanismo diferente do da estimulação eléctrica. Desde que Burn e Rand (1958) provaram em animais reserpinizados que a tiramina exerce os seus efeitos através da promoção da libertação de noradrenalina o mecanismo de acção das aminas simpaticomiméticas foi intensamente investigado encontrando-se numerosas diferenças em relação ao estímulo nervoso: não é sensível à acção da tetrodotoxina (Bell 1968), não depende da presença extracelular do cálcio (Thoenen *et al.* 1969), não afecta a libertação de dopamina- β -hidroxilase (Chubb *et al.* 1972) não é exocitótico (Thoa *et al.* 1975) e não é modulado pela angiotensina (Starke 1971a), pela activação de receptores α pré-sinápticos (Starke e Montel 1973, 1974) ou pelo AMP cíclico intracelular (Göthert e Hentrich 1986).

O mecanismo da libertação induzida pela tiramina dos terminais adrenérgicos tem como fase final um efluxo da noradrelina mediado por transportadores selectivos da membrana neuronal que carregam a amina do axoplasma para o espaço extracelular. Este movimento postulado pela primeira vez por Paton (1973) e a que o autor chamou "*accelerative exchange diffusion process*" realiza-se quando uma amina é captada pelo sistema de transporte neuronal sensível à cocaína. É o mesmo transportador, trazido para a face interna da membrana celular durante a fase de captação da tiramina, que movimenta depois a noradrenalina recolhida do axoplasma em direcção contrária, sendo o movimento tanto mais rápido e intenso quanto maior for a concentração de tiramina oferecida (Bönisch e Rodrigues-Pereira 1983). Esta hipótese modificada para incluir um cotransporte de sódio (Sammet e Graefe 1979; Stute e Trendelenburg 1984) e de cloreto (Friedrich e Bönisch 1986) foi corroborada em experiências efectuadas com canais deferentes isolados submetidos ou não a tratamentos com reserpina e pargilina (Langeloh *et al.* 1987; Langeloh e Trendelenburg 1987).

No entanto este transporte de saída (afinal da mesma natureza, mas em sentido contrário ao da captação neuronal sensível à cocaína) é apenas a fase final do mecanismo libertador da tiramina porque, em preparações não reserpinizadas, como os canais deferentes que foram utilizados no trabalho presente, ocorre uma mobilização muito intensa da amina vesicular para o axoplasma (requisito essencial para os libertadores bons — "*good releasers*" — como a tiramina e que falta nos libertadores fracos — "*poor releasers*" — como a guanetidina: Langeloh e Trendelenburg 1987). Assim, qualquer que seja a acção da tiramina sobre as vesículas — elevação do pH intravesicular (Johnson *et al.* 1982; Philips 1982) ou inibição do transporte sensível à reserpina (Michalke *et al.* 1987) — os factos relevantes para interpretar os resultados de libertação de uma amina recentemente incorporada

pelo terminal são, por um lado, o de que a tiramina possui uma capacidade, seguramente grande, de mobilizar depósitos vesiculares e o de que as vesículas mais periféricas têm uma maior probabilidade de ser atingidas pela tiramina do que as vesículas mais profundas (Langeloh e Trendelenburg 1987).

A escolha da adrenalina como amina exógena a utilizar no presente trabalho justifica-se pela capacidade que a tiramina tem de libertar adrenalina incorporada do exterior de forma semelhante à que se passa com a noradrenalina radioactiva. Este conhecimento vem já das experiências de Burn (1932) que mostrou, na circulação da pata posterior de Cão, um aumento muito marcado do efeito hipertensor da tiramina e da efedrina pela adição prévia de adrenalina ao sangue do circuito de perfusão. Experiências mais recentes provaram de forma muito clara que a adrenalina incorporada *in vitro* em terminais simpáticos é libertada pela tiramina (Guimarães e Paiva 1981b).

O facto da libertação da adrenalina provocada pela tiramina expressa em fracção do seu teor tecidual ser superior à libertação da noradrenalina endógena expressa da mesma forma, corrobora a interpretação de que as aminas recentemente incorporadas no terminal simpático se armazenam em vesículas mais próximas da superfície celular, a partir das quais se dá, com mais facilidade, a saída para o espaço extracelular. Esta interpretação está de acordo com os resultados de experiências com incorporação de noradrenalina tritiada e exposição à tiramina (no coração isolado e perfundido do Rato: Potter *et al.* 1962; no miocárdio de Cão: Chidsey e Harrison 1963).

A comparação dos resultados obtidos com 40 e 160 $\mu\text{mol/l}$ de tiramina mostram que o seu efeito libertador da adrenalina recentemente incorporada é dependente da concentração. Não se observou, no entanto, uma diferença significativa entre a relação das fracções de libertação da adrenalina e da noradrenalina endógena obtida com a concentração mais baixa e a correspondente relação obtida com a concentração mais alta. Este resultado não está de acordo com as previsões da interpretação muito bem documentada pela série de trabalhos de Brandão e colaboradores (Brandão *et al.* 1978, 1980b, 1981, 1985) segundo a qual todos os depósitos da amina simpática participam no efluxo pela tiramina, ao contrário do que se passa com o estímulo eléctrico para o qual existe uma fracção de noradrenalina inacessível. As concentrações crescentes de tiramina atingem vesículas progressivamente mais profundas atingindo a sua totalidade se forem usadas concentrações muito elevadas durante longas exposições. Assim, previa-se que a fracção de libertação da noradrenalina endógena se aproximasse da da adrenalina com a utilização da concentração mais elevada. A ausência deste resultado pode, no entanto, dever-se ao pequeno tempo de actuação da tiramina (presente estudo: 15 min; Brandão *et al.* 1981: 100 min) e à pequena variação das concentrações usadas (presente estudo: 40 a 160 $\mu\text{mol/l}$; Brandão *et al.* 1981: 0,49 a 3240 $\mu\text{mol/l}$).

Existe uma diferença fundamental entre o mecanismo de libertação da tiramina, por um lado, e, pelo outro, da estimulação eléctrica transmural, da estimulação eléctrica do nervo ou da exposição ao potássio uma vez que para todo este último grupo de estímulos a libertação se faz por exocitose, é dependente do cálcio e é modulada por activação de adreno-receptores pré-sinápticos (para revisão ver Smith e Winkler 1972; Smith 1973; Starke 1977).

No entanto, apesar da natureza geral do processo libertador ser a mesma, existem diferenças importantes para que se não possam considerar as experiências da estimulação nervosa e da despolarização induzida pelo potássio como duplicações das experiências de estimulação eléctrica transmural.

Sabe-se que a presença de potássio no meio exterior em concentrações superiores a 20 mmol/l promove um aumento da permeabilidade da membrana dos nervos ao cálcio e conseqüente activação do processo de excitação. No entanto, ao contrário do que se passa com a estimulação eléctrica, o potencial de acção gerado pelo excesso de potássio é muito fugaz e a libertação de amina mantém-se mesmo depois de extinto esse potencial (Haeusler *et al.* 1968). Como argumentos adicionais de que o mecanismo íntimo da acção libertadora do potássio apresenta diferenças em relação ao da estimulação transmural apontam-se a possibilidade de uma mobilização parcialmente independente do cálcio (Wakade e Kirpekar 1974) e a ausência de activação da síntese de prostaglandinas com efeito pré-sináptico frenador (Stjärne 1973a).

Para além de ter um mecanismo de libertação algo diferente do da estimulação eléctrica, a despolarização pelo potássio é um processo de libertação que, tal como o que é posto em marcha pela tiramina, atinge, por difusão através da parede da preparação, terminações simpáticas profundas. Este facto tem importância porque alguns autores admitem que a estimulação eléctrica transmural pode não atingir todos os terminais se a resistência eléctrica à passagem do estímulo for muito mais elevada nos planos mais profundos do tecido do que na periferia que está em contacto com o líquido nutritivo (Brandão *et al.* 1978). Apesar destas diferenças entre a estimulação transmural e a despolarização induzida pelo potássio, a fracção de libertação de adrenalina recentemente incorporada é superior à da noradrenalina endógena em qualquer dos casos.

Apesar destas diferenças entre a estimulação transmural e a despolarização induzida pelo potássio, a fracção de libertação da adrenalina recentemente incorporada é superior à da noradrenalina endógena em qualquer dos casos.

A estimulação do nervo hipogástrico produz também uma libertação por mecanismo diferente do da estimulação directa do canal deferente porque ao nível a que foi colocado o eléctrodo as fibras nervosas são pré-sinápticas (Weiner e Rabadjija 1968; Wakade e Kirpekar 1971). Para este tipo de estímulo está hoje provado por registos electrofisiológicos feitos através de uma técnica recentemente descrita (Brock e Cunnane 1987) que os potenciais de acção atingem todas as varicosidades, embora a libertação em cada uma delas seja intermitente (para revisão ver Cunnane e Stjärne 1982, 1984a, b). Não existe por isso a limitação atrás apontada para a propagação do estímulo eléctrico aplicado transmuralmente. Nestas condições continua a obter-se uma libertação preferencial da adrenalina quando comparada com a noradrenalina endógena.

Relação entre a acumulação tecidual de uma amina exógena e a sua libertação

Se as aminas incorporadas do exterior são libertadas em maior proporção relativa ao teor tecidual do que a noradrenalina endógena porque a via de acumulação favorece o armazenamento em locais mais acessíveis aos estímulos induzidos

res de libertação, pode-se aceitar, como hipótese, que é possível atenuar aquela diferença mudando algumas das condições experimentais em que se faz a acumulação ou a libertação. Assim, é aceitável conjecturar que os seguintes factores experimentais favorecem a aproximação do comportamento da noradrenalina endógena e da amina exógena: o aumento do tempo de contacto da preparação com a substância exógena; o aumento da intensidade do estímulo; finalmente, o aumento da quantidade da amina que é incorporada no terminal.

