

AUGUSTO LANGELOH

COMPARAÇÃO ENTRE OS EFEITOS CONTRÁTEIS
DA DOPAMINA E NORADRENALINA NO
DUCTO DEFERENTE DE RATO:

EVIDÊNCIAS CONTRA A PRESENÇA DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Tese de doutorado apresentada
à Escola Paulista de Medicina

São Paulo

1979

I

AUGUSTO LANGELOH

Tese preparada no Departamento de Farma
cologia, durante o Curso de Pós-graduação
em Farmacologia, setor Modo de Ação de Dro
gas e apresentada à Escola Paulista de Me
dicina como requisito parcial para a obten
ção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: professor Doutor Aron Jurkiewicz

São Paulo

1979

A GABRIELA
A SANDRA
AOS MEUS PAIS
AO ARON

AGRADECIMENTOS

É usual que a tese propriamente dita venha precedida dos agradecimentos do autor às pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram na execução do trabalho. Neste caso não é diferente, mas como o autor acredita que a tese só foi possível porque o ambiente foi (e continua sendo) propício e o ambiente é formado não só dos objetos, mas principalmente pelas pessoas, deveria relacionar aqui uma lista de nomes que, transcendendo os colegas de curso, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da EPM, incluísse a lista equivalente do Departamento de Bioquímica da EPM e os colegas da disciplina de Farmacologia, do Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica do Instituto de Biociências da UFRGS.

Seria uma homenagem justa, mas a exiguidade do tempo, neste momento, o risco das omissões e a própria extensão da lista impedem a execução desta idéia e nos restringem a mencionar apenas alguns nomes que contribuíram:

a) para nossa formação

científica:

Aron Jurkiewicz

José Ribeiro do Valle

b) com críticas e sugestões

na

elaboração do manuscrito:

Aron Jurkiewicz

Cecília Barreto Gomes

Hanako Hirata

José Ribeiro do Valle

Maria Lygia Cordeiro de Abreu

Neide Hyppolito Jurkiewicz

Regina Pekelman

c) com auxílio na parte

experimental:

Haydée Rezende Reuter

Teotila Rezende Reuter

d) com apoio financeiro:

CAPES

FAPERGS

FAPESP

FINEP

ÍNDICE

Prólogo. 1

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO I

BASES TEÓRICAS PARA A DIFERENCIAÇÃO DE RECEPTORES

1. Métodos para caracterização e diferenciação de receptores farmacológicos. 4

2. Fatores que podem influir na medida dos parâmetros farmacológicos 9

2.1. Captação neuronal e extraneuronal. 10

2.2. Ação indireta. 11

2.3. Ação em mais de um receptor.11
2.4. Perda de sensibilidade12
2.5. Falta de equilíbrio na interação droga-receptor. .	.13

3. Procedimentos para reduzir ou anular as influên cias indesejáveis na medida dos parâmetros farma cológicos.13
--	-----

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DO DUCTO DEFERENTE DE RATOS

1. Características da transmissão adrenérgica16
2. Receptores farmacológicos no ducto deferente de rato19
3. Indicações da presença de receptores dopaminérgi cos fora do SNC.20
3.1. Indicações da presença de receptores dopaminérgi cos no ducto deferente de rato23
4. Objetivos específicos.26

MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO III

1. Aparelhagem.28
-------------------------	-----

2. Líquido nutritivo.28
3. Animais.30
4. Ducto deferente <u>in vitro</u>30
5. Registros gráficos31
6. Curvas dose-efeito31
7. Método "bracketing".32
8. Curvas dose-efeito médias.33
9. Medidas farmacológicas efetuadas34
9.1. Afinidade do agonista (pD_2).34
9.2. Atividade intrínseca (α)35
9.3. Potência relativa (DR)35
9.4. Afinidade do antagonista (pA_2)36
9.5. Afinidade do antagonista não-competitivo ($\overline{pD_2^1}$)37
10. Pesquisa de taquifilaxia38
11. Tratamento com reserpina38
11.1. Teste de depleção de noradrenalina endógena.39
12. Proteção de receptores40
13. Drogas41
14. Estatística.42

RESULTADOS

CAPÍTULO IV	44
1.Comparação entre os efeitos contráteis da DA e NA na ausência de antagonistas competitivos . . .	46
1.1.Em condições normais.	46
1.1.1.Afinidade	46
1.1.2.Atividade intrínseca relativa	46
1.1.3.Presença de taquifilaxia.	48
1.2.Efeitos da DA e NA após depleção dos depósitos en- dógenos de catecolaminas por reserpina.	51
1.3.Efeitos da DA e NA após bloqueio de captação neu- ronal por cocaína	51
1.4.Efeitos da DA e NA após bloqueio de captação ex- traneuronal por metanefrina	54
1.5.Efeitos da DA e NA após bloqueio de receptores purinérgicos com aminofilina	54
2.Comparação entre os efeitos de DA e NA na presen- ça de antagonistas competitivos	56
2.1.Presença de antagonista α -adrenérgico, ioimbina .56	
2.1.1.Antagonista α -adrenérgico ioimbina na presença de cocaína.	64

2.2. Presença de antagonistas dopaminérgicos.	67
2.2.1. Haloperidol.	67
2.2.1.1. Haloperidol na presença de cocaína	70
2.2.2. Pimozide	73
2.2.2.1. Pimozide na presença de cocaína.	73
2.2.3. Apomorfina	75
2.3. Papaverina	78
3. Comparação entre os efeitos da DA e NA na <u>pre</u> sença de antagonista competitivo irreversível : fenoxibenzamina.	80
DISCUSSÃO	
CAPÍTULO V	83
SUMÁRIO E CONCLUSÕES	
CAPÍTULO VI.	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPÍTULO VII	98

PRÓLOGO

Nosso envolvimento no estudo de eventuais receptores dopaminérgicos no ducto deferente de rato (DDR) iniciou-se com uma observação casual, como costuma ocorrer na investigação científica. Em 1975, quando começamos a nos interessar pela farmacologia do DDR, procurávamos verificar as alterações no sistema adrenoceptor do ducto deferente de animais castrados⁽¹⁾. Entre outros parâmetros avaliamos a potência relativa de três agonistas adrenérgicos: noradrenalina, adrenalina e fenilefrina, na presença de cocaína. Verificamos que a adição de cocaína, em concentrações relativamente altas (10^{-5} e 3×10^{-5} M) podia produzir, per se, uma resposta contrátil do DDR⁽²⁾. Ao tentar inferir qual o receptor farmacológico capaz de interagir com a cocaína e responsável por esse efeito, utilizamos, entre outras drogas, a noradrenalina e a dopamina como agonistas, escolhidas de certa forma arbitrariamente. Nossa surpresa foi observar um comportamento farmacológico distinto para cada uma destas drogas na presença de antagonistas α -adrenérgicos⁽³⁾.

Embora os resultados não indicassem, necessariamente, a presença de um receptor independente para a dopamina, procuramos investigar esta hipótese. Há uma tendência na literatura a mostrar que existem receptores dopaminérgicos no ducto deferente de rato. No entanto, os dados experimentais em que estão fundamentados carecem, em sua grande maioria, dos cuidados necessários a tal tipo de conclusão (van Rossum, 1965; Simon & van Maanen, 1971 e 1976).

A ocorrência e a importância da dopamina no sistema nervoso central (SNC) está estabelecida desde longa data (Carlsson & cols, 1958; Iversen, 1975); entretanto, as referências a receptores dopaminérgicos fora do SNC são relativamente escassas e, até o presente, a principal delas está relacionada com a vasodilatação da artéria renal e de alguns outros leitos vasculares (Goldberg e cols, 1978a). Nos demais casos o efeito da dopamina é resultante da interação com receptores α ou β -adrenérgicos (Goldberg, 1972).

A existência de receptores dopaminérgicos numa preparação simples como o DDR facilitaria o estudo de drogas que imitam ou antagonizam a dopamina no SNC. Por outro lado, extrapolações desse tipo, baseadas em premissas falsas, teriam o risco, devido a sua origem e natureza, de bloquear o avanço do conhecimento nessa área. Em consequência, o objetivo geral do nosso trabalho foi o de verificar se

no DDR existem, ou não, duas populações independentes de receptores, uma para a dopamina e outra para a noradrenalina, empregando a metodologia farmacológica. Foi objetivo secundário o estudo de fatores que, no DDR, podem influir na medida de parâmetros farmacológicos relacionados com a classificação de receptores.

(1) Os resultados dessas experiências integraram parte da nossa tese de Mestrado apresentada à Escola Paulista de Medicina, em 1977, sob o título: "Receptores da Noradrenalina e do Cloreto de Bário em Ductos Deferentes de Ratos Castrados: Determinação de Parâmetros Farmacológicos e Estudo da Influência do Cálcio", que resultou na publicação do artigo: "Time-response curves for barium and noradrenaline in vas deferens of castrated rat", no Europ. J. Pharmacol. 45:145-51; 1977.

(2) Parte desses resultados foram apresentados nas 28^a; 29^a e 30^a reuniões anuais da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Os respectivos resumos estão publicados em Ciência e Cultura, 28 (Supl): 548; 1976, Ciência e Cultura, 29 (Supl): 602; 1977 e Ciência e Cultura, 30 (Supl): 451; 1978.

(3) Parte desses resultados foram apresentados nas 30^a e 31^a reuniões anuais da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Os respectivos resumos estão publicados em Ciência e Cultura, 30 (Supl): 458; 1978 e Ciência e Cultura, 31 (Supl): 525; 1979. Alguns resultados também foram apresentados no VIIº Congresso Latinoamericano de Farmacologia, realizado em 1978, SP.

CAPÍTULO I

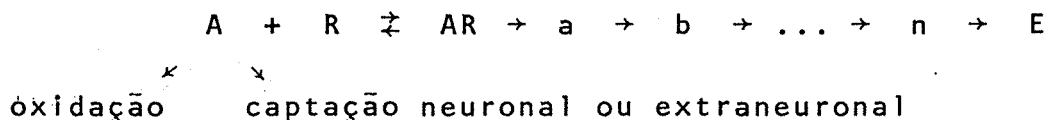
BASES TEÓRICAS PARA A DIFERENCIAÇÃO DE RECEPTORES

Para facilitar o entendimento da metodologia usada no presente trabalho é preciso considerar, primeiramente, alguns conceitos de uso habitual no estudo do modo de ação de drogas. Não há a pretensão de revisar o assunto, o que seria difícil dentro das limitações dos objetivos desta tese.

1. Métodos para caracterização e diferenciação de receptores farmacológicos

A luz da teoria dos receptores (Ariens, 1964; Furchgott, 1964 e 1972; Waud, 1968) uma droga A para produzir seu efeito (E) deve interagir com um receptor ou sistema receptor (R). Desta interação resulta o complexo droga-receptor (AR) ao qual se segue uma cadeia de eventos ($a \rightarrow n$)

que culmina com o evento final (E): contração, secreção ou outro, de acordo com o esquema:



É sabido que a concentração da droga A na vizinhança dos receptores (biofase) pode ser alterada por vãrios mecanismos, principalmente pela oxidação catalítica (Furchgott, 1955) e pela captação neuronal ou extraneuronal (Iversen, 1973).

A droga que produz o efeito ao interagir com o receptor é denominada agonista. Dois ou mais agonistas podem produzir o mesmo tipo de efeito através da interação com o mesmo receptor (R) ou com receptores diferentes (R e R').

Os receptores para um determinado grupo de drogas estão distribuídos, nas diversas espécies, em vários órgãos. Para se avaliar até que ponto os receptores de dois órgãos distintos são, ou não, do mesmo tipo, são necessários alguns procedimentos especiais (Furchgott, 1972). Como exemplo podemos citar a metodologia empregada para a classificação dos receptores adrenérgicos em α e β por Ahlquist (1948) e a posterior reclassificação dos receptores β em β_1 e β_2 por Lands e cols (1966; 1967).

Ahliquist classificou os adrenoceptores em α e β baseado, fundamentalmente, nas diferenças encontradas entre as potências relativas da noradrenalina (NA), adrenalina (A), α -metilnoradrenalina (MNA), α -metiladrenalina (MA), e isopropilnoradrenalina (INA). Ele observou que, no efeito vasoconstritor, na contração da membrana nictitante e na inibição da musculatura lisa intestinal, entre efeitos obtidos em outras preparações, os agonistas testados tinham uma potência relativa na ordem: $A > NA > MNA > MA > INA$, mas que no efeito vasodilatador e na frequência cardíaca, a potência relativa era inversa: $INA > A > MA > MNA > NA$. Baseado nessas duas relações de potência os adrenoceptores foram classificados, respectivamente, em α e β . Demonstrou-se também, posteriormente, que os efeitos devidos a interação com os α -adrenoceptores eram passíveis de serem bloqueados com o emprego dos antagonistas existentes na época (bloqueadores α), enquanto que os β -adrenoceptores só puderam ser bloqueados seletivamente cerca de 10 anos depois, com o desenvolvimento e caracterização farmacológica do DCI (dicloroisoproterenol), análogo da INA (Powel & Slater, 1958). Lands e cols (1966; 1967) seguiram um procedimento similar para avaliar as respostas devidas a interação com receptores β em órgãos isolados e in vivo. Empregando a NA, A, INA, MNA,

α -etilnoradrenalina e uma série de N-substituidos da NA, demonstraram que o aumento da frequência e força de contra o cardíaca, a lipólise e o relaxamento do intestino delgado obedeciam a uma rela o de potência distinta da observada para a bronco e vasodilata o. Dessas evidências resultou a divisão dos receptores β em β_1 e β_2 . Em consequência do exposto, podemos concluir que o principal método usado para a classifica o e diferencia o de receptores consiste na determina o da potência relativa de drogas. Furchgott (1972) preconisa o emprego de séries de agonistas e antagonistas competitivos baseado na experiência de v rios autores. Além da potência relativa de agonistas, Patil e cols (1971) postularam que o emprego de is meros ópticos dos agonistas deve fornecer uma rela o de potência constante, se o receptor envolvido na resposta farmacológica for de um único tipo. A vantagem do emprego de is meros ópticos está em minimizar as diferenças nas rela o es de potência decorrentes de processos difusionais.

Mais recentemente, Jurkiewicz e cols (1969 e 1976) sugeriram a medida dos valores de responsividade relativa de agonistas, com objetivo de se obter uma visão geral dos espectros de a o de determinados sistemas receptores em v rios  rgo os.

Outros procedimentos também foram cogitados. Em

1954 e 1966, Furchgott propôs a proteção de receptores contra a ligação irreversível (inativação) de antagonistas competitivos irreversíveis com o receptor, mediante o emprego de altas concentrações de agonista. Janis & Triggle (1971 e 1973) propuseram a medida da velocidade de recuperação do efeito após o bloqueio com "antagonistas irreversíveis de curta duração", para comparar e diferenciar receptores α -adrenérgicos.

Quando queremos distinguir entre dois receptores numa mesma preparação, tais como o noradrenérgico e o dopaminérgico no ducto deferente de rato, os procedimentos são relativamente mais fáceis. Teoricamente bastaria um antagonista competitivo reversível que bloqueasse o efeito de um agonista e não o de outro. Guardadas as devidas proporções, o procedimento seria semelhante ao usado, por exemplo, para distinguir o efeito contrátil da acetilcolina e o da noradrenalina, no ducto deferente de rato. O primeiro é bloqueado pela atropina e o segundo bloqueado pela ioimbina. Além disso ambos agonistas têm afinidades diferentes e seus receptores possuem responsabilidades relativas distintas (Jurkiewicz e cols, 1969). No caso da dopamina e noradrenalina teríamos que contar com um bloqueador específico para cada agonista ou, pelo menos, com um antagonista capaz de discriminar entre os dois agonistas. Esta discriminação se manifestaria por uma diferença entre os valores de pA_2 , o que

corresponderia a uma diferença entre as constantes de dissociação antagonista-receptor da noradrenalina e antagonista-receptor da dopamina. Segundo Furchgott (1972), uma diferença maior de 0,5 unidades entre os valores de pA_2 de um determinado antagonista (que equivale dizer uma diferença maior do que três vezes nos valores de K_B), pode ser considerada como uma evidência preliminar da existência de dois receptores. Duas ou mais diferenças de pA_2 desta mesma ordem (0,5 unidades) ou maiores, obtidas com o emprego de outros antagonistas, pode ser considerada como uma grande evidência.

O emprego de antagonistas competitivos irreversíveis pode caracterizar dois receptores se a diminuição da sensibilidade para os dois agonistas for diferente ou se for possível executar a proteção de apenas um dos receptores. Por outro lado, se os dois agonistas atuam no mesmo receptor, ambos devem proteger-se mutuamente contra a inativação irreversível produzida pelo antagonista (Furchgott, 1954 e 1966).

2. Fatores que podem influir na medida dos parâmetros farmacológicos

Em extensa revisão relacionada com a classifica-

ção de receptores adrenérgicos Furchgott, (1972) chamou a atenção sobre vários casos em que se chegou a conclusões errôneas no processo de diferenciação de receptores. Isso porque vários fatores podem influir na avaliação dos parâmetros farmacológicos dos agonistas adrenérgicos e de seus antagonistas, levando a determinação de valores diferentes dos reais. Dentre esses fatores poderíamos citar: a) captação neuronal e ou extraneuronal; b) ação indireta, através da liberação de mediador endógeno; c) ação em mais de um receptor; d) perda de sensibilidade da preparação e e) falta de equilíbrio entre a concentração do agonista ou do antagonista ao nível do receptor, na hora da medida do efeito.

2.1. Captação neuronal e extraneuronal

Os mecanismos de captação são muito ativos no sentido de remover o mediador endógeno das proximidades do receptor, armazenando-o: a) na terminação nervosa pré-sináptica, no caso da captação neuronal ou b) em outros tecidos, no caso da captação extraneuronal (Iversen, 1965; 1967 e 1973; Graefe e cols, 1977). A consequência é que a concentração do agonista exógeno, acrescentada ao banho, não corresponde a concentração efetiva ao nível da biofase. Desta forma a afinidade calculada para o agonista será sempre menor do que

a afinidade real. A determinação experimental dos valores de K_B ou pA_2 também pode ser afetada, mesmo que o antagonista não sofra captação (Furchgott, 1972).

2.2. Ação indireta

O efeito contrátil de alguns agonistas adrenérgicos, conhecidos como drogas de ação indireta (por exemplo a tiramina), não reflete a interação da droga com o seu receptor (R1), sendo dependente da liberação de um mediador endógeno que será o intermediário, atuando em um segundo receptor (R2). Este último representa o mesmo receptor que interage normalmente com drogas de ação direta. Na eventualidade de uma depleção do mediador endógeno esses agonistas não produzem nenhuma resposta contrátil ou apresentam um efeito reduzido devido a interação com o receptor R2.

2.3. Ação em mais de um receptor

O estudo de drogas adrenérgicas no intestino de coelhos, por exemplo, foi dificultado até o estabelecimento da existência de receptores α e β adrenérgicos atuando no mesmo sentido (sinérgicos) nesta preparação (Ahluquist & Le

vy, 1959). O mesmo tipo de problema ocorreu até que foi estabelecida a existência de receptores α e β adrenérgicos na artéria renal do cão (Yeh e cols, 1969). Em ambos os casos a administração de dopamina produz um efeito, resultante da interação com todos os receptores citados, impedindo a avaliação correta da afinidade. Uma outra possibilidade é que o efeito observado seja resultado da ação em um receptor excitatório e inibitório. A ação no receptor inibitório pode ser direta, como é o caso da NA (Jurkiewicz & Jurkiewicz, 1976) ou indireta, através da liberação de purinas (Burnstock, 1972; Muller & Paton, 1979). A aminofilina, que é um bloqueador purinérgico (Burnstock, 1972) poderia caracterizar este caso.

