

Capítulo 3

Efeitos contrácteis dos triptanos em vasos sanguíneos humanos

1. Introdução e Objectivos

A eficácia clínica dos triptanos no tratamento agudo da enxaqueca tem sido parcialmente atribuída à sua capacidade de induzir contração de vasos sanguíneos intracranianos excessivamente dilatados (Moskowitz, 1992; Goadsby et al., 2002). O receptor envolvido na resposta contráctil a triptanos, tanto de vasos sanguíneos humanos periféricos, como centrais, tem sido caracterizado como sendo do subtipo 5-HT_{1B} (Morecroft et al., 1999; Nilsson et al., 1999a; Verheggen et al., 1998; Razzaque et al., 1999).

No entanto, têm surgido na literatura dados que sugerem o envolvimento dos triptanos e da sua capacidade vasoconstritora em acidentes isquémicos graves afectando órgãos tanto centrais (Cavazos et al., 1994; Vijayan e Peacock, 2000) como periféricos (Willet et al., 1992; Ottervanger et al., 1993a; Witting, 1996; Knudsen et al., 1998; Liu e Ardolf, 2000).

Com o intuito de reduzir a incidência de tais efeitos adversos de natureza isquémica, têm sido sintetizados novos compostos que atravessem a barreira hematoencefálica e que, dada a distribuição diferencial no sistema trigémino-vascular humano dos subtipos de receptores 5-HT_{1B/1D/1F} (Bouchelet et al., 1996; Longmore et al., 1997a), sejam mais selectivos para os subtipos de receptores 5-HT_{1D} e 5-HT_{1F}, podendo potencialmente inibir a transmissão central da dor, a nível das estruturas do tronco cerebral e cervicoespinhais (Martin, 1997),

hipoteticamente sem a vasoconstrição periférica concomitante, subjacente aos efeitos adversos cardiovasculares atribuídos aos triptanos.

De forma a avaliar o mecanismo vascular subjacente a estes efeitos adversos, têm sido efectuados vários estudos *in vitro*, nos quais se avaliam os efeitos contrácteis dos triptanos em vasos sanguíneos humanos, quer cerebrais, quer periféricos. Poucos são os estudos que discriminaram farmacologicamente o subtipo de receptor 5-HT₁ envolvido nesses efeitos. De facto, devido à semelhança de perfis farmacológicos dos subtipos de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} (Hartig et al., 1996), muitos destes estudos não utilizaram antagonistas selectivos dos dois subtipos de receptores, ou são estudos moleculares de análise dos respectivos RNAm por PCR-RT, ou são estudos imunohistoquímicos com anticorpos específicos dos dois subtipos de receptores, pelo que não garantem a caracterização farmacológica de cada um dos subtipos de receptores, nem a expressão real ou a funcionalidade dos mesmos em tecidos nativos.

Efectivamente, com a utilização da técnica de PCR-RT, tem sido demonstrado que o RNAm do receptor 5-HT_{1B} predomina sobre o RNAm do receptor 5-HT_{1D} na artéria cerebral média (Hamel et al., 1993; Bouchelet et al., 1996), artéria meníngea média (Schmuck et al., 1996), artéria temporal (Verheggen et al., 1998) e na artéria coronária (Nilsson et al., 1999a; Bouchelet et al., 2000). A proteína do receptor 5-HT_{1B} tem sido também localizada nas células musculares lisas da artéria cerebral média (Nilsson et al., 1999b), artéria meníngea média (Longmore et al., 1997a; Longmore et al., 1998) e artéria coronária (Longmore et al., 1998; Nilsson et al., 1999a), enquanto que a proteína do receptor 5-HT_{1D} é pouco, ou não é de todo expressa, o que sugere fortemente que a vasoconstrição nestes vasos sanguíneos é mediada por receptores 5-HT_{1B} e não 5-HT_{1D}. A maioria dos estudos farmacológicos funcionais *in vitro* tem utilizado antagonistas não selectivos 5-HT_{1B/1D}, como o GR 55562 e o GR 127935 na artéria cerebral, ou o GR 125743, nos estudos em artérias corticais e artérias meníngeas médias (van den Broek et al., 2000; Jansen et al., 1992; Nilsson et al.,

1999b; Razzaque et al., 1999; van den Broek et al., 2000). Só recentemente a utilização do SB 224289 (Selkirk et al., 1998) e do BRL 15572 (Price et al., 1997), como antagonistas selectivos dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, respectivamente, possibilitou determinar farmacologicamente que o subtipo de receptor 5-HT₁ envolvido na contracção da artéria meníngea média (van den Broek et al., 2002), da artéria temporal (Verheggen et al., 1998; van den Broek et al., 2002), da artéria coronária (van den Broek et al., 2002), da artéria mesentérica (Gul e Yildiz, 2002) e de pequenas artérias pulmonares (Morecroft et al., 1999) é o 5-HT_{1B}.