Esta última possibilidade foi posta à prova no presente trabalho através das experiências em que se determinaram as fracções de libertação de adrenalina incorporada no canal deferente em presença de concentrações crescentes dessa amina no líquido de incubação. Estes resultados serão aqui discutidos. No fim desta secção faz-se referência aos resultados obtidos por outros autores que estudaram a influência das outras duas variáveis acima indicadas (tempo de contacto e aumento da intensidade do estímulo) na aproximação dos valores de acumulação e libertação das aminas exógena e endógena.

Nas nossas experiências empregaram-se concentrações de adrenalina no líquido de incubação que variaram mais de 200 vezes (entre 0,6 mmol/l e 160 mmol/l). Os resultados da acumulação tecidual de adrenalina foram dependentes da concentração utilizada, sem modificação marcada do teor tecidual da noradrenalina endógena. Também se não observaram mudanças na fracção de libertação dessa noradrenalina endógena. Assim, a interpretação dos resultados da libertação da adrenalina em preparações incubadas na presença de diferentes concentrações de adrenalina é simples: a fracção de libertação da adrenalina vai-se tornando cada vez mais baixa, e, por isso, cada vez mais próxima da da noradrenalina endógena, à medida que a acumulação tecidual dessa adrenalina aumenta porque a incorporação neuronal crescente de adrenalina vai envolvendo depósitos sucessivamente mais profundos e menos acessíveis à estimulação eléctrica.

Hughes (1973a) chegou à mesma conclusão tendo como ponto de partida experiências de libertação de noradrenalina tritiada provocada por estimulação transmural do canal deferente de Coelho incubado na presença de duas concentrações diferentes de $^3\text{H}(-)$ -noradrenalina (10 ou 100 ng/ml). Os resultados daquele autor mostraram que para a concentração de 10 ng/ml, a fracção de libertação do isótopo radioactivo era maior do que a fracção de libertação da noradrenalina endógena (determinada por fluorimetria) enquanto que para a concentração de 100 ng/ml já se não detectavam diferenças.

Embora haja acordo entre a conclusão final de Hughes e a do presente trabalho, existe uma discrepância que é necessário analisar. Assim, a concentração para a qual já se não detectavam diferenças no comportamento das duas aminas é muito pequena quando comparada com as concentrações mais elevadas usadas neste trabalho e para as quais ainda se não atinge uma libertação sobreponível do marcador e do mediador (100ng/ml de noradrenalina correspondem a 592 nmol/l enquanto que nas experiências deste trabalho se atingiram 160 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina). Duas diferenças nas condições experimentais podem contribuir para esta discrepância: por um lado a diferença da frequência de estimulação e, por outro, a existência de valores do teor tecidual de noradrenalina mais baixos.

Sabe-se, em relação com o primeiro ponto, que a fracção de libertação de noradrenalina por pulso está na estreita dependência da frequência dos estímulos e cresce linearmente com a progressão logarítmica dessa frequência (canal defe

rente de Coelho: Hughes 1972; canal deferente de Cobaia: Stjärne 1973a). Por isso pode aceitar-se que a frequência utilizada nestas experiências (1Hz) mobilize menos noradrenalina endógena do que a empregue por Hughes (2 a 16 Hz).

Em relação ao segundo ponto, verifica-se uma diferença nítida nas concentrações teciduais de noradrenalina não radioactiva no canal deferente de Coelho determinadas por fluorimetria e no canal deferente de Cobaia determinadas por cromatografia líquida de alta pressão e detecção electroquímica: 8,5-10 µg/g (Hughes 1972) *versus* 15-20 µg/g no estudo presente. Quer resulte de uma diferença de técnica ou de espécie animal, a influência deste valor, que constitui o denominador da fracção de libertação, parece clara.

Nas nossas experiências o tempo de contacto da preparação com as aminas exógenas foi fixo. No entanto, resultados descritos por outros autores apoiam a interpretação segundo a qual quanto mais tempo decorrer entre a exposição dos tecidos aos compostos exógenos e a estimulação dos terminais, mais semelhante se tornam os comportamentos das aminas endógena e exógena. Em experiências de estimulação *in vivo* do nervo cardioacelerador de Cão após a administração endovenosa de noradrenalina tritiada, a relação entre noradrenalina radioactiva e noradrenalina total é maior no sangue do seio coronário do que no tecido cardíaco quando se faz a injeção da substância radioactiva 60 min antes da estimulação. No entanto, se a administração do isótopo tritiado ocorre 24 ou 48 h antes da estimulação do nervo cardioacelerador já se não detectam diferenças nas proporções noradrenalina radioactiva/noradrenalina total medidas no sangue e no coração (Chidsey e Harrison 1963). Também a libertação provocada pela tiramina no coração de Rato isolado e perfundido obtido a partir de animais a quem foi injectada noradrenalina tritiada com uma antecedência de 30 min a 48 h mostra a influência do tempo de incorporação da amina exógena na formação de misturas cada vez menos heterogéneas com a noradrenalina endógena (Potter *et al.* 1962). Os resultados destes autores mostram que a percentagem de isótopo radioactivo que é mobilizado pela tiramina é tanto menor quanto maior foi a antecedência com que se fez a administração do isótopo radioactivo.

Um terceiro resultado que confirma este fenómeno foi descrito para a estimulação transmural do canal deferente de Coelho incubado com ³H-noradrenalina 3 ou 8 h antes. Com o decorrer do tempo a percentagem de noradrenalina libertada que é radioactiva vai sendo menor e torna-se igual à percentagem de marcação radioactiva da noradrenalina tecidual (Hughes 1973a).

Também não podemos retirar conclusões sobre a influência da intensidade do estímulo nas diferenças entre a libertação da amina endógena e a recentemente incorporada, uma vez que a variação deste factor foi pequena nas nossas condições experimentais. Só nas experiências com tiramina se utilizaram estímulos de eficácia diferente e, mesmo neste caso, a diferença entre os valores extremos das concentrações empregues foi pequena (40 e 160 µmol/l). As diferenças entre as fracções de libertação da noradrenalina e da adrenalina recentemente incorporada mantêm-se com o emprego da concentração maior de tiramina. No entanto, a tiramina administrada *in vivo* em doses de 40 a 1000 µg/kg, no Cão previamente injectado com ³H-noradrenalina mobiliza para o seio coronário uma

quantidade total de noradrenalina crescente. Simultaneamente, a percentagem de radioactividade na amina libertada vai sendo menor e aproxima-se da observada no miocárdio (Chidsey e Harrison 1963).

Hughes (1973a) refere também que no canal deferente de Coelho incubado com ^3H - noradrenalina a percentagem da amina libertada que é radioactiva é maior nas experiências conduzidas com 2 Hz do que com 16 Hz.

Pode em resumo concluir-se que a libertação preferencial da amina recentemente incorporada é tanto mais marcada quanto menor for a quantidade incorporada, quanto mais recente for a incorporação e quanto menor for a intensidade do estímulo. Este conjunto de resultados são um forte argumento a favor da topografia diferente dos locais de acumulação das aminas incorporadas a partir do espaço extracelular e da noradrenalina pré-existente no terminal simpático.

Relação entre a acumulação tecidual de uma amina exógena e o teor em noradrenalina endógena

Dos resultados da acumulação de adrenalina obtidos com diferentes concentrações da amina no líquido de incubação pode retirar-se um outro argumento a favor da heterogeneidade da mistura entre a noradrenalina endógena e as aminas incorporadas do exterior.

A capacidade de acumulação de catecolaminas pelos terminais simpáticos da veia safena e do canal deferente é claramente superior aos depósitos habituais de noradrenalina endógena porque o teor total de amina após incorporação de adrenalina é maior do que o teor em catecolaminas (noradrenalina endógena) na situação de controlo. Este fenómeno evidencia-se na veia safena sobretudo nas experiências com a concentração de adrenalina mais elevada, nas quais é também mais notória a ausência de uma redução equivalente no teor da amina endógena.

Nas experiências com o canal deferente a variação das concentrações de carga foi maior e verifica-se de forma nítida uma acumulação de teores teciduais de adrenalina crescentes sem redução paralela dos níveis endógenos de noradrenalina (Fig. 4). O valor mais alto atingido pelas concentrações de adrenalina no líquido de incubação foi de $160 \mu\text{mol/l}$ e a ele corresponde uma acumulação de adrenalina no canal deferente que representa cerca de 50% do teor total de aminas. Até à concentração utilizada não se observou saturação do processo de acumulação tecidual. Esta adrenalina acumulada na preparação encontra-se provavelmente em depósitos neuroniais e não em compartimentos extraneurais, porque é resistente à lavagem do espaço intercelular e dos compartimentos extraneuronais (a partir do $100.^{\circ}$ min de perfusão, o efluxo de noradrenalina no canal deferente é de origem neuronal: Graefe *et al.* 1977) e porque quanto mais adrenalina tem o tecido maior é a quantidade libertada por estímulos que caracteristicamente mobilizam depósitos neuroniais.

A principal conclusão a tirar destes resultados é a de que a acumulação de adrenalina se faz principalmente por adição e não por substituição, isto é, não há

trocas estequiométricas entre a adrenalina incorporada do exterior e a noradrenalina endógena.

Apesar de ser frequentemente referenciada na literatura a possibilidade da acumulação com troca estequiométrica entre o composto vindo do exterior e a noradrenalina endógena (ver Euler 1972) não há evidência experimental directa de que este fenómeno ocorra de forma regular. Pelo contrário, a possibilidade de captação pelos terminais simpáticos de aminas exógenas com aumento do teor total em amina tem sido comprovado em estruturas diferentes. Muscholl (1960) mostrou que a aurícula de Cobaia capta noradrenalina exógena de forma a que o conteúdo tecidual duplica. Garrett e Branco (1977) demonstraram que a capacidade das artérias mesentéricas acumularem noradrenalina exógena é muito elevada e que apesar de terem um conteúdo elevado de noradrenalina endógena são capazes de reter aproximadamente outro tanto.