2.4. Perda de Sensibilidade

A redução da sensibilidade da preparação farmacológica no decurso do experimento é amplamente conhecida; entretanto, algumas drogas apresentam como característica o fato de produzirem uma dessensibilização mais rápida (Paiva e cols, 1977). Em geral, nestes casos, as doses altas provocam maior dessensibilização do que as menores. A determinação da afinidade do agonista e de outros parâmetros farmacológicos, como a afinidade do antagonista, para drogas com

essa característica está sujeita a erros. Assim, o delineamento experimental deve prever o emprego de uma metodologia que permita verificar, quantificar e, se possível, evitar a dessensibilização (Furchgott, 1972).

2.5. Falta de equilíbrio na interação droga-receptor

No antagonismo produzido pela fentolamina no efeito contrátil obtido com fenilefrina em tiras de aorta, foi observado que os valores de pA_2 e, por conseguinte, os de K_B , variavam de acordo com o tempo de incubação do antagonista com a preparação. Somente após um contato longo, maior do que 90 minutos neste caso particular, é que os valores de pA_2 para a fentolamina se tornavam constantes (Furchgott, 1967). Esta observação foi estendida a outros agonistas e antagonistas revelando a importância do tempo requerido para que a interação antagonista-receptor alcance o equilíbrio e forneça valores reais.

3. Procedimentos para reduzir ou anular as influências indesejáveis na medida dos parâmetros farmacológicos

Para minimizar os erros introduzidos na avaliação dos parâmetros farmacológicos usados na caracterização de

adrenoceptores, devem ser observados alguns cuidados especiais (Furchgott, 1967, 1970 e 1972). São necessários: a) bloquear os mecanismos de captação neuronal e ou extraneuronal que podem reduzir a concentração efetiva do agonista na biofase, o que se consegue com emprego de cocaína e metanefrina, respectivamente; b) certificar-se que o agonista em estudo atua diretamente no receptor e não indiretamente. Isto pode ser conseguido pelo emprego de drogas, tais como a reserpina, que diminuem o conteúdo de mediador endógeno; c) reduzir ou anular as respostas resultantes da interação com outros receptores que não o alvo de estudo, pelo emprego de antagonistas específicos; d) estabelecer um protocolo experimental que possibilite a detecção de possíveis alterações de sensibilidade da preparação no decorrer do experimento e, eventualmente, corrigir estas alterações nos cálculos que forem efetuados. Isso pode ser conseguido com: 1) emprego de duas preparações do mesmo tecido (por exemplo duas tiras da mesma aorta) ou de preparações contralaterais, onde só uma recebe o agonista enquanto a outra recebe o mesmo agonista mais o antagonista e 2) empregando a técnica de "bracketing" (Furchgott, 1967); e) aguardar tempo suficiente para alcançar as condições de equilíbrio e assim atingir o efeito máximo de cada dose de agonista ou antagonista acrescentada ao banho.

Em resumo, ao nos depararmos com diferenças nas características farmacológicas de dois agonistas, são necessários alguns procedimentos realizados com as devidas precauções, antes de se concluir a respeito dos receptores existentes em uma determinada preparação.

CAPÍTULO II

CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DO DUCTO DEFERENTE DE RATO

Waddell, em 1916, foi o primeiro investigador a publicar resultados farmacológicos obtidos em ductos deferentes de várias espécies. Em nosso meio o uso de ductos deferentes de rato na experimentação fisiológica e farmacológica remonta aos idos de 1937 quando Martins e Valle, no laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, "tiveram a idéia de estudar in vitro nesta espécie, o comportamento do canal deferente desembaraçado dos outros elementos do cordão", do que resultaram inúmeras contribuições (ver Valle, 1939; Martins, 1952 e Jurkiewicz e cols, 1977).

1. Características da transmissão adrenérgica

O ducto deferente de rato é uma estrutura inervada por fibras pós-ganglionares simpáticas originadas no plexo hipogástrico. Este está situado na vizinhança da base das vesículas seminais e dos próprios ductos deferentes (Wakade & Kirpekar, 1971). O plexo hipogástrico recebe fibras nervosas oriundas do nervo hipogástrico.

Classicamente o ducto deferente de rato é considerado como uma estrutura muscular lisa, inervada pelo simpático, onde o neurotransmissor liberado fisiologicamente pela atividade nervosa é a noradrenalina. Apesar de algumas controvérsias (Ambache e cols, 1972; Adebajo e Ambache, 1978), inúmeras evidências histomorfológicas, fisiológicas e farmacológicas apontam nesse sentido:

a - através de técnicas de histofluorescência é possível visualizar seletivamente os terminais nervosos contendo catecolaminas (van Orden III e cols, 1966; Sjöstrand & Swedin, 1976; Jurkiewicz e cols, 1977);

b - a microscopia eletrônica permite a visualização dos terminais nervosos e dos grânulos contidos no seu interior. Estes grânulos armazenam o mediador químico, no caso a noradrenalina e se assemelham aos observados em outras estruturas inervadas pelo simpático (van Orden III e cols, 1966; Bloom, 1972);

c - nos terminais nervosos simpáticos intramurais do ducto deferente de rato pode-se comprovar a existência de noradrenalina, de seus precursores, entre os quais DA, e dos enzimas envolvidos em sua síntese, através de dosagens adequadas (Wakade e cols, 1975; Graefe e cols, 1977);

d - através da preparação nervo-ducto deferente e com auxílio

de estimulação elétrica ou de drogas de ação indireta é possível promover a liberação de quantidades apreciáveis de noradrenalina para o líquido de incubação. Essa noradrenalina liberada pode ser dosada com o uso de técnicas convenientes (Langer, 1970).

e - o tratamento com bloqueadores de síntese como a α -metil-p-tirosina, acompanhado de estimulação elétrica, leva a uma redução nos níveis de noradrenalina armazenada (Swedin, 1972);

f - a desnervação cirúrgica por destruição do plexo hipogástrico e conseqüente degeneração das fibras simpáticas pós-ganglionares (Birmingham, 1970), leva a um aumento da sensibilidade para a noradrenalina e outras drogas (Lee e cols, 1975) e a uma redução no conteúdo de catecolaminas (Westfall e cols, 1975; Jurkiewicz e cols, 1977);

g - o tratamento do animal com reserpina provoca, simultaneamente, a depleção do conteúdo de catecolaminas (Lee e cols, 1975) e o aumento da sensibilidade no mesmo sentido que ocorre na desnervação cirúrgica (Westfall, 1977);

h - a presença de cocaína no líquido nutritivo do ducto deferente de rato in vitro provoca um aumento dos efeitos da noradrenalina exógena, manifestado por um deslocamento à esquerda das curvas dose-efeito, devido a sua clássica ação como bloqueadora da captação neuronal (Jurkiewicz & Jurkie

wicz, 1976).

Conclui-se que o ducto deferente de rato, por estimulação nervosa, libera noradrenalina endógena cujos receptores devem estar localizados na vizinhança das terminações nervosas. É também evidente, pelos dados referidos nos ítems f, g e h, que a integridade do tecido nervoso contribui de alguma forma para diminuir a sensibilidade da preparação à noradrenalina, possivelmente devido a presença de um mecanismo de captação neuronal.

Apesar da importância desses receptores sua natureza farmacológica ainda é sujeita a controvérsias, já que alguns autores propõem a existência, nessa preparação, de duas populações de receptores relacionadas ao sistema nervoso simpático, uma interagindo preferencialmente com a noradrenalina e a outra com a dopamina (van Rossum, 1965; Simon & van Maanen, 1971 e 1976). As evidências que indicam a existência desses e de outros receptores farmacológicos no ducto deferente de rato serão discutidos a seguir.

2. Receptores farmacológicos no ducto deferente de rato

Além de receptores adrenérgicos, existem no ducto deferente populações de receptores para outros agonistas independentes como a acetilcolina, a histamina, a serotonina

e o cloreto de bário (Jurkiewicz e cols, 1969). A caracterização de alguns destes receptores é relativamente fácil devido a existência de drogas antagonistas específicas.

Além disso, algumas drogas são capazes de produzir uma resposta contrátil no ducto deferente de rato através de uma ação indireta, pela liberação de neurotransmissor endógeno; entre essas drogas citam-se a tiramina (Carneiro e cols, 1977 e 1978) e a cocaína (Langeloh e cols, 1978).

3. Indicações da presença de receptores dopaminérgicos fora do SNC

Em 1965, van Rossum fez um estudo comparativo entre os receptores α -adrenérgicos existentes no ducto deferente de rato e os do duodeno isolado de coelho. Empregou uma série de agonistas adrenérgicos: (-)-noradrenalina, dopamina, (-)-adrenalina, (-)-fenilefrina e (-)-oxedrina; seus isômeros ópticos: (+)-noradrenalina, (+)-adrenalina, (+)-fenilefrina; (+)-oxedrina e uma série de drogas bloqueadoras adrenérgicas. Baseado nas diferenças de potência relativa dos agonistas e na potência relativa dos antagonistas em ambos os tecidos, concluiu que os receptores no intestino do coelho são mais específicos para a noradrenalina que os do ducto deferente, sugerindo que os receptores do DDR teriam maior afi

nidade pela dopamina e, portanto, seriam melhor bloqueados pelo droperidol. Entretanto, o droperidol, descrito como bloqueador dopaminérgico no SNC, também tem nítida ação bloqueadora α em vários tecidos ricos neste tipo de receptor, tais como baço de coelho, tiras de aorta, artéria central da orelha de coelho e ducto deferente de rato (van Neuten e cols, 1977). Assim a ocorrência de um virtual receptor para a dopamina no ducto deferente capaz de discriminar a nora adrenalina ficava por ser comprovada pela falta de um bloqueador específico para os efeitos da dopamina.

Nesta mesma época, McNay & Goldberg (1966) conseguiram demonstrar um efeito vasodilatador renal produzido pela dopamina, no cão, in vivo, após um tratamento com fenoxibenzamina para bloquear os efeitos resultantes da interação com o α -adrenoceptor. O emprego de DCI e pronetalol não alterou o efeito vasodilatador, excluindo o envolvimento dos receptores β -adrenérgicos. Algumas drogas como o haloperidol, o sulpiride e a metoclopramida são capazes de bloquear de forma mais ou menos seletiva o efeito vasodilatador renal devido a dopamina (Kohli e cols, 1978), caracterizando-se, assim, a existência de receptores dopaminérgicos fora do SNC.

Com as mesmas características da vasodilatação renal, foi descrito um efeito vasodilatador produzido pela dopamina no leito vascular mesentérico (Yeh e cols, 1969).

Vale ressaltar que algumas características do receptor dopaminérgico do SNC (Carlsson e cols, 1958; Iversen, 1975) coincidem com as observadas para os receptores vasculares, embora hajam discrepâncias (Goldberg e cols, 1978a, b). Assim o pimozide (R 6823), que é uma droga neuroléptica de desenvolvimento relativamente recente (Jansen e cols, 1968), é capaz de bloquear, no SNC, os receptores dopaminérgicos de forma específica e competitiva (Andén e cols, 1970). Entretanto mostra-se inativo como antagonista dopaminérgico no coração (Setler e cols, 1975) e na secreção de renina no cão (Imbs e cols, 1976), não tendo sido possível testá-lo no receptor vascular propriamente dito, devido a sua pequena hidrossolubilidade (Goldberg e cols, 1978a).

A apomorfina, que no SNC é um potente agonista dopaminérgico (Andén e cols, 1967), no receptor dopaminérgico vascular se comporta como um agonista parcial (Crumly e cols, 1976). As fenotiazinas contendo fluor na molécula (flufenazina e triflufenazina) são mais potentes do que o haloperidol em inibir os efeitos da dopamina no SNC, mas têm somente 50% da potência deste como antagonista da vasodilatação renal (Goldberg e cols, 1978a).

Tem sido investigada e constatada a presença de receptores específicos para a dopamina em outras preparações periféricas (Goldberg e cols, 1978a, b), sem que, en

tretanto, os preceitos necessários para a caracterização do receptor (Furchgott, 1972) tenham sido satisfeitos.

3.1. Indicações da presença de receptores dopaminérgicos no ducto deferente de rato

Após o trabalho pioneiro de van Rossum (1965), Simon & van Maanen (1971) observaram que a apomorfina produziu um deslocamento para a direita, dose-dependente, das curvas dose-efeito de dopamina obtidas em ductos deferentes de rato. Nas mesmas condições as curvas dose-efeito de noradrenalina não eram afetadas. Esses dados foram confirmados por Ferrini & Miragoli (1972) e estendidos à adrenalina e à fenilefrina. Estes dois agonistas também não foram antagonizados competitivamente pela apomorfina nas concentrações capazes de deslocar a dopamina. A dose de 3×10^{-5} g.ml⁻¹ deprimiu a resposta do órgão à dopamina, mas foram necessárias concentrações entre três e dez vezes maiores para reduzir o efeito máximo da noradrenalina (Simon & van Maanen, 1971). A diferença entre os valores de pd_2^1 determinados para a noradrenalina ($6,0 \pm 0,30$) e para a dopamina ($5,3 \pm 0,24$) encorajou os autores a concluir que ambos os agonistas atuam em receptores diferentes.

Posteriormente foi mostrado que a apomorfina anta

gonizava de forma semelhante os efeitos obtidos com a estimulação elétrica transmural, a tiramina e a dopamina (Simon & van Maanen, 1976), tendo sido sugerido que o neurotransmissor fisiológico no ducto deferente de rato é a dopamina e que esta atuaria através de receptores dopaminérgicos (Simon & van Maanen, 1976). Reforçando esta hipótese foi observado que, no ducto deferente, o haloperidol, cuja ação antidopaminérgica no SNC é comprovada (Andén e cols, 1970), apresenta um antagonismo tipo competitivo contra a dopamina, mas não contra a noradrenalina (Ferrini & Miragoli, 1973). Também a fentolamina, um antagonista α -adrenérgico clássico (Jurkiewicz & Jurkiewicz, 1976), apresentou maior afinidade contra os efeitos da dopamina do que contra os da noradrenalina (Simon & van Maanen, 1971, 1976; Ferrini & Miragoli, 1973).

Recentemente, Tayo (1977, 1979a), apresentou evidências que sugerem a existência de receptores dopaminérgicos pré-sinápticos no DDR. A ativação destes receptores pela dopamina reduz a amplitude da contração do ducto produzida por estimulação elétrica. Em doses adequadas a noradrenalina também produz esse efeito, mas por ação em α -adrenoceptores pré-sinápticos (Langer, 1977).

Apesar dessas informações sugerindo a existência de receptores específicos para a dopamina e propondo a me

dição dopaminérgica no ducto deferente de rato, há muitas controvérsias. Patil e cols (1973) mostraram que a apomorfina é um agonista parcial, capaz de antagonizar os efeitos da dopamina no ducto deferente de rato. Empregando a bulbocapnina, que é um antagonista seletivo da ação da dopamina no SNC (Ernst, 1969), Patil e cols encontraram valores de pA_2 semelhantes, seja contra a fenilefrina ou contra a dopamina, concluindo que o efeito produzido pelos dois agonistas se fazia através do mesmo sistema receptor. A nomifensina, que é um agonista dopaminérgico no SNC, não produz resposta contrátil no ducto deferente de rato (Tayo, 1979b).

Estudos executados no ducto deferente de camundongo por Gibson & Samini (1978), empregando a dopamina e a noradrenalina como agonistas também não conseguiram caracterizar receptores diferentes para cada agonista. Além disso o emprego de bromocriptina, um agonista dopaminérgico ao nível do SNC (Johnson e cols, 1976), não produziu resposta contrátil mas, pelo contrário, antagonizou os efeitos da noradrenalina e da dopamina (Gibson & Samini, 1978).

Assim, as evidências a favor da presença de receptores dopaminérgicos no ducto deferente de rato baseadas em a) diferentes potências relativas de agonistas e antagonistas (van Rossum, 1965); b) antagonismo competitivo da apomorfina e do haloperidol contra o efeito contrátil da dog

pamina, mas não da noradrenalina (Simon & van Maanen, 1971 e 1976; Ferrini & Miragoli, 1972 e 1973) e c) atuação da apo₂ morfina como agonista parcial (Patil e cols, 1973), ficam contrabalançadas pelas evidências em contrário, como por exemplo: a) a determinação de valores de pA_2 iguais para a fentolamina, seja com emprego de noradrenalina ou dopamina; (Patil e cols, 1973; Gibson & Samini, 1978); b) os efeitos da dopamina e da noradrenalina são antagonizados pela bromocriptina, fornecendo valores de pD_2' iguais (Gibson & Samini, 1978); c) a ausência de especificidade do antagonista droperidol (van Neuten e cols, 1977) e d) a ausência de resposta contrátil com o emprego de agonistas dopaminérgicos como a nomifensina (Tayo, 1979b) e a bromocriptina (Gibson & Samini, 1978).

Ainda deve ser acrescentado que os cuidados preconizados por Furchgott (1972) para a classificação de adrenocceptores não foram observados nos experimentos de van Rossúm (1965) e de Simon & van Maanen (1976).

4. Objetivos específicos

Em vista dos dados acima e de nossos objetivos gerais, já revelados no prólogo da presente dissertação, os objetivos específicos do nosso trabalho compreenderam:

- a - medir algumas características farmacológicas dos efeitos contráteis induzidos pela dopamina e noradrenalina no ducto deferente de rato;
- b - verificar a influência de fatores capazes de alterar a resposta farmacológica a esses agonistas, tais como captação neuronal, captação extraneuronal, liberação de mediador endógeno e presença de dessensibilização;
- c - verificar o efeito de algumas drogas descritas como agonistas e antagonistas dopaminérgicos, tais como a apomorfina, o haloperídol e o pimozide;
- d - verificar se o bloqueio de receptores α -adrenérgicos por fenoxibenzamina, que é um antagonista irreversível, permite evidenciar a presença de uma população de receptores específicos para a dopamina;
- e - estudar o comportamento dos agonistas, dopamina e noradrenalina, frente a alguns antagonistas competitivos, lembrando o efeito dual descrito por Jurkiewicz & Jurkiewicz (1976) para a noradrenalina e adrenalina frente a antagonistas α -adrenérgicos competitivos clássicos.

MATERIAL E MÉTODOS

CAPÍTULO III

1. Aparelhagem

A figura 1 mostra esquematicamente a aparelhagem empregada, já conhecida por aqueles que se dedicam ao estudo da Farmacologia.

Consiste de uma cuba de vidro onde se localiza a câmara muscular com 10 ml de volume útil e uma serpentina helicoidal. Uma bomba de circulação de água, com aquecimento regulável por termostato, uma bomba de ar, frasco de Mariotte, haste de vidro para a aeração do líquido nutritivo e fixação do órgão, alavanca inscritora e quimógrafo completam a relação.

2. Líquido nutritivo

Foi utilizado o líquido de Tyrode modificado com a seguinte composição (mM): NaCl 138,0; KCl 5,7; CaCl₂ 1,8; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 15,0 e glicose 5,5 em água destilada (Picarelli e cols, 1962). Essa solução nutritiva era preparada imediatamente antes dos experimentos, a partir de uma solução estoque composta de (g/l): NaCl 160,0; KCl 8,4 e

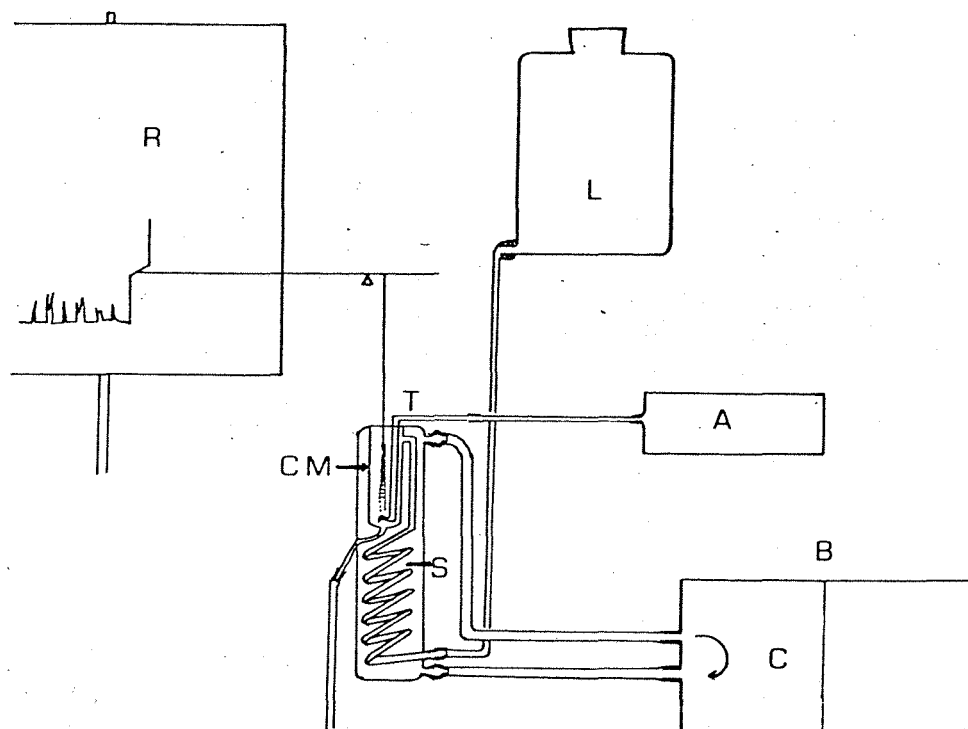


FIGURA 1. Representação esquemática da aparelhagem utilizada na experimentação farmacológica com músculo isolado. L= frasco de Mariotte com líquido nutritivo; A = bomba de ar; B = bomba de circulação; C = aquecimento, ajustável com termostato; S = serpentina; CM = câmara muscular onde se monta a preparação fixada na haste T, por onde se efetua a aeração. O registro é feito em papel esfumaçado (R) fixado em tambor de quimógrafo, através de alavanca isotônica.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,3, conservada sob refrigeração a 4°C . Tomavam-se 50 ml da solução estoque para cada litro de líquido nutritivo acrescentando-se os demais componentes (fosfato, bicarbonato e glicose) no momento desta diluição.

3. Animais

Foram usados ratos albinos, machos, adultos, da colônia 2BAW, com idade entre 5 e 6 meses e peso entre 250 e 320 gramas. Os animais eram sacrificados com pancada na região occipito-cervical e exanguinados por seccionamento dos vasos cervicais.

4. Ducto deferente "in vitro"

Ambos os ductos eram removidos, limpos dos tecidos adjacentes e a luz lavada com líquido nutritivo. A seguir eram montados na câmara muscular contendo líquido nutritivo aerado e aquecido a 30°C .

Decorridos de 30 a 60 minutos, tempo necessário para o relaxamento e a estabilização do ducto na solução nutritiva, iniciava-se o experimento.

5. Registros gráficos

Registraram-se as contrações isotônicas dos ductos deferentes submetidos a uma carga de 1 g e com 6 vezes de ampliação.

A inscrição foi feita em papel esfumado com auxílio de quimógrafo e de alavanca isotônica de inscrição tangencial.

6. Curvas dose-efeito

Foram executadas curvas dose-efeito (D-E) completas, a intervalos regulares de 30 a 35 minutos, pela técnica das doses cumulativas conforme van Rossum & van den Brink (1963) e van Rossum (1963). Por esta técnica a concentração da droga no líquido que banha o órgão vai crescendo, passo a passo, numa razão de 3,0 ou 3,3, sem lavar o órgão após cada dose. Iniciava-se com pequenas concentrações de agonista, incapazes de provocar um efeito mensurável, até alcançar doses altas às quais não se seguia aumento de efeito.

Em geral foram obtidas 3 ou 4 curvas D-E completas para o agonista em estudo. Se estas eram reproduzíveis, ou seja, semelhantes entre si com referência ao efeito máximo e a afinidade, passava-se a obter as curvas D-E experi

mentais. Em alguns casos houve um controle adicional que consistiu no bloqueio de captação neuronal com cocaína. Uma ou duas curvas D-E para o agonista eram obtidas nessas condições (curvas d e e na figura 9 dos resultados). Em sequência acrescentava-se ao banho, se fosse o caso, um novo fármaco (por exemplo um antagonista) na menor dose escolhida. Na presença de cocaína e da dose eleita de antagonista nova curva D-E era obtida. Assim sucessivamente até a maior dose de antagonista empregada. Em média foram usadas três doses crescentes em cada experimento. Cada dose de antagonista bem como a cocaína e a metanefrina, sempre foram incubados durante 30 minutos antes de se iniciar a construção da curva dose-efeito.

7. Método "bracketing"

A técnica de "bracketing", proposta por Furchgott (1967), designa um dos métodos empregados no estudo do mecanismo de ação de drogas para minimizar as diferenças entre agonistas, decorrentes de alterações de sensibilidade da preparação farmacológica. O método consiste na alternância de curvas D-E de dois agonistas na mesma preparação. Assim as curvas D-E obtidas ficam precedidas e sucedidas de curvas do

mesmo agonista. A figura 6, em resultados, apresenta um experimento onde se empregou esta técnica.

O método de "bracketing" foi empregado: a) na determinação da atividade intrínseca (α) e efeito máximo; b) na determinação da potência relativa de agonistas; c) no estudo do antagonismo competitivo e determinação do pA_2 e d) na proteção de receptores.

8. Curvas dose-efeito médias

Em experimentos executados conforme descrito acima, era determinada a curva D-E média para cada agonista em estudo e cada condição experimental.

Essa determinação consistia em: a) relacionar em tabelas o efeito contrátil, em milímetros, com as doses em concentração molar; b) transformar os efeitos parciais em porcentagem do efeito máximo de cada curva e c) efetuar a média. Para exemplificar, no experimento mostrado na figura 9, das três curvas iniciais de dopamina (a, b e c) resulta uma curva média, controle para o bloqueio de captação com cocaína. Das duas curvas de dopamina na presença de cocaína (d e e) resulta uma curva média, controle para as obtidas na presença de antagonista (curvas f em diante). Os valores médios eram tabelados em lotes experimentais do mesmo grupo

sendo somados os efeitos para as mesmas doses. Calculava-se a média e o erro padrão da média.

Em papel milimetrado lançava-se, em abcissa, o logaritmo das doses e, em ordenada, o efeito. Este pode ser representado: a) em porcentagem da resposta máxima da curva dose-efeito controle ou b) em porcentagem da resposta máxima de cada curva dose-efeito.

9. Medidas farmacológicas efetuadas

9.1. Afinidade do agonista (pD₂)

Os valores de pD₂ foram determinados pelo método gráfico a partir da dose do agonista que provoca 50% do efeito máximo (ED50), para cada curva D-E. Utilizou-se a seguinte fórmula:

$$pD_2 = \log \frac{1}{ED50} = -(\log ED50)$$

Para determinar a ED50 é preciso: a) construir a curva D-E completa; b) tabelar os dados, como foi descrito no item ⁸ 11, para obtenção das curvas D-E médias; c) traçar gráficos em papel milimetrado relacionando na abcissa, os logarítmos das doses e, na ordenada, o efeito (em milímetros

ou em porcentagem do efeito máximo) e d) calcular a ED50 pela intersecção, no eixo das abcissas, da perpendicular tirada da curva no ponto correspondente a metade do efeito máximo.

9.2 Atividade intrínseca (α)

A atividade intrínseca é expressa pela relação entre os efeitos máximos obtidos na preparação por distintos agonistas que atuam através do mesmo sistema receptor, de acordo com a equação (Ariens, 1964, van Rossum, 1963):

$$\alpha = \frac{E_{Am}}{E_m}$$

onde E_{Am} é o efeito máximo produzido por um agonista, e E_m é o efeito máximo da preparação produzido através do mesmo sistema de receptores pelo agonista de referência, chamado Agonista Total. Para o sistema α -adrenoceptor do ducto deferente de rato o agonista total é a noradrenalina.

9.3 Potência relativa (DR)

A potência relativa entre a noradrenalina e a dopamina foi avaliada pela medida do antilogaritmo da dife

rença dos valores de pD_2 ou pela relação entre as ED50. Arbitrariamente a potência da dopamina foi escolhida como referência tendo, em consequência, valor unitário.

$$DR = \text{antilog} (pD_2 \text{ da NA} - pD_2 \text{ da DA}) = \frac{ED50 \text{ DA}}{ED50 \text{ NA}}$$

Em outros casos foi medida a potência relativa para a dopamina ou noradrenalina em duas condições experimentais diferentes: uma era a controle e a outra era a presença de um antagonista ou bloqueador de captação, etc.

9.4 Afinidade do antagonista (pA_2)

Os valores de pA_2 foram determinados através da análise de regressão linear a partir dos dados lançados no gráfico proposto por Schild (1957), com auxílio da equação:

$$\log (DR - 1) = \log (B) - \log K_B$$

onde DR é a relação de potência; (B) é a concentração molar do antagonista em equilíbrio com o receptor e K_B é a constante de dissociação do complexo antagonista-receptor. Quando a relação de potência (DR) for igual a duas unidades teremos: $-\log (B) = -\log K_B$. Este último, por definição constitui o pA_2 .

Lançando-se em gráfico cartesiano os valores de $\log (DR - 1)$ na ordenada e $-\log (B)$ na abcissa, os pontos distribuem-se ao longo de uma reta cuja inclinação deve ser próxima de 1,0 se o antagonismo for do tipo competitivo (Arunlakshana & Schild, 1959; Furchgott, 1972). O prolongamento da reta, na intersecção com o eixo "x" (onde estão lançados os valores logarítmicos negativos da concentração do antagonista), nos fornece o valor de pA_2 .

9.5 Afinidade do antagonista não-competitivo (pD_2')

Pode ser calculada a partir de uma modificação no gráfico de Schild (Ariens & van Rossum, 1957). Esta modificação consiste em relacionar o $\log (ER - 1)$ na ordenada, onde ER é a relação dos efeitos máximos obtidos na ausência e na presença do antagonista, respectivamente. Pode-se de mostrar que:

$$\log (ER - 1) = \log (B') - \log K_B'$$

onde (B') é a concentração do antagonista não competitivo, em molaridade e K_B' é a constante de dissociação deste antagonista não-competitivo. Por convenção: $-\log K_B'$ é o pD_2' .

10. Pesquisa de taquifilaxia

A possibilidade da presença de taquifilaxia para a dopamina foi estudada mediante a obtenção de curvas dose-efeito cumulativas para este agonista a intervalos constantes de 30 a 35 minutos, obtendo-se pelo menos seis curvas por preparação. A noradrenalina foi empregada como controle em ductos contralaterais.

11. Tratamento com reserpina

Nos ratos que receberam reserpina ($7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) o tratamento foi iniciado 72 horas antes do sacrifício, administrando-se $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Serpasol, via intraperitôniais às 72, 48 e 24 horas antes do experimento. Este esquema se mostrou eficiente na depleção de catecolaminas endógenas:

- a - os ratos sempre mostravam sinais de "reserpinização" com intensa diarreia, depressão profunda, sonolência e redução de peso;
- b - as dosagens espectrofotofluorimétricas de noradrenalina pelo método de Anton & Sayre (1962), feitos em ductos de ratos submetidos ao mesmo tratamento com reserpina, revelaram concentrações de noradrenalina da ordem de $0,11 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{g/g}$ (n=6) em comparação com $9,25 \pm 0,81 \text{ } \mu\text{g/g}$ (n=3) nos ductos

deferentes de ratos controles que receberam solução fisiológica; e

e os ductos deferentes de ratos tratados com reserpina e montados in vitro como descrito anteriormente, não responderam à tiramina (ver item a seguir).

11.1 Teste de depleção de noradrenalina endógena

Sendo a tiramina um agonista de ação predominantemente indireta (Trendelenburg, 1972) foi utilizada para avaliar os estoques liberáveis de noradrenalina endógena nos ductos deferentes montados in vitro, provenientes de ratos tratados com reserpina e dos controles.

Foi utilizada uma dose simples de 3×10^{-4} M (52 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) administrada no início do experimento, logo após o período de estabilização do ducto. Em alguns casos a mesma dose foi repetida ao final do experimento. Os ductos deferentes de ratos tratados com reserpina que produziam resposta contrátil significativa eram excluídos, ainda que o efeito observado pudesse ser atribuído a ação direta sobre o α -adrenoceptor, devido a elevada dose de tiramina empregada (Furchgott e cols, 1963; Krzanowski & Woodbury, 1966).

12. Proteção de receptores

A técnica de proteção de receptores contra o bloqueio produzido pela fenoxibenzamina, foi executada com os seguintes agonistas: dopamina, noradrenalina, fenilefrina e acetilcolina e com a apomorfina e o pimozide, que no ducto deferente se revelaram antagonistas não-competitivos.

Nos experimentos com proteção, obtinham-se um ou dois pares de curvas D-E, completas e reproduzíveis, com algum dos agonistas mencionados. A concentração de agonista que produzia o efeito máximo na última curva D-E era mantida por mais 5 minutos e, sem lavar, acrescentava-se a fenoxibenzamina, 3×10^{-8} M, por 5 minutos, lavando-se, então, a preparação três ou quatro vezes.

Quando empregamos apomorfina ou pimozide, a droga era incubada 5 minutos antes da adição de fenoxibenzamina.

Nos experimentos controles, sem proteção, a conduta experimental era similar, exceto que o agonista era lavado após as curvas D-E controles e a fenoxibenzamina incubada, então, na ausência deste.

Para avaliar o grau de proteção do bloqueio produzido pela fenoxibenzamina, comparamos os efeitos máximos das curvas D-E obtidas após o bloqueio (com ou sem proteção) com as curvas obtidas antes de incubar o antagonista e as representamos em porcentagem.

13. Drogas

Foram usadas as seguintes drogas:

Acetilcolina (Acetylcholine chloride); Adrenalina (L-epinephrine bitartrate); Dopamina (3,hydroxy-tyramine hydrochloride); Fenilefrina (L-phenylephrine); Noradrenalina ((-)-arterenol hydrochloride); Papaverina (papaverine hydrochloride) e Tiramina (tyramine-hydrochloride) da Sigma Chemical Co., EE.UU.

Apomorfinina ((-)-apomorphine-HCl); Cocaína ((-)-cocaine hydrochloride) e Ioimbina (yohimbium chlorid) da Merck, Darmstadt, Alemanha.

Haloperidol e Pimozide (R 6238) da Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil.

Aminofilina (teofilina composta com etilenodiamina) da Wander-Sandoz, São Paulo, Brasil.

Metanefrina (DL-metanephrine hydrochloride) da Man Research Laboratories, EE.UU.

Fenoxibenzamina da Smith Kline and French, Filadélfia, EE.UU.

Reserpina (Serpasol) da Ciba-Geygi Química SA. - São Paulo, Brasil.

Os demais sais utilizados: a) na preparação do lí

quido nutritivo; b) como conservante das soluções estoque (EDTA, HCl, metabissulfito sódico e ácido ascórbico) e c) como solventes (etanol e HCl) eram reagentes P.A. da Merck do Brasil ou da J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.Y. EE.UU.

As soluções estoque de catecolaminas eram dissolvidas em ácido clorídrico 0,01 N contendo EDTA (10 µg/ml) ou ácido ascórbico (50 µg/ml), para retardar a oxidação por traços de metais (Furchgott, 1955) e conservadas congeladas até o momento de sua diluição e uso. A apomorfina, a fenoxibenzamina e o pimozide eram preparados no dia da utilização a partir dos respectivos sais. A apomorfina era dissolvida em metabissulfito sódico 0,05% (Patil e cols, 1973), a fenoxibenzamina e o pimozide em etanol acidificado. As diluições posteriores, da ordem 10^{-1} M para 10^{-5} M (10.000 x), eram feitas em água destilada.

14. Estatística

Os valores de pd_2 , atividade intrínseca, efeito máximo, pa_2 e pd_2^1 obtidos para os agonistas ou antagonistas em estudo foram comparados e as diferenças testadas com teste "t" de Student para amostras não pareadas (Sned-

cor & Cochram, 1967). No estudo da presença de taquifilaxia foi usado o teste "t" pareado (Snedecor & Cochram, 1967). A ceitamos como estatísticamente significativo o nível mínimo de 5%, mas indicamos, quando for o caso, o nível de significância alcançado.

Os valores de pA_2 , pD_2^i e inclinação da reta foram determinados com emprego da análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados (Snedecor & Cochram, 1967).

Todos os nossos resultados são apresentados pela média e erro padrão da média (epm).

RESULTADOS

CAPÍTULO IV

A figura 2 mostra curvas log dose-efeito cumulativas médias para o efeito contrátil da dopamina (DA) e noradrenalina (NA), no ducto deferente de rato. Quando se aplica o antagonista dopaminérgico haloperidol, há necessidade de se aumentarem as doses de DA e NA para a obtenção de efeitos equivalentes aos obtidos na ausência de agonista. No entanto o deslocamento para a direita produzido pela dose de 3×10^{-7} M de haloperidol foi maior para a curva de DA do que para a NA. Essa diferenciação entre os efeitos dos dois agonistas, produzida pelo haloperidol, poderia indicar a presença de receptores dopaminérgicos no ducto deferente de rato. No entanto, essa experiência não nos permite eliminar a hipótese da presença de distorções devidas a alguns dos fatores discutidos no capítulo II. Esses fatores só pode

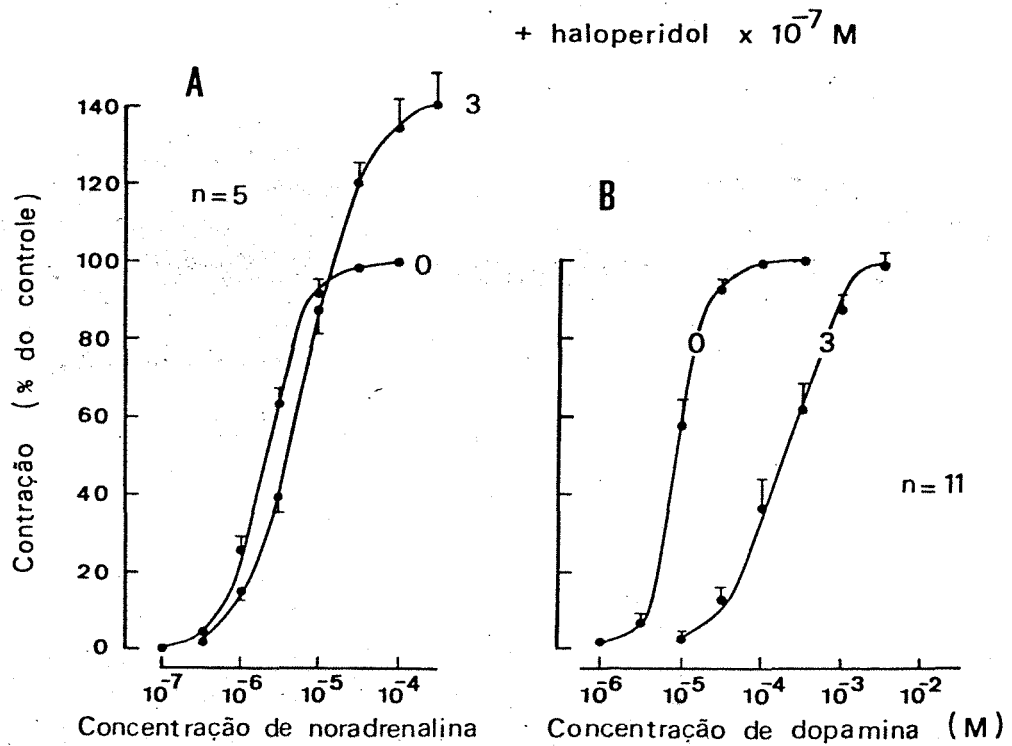


FIGURA 2. Curvas log dose-efeito cumulativas médias para a NA, em A, e para a DA, em B, obtidas em ductos deferentes in vitro, na ausência (0) e na presença de 3×10^{-7} M de haloperidol. Pode-se verificar que a NA sofreu um antagonismo discreto, mas o efeito máximo está aumentado. Com a DA, en tretanto, ocorreu um antagonismo maior e não foi observada alteração significativa do efeito máximo. As barras verticais representam um erro padrão da média.

rão ser evidenciados, ou não, através de uma análise quantitativa de nossos resultados obtidos dentro dos critérios de lineados no ítem 3 daquele capítulo.