Localização da noradrenalina tritiada por auto-radiografia

Algumas reservas ao emprego de métodos auto-radiográficos têm como fundamento a hipótese de que nos tecidos sujeitos a fixação em meios líquidos, a desidratação em solventes orgânicos ou a inclusão em materiais como a parafina ou as epoxi-resinas, o material radioactivo possa sofrer arrastamento dos locais onde estava originariamente localizado para zonas artificialmente favorecidas por artefacto da técnica empregue (ver VanOrden 1976). Existe, pelo contrário, o argumento favorável segundo o qual estes processos de fixação, desidratação e inclusão removem a substância livre ou fixada por ligações pouco estáveis e que por isso tem maior probabilidade de corresponder a locais de acumulação biologicamente pouco significativos.

Existe um importante número de trabalhos em que se empregaram simultaneamente métodos de auto-radiografia e métodos de doseamento radioquímico. A correlação entre os resultados obtidos por uma e outra via mostram a validade dos estudos morfológicos (Azevedo 1982; Azevedo *et al.* 1983).

O canal deferente de Cobaia é uma estrutura muito rica em nervos com muitas varicosidades ao longo do seu trajecto ("*boutons-en-passant*") e que nas preparações de histofluorescência feitas pelo método de Falck e Hillarp formam um plexo muito denso e **uniformemente distribuído** por todas as camadas musculares lisas (ver Burnstock e Costa 1975) e ao longo de todo o seu comprimento (Wakade e Kirpekar 1971). Há autores que descrevem, no canal deferente de Rato, uma pequena assimetria na densidade dos nervos tornados fluorescentes pelo aldeído fórmico (Anton *et al.* 1977). Essa assimetria ocorre apenas no topo epididimário e o seu padrão é oposto ao que observámos nas preparações de auto-radiografia obtidas com a noradrenalina tritiada: enquanto que as auto-radiografias mostram uma acumulação preferencial de grãos de prata nas camadas mais exteriores do órgão, a histofluorescência da porção epididimária do canal deferente de Rato revela que a camada circular interna é mais densamente inervada do que a camada longitudinal externa (Anton *et al.* 1977).

trocas estoiquiométricas entre a adrenalina incorporada do exterior e a noradrenalina endógena.

Apesar de ser frequentemente referenciada na literatura a possibilidade da acumulação com troca estoiquiométrica entre o composto vindo do exterior e a noradrenalina endógena (ver Euler 1972) não há evidência experimental directa de que este fenómeno ocorra de forma regular. Pelo contrário, a possibilidade de captação pelos terminais simpáticos de amins exógenas com aumento do teor total em amina tem sido comprovado em estruturas diferentes. Muscholl (1960) mostrou que a aurícula de Cobaia capta noradrenalina exógena de forma a que o conteúdo tecidual duplica. Garrett e Branco (1977) demonstraram que a capacidade das artérias mesentéricas acumularem noradrenalina exógena é muito elevada e que apesar de terem um conteúdo elevado de noradrenalina endógena são capazes de reter aproximadamente outro tanto.

Duas explicações se podem invocar para interpretar este resultado da marcação auto-radiográfica predominante nas camadas exteriores do canal deferente: a presença nas camadas mais profundas do órgão de fibras nervosas não adrenérgicas incapazes de captar noradrenalina ou a dificuldade da noradrenalina exógena atingir, durante a incubação, nervos profundos capazes de a captar.

A observação do canal deferente de Cobaia pelo método de histofluorescência de Falck e Hillarp, característico das catecolaminas, mostra abundantes trajectos fluorescentes correspondentes a nervos nas camadas que nas nossas preparações não são marcadas pelos grãos de prata correspondentes à noradrenalina.

Para além disso, põe-se actualmente em dúvida que exista na parede do canal deferente um contingente importante de nervos vegetativos desprovidos de mecanismos de síntese, captação, armazenamento e libertação de noradrenalina. É certo que a existência de uma neurotransmissão não adrenérgica e não colinérgica proposta de uma forma explícita por Burnstock *et al.* (1963) está hoje bem estabelecida em numerosos tecidos, incluindo o canal deferente de Cobaia (Ambache e Zar 1971). No entanto, o conceito de um terceiro sistema nervoso vegetativo formado por um contingente distinto de nervos não adrenérgicos e não colinérgicos não se revelou satisfatório e foi substituído pela hipótese diferente de que as duas divisões clássicas do sistema nervoso vegetativo podem conter, para além da noradrenalina ou da acetilcolina, outros neurotransmissores em diferentes proporções (para revisão ver Burnstock 1986). O canal deferente é um dos órgãos em que se tem encontrado um número maior de efeitos resultantes da actividade nervosa que não são mediados pela noradrenalina. Sabe-se que a fase inicial rápida da contracção muscular é provocada pelo ATP (Fedan *et al.* 1981; Meldrum e Burnstock 1983; Sneddon e Westfall 1984) e que a inibição pré-sináptica depende em parte da adenosina (Hedqvist e Fredholm 1976) e do neuropeptídeo Y (Lundberg *et al.* 1982). É também possível que as consequências morfológicas da desnervação (aumento do número de nexos entre as células musculares lisas: Westfall *et al.* 1977) sejam independentes da falta de noradrenalina, à semelhança do que está descrito para outras estruturas sujeitas à privação experimental da sua inervação simpática (Branco *et al.* 1984; Azevedo e Osswald 1986; Albino-Teixeira *et al.* 1987; Sarmiento *et al.* 1987).

Apesar desta variedade de substâncias libertadas pelos nervos do canal deferente, tem sido possível mostrar que a noradrenalina e esses compostos são cotransmissores de proveniência neuronal comum (Westfall *et al.* 1977; Fedan *et al.* 1981; Lundberg *et al.* 1982; Meldrum e Burnstock 1983; Sneddon e Westfall 1984). A conclusão análoga chegou também Soares-da-Silva (1987a,b) na sua tentativa de localização do "pool" independente de dopamina nos ramos da artéria mesentérica (Soares-da-Silva e Davidson 1985; Soares-da-Silva 1986).

Parece assim necessário adoptar a explicação de que a ausência de marcação auto-radiográfica da porção profunda da parede do canal deferente resulta da dificuldade da noradrenalina exógena atingir, durante o processo de incubação os nervos de profundidade. Há duas possibilidades para que tal aconteça: ou se trata de uma simples dificuldade de difusão ou se trata de uma captação maciça pela rede nervosa periférica que sequestra a totalidade de amina que a atinge.

Dois factores dificultam a difusão de substâncias da superfície para a profundidade do canal deferente: a espessura da sua parede e a contracção intensa que se observa durante todo o período de incubação e que é provocada pelas elevadas concentrações de adrenalina ou de noradrenalina presentes no líquido de incubação.

Mais do que decidir se a espessura da parede de um órgão influencia de forma clara a difusão de noradrenalina exógena através dessa parede, a questão importante para a interpretação dos resultados auto-radiográficos deste estudo está em saber se 1 h de incubação é suficiente para assegurar a difusão completa da amina. A literatura é omissa quanto a estudos de incorporação seriada de catecolaminas exógenas no canal deferente.

Existem estudos auto-radiográficos pormenorizados feitos em condições experimentais muito semelhantes às deste trabalho que respondem a uma questão semelhante posta para uma outra estrutura. Na veia safena de Cão existe apenas uma assimetria na acumulação de isoprenalina aos 2 min de incubação e 8 min bastam para que não haja diferenças na densidade de marcação entre as camadas justa-intima e justa-adventicial (Azevedo e Osswald 1976). A marcação inicial mais intensa do lado da íntima é possivelmente devida a um sistema de captação e transporte activo através do endotélio e não parece existir uma dificuldade importante de difusão.

A penetração da noradrenalina na parede da veia safena de Cão em ambas as direcções é também muito rápida. A auto-radiografia executada a tempos diferentes após oferta via intraluminal de ^3H -noradrenalina mostra uma clara progressão dos grãos de prata no sentido da íntima para a camada média mas este fenómeno só é detectado durante um período de tempo muito curto (30 seg-2 min) (Osswald *et al.* 1971). Fenómeno idêntico em sentido inverso se obteve quando a oferta de noradrenalina radioactiva é feita pelo lado da adventícia (Osswald *et al.* 1971). O estudo da veia safena de Cão por histofluorescência segundo a técnica de Falck e Hillarp e por auto-radiografia permite concluir que a marcação das diferentes camadas pelos grãos de prata é sobreponível à topografia dos trajectos nervosos fluorescentes, bastando para tal 1 ou 2 min de incubação com ^3H -noradrenalina (Coimbra *et al.* 1974).

É claro que o canal deferente de Cobaia possui uma camada muscular longitudinal externa que não existe nas veias e uma camada circular muito densamente povoada por fibras musculares lisas, o que no seu conjunto dá a esta estrutura uma espessura de parede maior do que aquela que é conferida à veia safena de Cão por 8 a 12 camadas de fibras musculares lisas circulares. Não é, por isso, legítimo extrapolar para o canal deferente os resultados deste estudo pormenorizado feito com uma veia de calibre médio mas parece pouco provável que 1 h de incubação não permita completar uma difusão que na veia safena se conclui entre 1 a 8 min.

A difusão pode ainda estar dificultada pelo estado de contracção da parede da estrutura, como foi demonstrado por Paiva e Guimarães (1984) para a veia safena. A sua importância para os nossos resultados só poderá ser avaliada através de experiências em que se mantenha o canal deferente relaxado durante o período de incubação mediante adição de bloqueadores α .