1. Comparação entre os efeitos da DA e NA na ausência de antagonistas competitivos

1.1. Em condições normais

Foram consideradas condições normais aquelas em que as curvas dose-efeito eram obtidas em ductos deferentes com o agonista considerado sem adição de qualquer outra droga e sem qualquer tratamento do animal doador.

1.1.1. Afinidade

Em condições normais, a NA foi 4,27 vezes ($0,63 \pm 0,02$ unidades de pD_2) mais potente do que a DA ($n=57$) nas nossas condições experimentais, como podemos verificar na tabela 1.

1.1.2. Atividade intrínseca relativa

O efeito contrátil máximo da DA, no ducto deferente de rato foi semelhante ao obtido com a NA, o que lhes con

TABELA 1. Parâmetros medidos em curvas dose-efeito cumulativas para noradrenalina (NA) e dopamina (DA)

Parâmetros	NA	DA
n	57	57
$pD_2 \pm \text{epm}$	$5,66 \pm 0,02$	$5,03^{**} \pm 0,02$
$\log(DR)$	$0,63 \pm 0,02$	0
DR	4,27	1,00
$E_{\text{max}} \pm \text{epm}$ (mm)	$98,28 \pm 2,68$	$99,45 \pm 2,56$
α	1,00	$1,03 \pm 0,02$

n = número de experimentos

** p < 0,01 em relação a NA

α = atividade intrínseca relativa

ferre a mesma atividade intrínseca (α) partindo-se do presuposto que atuem no mesmo receptor. Na tabela 1 são apresentados os valores médios de efeito máximo e o valor de α para a DA e a NA obtidos em 57 experimentos.

1.1.3 Presença de taquifilaxia

A ocorrência de dessensibilização para a DA foi pesquisada em curvas D-E cumulativas. Em algumas preparações a dessensibilização foi muito evidente (figura 3) enquanto noutras não. Os resultados médios de pd_2 e efeito máximo estão representados na tabela 2. Podemos notar que a variação máxima de pd_2 para a DA foi da ordem de 0,16 unidades de pd_2 (5,10 - 4,94), enquanto o efeito máximo se reduziu em cerca de 15%.

Em contraste com os resultados obtidos com a DA, a NA não apresentou taquifilaxia, seja sob a forma de queda do efeito máximo, seja em termos de pd_2 , embora tenha apresentado uma queda gradativa de efeito, não alcançou nível significicante ($p > 0,05$) até a 6ª curva D-E investigada.

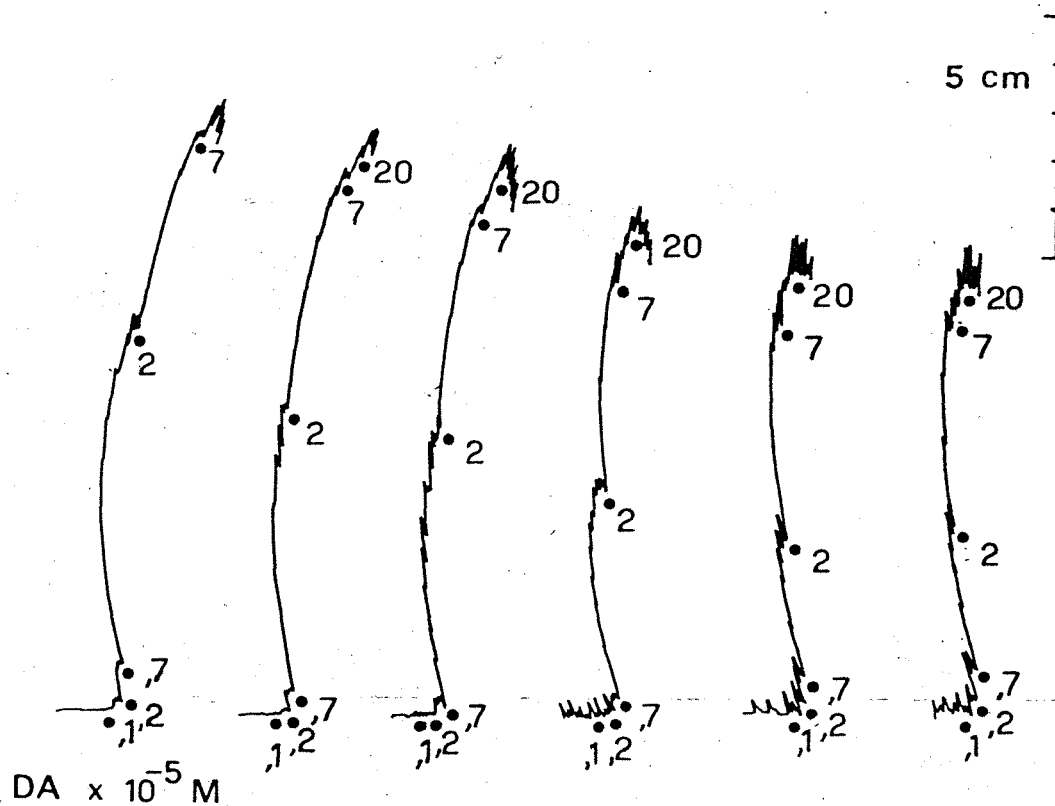


FIGURA 3. Curvas dose-efeito cumulativas típicas obtidas no ducto deferente de rato, com o emprego de dopamina (DA) a 30-35 minutos de intervalo. Pode-se notar que houve uma gradativa dessensibilização da preparação, tanto no que se refere ao efeito máximo, como em relação a afinidade aparente.

TABELA 2. Valores de pD_2 e efeito máximo ($E_{m\acute{a}x.}$) para noradrenalina (NA) e dopamina (DA) e potência relativa (DR NA/DA) obtidas de curvas dose-efeito cumulativas em ductos deferentes de ratos a intervalos de 30 minutos. Média de 4 experimentos para a NA e de 8 para a DA.

curva D-E	NA		DA		DR NA/DA
	pD_2	$E_{m\acute{a}x.}$ (%)	pD_2	$E_{m\acute{a}x.}$ (%)	
1 ^a	5,56 ± 0,06	100	5,10 ± 0,04	100	2,9
2 ^a	5,54 ± 0,04	98,3 ± 5,6	5,11 ± 0,04	99,0 ± 2,2	2,7
3 ^a	5,50 ± 0,05	99,0 ± 4,7	5,07 ± 0,03	93,9 ± 2,7	2,7
4 ^a	5,53 ± 0,05	98,0 ± 8,0	5,00* ± 0,05	88,5 ± 4,1	3,4
5 ^a	5,53 ± 0,08	97,3 ± 7,8	4,96** ± 0,05	85,5** ± 4,1	3,7
6 ^a	5,55 ± 0,05	90,3 ± 2,8	4,94** ± 0,07	85,3** ± 4,2	4,1

± erro padrão da média

* $p < 0,05$ em relação à primeira curva D-E

** $p < 0,01$ em relação à primeira curva D-E

1.2. Efeitos da DA e NA após depleção dos depósitos endógenos de catecolaminas por reserpina

Nos ductos deferentes de ratos reserpínizados a DA produziu efeitos máximos comparáveis aos da NA (tabela 3). Foi possível observar, também, que os efeitos máximos nessas preparações foram maiores do que os correspondentes em controles não reserpínizados (tabela 3).

Com relação a afinidade, não houve uma alteração significativa para a DA, mas a NA sofreu uma potenciação discreta, porém significativa, de cerca de 2 vezes. Como resultado, alterou-se a relação de potência entre os dois agonistas (tabela 3): a NA passou a ser 12,88 vezes mais potente do que a DA.

1.3. Efeitos da DA e NA após bloqueio da captação neuronal por cocaína

Na tabela 4 são representados os valores de pd_2 para a DA e a NA obtidos em curvas D-E cumulativas na ausência (controle) e na presença de cocaína 10^{-5} M. Podemos observar que a DA foi potenciada discretamente, da ordem de 2 vezes (0,34 unidades de pd_2), enquanto que com a NA se observou uma potenciação de 39,8 vezes (1,60 unidades de pd_2). Assim a relação de potencia NA/DA passou a ser de 97,7 vezes ou

TABELA 3. Parâmetros medidos em curvas dose-efeito cumulativas para noradrenalina (NA) e dopamina (DA) em ductos deferentes de ratos controle (não tratados) e de tratados com reserpina ($7,5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Média de 5 experimentos para cada condição experimental e cada agonista.

	Controle (não tratado)		Tratado com reserpina	
	NA	DA	NA	DA
pD_2	$5,50 \pm 0,09$	$4,80 \pm 0,11^{(a)}$	$5,80 \pm 0,02^{(b)}$	$4,62 \pm 0,05^{(a)}$
$\log(DR)$	$0,71 \pm 0,09$	0	$1,11 \pm 0,06^{(c)}$	0
DR	5,12	1,00	12,88	1,00
$E_{\text{máx.}}$ (mm)	$87,6 \pm 5,7$	$97,4 \pm 7,4$	$117,8 \pm 8,3^{(d)}$	$112,4 \pm 9,3$

± erro padrão da média

(a) $p < 0,01$ comparado com o respectivo valor obtido para NA

(b) $p < 0,05$ comparado com NA controle

(c) $p < 0,01$ comparado com $\log(DR)$ controle

(d) $p < 0,01$ comparado com NA controle

TABELA 4. Valores de pD_2 para noradrenalina (NA) e dopamina (DA) calculados de curvas dose-efeito cumulativas executadas na presença de cocaína (COC) ou metanefrina (MN) e seus respectivos controles. Apresentadas, também, as relações de potência entre NA e DA (DR NA/DA) e entre o valor experimental e o controle (DR COC ou MN/controle).

	NA	DA	DR (NA/DA)
Controle	5,67 ± 0,04	4,94 ± 0,03	5,4
Presença de COC $10^{-5}M$	7,27 ± 0,06** (23)	5,28 ± 0,04 (18)	97,7
DR COC/controle	39,8	2,2	
Controle	5,69 ± 0,03	5,06 ± 0,07	4,3
Presença de MN $3 \times 10^{-5}M$	6,04 ± 0,07** (4)	5,03 ± 0,07 (4)	10,2
DR MN/controle	2,2	0,9	

± erro padrão da média

(n) número de experimentos

** $p < 0,01$ comparado com o respectivo controle

1,99 unidades de pD_2 na presença de cocaína (tabela 4).

A potenciação da DA e NA, produzida pela cocaína, também pode ser observada nas figuras 10 e 13 através do deslocamento para a esquerda das curvas log D-E médias.

1.4. Efeitos da DA e NA após bloqueio da captação extraneuronal por metanefrina

Na figura 4 temos a representação gráfica das curvas D-E médias e na tabela 4 estão apresentados os valores de pD_2 obtidos na presença do bloqueador de captação extraneuronal para a DA e NA e seus respectivos controles. Podemos observar que a curva D-E de DA praticamente não foi afetada pela presença da metanefrina (MN), obtendo-se valores de pD_2 semelhantes, mas para a NA tivemos uma potenciação discreta, mas significativa ($p < 0,01$), manifestada pelo deslocamento à esquerda da curva D-E (figura 4). Essa diferença no comportamento de DA e NA frente a MN resultou na modificação da potência relativa entre os agonistas (tabela 4).

1.5. Efeitos da DA e NA após bloqueio de receptores purinérgicos com aminofilina

As curvas D-E médias de DA e NA obtidas na presen-

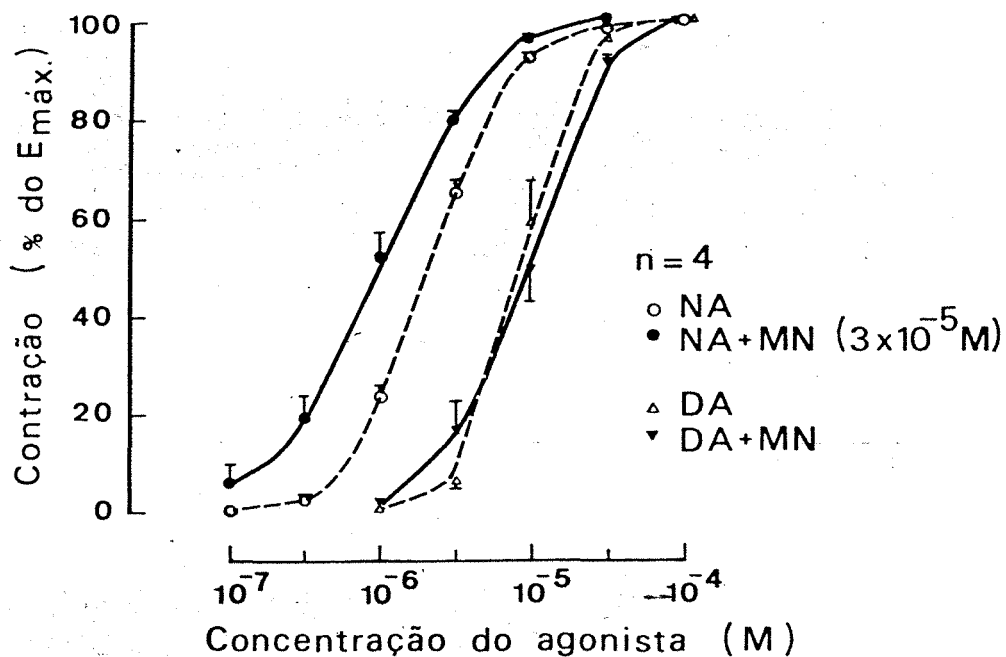


FIGURA 4. Curvas log dose-efeito médias obtidas antes (linha tracejada) e na presença de metanefrina (MN) 3×10^{-5} M, incubada 30 minutos antes da obtenção da curva. A NA sofreu uma discreta potenciação enquanto a DA permaneceu virtualmente inalterada. As barras verticais representam um epm.

ça de aminofilina estão representadas na figura 5. Foi possível verificar que os efeitos de ambos agonistas sofreram alterações que se coadunam com aquelas descritas para o antagonismo não-competitivo. Os valores de pd_2^1 determinados a partir destes dados foram $2,95 \pm 0,05$ contra a NA (n=3) e $3,07 \pm 0,02$ frente a DA (n=3), que não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

2. Comparação entre os efeitos da DA e NA na presença de antagonistas competitivos

Foram empregados: ioimbina, por ser um antagonista α -adrenérgico clássico; haloperídol e pimozide, por suas ações contra os efeitos dopaminérgicos periféricos; apomorfina por seu efeito dopaminérgico ao nível do SNC e sua ação antidopaminérgica no ducto deferente. Como controle para o antagonismo não-competitivo utilizamos a papaverina.

2.1. Presença de antagonista α -adrenérgico, ioimbina

Registros de curvas D-E cumulativas típicas para o efeito contrátil da DA e NA no DDR, na presença de ioimbina, podem ser observadas na figura 6. Podemos verificar que a ioimbina foi mais eficiente em antagonizar os efeitos da DA

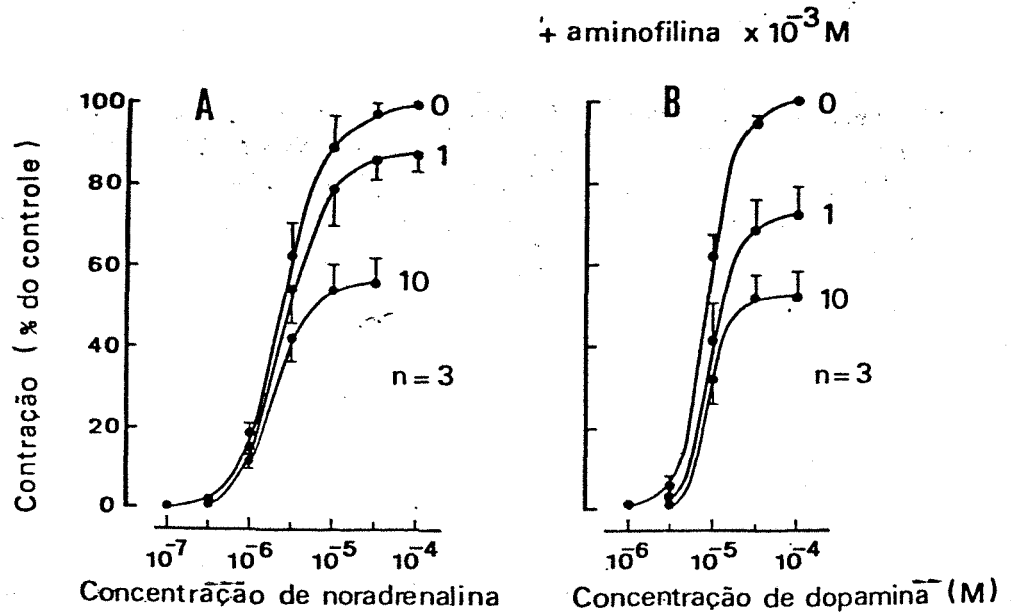


FIGURA 5. Curvas log dose-efeito para a NA, em A, e DA, em B, obtidas na presença do bloqueador purinérgico, aminofilina, nas doses indicadas e seus respectivos controles (0). A aminofilina se comportou como um antagonista não-competitivo frente a ambos agonistas. As barras verticais representam um e.p.m.

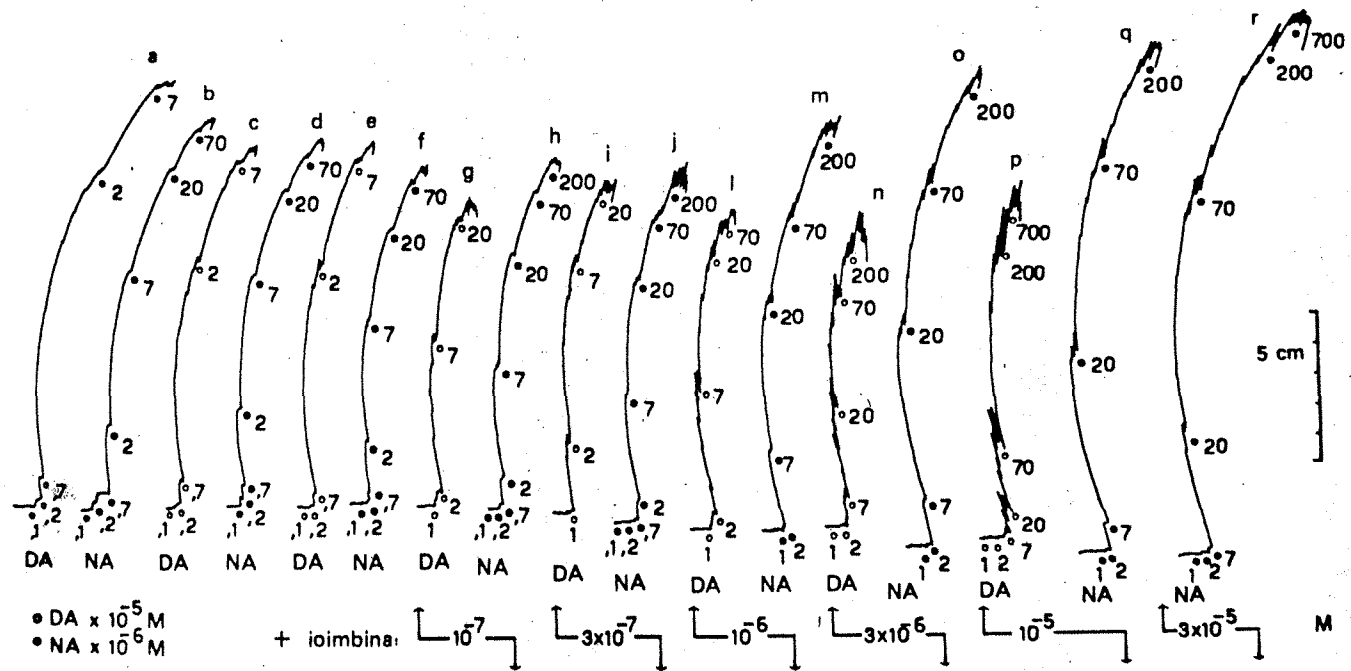


FIGURA 6. Curvas dose-efeito cumulativas obtidas com emprego de dopamina (DA) e noradrenalina (NA) pela técnica de "bracketing", no ducto deferente de rato in vitro. Nesta preparação foram obtidas 17 curvas D-E completas com intervalos de 30 minutos nos quais, a partir da curva g, foi incubada ioimbina na dose indicada. Podemos observar: a) o efeito da DA foi virtualmente igual ao da NA nas curvas controle (c, d e e); b) na presença de ioimbina ocorreu um gradativo aumento da resposta máxima da NA, enquanto que a DA permaneceu relativamente estável.

do que os da NA. A mesma observação havia sido feita com o emprego do haloperidol (ver figura 2) e, a exemplo deste, a ioimbina também foi capaz de aumentar o efeito máximo da NA mas não o da DA (tabela 5, figura 6). As duas alterações podem ser visualizadas melhor na figura 7, onde estão representadas as curvas log D-E médias para os dois agonistas frente a ioimbina, obtidas em experimentos similares aos apresentados na figura 6. A ioimbina, mesmo sendo um antagonista α -adrenérgico produziu um deslocamento paralelo das curvas D-E de DA, que foi maior do que o observado para a NA. A pequena queda do efeito máximo da DA, na presença de ioimbina, não alcança níveis significativos se forem efetuadas correções para compensar a queda devida a taquifilaxia referida no item 1.1.3.. A partir das curvas D-E apresentadas na figura 7 foram determinados os valores de pA_2 e de inclinação segundo o método gráfico de Schild. Foram lançados em ordenadas cartesianas os valores $\log (DR - 1)$ em função da concentração de antagonista, obtendo-se duas retas (figura 8). A reta de menor inclinação foi obtida para a NA enquanto que a DA apresentou valores de inclinação que se aproximam da unidade, dentro da faixa de doses de antagonista utilizada. A determinação dos valores de pA_2 , através da análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados, mostrou valores para a DA diferentes dos obtidos para a NA (tabela 6).

TABELA 5. Efeito máximo ($E_{m\acute{a}x.}$) e atividade intrínseca (α) para noradrenalina (NA) e dopamina (DA) medidos em curvas dose-efeito cumulativas no ducto deferente de rato, antes (controle) e na presença de ioimbina. Média de 5 experimentos conduzidos pelo método de "bracketing".

	Agonista	$E_{m\acute{a}x.}$ (mm)	α
Controle	NA	119,5 ± 6,1	1,00
	DA	119,5 ± 6,8	1,00 ± 0,03
Ioimbina	NA	156,2 ± 8,2 ^{**}	1,00
	DA	107,8 ± 6,2 ⁺⁺	0,69 ± 0,03 ^{**}

± erro padrão da média

** $p < 0,01$ comparado com o respectivo controle

++ $p < 0,01$ comparado com o valor obtido para NA mais ioimbina

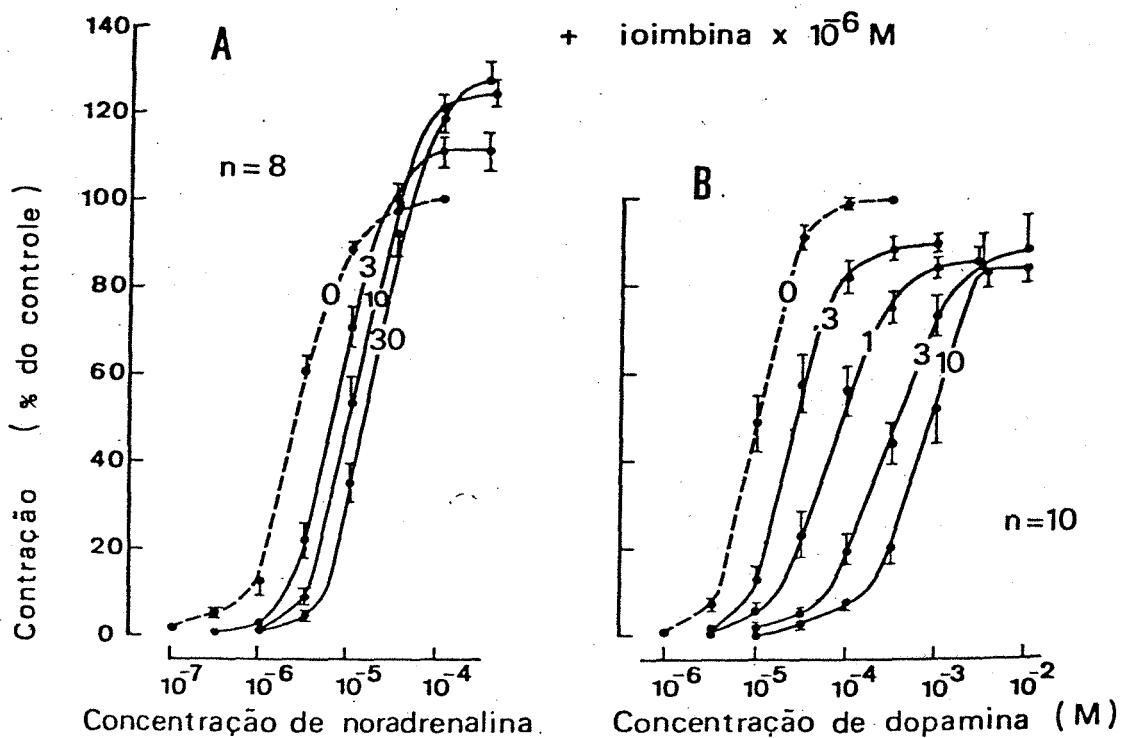


FIGURA 7. Curvas log dose-efeito médias obtidas no ducto deferente de rato com a NA, à esquerda (A) e com DA, a direita (B), na ausência (0) e na presença de doses crescentes de ioimbina. Na presença do antagonista, as curvas D-E de NA apresentaram um aumento do efeito máximo não observado com o emprego de DA. O antagonista provocou o deslocamento paralelo das curvas D-E de agonista para a direita. Notar que o deslocamento de DA ocorreu com concentrações menores de antagonista do que o deslocamento das curvas de NA. As curvas D-E são médias de, no mínimo, 8 experimentos para a NA e de 10 para a DA. As barras verticais representam \pm um epm.

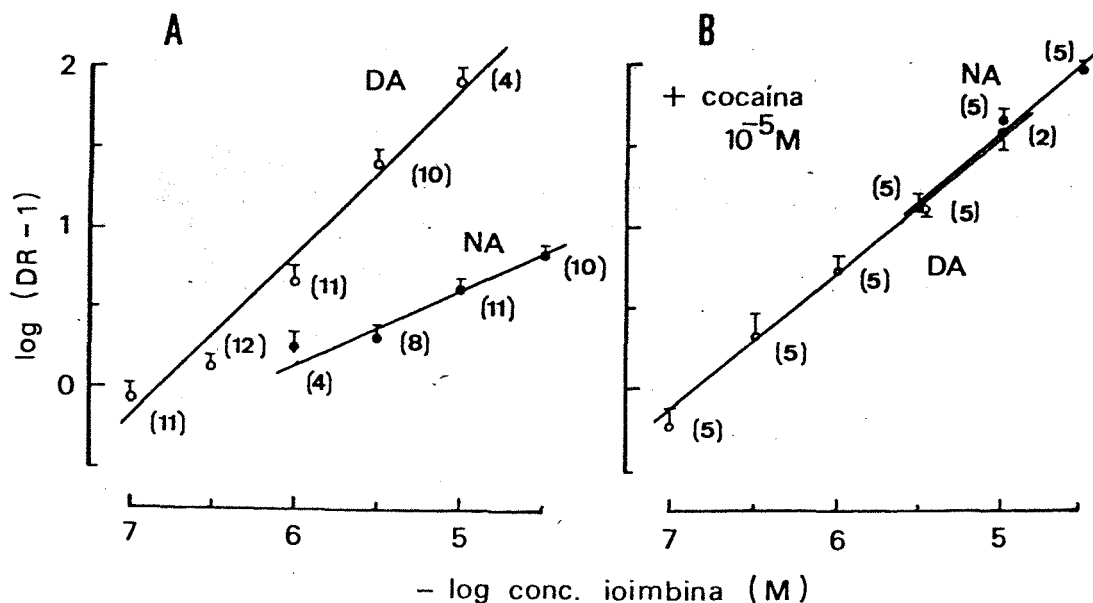


FIGURA 8. Gráficos de Schild (ver material e métodos, ítem 9.4) obtidos com o antagonismo dos efeitos contráteis de DA e NA pela ioimbina, em experimentos semelhantes ao da figura 6. Em A, na ausência de cocaína, notamos que os valores $\log(DR-1)$ para a DA se distribuíram ao longo de uma reta com inclinação próxima da unidade, enquanto os valores obtidos para a NA, nas mesmas condições, tiveram inclinação menor. Em B, experimentos similares executados na presença de cocaína. Neste caso as duas retas se confundem e ambas tiveram inclinação que se aproximou da esperada pela teoria. As linhas verticais indicam um e.p.m. Os valores entre parênteses indicam o número de experiências executadas para cada dose de antagonista.

TABELA 6. Valores de pA_2 e inclinação (a) para a ioimbina e o haloperidol, obtidos por análise de regressão a partir do método gráfico de Schild, com emprego de noradrenalina (NA) e dopamina (DA), na ausência e na presença de cocaína (COC) $10^{-5}M$.

		ausência de COC		presença de COC	
		pA_2	a	pA_2	a
IOIMBINA	NA (12)	$6,20 \pm 0,11$	$0,54 \pm 0,04$	(5) $6,90 \pm 0,18$	$0,86 \pm 0,66$
	DA (12)	$6,88 \pm 0,06^{**}$	$0,96 \pm 0,04^{**}$	(5) $6,84 \pm 0,11$	$0,85 \pm 0,08$
HALOPERIDOL	NA (5)	$7,19 \pm 0,25$	$0,35 \pm 0,03$	(5) $7,80 \pm 0,06$	$1,32 \pm 0,07$
	DA (15)	$7,68 \pm 0,09^{**}$	$1,15 \pm 0,08^{**}$	(9) $7,75 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,08$

(n) = número de experimentos

\pm erro padrão da média

** $p < 0,01$ comparado com o respectivo valor obtido com NA

2.1.1. Antagonista α -adrenérgico ioimbina na presença de cocaína

Experimentos semelhantes ao descrito no ítem anterior, mas efetuados na presença do antagonista mais o bloqueador de captação neuronal cocaína, mostraram alterações no grau de deslocamento das curvas D-E de NA (figuras 9 e 10): na presença de cocaína, a curva D-E se apresentou sensivelmente deslocada para a esquerda, cerca de 1,6 unidades de pD_2 (como foi referido no ítem 1.3.) e foi a esta que comparamos as curvas D-E de NA na presença de cocaína mais ioimbina. A consequência do maior grau de deslocamento para a direita, provocado pela ioimbina, foi uma inclinação no gráfico de Schild, para a NA, mais próxima da unidade (tabela 6 e figura 8B). Assim a ioimbina, na presença de cocaína, provocou um antagonismo semelhante para a NA e DA (figura 10) e, avaliando-se o pA_2 nestas condições, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$), como podemos ver na tabela 6.

Com relação aos efeitos máximos de NA e DA, na presença de cocaína, as observações ficaram prejudicadas porque esta droga geralmente provocava uma redução da resposta contrátil (ver figura 9, curvas d e e). Quando ocorria essa redução, a ioimbina sempre era capaz de fazer voltar o

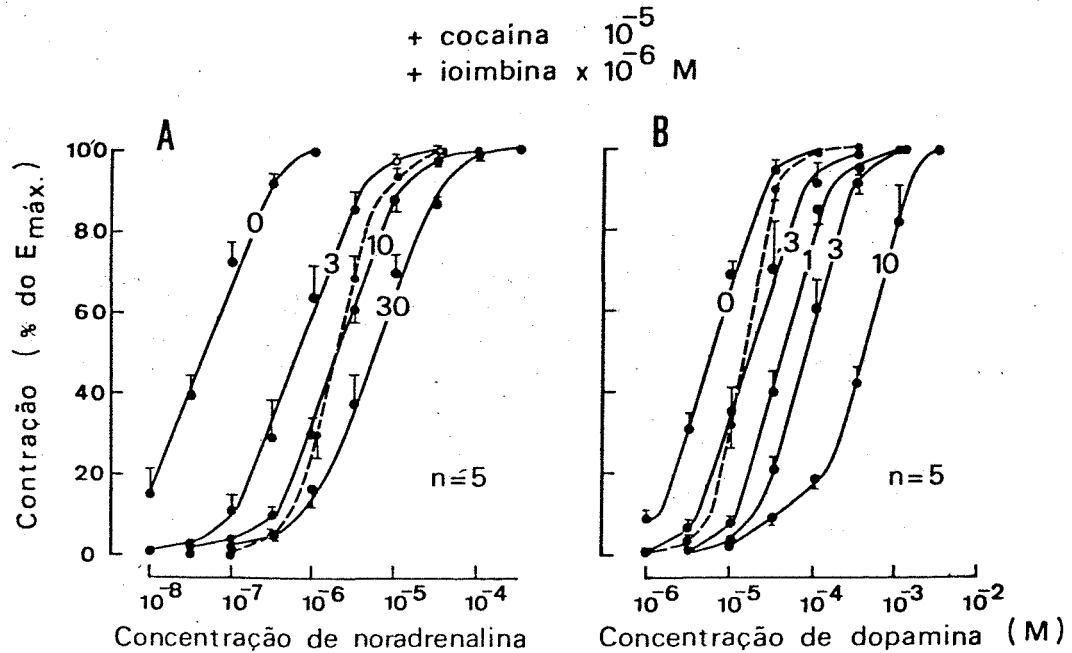


FIGURA 10. Curvas log dose-efeito médias para $\tilde{\alpha}$ -NA em A, e DA, em B, obtidas na ausência de cocaína (linhas tracejadas), na presença de cocaína (0) ou de cocaína mais ioimbina nas doses indicadas. Em contraste com o que foi mostrado na figura 7, notamos um deslocamento das curvas D-E de NA para a direita, conforme esperado pela teoria para o antagonismo competitivo. Na comparação com as curvas D-E de DA, em B, podemos notar que as doses de 3×10^{-6} e 10^{-5} M de ioimbina produziram deslocamentos para a direita muito semelhantes para ambos agonistas. Observar, também, que a potenciação produzida pela cocaína para a NA foi maior do que para a DA. Médias de, no mínimo, 5 experimentos para cada agonista. As linhas verticais representam um epm.

efeito a valores equivalentes ao observado antes da incubação de cocaína, independentemente do agonista, DA ou NA, considerado.

2.2. Presença de antagonistas dopaminérgicos

2.2.1. Haloperidol

Como foi observado anteriormente (figura 2) também com o haloperidol registrou-se um efeito duplo sobre as curvas D-E obtidas com NA. Houve um aumento significativo do efeito máximo junto com um deslocamento discreto para a direita (figura 11). Com a utilização de DA como agonista, observamos somente o deslocamento para a direita. Este deslocamento com a DA foi maior do que o observado com a NA e foi proporcional a dose de haloperidol empregada (figura 11). Lançados em gráfico de Schild, os dados obtidos para a DA forneceram uma reta cuja inclinação se aproxima da unidade, enquanto que a reta obtida para a NA teve uma inclinação muito pequena, significativamente diferente de 1,0 (ver tabela 6 e figura 12A).

Os valores de pA_2 para o haloperidol, determinados a partir da análise de regressão das retas obtidas pelo método gráfico de Schild foram distintos conforme o agonis-

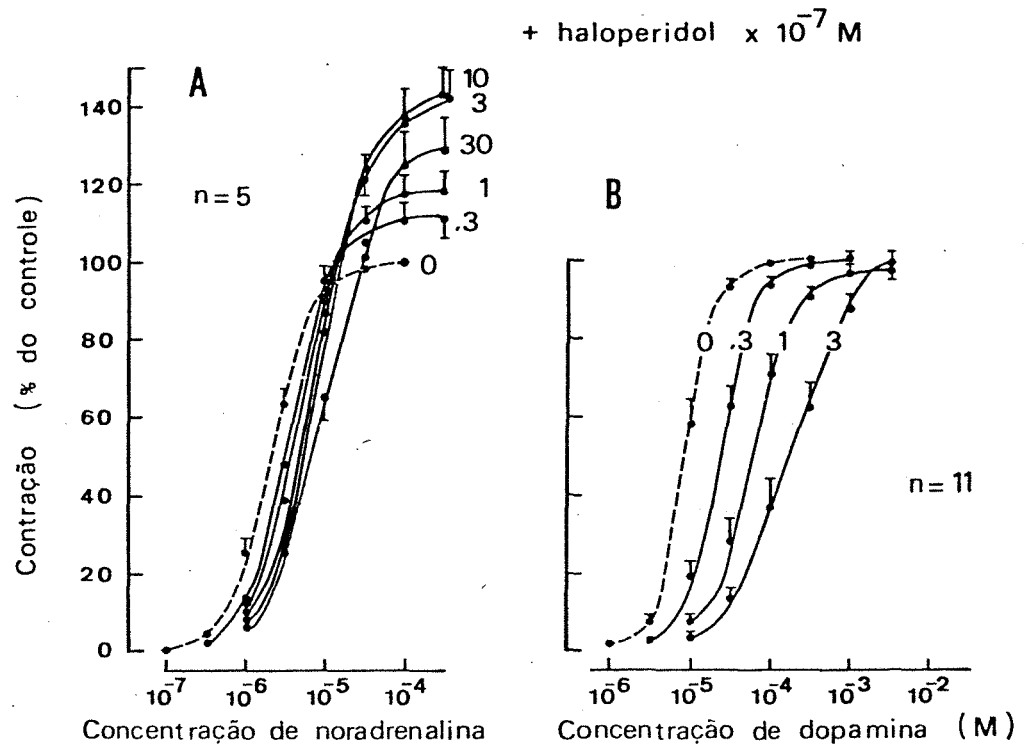


FIGURA 11. Curvas dose-efeito médias obtidas com NA, em A, e com DA, em B, na ausência (0) e na presença de doses crescentes de haloperidol. Podemos notar que os resultados foram semelhantes aos obtidos com emprego de ioimbina (figura 7): o deslocamento das curvas D-E foi maior para a DA do que para a NA, enquanto o efeito máximo só está aumentado para as curvas D-E de NA. As barras verticais representam um epm.