A densa inervação concêntrica do canal deferente pode constituir uma barreira de acesso, independente da maior ou menor dificuldade de difusão da noradrenalina. Este tipo de barreira constituído por um círculo mais externo de terminais simpáticos está muito bem caracterizado na artéria central da orelha de Coelho. Nesta estrutura a distribuição dos nervos adrenérgicos faz-se apenas à adventícia. Não há grandes barreiras de difusão mas a noradrenalina aplicada pelo lado da adventícia é avidamente captada pelos neurónios que envolvem a artéria e chega em menor quantidade às fibras musculares situadas na profundidade. A preparação é muito mais sensível à acção constritora da noradrenalina aplicada pelo lado da íntima. O bloqueio de captação neuronal pela cocaína e a desnervação fazem desaparecer estas diferenças de sensibilidade porque abolem esse sistema que não deixa penetrar a noradrenalina (De la Lande *et al.* 1967).

Um modelo experimental semelhante ao utilizado por aqueles autores em que o canal deferente fosse ora perfundido ora perfundido por um líquido nutritivo contendo noradrenalina radioactiva ou adrenalina permitiria resolver o problema que nas nossas experiências não tem resposta.

As nossas observações auto-radiográficas de luz confirmam a possibilidade de uma marcação heterogénea das varicosidades. Existe ainda a possibilidade de uma marcação heterogénea dentro de cada varicosidade como está descrito por autores que utilizaram a auto-radiografia ultraestrutural. Budd e Salpeter (1969) referem uma marcação mais periférica nos terminais simpáticos em preparações de auto-radiografia observadas ao microscópio electrónico após exposição à noradrenalina radioactiva.

Efeito do bloqueio α sobre a libertação da noradrenalina exógena e da noradrenalina endógena

A discussão dos mecanismos reguladores da neuro-secreção de noradrenalina por auto-receptores pré-sinápticos frenadores não faz parte da índole do trabalho presente. Apontam-se apenas as referências cruciais do seu desenvolvi-

mento, mais a título de tributo e para prazer intelectual do autor, e indicam-se depois os trabalhos de revisão mais consagrados e recentes. A observação original de Brown e Gillespie (1957) de que a fenoxibenzamina produz um aumento muito marcado do efluxo do transmissor simpático durante a estimulação eléctrica dos nervos esplênicos de Gato só encontrou uma explicação adequada com a descoberta da inibição da libertação de noradrenalina via receptores α existentes nos terminais adrenérgicos (Farnebo e Hamberger 1971; Kirpekar e Puig 1971; Langer *et al.* 1971; Starke 1971b). Pouco depois reconheceu-se que existiam diferenças farmacológicas entre os receptores α predominantes nos terminais nervosos e os receptores α predominantes no órgão efector através da descoberta de agonistas selectivos (Starke 1972) e de antagonistas selectivos (Cubeddu *et al.* 1974; Dubocovich e Langer 1974). Enero e Langer (1973) mostraram, de forma directa a existência de uma relação inversa entre a quantidade de noradrenalina presente na biófase e a que é libertada pelo nervo e Langer (1974) propôs a classificação das subpopulações de receptores α em α_1 e α_2 (com predomínio pós e pré-sináptico, respectivamente). Para revisão, vejam-se os trabalhos de Starke e Langer que se encontram entre as referências mais vezes citadas nas publicações referentes a trabalhos no domínio da Biologia (Langer 1974, 1977, 1980; Starke 1977, 1981a, 1987).

Apesar da génese desta sequência de trabalhos ter sido marcada por experiências de doseamento de noradrenalina endógena (aferição biológica através da resposta hipertensora à injeção das amostras: Brown e Gillespie 1957) quase todos os resultados obtidos posteriormente provieram do recurso à incorporação de marcadores exógenos e há, ainda, falta de observações comparativas da influência da regulação pré-sináptica sobre esses marcadores e a noradrenalina endógena.

A frequência de estimulação foi escolhida a partir do conhecimento de que a libertação de noradrenalina a partir do canal deferente de Cobaia varia inversamente com o aumento dessa frequência de estimulação e é para os valores de libertação mais baixos que se podem evidenciar de forma mais marcada os efeitos facilitatórios dos fármacos que actuam sobre adreno-receptores pré-sinápticos (Stjärne 1973a, b). Os resultados obtidos com o bloqueio da regulação inibitória pré-sináptica mostram que a libertação de amina exógena é sensível ao antagonismo dos receptores α_2 . A fentolamina foi utilizada na concentração de 3 $\mu\text{mol/l}$ que não inibe a captação neuronal (Adler-Graschinsky e Langer 1975) e aumentou a libertação de noradrenalina para valores cerca de 2 vezes superior, o que está de acordo com resultados anteriormente obtidos (Guimarães *et al.* 1986) e com as descrições publicadas por outros autores que utilizaram a mesma preparação (Hughes 1973b; Stjärne 1973a; Belis *et al.* 1982). Os resultados parecem demonstrar que as vesículas ou varicosidades mobilizáveis pela estimulação eléctrica na ausência e na presença de bloqueio pré-sináptico estão na mesma área geográfica. Com o estímulo eléctrico normal não são mobilizadas todas as vesículas ou varicosidades dessa área. O bloqueio pré-sináptico fará mobilizar maior número de vesículas ou de varicosidades, mas da mesma área, isto é, com o mesmo tipo de carregamento. Se as vesículas ou as varicosidades adicionalmente mobiliza-

das após bloqueio dos receptores pré-sinápticos α tivessem uma carga diferente de amina exógena, a fracção de libertação da endógena aumentaria mais. O bloqueio do "feed-back" não faz com que vesículas ou varicosidades mais profundas sejam libertadas mas sim que se liberte maior número das superficiais (Fig. 13).

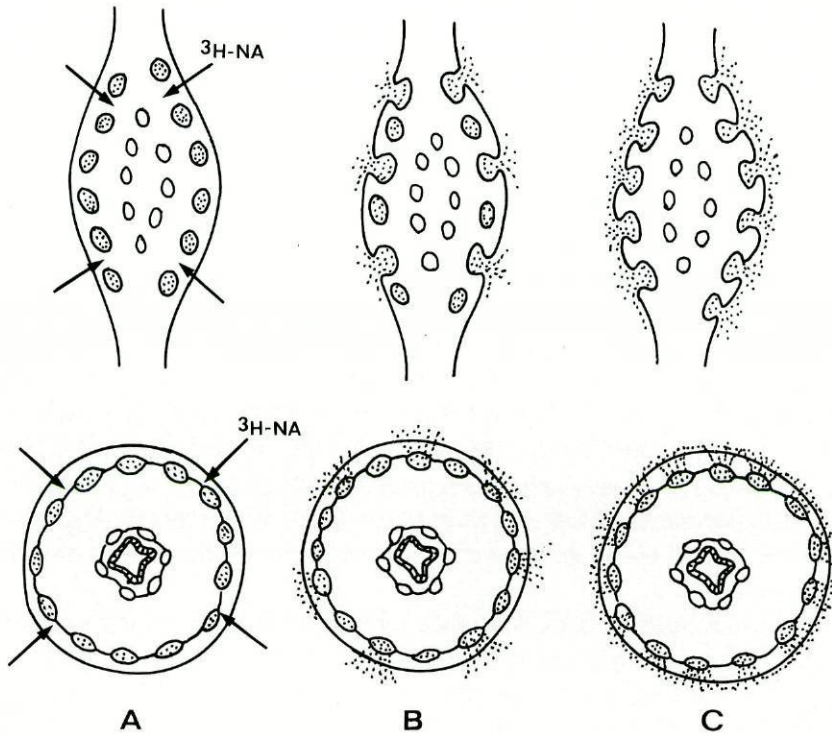


Fig. 13. Esquema de duas possibilidades diferentes de marcação heterogénea pela noradrenalina radioactiva (^3H -NA) da inervação simpática do canal deferente. Os três desenhos da metade superior da figura representam varicosidades isoladas. Os três desenhos da metade inferior representam cortes transversais de canal deferente com uma série de varicosidades mais externa e outra série mais profunda. Em A representa-se a fase de incubação com a acumulação preferencial da amina exógena em vesículas ou varicosidades mais periféricas, em B a libertação por estimulação eléctrica com mobilização preferencial das estruturas marcadas e em C o aumento de libertação induzido pelo bloqueio α com recrutamento de um maior número de estruturas do mesmo tipo.

Efeito da libertação da adrenalina recentemente incorporada sobre a libertação de noradrenalina endógena

Depois de ter sido proposta a existência de um mecanismo facilitatório da libertação simpática dependente da activação de adreno-receptores β (Adler-Graschinsky e Langer 1975; Stjärne e Brundin 1975), e sendo conhecida a baixa afinidade da noradrenalina para algumas subpopulações deste tipo de receptor, cedo se postulou que a adrenalina poderia ser a substância que em condições fisiológicas activasse, de forma importante esse mecanismo. Stjärne e Brundin (1975) admitiram que a adrenalina circulante pudesse desempenhar esse papel e Guimarães *et al.* (1978) provaram que a adrenalina captada para os terminais simpáticos da veia safena de Cão se comporta como um falso transmissor ao ser libertada em simultâneo com a noradrenalina e que aumenta a libertação dos nervos adrenérgicos por um mecanismo sensível ao bloqueio pelo propranolol. Rand e colaboradores decreveram também a existência deste mecanismo (Rand *et al.* 1979) e com base nele propuseram a sua bem conhecida hipótese da intervenção fisiopatológica da adrenalina na hipertensão essencial segundo a qual, a adrenalina circulante, segregada pela medula supra-renal, se pode acumular nas terminações simpáticas, libertar-se como se fosse um cotransmissor da noradrenalina e aumentar a libertação da noradrenalina por estimulação de receptores β pré-sinápticos facilitatórios (Majewski e Rand 1981, 1984). Esta hipótese tem recebido extenso apoio de resultados obtidos *in vivo* em diferentes espécies animais de laboratório (Coelho anestesiado: Majewsky *et al.* 1982; Cão anestesiado: Yamaguchi *et al.* 1977, Branco e Garrett 1985; pata posterior perfundida de Gato: Dalhög 1981; pata perfundida de Cão: Kahan *et al.* 1984), no Homem (Brown e Macquin 1981) e em muitas preparações *in vitro* (para revisões ver: Dalhög 1981; Majewski 1983; Kahan 1987).