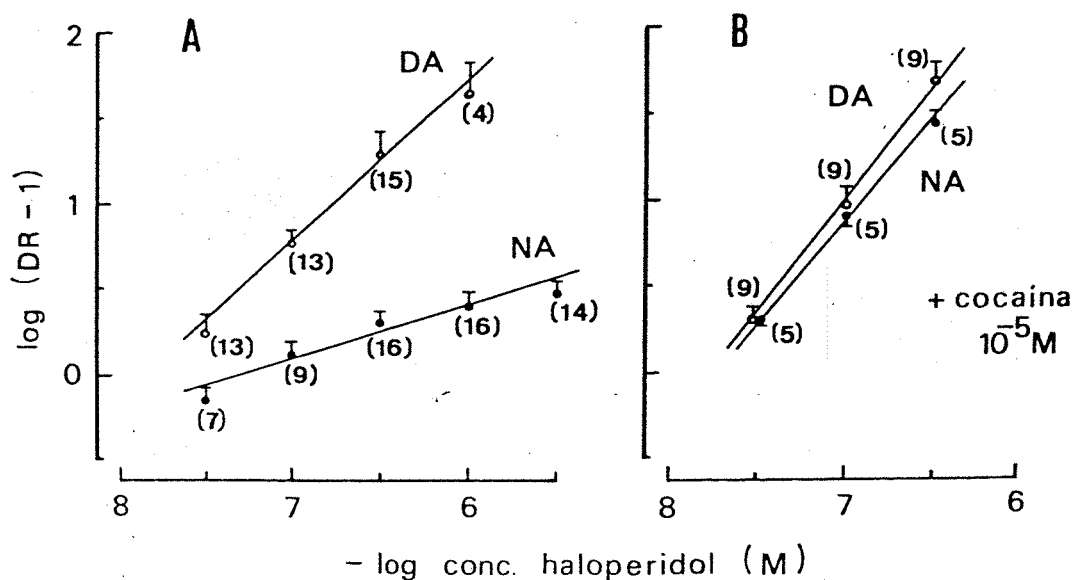


FIGURA 12. Gráficos de Schild obtidos com o antagonismo dos efeitos contrâteis de DA e NA pelo haloperidol. Em A, na ausência de cocaína, obtivemos duas retas com inclinações distintas, sendo a obtida com DA maior do que a de NA. Em B, na presença de cocaína, 10^{-5} M, as duas retas tiveram inclinação semelhante e próxima da esperada pela teoria. Os números entre parênteses indicam o número de experimentos efetuado para cada dose de antagonista, enquanto as linhas verticais indicam um epm.

ta, NA ou DA, considerado (tabela 6).

2.2.1.1. Haloperidol na presença de cocaína

Na figura 13 estão representadas as curvas D-E do antagonismo entre o haloperidol contra a NA ou DA, na presença de cocaína. Podemos observar que as curvas de NA e DA na presença de cocaína estão deslocadas para a esquerda. O deslocamento foi maior para a NA do que para a DA como havia sido observado quando empregamos a cocaína para estudar o antagonismo produzido pela ioimbina (figura 10).

Comparando as figuras 13A e 11A observamos que as mesmas doses de haloperidol que produziam deslocamento discreto nas curvas D-E de NA para a direita, na presença de cocaína provocaram deslocamentos apreciáveis, da ordem de meia unidade logarítmica para cada aumento de três vezes na dose de haloperidol.

Em relação as curvas D-E médias de DA na presença de cocaína e haloperidol (figura 13B) e as obtidas na ausência de cocaína (figura 11B), não se observaram diferenças

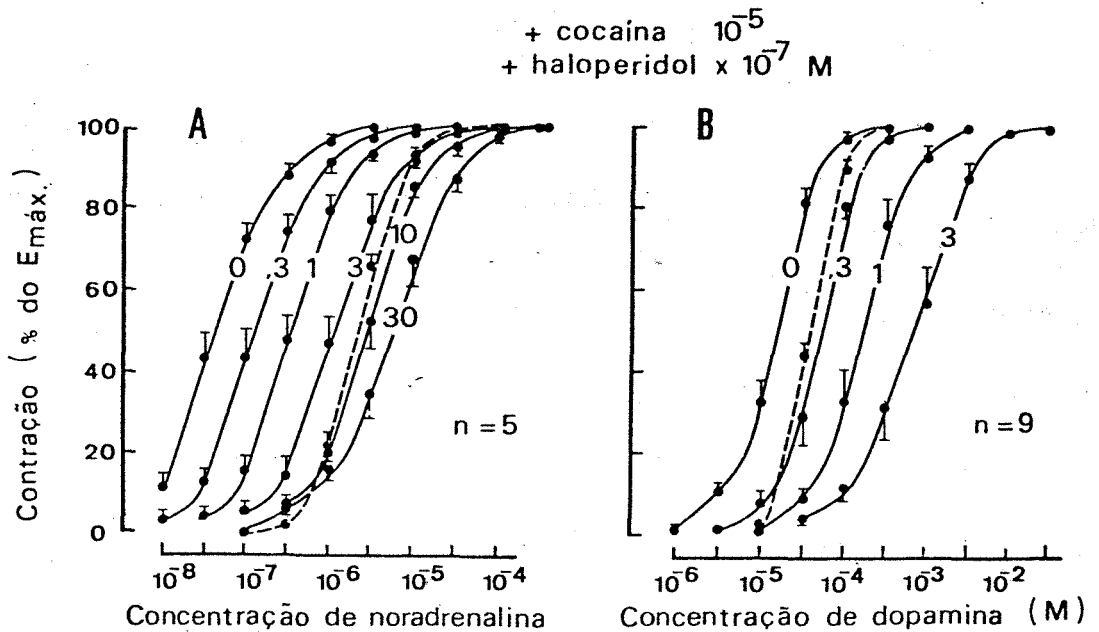


FIGURA 13. Curvas log dose-efeito médias para a NA, em A, e para a DA, em B, obtidas na ausência de cocaína (linhas tracejadas), na presença de cocaína (0) ou de cocaína mais haloperidol nas doses indicadas. Em contraste com o que foi mostrado na figura 11, observamos um deslocamento das curvas D-E de NA para a direita, conforme esperado pela teoria. Comparando as curvas obtidas para NA e DA na presença das mesmas concentrações de haloperidol, verificamos que os deslocamentos para a direita foram equivalentes. As barras verticais representam o e.p.m.

notáveis. O deslocamento para a direita foi discretamente maior quando o antagonista foi utilizado na presença de cocaína.

Os dados das figuras 13A e B lançados num gráfico de Schild, nos forneceram duas retas, uma para a NA e outra para a DA. As retas tiveram inclinação muito semelhante (ver figura 12B) quando consideramos as três primeiras doses de haloperidol, isto é 3×10^{-8} ; 10^{-7} e 3×10^{-7} M, que foram empregadas igualmente contra NA e DA. A determinação dos valores de pA_2 para o haloperidol a partir destes dados nos forneceu valores idênticos (tabela 6), seja empregando NA ou DA como agonista.

Em relação aos efeitos máximos, quando as curvas D-E de NA e DA obtidas na presença de cocaína foram menores do que as curvas controle, o haloperidol foi capaz de reduzir a diferença entre os mesmos. Isto já havia sido observado com o emprego de ioimbina, nos experimentos realizados nas mesmas condições (ítem 2.1.1.).

2.2.2. Pimozide

Na figura 14 estão representadas as curvas D-E para a NA e para a DA obtidas na presença de doses crescentes de pimozide e seus respectivos controles. Podemos observar que o pimozide foi eficiente em antagonizar de forma não-competitiva a ambos os agonistas. Entretanto, a observação das curvas D-E para a NA e para a DA obtidas na presença de 3×10^{-6} M de pimozide permitem sugerir que, nas condições usadas, houve uma eficiência maior em antagonizar os efeitos contráteis da DA.

O componente competitivo do antagonismo produzido por pimozide, avaliado pelo grau de deslocamento das curvas D-E de NA ou DA para a direita, foi discreto. Ocorreu um deslocamento máximo de $0,45 \pm 0,03$ unidades de pD_2 para a NA e de $0,48 \pm 0,03$ unidades de pD_2 para a DA, que não foram diferentes entre si ($p > 0,05$) e não permitiram a determinação dos valores de pA_2 .

2.2.2.1. Pimozide na presença de cocaína

Ainda na figura 14 estão representadas, em C e D, as curvas D-E de NA e DA obtidas na presença de cocaína (controles) e de cocaína e pimozide simultaneamente. Pode

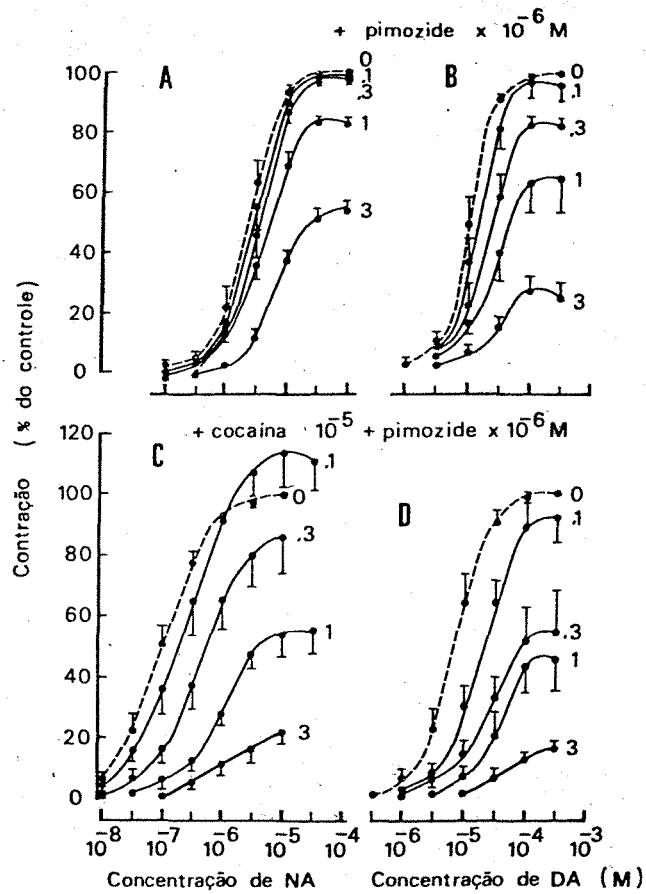


FIGURA 14. Curvas log dose-efeito cumulativas médias, obtidas na ausência (0) e na presença das concentrações indicadas de pimoziide, para a NA (em A) e DA (em B). Por estas curvas o pimoziide antagonizou melhor a DA; entretanto, as curvas D-E obtidas após bloquear a captação neuronal com cocaína, representadas em C, para NA, e em D, para DA, mostraram que o grau de antagonismo é o mesmo para ambos os agonistas. As barras verticais representam um epm.

mos observar melhor que o antagonismo do pimozide contra os efeitos da NA e da DA foi de dois tipos: a) nitidamente não-competitivo, evidenciado pela redução dos efeitos máximos de ambos os agonistas e b) competitivo, manifestado por deslocamento, embora discreto, das curvas D-E para a direita. A observação das curvas D-E médias para NA e DA na figura 14 C e D levam à conclusão de que, na presença de cocaína não houve diferença entre a intensidade do bloqueio não-competitivo pelo pimozide contra ambos os agonistas. A determinação dos valores de pD_2^1 , através do método gráfico de Schild modificado, nos forneceu valores de $5,91 \pm 0,09$ para a NA e $6,20 \pm 0,15$ para a DA ($n=4$ para DA e NA; $p > 0,05$).

O deslocamento das curvas D-E para a direita de $1,59 \pm 0,08$ unidades de pD_2 para a NA e de $0,74 \pm 0,05$ para a DA foi maior do que o observado na ausência de cocaína. Embora a diferença entre estes valores seja significativa ($p < 0,05$), os valores de pA_2 determinados pela análise de regressão linear a partir destes dados não foram significativamente diferentes entre si: $6,92 \pm 0,15$ para a NA e $7,22 \pm 0,17$ para a DA ($p > 0,05$).

2.2.3. Apomorfina

Nas nossas condições experimentais a apomorfina,

nas doses de 3×10^{-6} até 3×10^{-4} M, não apresentou contração mensurável no ducto deferente de rato. Entretanto foi capaz de provocar alterações nas curvas D-E de NA e DA. Na figura 15 estão representadas as curvas D-E de NA e de DA obtidas antes e na presença de apomorfina. Vemos que nas doses de 10^{-5} e 3×10^{-5} M, a apomorfina foi capaz de potenciar o efeito máximo das curvas D-E de NA, mas não das de DA onde essas doses de apomorfina provocaram uma queda discreta do efeito máximo, acompanhado de um deslocamento, também discreto ($0,27 \pm 0,06$ unidades de pd_2) para a direita. A dose de 10^{-4} M de apomorfina não produziu mais potenciação no efeito máximo da NA mas, pelo contrário, reduziu o mesmo e provocou um deslocamento adicional para a direita das curvas D-E de DA, alcançando o máximo de $0,43 \pm 0,03$ unidades de pd_2 contra $0,20 \pm 0,10$ observado para a NA. Aumentos adicionais da dose de apomorfina provocaram acentuada queda dos efeitos de ambos os agonistas, a níveis da ordem de 20% dos controles, dificultando sobretudo a determinação dos valores de afinidade.

Os valores de pd_2^1 determinados a partir destes experimentos para avaliar o antagonismo não-competitivo contra ambos os agonistas foram: $3,81 \pm 0,15$ para NA (n=5) e $4,19 \pm 0,08$ para a DA (n=4). Essa diferença não foi signifi-

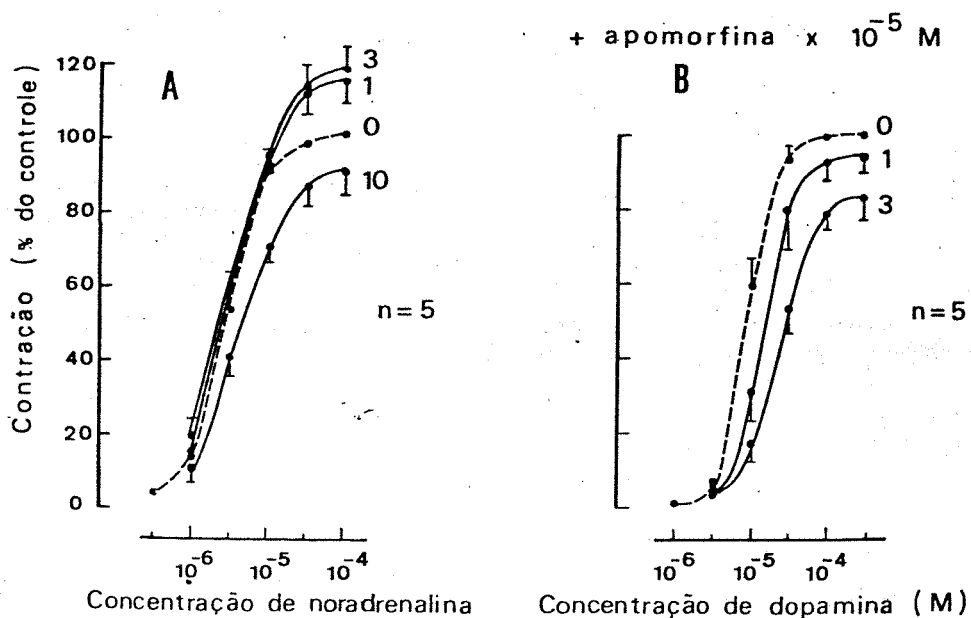


FIGURA 15. Curvas log dose-efeito cumulativas médias para a NA (em A) e DA (em B), obtidas na presença das doses indicadas de apomorfina e seus respectivos controles (0). Verificou-se que a apomorfina foi capaz de provocar um aumento da resposta máxima da NA, mas não da DA, como fora observado com a ioimbina (figura 10) e com o haloperidol (figura 14). Os deslocamentos das curvas de DA para a direita foram ligeiramente maiores do que os observados para a NA. As barras verticais representam um epm.

cativa ($p > 0,05$).

2.3. Papaverina

Na figura 16 estão representadas as curvas D-E médias para a NA e DA obtidas na presença de papaverina. Esta droga é um antagonista não-competitivo, não possuindo componente competitivo. Isso foi efetivamente observado empregando-a contra o efeito contrátil da NA (figura 16A). Frente a DA, entretanto, ocorreu um deslocamento discreto para a direita, que alcançou o valor máximo de $0,40 \pm 0,06$ unidades de pD_2 ($n=7$) indicando que deslocamentos semelhantes, observados com o emprego de pimozide (figura 14) e apomorfina (figura 15) podem ser atribuídos a outros fatores que não a um componente de antagonismo competitivo. Por exemplo, esse deslocamento poderia ser atribuído à taquifilaxia observada para a dopamina (ver ítem 1.1.3 e tabela 2) e à dificuldade de se determinar com precisão os valores de pD_2 nas curvas D-E muito pequenas.

Os valores de pD_2^1 para a papaverina, calculados a partir das curvas apresentadas na figura 16 através do método do gráfico de Schild modificado, foram: $4,91 \pm 0,05$ contra a NA ($n=7$) e $5,04 \pm 0,04$ contra a DA ($n=7$). Ambos não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

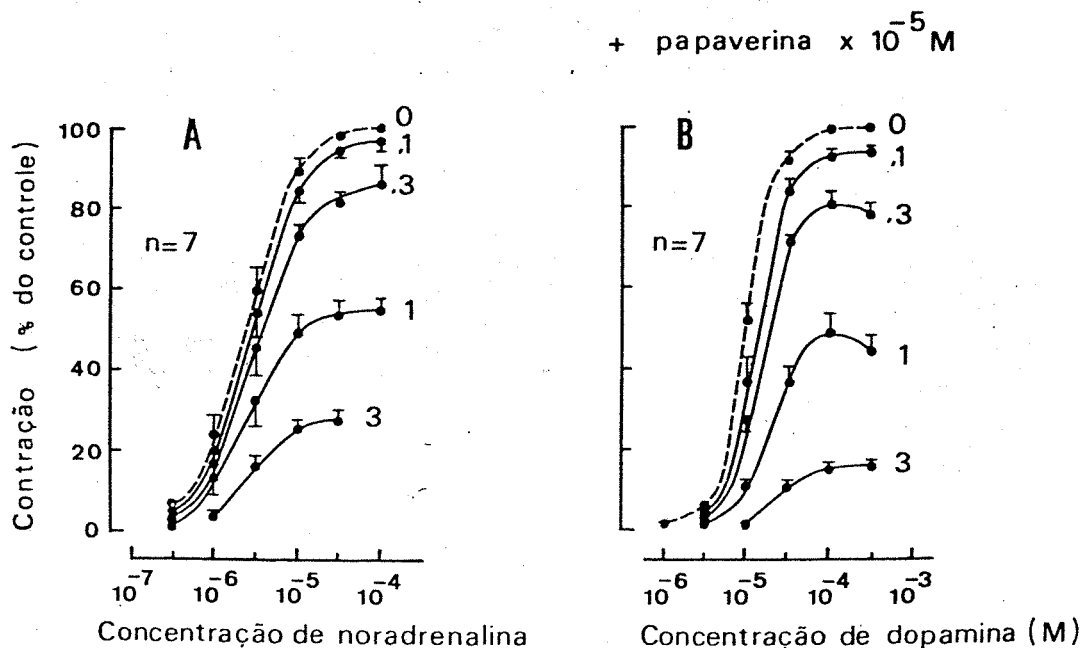


FIGURA 16. Curvas log dose-efeito cumulativas médias para a NA (em A) e DA (em B), obtidas na presença das doses indicadas de papaverina e seus respectivos controles (0). Podemos observar que, enquanto a papaverina atuou como um antagonista não-competitivo para os efeitos da NA, provocou um deslocamento discreto para as curvas D-E obtidas com DA, simultaneamente com a queda das respostas. Verificar a semelhança com as curvas D-E obtidas na presença de pimozide (figuras 14A e B) e na presença de apomorfina (figura 15). As barras verticais representam um e.p.m.

3. Comparação entre os efeitos da DA e NA na presença de antagonista competitivo irreversível: fenoxibenzamina

Os resultados obtidos com emprego de fenoxibenzamina (PBZ), que foi o antagonista competitivo irreversível escolhido, estão resumidos na figura 17. Podemos observar que a NA 10^{-4} M foi capaz de proteger o seu receptor em $75,1 \pm 6,8\%$ e também capaz de proteger o efeito da dopamina em $51,5 \pm 6,8\%$, contra o bloqueio irreversível provocado pela PBZ, 3×10^{-8} M incubada durante 5 minutos. A DA por sua vez também protegeu o receptor da NA, mas foi necessária uma dose maior para alcançar o mesmo nível de proteção (figura ¹⁷ 20). Em doses equimolares, a DA é menos eficaz do que a NA, porém aumentando-se a dose em três vezes (3×10^{-4} M) observou-se uma proteção equivalente à obtida com NA: $82,1 \pm 2,0\%$ de proteção para o efeito produzido pela NA e $75,7 \pm 6,2\%$ de autoproteção.

A proteção que ocorreu contra o bloqueio provocado pela PBZ foi específica, como foi possível confirmar com o emprego de acetilcolina e de fenilefrina. A acetilcolina protegeu o seu receptor em $68,1 \pm 12,1\%$ (n=4) sem impedir a inativação dos α -adrenoceptores (figura 17). A fenilefrina que tem uma ação através dos α -adrenoceptores, protegeu os

efeitos da NA.

O emprego do pimozide ($3 \times 10^{-6} M$) como eventual protetor do efeito contrátil da DA e NA, revelou uma proteção equivalente para ambos agonistas, embora pequena (figura 17).

Os resultados obtidos com a utilização de apomorfina na concentração de $10^{-4} M$, também revelaram uma proteção dos efeitos da DA semelhante à observada para a NA, mas ligeiramente melhor que a registrada com o emprego do pimozide.

DISCUSSÃO

CAPÍTULO V

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram várias diferenças entre as características farmacológicas da NA e DA no ducto deferente de rato, enumerando-se: a) diferença quanto a afinidade relativa (tabela 1); b) presença de taquifilaxia para o efeito da DA, mas não para a NA (tabela 2 e figura 3); c) aumento de sensibilidade para a NA, mas não para a DA, nos ductos deferentes de ratos tratados com reserpina (tabela 3); d) maior deslocamento das curvas D-E de NA, do que de DA, por ação da cocaína e metanefrina (tabela 4 e figura 4); e) maior suscetibilidade dos efeitos da DA, do que da NA, ao bloqueio pela ioimbina ou haloperidol, na ausência de cocaína (figuras 2, 7 e 11); f) inclinações distintas das retas de regressão dos gráficos de Schild, conforme o agonista considerado (figuras 8A e 12A) na ausência de cocaína; g) diferentes valores de pA_2 ,

da ordem de 0,5 unidades, para um dado antagonista quando testado respectivamente em relação a NA ou DA (tabela 6).

Embora a diferença de afinidade relativa não indique a existência de grupos de receptores distintos, as outras diferenças no comportamento farmacológico de NA e DA se consideradas isoladamente poderiam sugerir que os efeitos desses dois agonistas são devidos a interação com dois grupos de receptores distintos. No entanto, quando analisados em conjunto, os dados acima constituem-se em evidências contra a presença de receptores dopaminérgicos no DDR.

O argumento de maior peso a favor da indicação da existência de dois receptores, que seria o deslocamento de sinal das curvas D-E de DA e NA na presença dos antagonistas ioimbina e haloperidol (figuras 7 e 11) não resiste a uma análise mais profunda, quando julgado em conjunto com outros dois dados, quais sejam: a maior potenciação do efeito da NA pela cocaína e a demonstração, não citada acima, que, na presença de cocaína, as curvas D-E de NA e DA sofrem o mesmo grau de deslocamento pelos antagonistas ioimbina e haloperidol (figuras 10 e 13); de fato, os dados acima constituem uma forte indicação de que as diferenças observadas se devem à presença de um potente mecanismo de captação neuronal que afeta a NA e que praticamente não atua sobre a DA.

A captação neuronal, como vimos anteriormente, é muito ativa no sentido de remover a NA das proximidades do receptor. Em consequência, a concentração do agonista na vizinhança do receptor pode ser dezenas de vezes inferior a sua concentração no banho. Na presença de um bloqueador de captação neuronal, como é o caso da cocaína, as curvas D-E daqueles agonistas que sofrem captação, se deslocam para a esquerda, porque a concentração ao nível do receptor se iguala à concentração da droga no banho.

Por ser um mecanismo saturável a captação neuronal afeta com maior intensidade as pequenas e médias concentrações de agonista. A medida que a concentração da droga no banho vai aumentando diminui a importância da fração que é captada a tal ponto que, para as maiores concentrações, quando a captação neuronal está saturada, a concentração de agonista na biofase praticamente se iguala à concentração da droga no banho, como ocorreria na presença de um bloqueador de captação neuronal. A concentração necessária para saturar o mencionado mecanismo depende de suas características, sendo possível que as concentrações que provocam o efeito máximo da preparação não sejam, ainda, suficientes para esse objetivo. O estudo teórico da influência da captação neuronal sobre as curvas D-E de NA e outros agonistas suscetíveis de sua ação, foi executado, entre outros, por

Furchgott (1972), mas está fora dos objetivos de revisá-los mais extensamente neste trabalho. No entanto é importante fazer alguns comentários a respeito do emprego de antagonistas competitivos. Normalmente estas drogas interagem com o adrenoceptor impedindo a ligação do agonista, resultando em um deslocamento das curvas D-E para a direita, uma vez que serão necessárias concentrações maiores para a obtenção de efeitos equivalentes. Simultaneamente essas maiores concentrações de agonista no banho aumentam, também, a concentração a nível da biofase, tendendo a saturar o sistema de captação neuronal e a deslocar as curvas D-E para a esquerda. Portanto é de se esperar que as curvas D-E de NA e outros agonistas que sofrem captação neuronal tenham um deslocamento para a direita menos pronunciado do que na ausência de captação, já que o mesmo é resultante da somatória de duas forças antagonicas: deslocamento para a direita provocado pelo antagonista, por ocupação de receptores pós-sinápticos, e deslocamento para a esquerda, induzido por uma saturação gradual do mecanismo de captação neuronal. Isso explica por que, nas figuras 7 e 11, as curvas D-E de NA praticamente não foram deslocadas na presença do antagonista. Após cocaína, no entanto, as curvas D-E foram deslocadas proporcionalmente à dose de antagonista, indicando que aquelas alterações de deviam ao mecanismo de captação.

Os dados obtidos, representados num gráfico de Schild, forneceram pontos aos quais se pode ajustar uma reta. Contudo a inclinação para esta reta, para a NA, teve valor menor do que o previsto pela teoria dos receptores (Schild, 1957; Arunlakshana & Schild, 1959; Furchgott, 1972) indicando, mais uma vez, a presença de captação neuronal. Para a DA a inclinação da reta foi em torno de 45° , conforme o esperado, independentemente da presença de cocaína e com quaisquer dos antagonistas empregados, mostrando que a DA não é sensível ao mecanismo de captção neuronal no DDR. Esse fato é digno de destaque já que em outras preparações, como o coração isolado de rato, a afinidade pela captção neuronal é maior para a DA (Iversen, 1967). Hendley & Snyder (1972) mostraram que no DDR o mecanismo de captção exibe estereoespecificidade para a (-) NA, mas não testaram a DA.

Vários autores que propuseram a existência de receptores dopaminérgicos no DDR ignoraram a presença de um mecanismo de captção neuronal (van Rossum, 1965; Simon & van Maanen, 1971; 1976; Ferrini & Miragoli, 1972; 1973) e, portanto, basearam suas conclusões nos valores de pA_2 distorcidos, quando o agonista foi a NA (ver tabela 7). A detecção de uma maior afinidade da fentolamina para antagonizar a DA do que a NA, observada por alguns autores (tabe

TABELA 7. Valores de $pA_2 \pm$ desvio padrão de antagonistas competitivos reversíveis contra o efeito contrátil produzido pela dopamina (DA) ou noradrenalina (NA) no ducto deferente de rato, obtidos na literatura citada e neste trabalho.

	IOIMBINA		FENTOLAMINA		HALOPERIDOL	
	DA	NA	DA	NA	DA	NA
van Rossum, 1965		5,3		6,9		6,7
Simon & van Maanen, 1971			8,7 \pm 0,3	7,6 \pm 0,27		
Ferrini & Miragoli, 1973			8,76 \pm 0,32	7,77 \pm 0,60	8,10 \pm 0,56	(1)
Simon & van Maanen, 1976			8,02 \pm 0,34	7,07 \pm 0,24	7,27 \pm 0,25	6,54 \pm 0,21
			(7,61 \pm 0,13)	(6,81 \pm 0,24)		
Dados deste trabalho	6,88 \pm 0,06	6,20 \pm 0,11			7,68 \pm 0,09	7,19 \pm 0,25
\pm epm	(6,84 \pm 0,11)	(6,90 \pm 0,18)			(7,75 \pm 0,03)	(7,80 \pm 0,06)

(1) não observou antagonismo competitivo entre o haloperidol e NA;

Os valores apresentados entre parênteses foram obtidos na presença de cocaína;

la 7) e a constatação que o haloperidol não antagonizava competitivamente os efeitos da NA no DDR (Ferrini & Miragoli, 1973) também podem ser atribuídos à influência da captação neuronal, como pode ser visto nas fig. 11 e 12. Em resumo, é possível concluir que a distinção entre antagonistas dopamínicos e α -adrenérgicos no DDR, feita por vários autores, não existe quando se bloqueia a captação neuronal. Nessas condições, tanto a ioimbina quanto o haloperidol bloqueiam indiferentemente a DA e a NA. Simon & van Maanen (1976) não observaram diferença significativa entre os pA_2 para a fentolamina determinados na ausência e na presença de cocaína, dispensando, por isso, a sua utilização, mesmo quando estudaram outros antagonistas. A explicação para a ausência de diferenças significantes entre os valores de pA_2 poderia ser encontrada no fato que alguns antagonistas α -adrenérgicos, entre os quais a própria fentolamina, podem, efetivamente, apresentar um efeito bloqueador sobre a captação neuronal (Iversen, 1967; Eisenfeld & cols, 1967; Trendelenburg, 1972) ou que não foi esperado um tempo suficientemente longo para alcançar o equilíbrio entre o antagonista e o receptor, propiciando a determinação de valores inferiores aos reais. Em geral as doses de antagonistas α necessárias para obter bloqueio de captação são maiores do que as empregadas para antagonizar os efeitos dos agonistas α -adrenérgi

cos, tornando-os inadequados para esta função quando se está estudando o efeito de drogas sobre o α -adrenoceptor (ver Furchgott, 1970). Por exemplo, no coração isolado de rato, a fentolamina, na concentração de 10^{-5} M inibe cerca de 66% da captação neuronal, enquanto a cocaína, na mesma concentração, reduz a captação em 95%, sem, contudo, afetar o receptor adrenérgico na mesma extensão que o antagonista α .

O uso de pimozide e apomorfina forneceram outras evidências contrárias à presença de receptores dopaminérgicos no DDR. O pimozide deveria produzir um antagonismo específico para a DA se, no DDR, produzisse efeitos semelhantes aos centrais. Não foi o que observamos: pelo contrário, o deslocamento das curvas D-E foi maior para a NA do que para a DA, revelando uma maior afinidade contra a NA. Além do componente competitivo o pimozide mostrou-se um antagonista não-competitivo e também neste aspecto seu efeito foi igual em relação a ambos os agonistas. A apomorfina, devido a sua ação dopaminérgica no SNC, deveria exibir um efeito contrátil no DDR, como foi observado por Patil e cols (1973). Não foi o que observamos, mas também outros agonistas dopaminérgicos centrais como a nomifensina (Tayo, 1979b) e a bromocriptina (Gibson & Samini, 1978) já se haviam revelado incapazes de produzir uma resposta contrátil no DDR. A apomorfi

na antagonizou discretamente o efeito contrátil da DA, mas esse efeito também foi observado com o emprego de papaverina que é, classicamente, um antagonista não-competitivo e que, portanto, não produz deslocamento das curvas D-E no eixo das abcissas (Ariens, 1964). Além disso, nem a apomorfina, nem a papaverina deslocaram as curvas controle, de NA, indicando que o mecanismo responsável por esse efeito, deslocamento da DA, está relacionado com o efeito taquifilático observado para este agonista.

Ferrini & Miragoli (1972) e Simon & van Maanen, (1971) registraram um antagonismo específico dos efeitos da DA, mas não da NA, pela apomorfina. Pela falta de controles confiáveis, é possível que seus resultados estejam alterados devido ao pequeno tempo de incubação (10 minutos), insuficiente para alcançar o equilíbrio entre droga e receptor e devido a dessensibilização à DA. Em resumo, os resultados obtidos com a apomorfina e o pimozide também não são compativeis com a presença de receptores dopaminérgicos no DDR.

Seriam, então, os efeitos observados pelo emprego da DA devidos a interação desta droga com os receptores α -adrenérgicos? O trabalho de Furchgott (1970) sobre as exigências estruturais dos agonistas para uma ação em receptores α -adrenérgicos, mostrou que era necessária pelo menos uma oxidrila alcoólica em posição β ou uma oxidrila fenóli-

ca em posição meta, na molécula de feniletilamina. Ora, a DA cumpre o requisito pois possui a mesma estrutura que a NA, com excessão da oxidrila β -alcoólica que é anexada já no final do processo de síntese da NA, dentro do grânulo de armazenamento, pela enzima dopamina- β -hidroxilase, podendo portanto atuar no adrenoceptor.

Outra forte indicação da interação da DA com α -adrenoceptores pode ser obtida com os experimentos realizados com a PBZ para bloquear apenas um dos dois tipos de receptores e tentar diferenciá-los entre dopaminérgicos e noradrenérgicos (figura 17). Os resultados permitiram observar que a NA e a DA se protegem mutuamente quando empregamos concentrações adequadas. Assim a concentração de DA para autoprotéger seu receptor e para proteger o da NA contra a inativação irreversível pela PBZ, foi três vezes maior do que a de NA, para alcançar o mesmo nível de proteção. Esta observação reforça o fato de que a afinidade da DA pelo receptor é cerca de 4 vezes menor do que a afinidade da NA. Estes experimentos de proteção se revelaram específicos pois o emprego de ACh somente protegeu o receptor colinérgico e não o adrenérgico, enquanto que a fenilefrina, por se ligar ao α -adrenoceptor, foi capaz de protegê-lo. O emprego de apomorfina e pimozide nestes experimentos também não permitiu a detecção de possíveis diferenças entre os re

ceptores envolvidos. Entretanto estas duas drogas não são exatamente adequadas para esse tipo de experimento, pois se revelaram antagonistas não-competitivos e estes não se ligam ao receptor, mas em alguma etapa pós interação droga-receptor (Ariens, 1964; Jurkiewicz, 1970).

A taquifilaxia observada para o efeito da DA poderia ser atribuída a uma ação parcialmente indireta através da liberação de um mediador excitatório endógeno, esgotável, como por exemplo a NA. O uso do DDR tratado com reserpina mostrou que a afinidade da DA nessa circunstância diminuiu ligeiramente, o que poderia se constituir numa confirmação daquela hipótese. Entretanto o exame dos efeitos do tratamento com reserpina sobre as curvas D-E de NA revela que a afinidade deste agonista foi potenciada (tabela 3) e esperar-se-ia que, se a DA atuasse diretamente no α -adrenoceptor, também sofresse o mesmo tipo de modificação. Este ponto fica merecendo estudos mais acurados.

Outro ponto sujeito a controvérsia e que deve merecer estudos posteriores relaciona-se com o aumento do efeito contrátil máximo na presença de antagonistas α -adrenérgicos (figuras 2, 7 e 11 e tabela 6). Jurkiewicz & Jurkiewicz (1976) postularam a existência de dois tipos de α -adrenoceptores pós-sinápticos no DDR: um excitatório e um inibitório. O bloqueio preferencial do receptor inibitório

pelo antagonista α permitiria a obtenção de respostas contráteis maiores que as observadas quando os dois são ativados simultaneamente. Especulativamente, a DA deve atuar somente no excitatório e, neste caso, poderia servir como uma ferramenta para aprofundar estes estudos.

Em conclusão, os resultados apresentados mostram evidências suficientemente fortes para concluir que, no ducto deferente de rato não existe um receptor dopaminérgico pós-sináptico excitatório, específico, diferente do α -adrenocep-tor.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

CAPÍTULO VI

Foram estudados os efeitos contráteis de dopamina e noradrenalina no ducto deferente de rato com objetivo de verificar se estes agonistas atuam, ou não, em receptores distintos. Os ductos deferentes foram montados in vitro registrando-se as contrações isotônicas obtidas por meio de curvas D-E cumulativas.

Foram tomadas medidas visando controlar os fatores que podem influir na caracterização e diferenciação de receptores, tais como: bloqueio da captação neuronal com cocaína 10^{-5} M; bloqueio da captação extraneuronal com metanefrina 3×10^{-5} M e tratamento dos ratos com reserpina na dose de $7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Para eventual diferenciação de dois grupos distintos de receptores, um para a NA outro para a DA, foi utili

zada a determinação do valor de pA_2 para o antagonista α -adrenérgico, ioimbina, e para o antagonista dopaminérgico, haloperidol. Foram empregados, ainda, pimozide, apomorfina, papaverina e aminofilina que, sem exceção, apresentaram características de antagonistas não-competitivos.

Foi observado que:

1. a DA foi 4,27 vezes menos potente do que a NA;
2. a DA e a NA no ducto deferente de ratos normais (não tratados) e nos tratados com reserpina, apresentaram o mesmo efeito máximo e, em consequência, a mesma atividade intrínseca;
3. o tratamento com reserpina não alterou significativamente a afinidade relativa (ED_{50}) da DA, mas aumentou a da NA;
4. as curvas D-E cumulativas de DA, mas não as de NA, obtidas a intervalos de 30 a 35 minutos apresentaram uma discreta, mas significativa, taquifilaxia;
5. após bloqueio da captação neuronal com cocaína, as curvas D-E de DA, apresentaram discreta potenciação em contraste com a potenciação acentuada observada para a NA;
6. o bloqueio da captação extraneuronal com metanefrina não afetou a afinidade relativa da DA, mas provocou discreta potenciação da NA;

6.1. a consequência dos ítems 3, 4, 5 e 6 foi uma alteração na relação de potência (DR) entre DA e NA no ducto deferente de rato;

7. as curvas D-E de DA obtidas na presença do antagonista α -adrenérgico ioimbina ou do antagonista dopami-nérgico haloperidol, não apresentaram aumento do efeito máximo, em contraste com o que foi observado para a NA;

8. na ausência de cocaína a ioimbina e o haloperidol antagonizaram melhor os efeitos da DA que os da NA;

9. na presença de cocaína a ioimbina e o haloperidol produziram a mesma intensidade de antagonismo contra os efeitos da DA e da NA;

10. a determinação dos valores de pA_2 forneceu valores iguais, dentro do erro experimental, para cada antagonista empregado, seja determinado com a NA ou com a DA desde que na presença de cocaína;

11. a técnica de proteção de receptores contra a inativação por PBZ foi incapaz de diferenciar entre o receptor da DA e o da NA.