Nas experiências do corrente trabalho realizadas no canal deferente e na preparação de nervo hipogástrico-canal deferente incubados com adrenalina não se observaram modificações no efluxo da noradrenalina endógena induzido por estimulação eléctrica. Como a estimulação eléctrica transmural tinha uma frequência baixa (1Hz) geralmente apontada como a mais adequada à intervenção do efeito facilitatório e como há evidência de que existem receptores pré-sinápticos β no canal deferente de Cobaia (Stjärne 1975; Leighton e Westfall 1976; Saelens *et al.* 1977) a interpretação para os nossos resultados é a de que a libertação simpática neste órgão está submetida a uma influência pré-sináptica inibitória α muito marcada e a uma influência facilitatória β pouco importante. Esta interpretação está de acordo com a descrição de influências duplas antagónicas da adrenalina sobre a libertação simpática (Stjärne e Brudin 1975; Majewsky *et al.* 1985). No caso específico do canal deferente de Cobaia, os agonistas selectivos β aumentam a libertação simpática (isoprenalina: Stjärne 1975, Leighton e Westfall 1976; terbutalina e salbutamol: Leighton e Westfall 1976) enquanto que a adrenalina (0,2 $\mu\text{mol/l}$) reduz essa libertação para cerca de metade (Stjärne 1975).

Como conclusão geral deste trabalho fica a comprovação de que há discrepâncias quantitativas nos processos de acumulação e libertação entre a noradre-

nalina endógena e aminas exógenas utilizadas como marcadores da função neuroefectora simpática. Estas discrepâncias vêm juntar-se a outras que começaram a ser apontadas por vários autores desde que as técnicas de doseamento cromatográficas e radioenzimáticas das catecolaminas entraram nos estudos dos mecanismos adrenérgicos (diferenças na actividade específica da noradrenalina acumulada e libertada: Rorie *et al.* 1980; diferenças entre a relação DOPEG/noradrenalina radioactivos e DOPEG/noradrenalina não radioactivos no efluxo induzido pela ubaína: Branco e Osswald 1986).

No entanto, não se encontraram diferenças qualitativas marcadas entre a noradrenalina endógena e a noradrenalina radioactiva. Parece razoável prever que os estudos com as aminas endógenas venham a trazer, sobretudo, mais rigor às inferências feitas a partir do riquíssimo conhecimento adquirido com o emprego de isótopos radioactivos e os nossos modelos actuais de transmissão adrenérgica talvez possam, no entanto, continuar válidos. Parafraseando duas afirmações de Ullrich Trendelenburg e seus colaboradores poderemos concluir que talvez se venham a encontrar diferenças como resultado do emprego de "*suboptimal experimental tools available at that time*" (Grohmann *et al.* 1986) e que "*The tools we use are not without problems, but... the problem is small*" (Trendelenburg 1986).

Resumo

As catecolaminas radioactivas são instrumentos úteis para o estudo dos mecanismos adrenérgicos. No entanto, a hipótese de que as aminas exógenas incorporadas nas terminações nervosas simpáticas são marcadores fiéis da acumulação e da libertação da noradrenalina endógena não está completamente investigada porque tem havido dificuldade em fazer determinações analíticas do transmissor endógeno.

O objectivo deste trabalho foi colocar à prova se a mistura das aminas recentemente incorporadas, como a noradrenalina tritiada e a adrenalina não radioactiva, com os depósitos endógenos é homogénea.

Incubaram-se preparações isoladas de canal deferente ou de nervo hipogástrico-canal deferente de Cobaia na presença de 2,3 $\mu\text{mol/l}$ de adrenalina ou de ^3H -(-)-noradrenalina marcada predominantemente em posição 7, durante 1h (utilizou-se pargilina na concentração de 1 mmol/l e hidrocortisona na concentração de 41 $\mu\text{mol/l}$ para reduzir a actividade da monoaminoxidase e da captação extraneuronal, respectivamente). Montaram-se as preparações em câmaras de perfusão e aplicaram-se estímulos diferentes: estimulação eléctrica directa do canal deferente (1 Hz, 100V, 2 mseg), estimulação eléctrica do nervo (25 Hz, 5 ou 10 V, 2 mseg), despolarização provocada pelo potássio (50 mmol/l) e exposição à tiramina (40 e 160 $\mu\text{mol/l}$).

Noutra série de experiências, carregaram-se as preparações com quantidades diferentes de amina exógena fazendo a incubação dos tecidos na presença de concentrações de adrenalina compreendidas entre 0,6 e 160 $\mu\text{mol/l}$.

Mediram-se os efluxos e os teores teciduais de noradrenalina e de adrenalina por contagem de cintilações e por cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica.

Prepararam-se auto-radiografias de luz a partir de cortes de canais deferentes carregados com noradrenalina tritiada.

Com qualquer dos estímulos utilizados, o efluxo (expresso em fracção do seu teor tecidual) das aminas exógenas foi superior ao da noradrenalina endógena. Quando se carregaram os tecidos com concentrações crescentes de adrenalina, a fracção de libertação desta amina reduziu-se e aproximou-se da da noradrenalina endógena. Estes resultados indicam que a mobilização preferencial das aminas de incorporação recente não depende do mecanismo de libertação nem da natureza química dessas aminas.

As catecolaminas exógenas podem ser armazenadas em locais mais periféricos dos terminais nervosos ou nas varicosidades mais externas da parede tecidual. A segunda possibilidade foi confirmada pelas observações auto-radiográficas.

A principal conclusão deste estudo é a de que as catecolaminas de incorporação recente são libertadas preferencialmente em relação à noradrenalina endógena.

Summary

Release from sympathetic nerve terminals of endogenous noradrenaline and exogenously incorporated amines induced by different agents. Radioactive catecholamines are useful tools for the study of adrenergic mechanisms. Although the incorporation of exogenous amines into the sympathetic nerve endings has been assumed to be an accurate marker of the accumulation and release of endogenous noradrenaline, this hypothesis has not been fully investigated, due to difficulties in the assay of the endogenous transmitter.

The purpose of the present work was to test if recently incorporated amines (tritiated noradrenaline or unlabelled adrenaline) would mix homogeneously with the endogenous stores.

Guinea pig isolated vasa deferentia or hypogastric nerve-vas deferens preparations were incubated with 2.3 $\mu\text{mol/l}$ adrenaline or ^3H -(-)-noradrenaline predominantly labelled in position 7 during 1h (1 mmol/l of pargyline and 41 $\mu\text{mol/l}$ of hydrocortisone were used to inhibit monoamine oxidase and extraneuronal uptake), mounted in perfusion chambers and submitted to various stimuli: direct electrical stimulation of the vas (1 Hz, 100 V, 2 msec), electrical stimulation of the nerve (25 Hz, 5 or 10 V, 2 msec), depolarization evoked by potassium (50 mmol/l) and tyramine (40 and 160 $\mu\text{mol/l}$).

In another series of experiments the preparations were loaded with different amounts of the exogenous amine by incubating the tissues with adrenaline in a range of concentrations from 0.6 to 160 $\mu\text{mol/l}$.

Similar experiments were carried out in the canine saphenous vein.

The outflow and the tissue content of noradrenaline and adrenaline were measured by scintillation counting and HPLC-EC. Autoradiographs were obtained from slices of vasa deferentia previously loaded with tritiated noradrenaline.

For all the stimuli the amine overflow (expressed as a fraction of its tissue content) was higher for the exogenous amines than for the endogenous noradrenaline. When tissues were loaded with increasing concentrations of adrenaline, its fractional release decreases and becomes closer to that of endogenous noradrenaline. These results indicate that the preferential mobilization of recently incorporated amines does not depend either on the particular type of releasing mechanism or on the chemical nature of the amine.

The exogenous catecholamines may be stored in more peripheral sites of the nerve endings or in the varicosities of the outer layers of the tissue wall. The second possibility was confirmed by autoradiography.

The main conclusion of the present study is that, in comparison with the endogenous noradrenaline, recently incorporated catecholamines are preferentially released from nerve endings.

Bibliografia

- Adler-Graschinsky E, Langer SZ (1975) Possible role of β -adrenoceptor in the regulation of noradrenaline release by nerve stimulation through a positive feed-back mechanism. *Br J Pharmacol* 53:43-50
- Albino-Teixeira A, Azevedo I, Branco D, Osswald W (1987) Prevention by adenosine of the structural changes caused at the extraneuronal level by sympathetic denervation. *Blood Vessels* 24:282
- Ambache N, Zar MA (1971) Evidence against adrenergic motor transmission in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol (Lond)* 216:359-389
- Anden NE (1964) Uptake and release of dextro- and laevo-adrenaline in noradrenergic stores. *Acta Pharmacol Toxicol* 21:59-75
- Anton AH, Sayre DF (1962) A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* 138:360-375
- Anton PG, Duncan ME, McGrath JC (1977) An analysis of the anatomical basis for the mechanical response to motor nerve stimulation of the rat vas deferens. *J Physiol (Lond)* 273:23-43
- Axelrod J, Weil-Malherbe H, Tomchick R (1959) The physiological disposition of H^3 -epinephrine and its metabolite metanephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 127:251-256
- Axelrod J, Gordon E, Hertting G, Kopin IJ, Potter LT (1962) On the mechanism of tachyphylaxis to tyramine in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol* 19:56-63
- Azevedo MIA (1982) Captação extraneuronal de catecolaminas, proposta de interpretação. Tese. Faculdade de Medicina, Porto
- Azevedo I, Osswald W (1976) Uptake, distribution and metabolism of isoprenaline in the dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 295:141-147
- Azevedo I, Osswald W (1986) Trophic role of the sympathetic innervation. *J Pharmacol (Paris)* 17 (suppl II):30-43
- Azevedo I, Bönisch H, Osswald W, Trendelenburg U (1983) Autoradiographic study of rat hearts perfused with 3H -isoprenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 322:1-5
- Belis JA, Colby JE, Westfall DP (1982) Effects of α -adrenoceptor agents on norepinephrine release from vas deferens of several species including man. *Eur J Pharmacol* 78:487-490
- Bell C (1968) Differential effects of tetrodotoxin on sympathomimetic actions of nicotine and tyramine. *Br J Pharmacol* 32:96-103
- Belleau B, Burba J, Pindell M, Reiffenstein J (1961) Effect of deuterium substitution in sympathomimetic amines on adrenergic responses. *Science* 133:102-144