Em resumo, os resultados obtidos constituem-se em evidências que permitem concluir que no ducto deferente de rato não existe um receptor pós-sináptico, excitatório, para a DA diferente do α -adrenoceptor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VII

- ADEBANJO, A.O. & AMBACHE, N.: Species variation in vas deferens motor transmission. J.Physiol.(London), 281: 28-29P; 1978.
- AHLQUIST, R.P.: A study of the adrenotropic receptors. Amer. J.Physiol., 153: 586-600; 1948.
- AHLQUIST, R.P. & LEVY, B.: Adrenergic receptive mechanism of canine ileum. J.Pharmacol.exp.Ther., 127: 146-9; 1959.
- AMBACHE, N.; DUNK, L.P.; VERNEY, J. & ZAR, M.A.: Inhibition of post-ganglionic motor transmission in vas deferens by indirectly acting sympathomimetic drugs. J.Physiol.(London), 227: 433-56; 1972.
- ANDÉN, N-E.; BUTCHER, S.G.; CORRODI, H.; FUXE, K. & UNGERSTEDT, U.: Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. Europ.J.Pharmacol., 11: 303-14; 1970.
- ANDÉN, N-E.; ROBENSON, A.; FUXE, K, & HÖKFELT, T.: Evidence for dopamine receptor stimulation by apomorphine. J.Pharm. Pharmacol., 19: 627-9; 1967.
- ANTON, A.H. & SAYRE, D.F.: A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. J.Pharmacol.exp.Ther., 138: 360-75; 1962.
- ARIENS, E.J.: Molecular pharmacology. The mode of action of biologically active compounds. Vol.1, New York, Academic Press; 1964.

- ARIENS, E.J. & VAN ROSSUM, J.M.: pD_x , pA_x , and pD'_x values in the analysis of pharmacodynamics. Arch.int.Pharmacodyn. 110: 275-99; 1957.
- ARUNLAKSHANA, O. & SCHILD, H.O.: Some quantitative uses of drug antagonists. Brit.J.Pharmacol., 14: 48-58; 1959.
- BIRMINGHAM, A.T.: Sympathetic denervation of the smooth muscle of the vas deferens. J.Physiol. (London), 206: 245-61; 1970.
- BLOOM, F.E.: Electron microscopy of catecholamine-containing structures. In: Catecholamines, Handb.Exp.Pharm. XXXIII, ed. BLASCHKO, H. & MUSCHOLL, E.; Berlin, Springer-Verlag; Cap. 3, pp 46-78; 1972.
- BURNSTOCK, G.: Purinergic nerves. Pharmacol.Rev., 24: 509-81; 1972.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNOSSON, T. & WALDECK, B.: On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. Science, 127: 471, 1958.
- CARNEIRO, I.C.; JURKIEWICZ, N.H. & JURKIEWICZ, A.: Efeito de aminas simpatomiméticas de ação indireta no ducto deferente de rato. Ciência e Cultura, 29 (Supl): 602; 1977.
- CARNEIRO, I.C. JURKIEWICZ, N.H. & JURKIEWICZ, A.: Análise teórica e experimental do efeito de drogas de ação indireta na musculatura lisa. Ciência e Cultura, 30 (Supl): 457; 1978.

- CRUMLY, H.J., Jr.; PINDER, R.M.; HINSHAW, W.B. & GOLDBERG, L.I.: Dopamine-like renal and mesenteric vasodilation caused by apomorphine, 6-propylnorapomorphine and 2-amino-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene. Nature, 259: 584-6; 1976.
- EISENFELD, A.J.; AXELROD, J. & KRAKOFF, L.: Inhibition of the extraneuronal accumulation and metabolism of norepinephrine by adrenergic blocking agents. J.Pharmacol.exp. Ther., 156: 107-13; 1967.
- ERNST, A.M.: The role of biogenic amines in the extra-pyramidal system. Acta physiol.pharmacol.neerl., 15: 141-54; 1969.
- FERRINI, R. & MIRAGOLI, G.: Selective antagonism of dopamine by apomorphine. Pharmacol. Res.Commun., 4: 347-52; 1972.
- FERRINI, R. & MIRAGOLI, G.: Antagonismo dell'effetto della dopamina e della noradrenalina su alcuni organi isolati. Boll.Soc.ital.Biol.sper., 49: 648-52; 1973.
- FURCHGOTT, R.F.: Dibenamine blockade in strips of rabbit aorta and its use in differentiating receptors. J.Pharmacol.exp.Ther., 111: 265-84; 1954.
- FURCHGOTT, R.F.: The pharmacology of vascular smooth muscle. Pharmacol.Rev., 7: 183-265; 1955.
- FURCHGOTT, R.F.: Receptor mechanisms. Ann.Rev.Pharmacol., 4: 21-50; 1964.
- FURCHGOTT, R.F.: The use of β -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in the determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. In: Advances in Drug Research, ed. HARPER, N.J. & SIMMONDS, A.B.;

- London, Academic Press; Vol. 3, pp. 21-55; 1966.
- FURCHGOTT, R.F.: The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. Ann.N.Y.Acad.Sci., 139: 553-70; 1967.
- FURCHGOTT, R.F.: Pharmacological characteristics of adrenergic receptors. Fed.Proc., 29: 1352-61; 1970.
- FURCHGOTT, R.F.: The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Catecholamines, Handb.Exp.Pharm. XXXIII, ed. BLASCHKO, H. & MUSCHÖLL, E.; Berlin, Springer-Verlag; Cap. 9, pp. 283-335; 1972.
- FURCHGOTT, R.F.; KIRPEKAR, S.M.; RIEKER, M. & SCHWAB, A.: Actions and interactions of norepinephrine, tyramine and cocaine on aortic strips of rabbit and left atria of guinea pig and cat. J.Pharmacol.exp.Ther., 142: 39-58; 1963.
- GIBSON, A. & SAMINI, M.: Responses of the mouse vas deferens to dopamine and some related drugs. Brit.J.Pharmacol., 63: 339-340P; 1978.
- GOLDBERG, L.I.: Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. Pharmacol.Rev., 24: 1-29; 1972.
- GOLDBERG, L.I.; KOHLI, J.D.; KOTAKE, A.N. & VOLKMAN, P.H.: Characteristics of the vascular dopamine receptor: comparison with other receptors. Fed.Proc., 37: 2396-402; 1978a.

- GOLDBERG, L.I.; VOLKMAN, P.H. & KOHLI, J.D.: A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 18: 57-79; 1978b.
- GRAEFE, K.-H.; STEFANO, F.J.E. & LANGER, S.Z.: Stereoselectivity in the metabolism of ³H-noradrenaline during uptake and efflux from the isolated rat vas deferens. Naumyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol., 299: 225-38; 1977.
- HENDLEY, E.D. & SNYDER, S.H.: Stereoselectivity of catecholamine uptake in noradrenergic and dopaminergic peripheral organs. Europ.J.Pharmacol., 19: 56-66; 1972.
- IMBS, J.L.; SCHMIDT, M.; VELLY, J. & SCHWARTZ, J.: Effects of apomorphine and of pimozide on renin secretion in the anaesthetized dog. Europ.J.Pharmacol., 38: 175-78; 1976.
- IVERSEN, L.L.: The inhibition of noradrenaline uptake by drugs. In: Advances in Drug Research ed. HARPER, N.J. & SIMMONDS, A.B.; London, Academic Press; Vol.2, pp.1-46; 1965.
- IVERSEN, L.L.: The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge, UK; Cambridge University Press; 1967.
- IVERSEN, L.L.: Neuronal and extra-neuronal catecholamine uptake mechanisms. In: Frontiers in Catecholamine Research, ed. USDIN, E. & SNYDER, S.; New York, Pergamon Press Inc., pp. 403-8; 1973.
- IVERSEN, L.L.: Dopamine receptors in the brain. Science, 188: 1084-89; 1975.

- JANIS, R.A. & TRIGGLE, D.J.: A comparison of adrenergic α -receptors by the use of N,N-dimethyl-2-bromo-2-phenyl-ethylamine (DMPEA). J.Pharm.Pharmacol., 23: 707-8; 1971.
- JANIS, R.A. & TRIGGLE, D.J.: On the question of subclassification of α -adrenoceptors. J.Pharm.Pharmacol., 25: 263-4; 1973.
- JANSSEN, P.A.J.; NIEMEGERES, C.J.E.; SCHELLEKENS, K.H.L.; DRESSE, A.; LENAERTS, F.M.; PINCHARD, A.; SCHAPER, W.K.A. VAN NEUTEN, J.M. & VERBRUGGEN, F.J.: Pimozide, a chemically novel, highly potent and orally long-acting neuroleptic drug. Part I: The comparative pharmacology of pimozide, haloperidol, and chlorpromazine. Arzneim.Forsch., 18: 261-79; 1968.
- JOHNSON, A.M.; LOEW, D.M. & VIGOURET, J.M.: Stimulant properties of bromocriptine on central dopamine receptors in comparison to apomorphine, (+)-amphetamine and L-dopa. Brit.J.Pharmacol., 56: 59-68; 1976.
- JURKIEWICZ, A.: Responsividade relativa de receptores farmacológicos (ρ). Considerações teóricas e determinação experimental. São Paulo, 1970. Tese. 148pp.
- JURKIEWICZ, A.; ABDO, A.O.; JURKIEWICZ, N.H.; GUEDES, A.O. & SOUCCAR, C.: Relative responsiveness (ρ): a critical analysis of a new method in receptor differentiation. Gen.Pharmacol., 7: 93-101; 1976.
- JURKIEWICZ, A. & JURKIEWICZ, N.H.: Dual effect of α -adrenoceptor antagonists in rat isolated vas deferens. Brit.J.Pharmacol. 56: 169-78; 1976.

- JURKIEWICZ, A.; JURKIEWICZ, N.H.; BARROS, G.G. & VALLE, J.R.: Relative responsiveness (ρ) of pharmacological receptor systems in the rat vas deferens. Pharmacology, 2: 89-99; 1969.
- JURKIEWICZ, N.H.; JURKIEWICZ, A.; GOMES, C.B. & AUCELIO, J.G.: Pharmacodynamic analysis of the rat isolated vas deferens after transplantation to the intestinal wall. J.Pharmacol.exp.Ther., 203: 112-19; 1977.
- JURKIEWICZ, A.; LANGELOH, A. & GUEDES, A.O.: Time-response curves for barium and noradrenaline in vas deferens of castrated rat. Europ.J.Pharmacol., 45: 145-51; 1977.
- KOHLI, J.D.; VOLKMAN, P.H.; GLOCK, D. & GOLDBERG, L.I.: Metoclopramine and sulpiride: antagonists of the vascular dopamine receptor. Fed.Proc., 37: 792; 1978.
- KRZANOWSKI, J.J., Jr. & WOODBURY, R.A.: Influence of tyramine on receptor interaction with dibenamine in aortic strips from reserpine-treated rabbits. J.Pharmacol. exp. Ther., 154: 472-80; 1966.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J.P.; LUDUENA, F.P. & BROWN, T.G.: Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. Nature, 214: 597-8; 1967.
- LANDS, A.M.; GROBLEWSKI, G.E. & BROWN, T.G.: Comparison of the action of isoproterenol and several related compounds on blood pressure, heart and bronchioles. Arch. int. Pharmacodyn., 161: 68-75; 1966
- LANGELOH, A.; JURKIEWICZ, N.H. & JURKIEWICZ, A.: Efeitos da cocaína em ductos deferentes de ratos após depleção de catecolaminas por desnervação cirúrgica e por tratamento a baixa temperatura. Ciência e Cultura, 30 (Supl): 451; 1978.

- LANGER, S.Z.: The metabolism of ^3H -noradrenaline released by electrical stimulation from the isolated nictitating membrane of the cat and from the vas deferens of the rat. J.Physiol. (London): 208: 515-46; 1970.
- LANGER, S.Z.: Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. Brit.J.Pharmacol. 60: 481-97; 1977.
- LEE, T.J-F.; WESTFALL, D.P. & FLEMING, W.W.: The correlation between spontaneous contractions and postjunctional supersensitivity of the smooth muscle of the rat vas deferens. J.Pharmacol.exp.Ther., 192: 136-48; 1975.
- MARTINS, T.: Cinética da genitália masculina e seu controle pelos hormônios sexuais. Rio de Janeiro, 1952. Tese. 91p.
- MCNAY, J.L. & GOLDBERG, L.I.: Comparison of the effects of dopamine, isoproterenol, norepinephrine and bradykinin on canine renal and femoral blood flow. J.Pharmacol.exp.Ther., 151: 23-31; 1966.
- MULLER, M.J. & PATON, D.M.: Présynaptic inhibitory actions of 2-substituted adenosine derivatives on neurotransmission in rat vas deferens: Effects of inhibitors of adenosine uptake and deamination. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 306: 23-8; 1979.
- PAIVA, T.B.; MIYAMOTO, M.E.; JULIANO, L. & PAIVA, A.C.M.: Requirements for angiotensin tachyphylaxis in smooth muscles. J.Pharmacol.exp.Ther., 202: 294-300; 1977.
- PATIL, P.N.; BURKMAN, A.M.; YAMAUCHI, D. & HETÉY, S.: Analysis of the effects of apomorphine and bulbocapnine in relation to the proposed dopamine receptor. J.Pharm. Pharmacol., 25: 221-8; 1973.

- PATIL, P.N.; PATEL, D.G. & KRELL, R.D.: Steric aspects of adrenérgic drugs. XV. Use of isomeric activity ratio as a criterion to differentiate adrenérgic receptors. J.Pharmacol.exp.Ther., 176: 622-33; 1971.
- PICARELLI, Z.P.; HYPPOLITO, N. & VALLE, J.R.: Synergistic effect of 5-hydroxytryptamine on the response of rats' seminal vesicles to adrenaline and noradrenaline. Arch.int.Pharmacodyn., 138: 354-63; 1962
- POWELL, C.E. & SLATER, I.H.: Blocking of inhibitory adre nérgic receptors by a dicholoro analogue of isoproterenol. J.Pharmacol.exp.Ther., 122: 480-8; 1958.
- SCHILD, H.O.: Drug antagonism and pA_x . Pharm.Rev., 9:242-6; 1957.
- SETLER, P.E.; PENDLETON, R.G. & FINLAY, E.: The cardiovascular actions of dopamine and the effects of central and peripheral catecholaminergic receptor blocking drugs. J.Pharmacol.exp.Ther., 192: 702-12; 1975.
- SIMON, A. & VAN MAANEN, E.F.: Apomorphine and phentolamine antagonism of dopamine and norepinephrine. Fed.Proc., 30: 624; 1971.
- SIMON, A. & VAN MAANEN, E.F.: Dopamine receptors and dopa minérgic nerves in the vas deferens of the rat. Arch.int.Pharmacodyn., 222: 4-15; 1976.
- SJÖSTRAND, N.O. & SWEDIN, G.: Influence of age, growth, castration, and testosterone treatment on the noradrenaline levels of the ductus deferens and the auxiliary male reproductive glands of the rat. Acta.physiol.scand., 98: 323-38; 1976.

- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, G.C.: Statistical Methods. 6^o ed. Ames, Iowa State University Press, 1967.
- SWEDIN, G.: Effect of nerve stimulation in vitro on the noradrenaline content of the rat vas deferens in the presence of inhibitors of noradrenaline uptake and synthesis. Acta physiol.scand., 84: 224-30; 1972.
- TAYO, F.M.: Further evidence for dopaminoceptors in the vas deferens. Brit.J.Pharmacol., 59: 511-512P; 1977.
- TAYO, F.M.: Prejunctional inhibitory α -adrenoceptors and dopaminoceptors of the rat vas deferens and the guinea-pig ileum in vitro. Europ.J.Pharmacol., 58: 18-95; 1979a.
- TAYO, F.M.: Effects of nomifensine on the isolated vas deferens of the rat. Arch.int.Pharmacodyn., 240: 94-102; 1979b.
- TRENDELENBURG, :U.: Classification of sympathomimetic amines. In: Catecholamines, Handb.Exp.Pharm.XXXIII, ed. BLASCHKO, H. & MUSCHOLL, E., Berlin, Springer-Verlag; Cap.10, pp.336-62; 1972.
- VALLE, J.R.: Farmacologia do canal deferente e da vesícula seminal do cobaio (papel dos hormônios sexuais). São Paulo, 1939. Escola Paulista de Medicina, Têse, 44p.
- VAN NEUTEN, J.M.; RENEMAN, R.S. & JANSSEN, P.A.J.: Specific α -adrenoceptor blocking effect of droperidol on isolated smooth muscle. Europ.J.Pharmacol., 44: 1-8; 1977.
- VAN ORDEN, L.S., III; BLOOM, F.E.; BARNETT, R.J. & GIARMAN, N.J.: Histochemical and functional relationships of catecholamines in adrenergic nerve endings. I. Participation of granular vesicles. J.Pharmacol.exp.Ther., 154: 185-99; 1966.

- VAN ROSSUM, J.M.: Different types of sympathomimetic α -receptors. J.Pharm.Pharmacol., 17: 202-16; 1965.
- VAN ROSSUM, J.M.: Cumulative dose-response curves. II. The technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. Arch. int. Pharmacodyn., 143: 299-330; 1963.
- VAN ROSSUM, J.M. & VAN DEN BRINK, F.G.: Cumulative dose-response curves. I. Introduction to the technique. Arch. int. Pharmacodyn., 143: 240-6; 1963.
- WADDELL, J.A.: The pharmacology of the vas deferens. J.Pharmacol.exp.Ther., 8: 551-9; 1916.
- WAKADE, A.R. & KIRPEKAR, S.M.: Chemical and histochemical studies on the sympathetic innervation of the vas deferens and seminal vesicle of the guinea-pig. J.Pharmacol.exp.Ther., 178: 432-41; 1971.
- WAKADE, A.R.; GARCIA, A.G. & KIRPEKAR, S.M.: Effect of castration on the smooth muscle cells of the internal sex organs of the rat: Influence of the smooth muscle on the sympathetic neurons innervating the vas deferens, seminal vesicle and coagulating gland. J.Pharmacol.exp.Ther., 193: 424-34; 1975.
- WAUD, D.R.: Pharmacological receptors. Pharmacol.Rev., 20: 49-88; 1968.
- WESTFALL, D.P.: The effects of denervation, cocaine, 6-hydroxydopamine and reserpine on the characteristics of drug-induced contractions of the depolarized smooth muscle of the rat and guinea-pig vas deferens. J.Pharmacol.exp.Ther., 201: 267-75; 1977.

WESTFALL, D.P.; LEE, T.J-F. & STITZEL, R.E.: Morphological and biochemical changes in supersensitive smooth muscle. Fed.Proc., 34: 1985-9; 1975.

YEH, B.K.; McNAY, J.L. & GOLDBERG, L.: Attenuation of dopamine renal and mesenteric vasodilatation by haloperidol : evidence for a specific dopamine receptor. J.Pharmacol. exp.Ther., 168: 303-9; 1969.