- Bioanalytical Systems (1981) Plasma catecholamines. LCEC application note 14. BAS, West Lafayette IN
- Bönisch H, Rodrigues-Pereira E (1983) Uptake of ^{14}C -tyramine and release of extravesicular ^3H -noradrenaline in isolated perfused rabbit hearts. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 323:233-244
- Branco D, Garrett J (1985) Adrenaline activates in the intact dog a positive feedback loop causing an increase in noradrenaline plasma levels. *Arch Int Pharmacodyn* 276:50-59
- Branco D, Osswald W (1986) Ouabain-induced efflux of catecholamines and metabolites from blood vessels of normotensive and hypertensive dogs. In: Erdmann E, Greeff K, Skou JC (eds) *Cardiac glycosides 1785-1985*. Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp 367-376
- Branco D, Albino-Teixeira A, Azevedo I, Osswald W (1984) Structural and functional alterations caused at the extraneuronal level by sympathetic denervation of blood vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 326:302-312
- Brandão F (1977) Inactivation of norepinephrine in an isolated vein. *J Pharmacol Exp Ther* 203:23-29
- Brandão F, Guimarães S (1974) Inactivation of endogenous noradrenaline released by electrical stimulation *in vitro* of dog saphenous vein. *Blood Vessels* 11:45-54
- Brandão F, Monteiro JG, Osswald W (1978) Differences in the metabolic fate of noradrenaline released by electrical stimulation or by tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305:37-40
- Brandão F, Paiva MQ, Guimarães S (1980a) The role of neuronal and extraneuronal systems in the metabolism of adrenaline and noradrenaline released from nerve terminals by electrical stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311:1-7
- Brandão F, Rodrigues-Pereira E, Monteiro JG, Osswald W (1980b) Characteristics of tyramine-induced release of noradrenaline: mode of action of tyramine and metabolic fate of the transmitter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311:9-15
- Brandão F, Rodrigues-Pereira E, Monteiro JG, Davidson R (1981) A kinetic study of the release of noradrenaline by tyramine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 318:83-87
- Brandão F, Davidson R, Monteiro JG (1985) A kinetic study of the release of noradrenaline by electrical stimulation: influence of presynaptic α -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328:248-252
- Brock JA, Cunnane TC (1987) Characteristic features of transmitter release from sympathetic nerve terminals. *Blood Vessels* 24:253-260

- Brown GL, Gillespie JS (1957) The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J Physiol (Lond)* 138:81-102
- Brown MJ, Macquin I (1981) Is adrenaline the cause of essential hypertension? *Lancet* 2:1079-1082
- Budd GC, Salpeter MM (1969) The distribution of labeled norepinephrine within sympathetic nerve terminals studied with electron microscope radioautography. *J Cell Biol* 41:21-32
- Burn GP, Burn JH (1961) Uptake of labelled noradrenaline by isolated atria. *Br J Pharmacol* 16:344-351
- Burn JH (1932) The action of tyramine and ephedrine. *J Pharmacol Exp Ther* 46:75-95
- Burn JH, Rand MJ (1958) The action of sympathomimetic amines in animals treated with reserpine. *J Physiol (Lond)* 144:314-346
- Burn JH, Rand MJ (1960a) The relation of circulating noradrenaline to the effect of sympathetic stimulation. *J Physiol (Lond)* 150:295-305
- Burn JH, Rand MJ (1960b) The effect of precursors of noradrenaline on the response to tyramine and sympathetic stimulation. *Br J Pharmacol* 15:47-55
- Burnstock G (1986) The changing face of autonomic neurotransmission. *Acta Physiol Scand* 126:67-91
- Burnstock G, Costa M (1975) Adrenergic neurons: their organization, function and development in the peripheral nervous system. Chapman and Hall, London
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME (1963) Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature* 200:581-582
- Chidsey CA, Harrison DC (1963) Studies on the distribution of exogenous norepinephrine in the sympathetic neurotransmitter store. *J Pharmacol Exp Ther* 140:217-223
- Chubb IW, DePotter WP, DeSchaepe-dryver AF (1972) Tyramine does not release noradrenaline from splenic nerve by exocytosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 274:281-286
- Coimbra A, Ribeiro-Silva A, Osswald W (1974) Fine structural and radioautographic study of the adrenergic innervation of the dog lateral saphenous vein. *Blood Vessels* 11:128-144
- Crout JR (1964) The uptake and release of H³-norepinephrine by the guinea-pig heart in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 248:85-98
- Crout JR, Muskus AJ, Trendelenburg U (1962) Effect of tyramine on isolated guinea-pig atria in relation to their noradrenaline stores. *Br J Pharmacol* 18:600-611

- Cubeddu LX, Barnes EM, Langer SZ, Weiner N (1974) Release of norepinephrine and dopamine- β -hydroxylase by nerve stimulation. I. Role of neuronal and extra-neuronal uptake and of *alpha* presynaptic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 190:431-450
- Cunnane TC, Stjärne L (1982) Secretion of transmitter from individual varicosities of guinea-pig and mouse vas deferens: all-or-none and extremely intermittent. *Neuroscience* 7:2565-2576
- Cunnane TC, Stjärne L (1984a) Frequency dependent intermittency and ionic basis of impulse conduction in postganglionic sympathetic fibres of guinea-pig vas deferens. *Neuroscience* 11:211-229
- Cunnane TC, Stjärne L (1984b) Transmitter secretion from individual varicosities of guinea-pig and mouse vas deferens: highly intermittent and monoquantal. *Neuroscience* 13:1-20
- Dahlöf C (1981) Studies on β -adrenoceptor mediated facilitation of sympathetic neurotransmission. *Acta Physiol Scand Suppl* 500:1-147
- Davis GC, Kissinger PT, Shoup RE (1981) Strategies for determination of serum or plasma norepinephrine by reverse-phase liquid chromatography. *Anal Chem* 53:156-159
- De la Lande IS, Frewin D, Waterson JG (1967) The influence of sympathetic innervation on vascular sensitivity to noradrenaline. *Br J Pharmacol* 31:82-93
- Dubocovich ML, Langer SZ (1974) Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors. *J Physiol (Lond)* 237:505-519
- Dubocovich ML, Langer SZ (1976) Influence of the frequency of nerve stimulation on the metabolism of ^3H -norepinephrine released from the perfused cat spleen: differences observed during and after the period of stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 198:83-101
- Enero MA, Langer SZ (1973) Influence of reserpine-induced depletion of noradrenaline on the negative feed-back mechanism for transmitter release during nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 49:214-225
- Euler US von (1946) A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline. *Acta Physiol Scand* 12:73-97
- Euler US von (1972) Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves, the effect of drugs. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 33, Catecholamines. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 186-230

- Farnebo L-O, Hamberger B (1971) Drug-induced changes in the release of [3 H]-noradrenaline from field stimulated rat iris. *Br J Pharmacol* 43:97-106
- Fedan JS, Hogaboom GK, O'Donnell JP, Colby J, Westfall DP (1981) Contribution by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 69:41-53
- Friedrich U, Bönisch H (1986) The neuronal noradrenaline transport system of PC-12 cells: kinetic analysis of the interaction between noradrenaline, Na $^+$ and Cl $^-$ in transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333:246-252
- Garrett J, Branco D (1977) Uptake and metabolism of noradrenaline by the mesenteric arteries of the dog. *Blood Vessels* 14:43-54
- Göthert M, Hentrich F (1986) Further evidence for the involvement of cyclic AMP in Ca $^{2+}$ - dependent, but not Ca $^{2+}$ - independent, noradrenaline release in the rabbit pulmonary artery. *Arch Int Pharmacodyn* 284:85-100
- Graefe K-H, Stefano FJE, Langer SZ (1973) Preferential metabolism of (-)- 3 H-norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens. *Biochem Pharmacol* 22:1147-1160
- Graefe K-H, Stefano FJE, Langer SZ (1977) Stereoselectivity in the metabolism of 3 H-noradrenaline during uptake into and efflux from the isolated rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 299:225-238
- Grillo MA (1966) Electron microscopy of sympathetic tissues. *Pharmacol Rev* 18:387-399
- Grohmann M, Trendelenburg U (1983) The isotope effect of tritium in 3 H-(-)-adrenaline with a very high specific activity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 324:233-234
- Grohmann M, Henseling M, Cassis L, Trendelenburg U (1986) Errors introduced by a tritium label in position 8 of catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332:34-42
- Guimarães S (1982) Two adrenergic biophases in blood vessels. *Trends Pharmacol Sci* 3:159-161
- Guimarães S, Osswald W (1969) Adrenergic receptors in the veins of the dog. *Eur J Pharmacol* 5:133-140
- Guimarães S, Paiva MQ (1977) The role played by the extraneuronal system in the disposition of noradrenaline and adrenaline in vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 296:279-287
- Guimarães S, Paiva MQ (1981a). Two distinct adrenoceptor-biophases in the vasculature: one for α - and other for β -agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:195-199

- Guimarães S, Paiva MQ (1981b) Two different biophases for adrenaline released by electrical stimulation of tyramine from the sympathetic nerve endings of the dog saphenous vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:200-204
- Guimarães S, Brandão F, Paiva MQ (1978) A study of the adrenoceptor-mediated feedback mechanisms by using adrenaline as a false transmitter. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305:185-188
- Guimarães S, Paiva MQ, Moura D (1982) Evidence for the existence of distinct biophases for α - and β - adrenoceptors in the vascular tissue. *J Cardiovasc Pharmacol* 4:S58-S62
- Guimarães S, Moura D, Paiva MQ (1986) Effects of phentolamine on the release of [3 H]-(-)- and endogenous noradrenaline by direct electrical stimulation. *Br J Pharmacol* 89:838P
- Haeusler G, Thoenen H, Haefely W, Huerlimann A (1968) Electrical events in cardiac adrenergic nerves and noradrenaline release from the heart induced by acetylcholine and KCl. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 261:389-411
- Hedqvist P, Fredholm BB (1976) Effects of adenosine on adrenergic neurotransmission; prejunctional inhibition and postjunctional enhancement. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 293:217-223
- Henseling M (1987) Differences between the neuronal handling of 3 H-7- and 3 H-7, 8-(-) noradrenaline: implications for the release of the labelled neurotransmitter by nerve stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335:129-135
- Hertting G, Axelrod J (1961) Fate of tritiated noradrenaline at the sympathetic nerve-endings. *Nature* 192:172-173
- Hertting G, Axelrod J, Kopin IJ, Whitby LG (1961a) Lack of uptake of catecholamines after chronic denervation of sympathetic nerves. *Nature* 189:66
- Hertting G, Axelrod J, Whitby LG (1961b) Effect of drugs on the uptake and metabolism of H^3 - norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 134:146-153
- Hjemdahl P (1984) Catecholamine measurements by high-performance liquid chromatography. *Am J Physiol* 247:E13-E20
- Hjemdahl P, Daleskog M, Kahan T (1979) Determination of plasma catecholamines by high performance liquid chromatography with electrochemical detection: comparison with a radioenzymatic method. *Life Sci* 25:131-138
- Holman ME (1975) Nerve-muscle preparations of vas deferens. In: Daniel EE, Paton DM (eds) *Methods in Pharmacology*, vol. 3, Smooth Muscle. Plenum Press, London, pp 403-417
- Holtz P, Credner K, Kronenberg G (1947) Über das sympathicomimetische pressorische Prinzip des Harns ("Urosympathin"). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 204:228-243
- Hughes J (1972) Evaluation of mechanisms controlling the release and inactivation of the adrenergic transmitter in the rabbit portal vein and vas deferens. *Br J Pharmacol* 44:472-491

- Hughes J (1973a) Differential labelling of intraneuronal noradrenaline stores with different concentrations of (–)-³H-noradrenaline. *Br J Pharmacol* 47:428-430
- Hughes J (1973b) Inhibition of noradrenaline release by lysergic acid diethylamide. *Br J Pharmacol* 49:706-708
- Huković S (1961) Responses of the isolated sympathetic nerve-ductus deferens preparation of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 16:188-194
- Johnson RG, Carty SE, Hayflick S, Scarpa A (1982). Mechanisms of accumulation of tyramine, metaraminol, and isoproterenol in isolated chromaffin granules and ghosts. *Biochem Pharmacol* 31:815-823
- Kahan T (1987) Prejunctional adrenergic receptors and sympathetic neurotransmission: studies in canine skeletal muscle vasculature *in situ*. *Acta Physiol Scand* 129 (suppl 560):7-38
- Kahan T, Hjemdahl P, Dahlöf C (1984) Relationship between the overflow of endogenous and radiolabelled noradrenaline from canine blood perfused gracilis muscle. *Acta Physiol Scand* 122:571-582
- Kirpekar SM, Puig M (1971) Effect of flow-stop on noradrenaline release from normal spleens and spleens treated with cocaine, phentolamine or phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 43:359-369
- Kissinger PT (1983) Determination of biogenic amines and their metabolites by liquid chromatography/electrochemistry. In: Parvez S, Nagatsu T, Nagatsu I, Parvez H, (eds) *Methods in biogenic amine research*. Elsevier, Amsterdam, pp 75-99
- Langeloh A, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the ³H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake; role of monoamine oxidase and of vesicularly stored ³H-noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:611-620
- Langeloh A, Bönisch H, Trendelenburg U (1987) The mechanism of the ³H-noradrenaline releasing effect of various substrates of uptake; multifactorial induction of outward transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 336:602-610
- Langer SZ (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 23:1793-1800
- Langer SZ (1977) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br J Pharmacol* 60:481-497
- Langer SZ (1980) Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 32:337-362
- Langer SZ, Adler E, Enero MA, Stefano FJE (1971) The role of the alpha receptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation. In: *Proceedings XXVth International Congress of Physiological Sciences*. Munich, pp 335

- Leighton HJ, Westfall TC (1976) Effect of β -agonists on field-stimulated release of ^3H -normetanephrine formation during ^3H -NE from guinea-pig vasa deferentia. *Pharmacologist* 18:208
- Luchelli-Fortis MA, Langer SZ (1975) Selective inhibition by hydrocortisone of ^3H -normetanephrine formation during ^3H - transmitter release elicited by nerve stimulation in the isolated nerve-muscle preparation of the cat nictitating membrane. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 287:261-275
- Lundberg JM, Terenius L, Hökfelt T, Martling CR, Tatemoto K, Mutt V, Polak J Bloom S, Goldstein M (1982) Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta Physiol Scand* 116:477-480
- Majewsky H (1983) Modulation of noradrenaline release through activation of pre-synaptic β -adrenoceptors. *J Auton Pharmacol* 3:47-60
- Majewsky H, Rand MJ (1981) Adrenaline-mediated hypertension: a clue to the anti-hypertensive effect of β -adrenoceptor blocking drugs? *Trends Pharmacol Sci* 2:24-26
- Majewsky H, Rand MJ (1984) Prejunctional β -adrenoceptors and hypertension: a hypothesis revisited. *Trends Pharmacol Sci* 5:500-502
- Majewsky H, Hedler L, Starke K (1982) The noradrenaline release rate in the anaesthetized rabbit: facilitation by adrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 321:20-27
- Majewsky H, Hedler L, Schurr C, Starke K (1985) Dual effect of adrenaline on noradrenaline release in the pithed rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol* 7:251-257
- Mann M, West GB (1950) The nature of hepatic and splenic sympathin. *Br J Pharmacol* 5:173-177
- Meldrum LA, Burnstock G (1983) Evidence that ATP acts as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol* 92:161-163
- Michalke W, Langer R, Burger A (1987) Mobilization of biogenic amines from chromaffin-granule ghosts by indirectly acting sympathomimetic amines (IASA). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335:R81
- Muscholl E (1960) Die Hemmung der Noradrenalin-Aufnahme des Herzens durch Reserpin und die Wirkung von Tyramin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 240:234-241
- Osswald W, Guimarães S (1983) Adrenergic mechanisms in blood vessels: morphological and pharmacological aspects. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 96:53-122
- Osswald W, Guimarães S, Coimbra A (1971) The termination of action of catecholamines in the isolated venous tissue of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 269:15-31

- Paiva MQ, Guimarães S (1978) A comparative study of the uptake and metabolism of noradrenaline and adrenaline by the isolated saphenous vein of the dog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 303:221-228
- Paiva MQ, Guimarães S (1984) The kinetic characteristics of the extraneuronal O—methylating system of the dog saphenous vein and the supersensitivity to catecholamines caused by its inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:48-55
- Paton DM (1973) Evidence for carrier-mediated efflux of noradrenaline from adrenergic nerves in rabbit atris. *J Pharm Pharmacol* 25:265-267
- Peart WS (1949) The nature of splenic sympathin. *J. Physiol (Lond)* 108:491-501
- Phillips JH (1982) Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience* 7:1595-1609
- Potter LT, Axelrod J, Kopin IJ (1962) Differential binding and release of norepinephrine and tachyphylaxis. *Fed Proc* 21:177
- Rand MJ, Majewsky H, McCulloch MW, Story DF (1979) An adrenaline-mediated positive feedback loop in sympathetic transmission. In: Langer SZ, Starke K, Dubocovich ML (eds) *Advances in the biosciences*, vol. 18, Presynaptic receptors. Pergamon Press, Oxford, pp 263-269
- Rorie DK, Muldoon SM, Tyce GM (1980) The specific activity of retained and released norepinephrine in dog saphenous vein prelabeled with radiolabeled norepinephrine. *Life Sci* 26:707-714
- Rosell S, Kopin IJ, Axelrod J (1963) Fate of ³H-norepinephrine in skeletal muscle before and following sympathetic nerve stimulation. *Am J Physiol* 205:317-321
- Rosell S, Axelrod J, Kopin IJ (1964) Release of tritiated epinephrine following sympathetic nerve stimulation. *Nature* 201:301
- Saelens DA, Daniell HB, Webb JG (1977) Studies on the interactions of propranolol with adrenergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 202:635-645
- Sammet S, Graefe K-H (1979) Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and Na⁺ in neuronal uptake: kinetic evidence for co-transport. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 309:99-107
- Sarmento A, Soares-da-Silva P, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1987) Effects of denervation induced by 6—hydroxydopamine on cell nucleus activity of arterial and cardiac cells of the dog. *J Auton Pharmacol* 7:119-126
- Smith AD (1973) Mechanisms involved in the release of noradrenaline from sympathetic nerves. *Br Med Bull* 29:123-129
- Smith AD, Winkler H (1972) Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. In: Blaschko H, Muscholl E (eds) *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 33, Catecholamines. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 538-617

- Sneddon P, Westfall DP (1984) Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol (Lond)* 347:561-580
- Snyder SH, Taylor KM (1972) Histamine in the brain: a neurotransmitter? In: Snyder SH (ed) *Perspectives in neuropharmacology: a tribute to Julius Axelrod*. Oxford University Press, New York, pp 43-73
- Soares-da-Silva P (1986) Evidence for a non-precursor dopamine pool in noradrenergic neurones of the dog mesenteric artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333:219-223
- Soares-da-Silva P (1987a) A comparison between the pattern of dopamine and noradrenaline release from sympathetic neurones of the dog mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 90:91-98
- Soares-da-Silva P (1987b) Dopamine released from nerve terminals activates pre-junctional dopamine receptors in dog mesenteric arterial vessels. *Br J Pharmacol* 91:591-599
- Soares-da-Silva P, Davidson R (1985) Effects of 6-hydroxydopamine on dopamine and noradrenaline content in the dog blood vessels and heart: evidence for a noradrenaline-independent dopamine pool. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 329:253-257
- Starke K (1971a) Action of angiotensin on uptake, release and metabolism of ^{14}C -noradrenaline by isolated rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 14:112-123
- Starke K (1971b) Influence of α -receptor stimulants on noradrenergic release. *Naturwissenschaften* 58:420
- Starke K (1972) Alpha sympathomimetic inhibition of adrenergic and cholinergic transmission in the rabbit heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 274:18-45
- Starke K (1977) Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 77:1-124
- Starke K (1981a) α -Adrenoceptor subclassification. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 88:199-236
- Starke K (1981b) Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:7-30
- Starke K (1987) Presynaptic α -autoreceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 107:73-146
- Starke K, Montel H (1973) Influence of drugs with affinity for alpha-adrenoceptors on noradrenaline release by potassium and tyramine. In: *Proceedings 2nd Meeting on Adrenergic Mechanisms*. University of Porto, Porto, pp 53-54
- Starke K, Montel H (1974) Influence of drugs with affinity for α -adrenoceptors on noradrenaline release by potassium, tyramine and dimethylphenylpiperazine. *Eur J Pharmacol* 27:273-280

- Starke K, Steppeler A, Zumstein A, Henseling M, Trendelenburg U (1980) False labelling of commercially available ^3H -catecholamines? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311:109-112
- Stjärne L (1973a) Frequency dependence of dual negative feedback control of secretion of sympathetic neurotransmitter in guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* 49:358-360
- Stjärne L (1973b) Alpha-adrenoceptor mediated feed-back control of sympathetic neurotransmitter secretion in guinea-pig vas deferens. *Nature (New Biol)* 241:190-191
- Stjärne L (1975) Selectivity for catecholamines of presynaptic alpha-receptors involved in feedback control of sympathetic neurotransmitter secretion in guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 288:296-303
- Stjärne L, Brundin J (1975) Dual adrenoceptor-mediated control of noradrenaline secretion from human vasoconstrictor nerves: facilitation by β -receptors and inhibition by α -receptors. *Acta Physiol Scand* 94:139-141
- Stute N, Trendelenburg U (1984) The outward transport of axoplasmic noradrenaline induced by a rise of the sodium concentration in the adrenergic nerve endings of the rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:124-132
- Thoa NB, Wooten GF, Axelrod J, Kopin IJ (1975) On the mechanism of release of norepinephrine from sympathetic nerves induced by depolarizing agents and sympathomimetic drugs. *Mol Pharmacol* 11:10-18
- Thoenen H, Huerlimann A, Haefely W (1969) Cation dependence of the noradrenaline-releasing action of tyramine. *Eur J Pharmacol* 6:29-37
- Trendelenburg U (1961) Modification of the effect of tyramine by various agents and procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 134:8-17
- Trendelenburg U (1983) A plea for a uniform terminology for words ending with ...ergic. *Trends Pharmacol Sci* 4:49-50
- Trendelenburg U (1986) The metabolizing systems involved in the inactivation of catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332:201-207
- Trendelenburg U, Stefano FJE, Grohmann M (1983) The isotope effect of tritium in ^3H -noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 323:128-140
- VanOrden LS (1976) Application of histochemistry, electron microscopy, autoradiography, and immunocytochemistry to studies of neuronal and extraneuronal transport of noradrenaline. In: Paton DM (ed) *The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines*. Raven Press, New York, pp 37-47
- Wakade AR, Kirpekar SM (1971) Chemical and histochemical studies on the sympathetic innervation of the vas deferens and seminal vesicle of the guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 178:432-441

- Wakade AR, Kirpekar SM (1971) Chemical and histochemical studies on the sympathetic innervation of the vas deferens and seminal vesicle of the guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 178:432-441
- Wakade AR, Kirpekar SM (1974) Calcium-independent release of ^3H - norepinephrine from reserpine-pretreated guinea-pig vas deferens and seminal vesicle. *J Pharmacol Exp Ther* 190:451-458
- Wakade AR, Wakade TD (1981) Release of noradrenaline by one pulse: modulation of such release by alpha-adrenoceptor antagonists and uptake blockers. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 317:302-309
- Warnhoff M (1984) Simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, 5-hydroxytryptamine and their main metabolites in rat brain using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 307:271-281
- Westfall DP, Millecchia LL, Lee TJ-F, Corey SP, Smith DJ, Fleming WW (1977) Effects of denervation and reserpine on nexuses in the rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 41:239-242
- Weiner N, Rabadjija M (1968) The effect of nerve stimulation on the synthesis and metabolism of norepinephrine in the isolated guinea-pig hypogastric nerve-vas deferens preparation. *J Pharmacol Exp Ther* 160:61-71
- Whitby LG, Axelrod J, Weil-Malherbe H (1961) The fate of H^3 - norepinephrine in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 132:193-201
- Yamaguchi N, Champlain J, Nadeau RA (1977) Regulation of norepinephrine release from cardiac sympathetic fibers in the dog by presynaptic α - and β -receptors. *Circ Res* 41:108-117

Agradecimentos

Gostaria de ter feito obra melhor. Fica-me a satisfação de poder descobrir, sempre, no que me parece lá estar de bom, a marca das pessoas admiráveis com quem vivi durante o tempo em que trabalhei nesta dissertação.

A primazia dessa marca vai, inteirinha, para o Professor Serafim Guimarães, meu orientador, a quem agradeço a forma como me guiou ao longo de todo o trabalho desde a escolha do problema, até à forma de escrever os resultados e a amizade com que conjugou um interesse constante, uma crítica tenaz e uma paciência sem limites para com os meus erros e lentidão.

Ao Professor José Garrett, agradeço ter permitido que tudo isto se tornasse possível, porque eu tive o privilégio de ainda pertencer às gerações que colheram os resultados das "três bolas brancas" que o Professor José Garrett lançou na sua vida universitária ao criar o Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto: vontade de construir, desejo de promover os discípulos e preocupação em cimentar a amizade e a solidariedade entre os seus colaboradores.

Ao Professor Walter Osswald não sei escrever o meu agradecimento. Que me desculpe o recurso, pouco original, à citação: "É um homem de muitas virtudes raras... e, consoante o tempo exige, excelente na alegria... e, outras vezes, de profunda gravidade" (escrito sobre Thomas Moore pelo seu contemporâneo, Robert Whittinton, segundo tradução e citação de Fernando de Mello Moser).

À Dra. Maria Quitéria Paiva agradeço as muitas horas de trabalho comum nas experiências de dissecação, montagem, perfusão e estimulação das preparações isoladas, técnicas que pacientemente ensinou a um licenciado de Medicina desastrado que "invadiu" um laboratório de Farmacologia.

À Professora Isabel Azevedo devo todo o trabalho de auto-radiografia e as fotografias que estão incluídos nesta dissertação e, sobretudo, o gosto que me transmitiu pela actividade científica através de um encantamento raro que consegue descobrir nas observações aparentemente mais insípidas.

À Domingas Branco agradeço o ensino da cromatografia líquida de alta pressão desde o tempo pioneiro em que ela trouxe ao Instituto Karolinska uma técnica praticamente desconhecida entre nós e que era ainda titubeante na análise de catecolaminas (obrigado também, por me ter mostrado como se trabalha e se mantém um laboratório arrumado).

Ao Dr. Patrício Soares da Silva agradeço as longas horas de discussão sobre o meu trabalho, as sugestões e críticas entusiastas, e o seu auxílio na "fabricação" dos eléctrodos de Burn e Rand. À amizade de Richard Davidson devo também muitas críticas, sugestões e cuidados a ter na execução das experiências bem como o engenho e gosto que pôs na adaptação e recuperação do material mais sofisticado que nas minhas mãos teimava em não funcionar.

À Prazeres Cleto devo a dedicação do seu auxílio técnico e na correcção de provas tipográficas. À Manuela Moura agradeço o rigor e a excelência do trabalho analítico.

A qualidade dos desenhos deve-se por inteiro, à disponibilidade e bom-gosto de Maria Luísa Vasques.

Ao Professor Fernando Brandão agradeço as críticas valiosas e os ensinamentos de cinética de libertação que tive a oportunidade de aprender nas experiências em que colaborei com ele e com o Dr. Domingos Araújo, a quem devo também amizade e encorajamento de longa data.

O ambiente que envolveu o Laboratório de Farmacologia e foi favorável ao meu trabalho deveu-se à solidariedade do Professor Jorge Castro Tavares, à riqueza de trato e inteligência do Professor Eduardo Rodrigues Pereira, à amizade dos Drs. António Albino Teixeira, António Sarmento e Durval Campos Costa, à camaradagem da Dra. Berta Quintas, ao exemplo de trabalhos incansáveis da Professora Margarida Carmona e do Dr. Jorge Polónia e à ajuda sempre solícita no trabalho de secretaria de Aida Camarinha e Eva Abrantes. Ao Dr. José Guilherme Monteiro agradeço as preciosas ajudas na utilização dos programas do microprocessador.

Ao agradecimento para os Srs. Aldovino Sousa e Abílio Nunes pelo auxílio prestado na preparação dos animais de experiência associa a saudade pelo Sr. Domingos Ferreira.

Exterior ao meio profissional fica ainda a gratidão aos meus amigos, dentre todos à Dra. Isabel Morgado pelo encorajamento nos períodos de desalento pior.

Por fim, e mais importante, é a dívida irrecuperável à Luísa, ao João Eduardo e à Maria João, a quem dedico o trabalho, pelo tempo, atenção, paciência e conforto material de que foram privados durante este tempo.