Porque os receptores 5-HT_{1D} têm sido descritos como tendo uma localização pré-sináptica e não pós-sináptica, com pouca ou nenhuma contribuição para a vasoconstrição (Bouchelet et al., 1996; Bouchelet et al., 2000), o seu envolvimento na resposta contráctil aos triptanos não tem sido considerado na maioria dos estudos referidos. No entanto, é de salientar que o RNAm para o receptor 5-HT_{1D} foi detectado em duas de oito amostras de artéria temporal humana (Verheggen et al., 1998) e que foi detectada imonureactividade ao receptor 5-HT_{1D} nas artérias meníngea média e coronária humanas, embora tenha sido considerada negligenciável (Longmore et al., 1998).

Por outro lado estes estudos revelaram-se contraditórios quanto à real contribuição dos receptores 5-HT_{1B/1D} na mediação dos efeitos contrácteis da 5-HT, quer a nível periférico, quer a nível central: na artéria coronária humana, enquanto alguns autores observaram que a contracção do sumatriptano era apenas 21-22% da resposta máxima obtida com a 5-HT (Connor et al., 1989; Bax et al., 1993), Nilsson e colaboradores (1999) verificaram, no mesmo vaso sanguíneo, que a contracção pelo sumatriptano correspondia a 55% da contracção máxima obtida com a 5-HT; na artéria uterina humana, também um vaso sanguíneo periférico, após a demonstração da presença de receptores do tipo 5-HT₂ a mediar a resposta contráctil à 5-HT por Fontes Ribeiro e colaboradores (1991), Karlsson e colaboradores (1997) verificaram que receptores do tipo 5-HT₁

contribuíam minoritariamente para o efeito contráctil daquele agonista; finalmente, enquanto que Razzaque e colaboradores (2002) observaram que o sumatriptano não tinha qualquer efeito contráctil na artéria temporal humana e esta não apresentava qualquer imunoreactividade ao receptor 5-HT_{1B}, Verheggen e colaboradores (1998) através de técnicas farmacológicas e análise de RNAm por PCR-RT concluíram que o efeito contráctil do sumatriptano neste vaso sanguíneo era relevante e era mediado por receptores 5-HT_{1B}.

Pelo descrito parece importante estudar os mecanismos farmacológicos que poderão estar subjacentes aos efeitos adversos isquémicos associados à toma de triptanos, procedendo-se à caracterização farmacológica do subtipo de receptor 5-HT₁ que medeia a contracção de vasos sanguíneos humanos, quer centrais, quer periféricos, induzida por triptanos, e comparando a actividade de triptanos de diferentes gerações nesses vasos sanguíneos, através das respectivas actividade intrínsecas e potências, o que pode contribuir para definir os seus perfis de segurança cardio e cerebrovascular.

Neste contexto foram identificados como objectivos do estudo:

1. Caracterizar os receptores que medeiam a resposta contráctil de vasos sanguíneos humanos à 5-HT e aos triptanos, através de estudos funcionais de contracção vascular e utilizando o sumatriptano como fármaco padrão do grupo farmacológico.
2. Verificar a contribuição de receptores do tipo 5-HT₂ na resposta contráctil à 5-HT de vasos sanguíneos centrais e periféricos.
3. Caracterizar farmacologicamente os subtipos de receptores 5-HT₁ que medeiam a resposta contráctil aos triptanos, através da utilização de antagonistas selectivos desses receptores.
4. Utilizar vasos sanguíneos humanos que são modelos de artérias centrais e periféricas e, das primeiras, que sejam representativas da circulação cerebral anterior e posterior ou vertebrobasilar. Para este

objectivo pretende-se utilizar respectivamente a artéria cerebral média, a artéria basilar e a artéria uterina.

5. Estudar comparativamente a resposta contráctil à 5-HT, sumatriptano, naratriptano e zolmitriptano nos vasos sanguíneos seleccionados, procurando esclarecer sobre a selectividade dos triptanos em termos de território vascular.
6. Uma vez que é utilizado material biológico humano *post-mortem*, pretende-se avaliar a funcionalidade dos receptores envolvidos na resposta contráctil aos triptanos com o tempo de isolamento do vaso sanguíneo, para o que se mimetizam as condições *post-mortem* com a artéria uterina, que é obtida *ex vivo*.
7. Complementar os estudos funcionais com técnicas moleculares que permitirão detectar a proteína de diferentes subtipos de receptores 5-HT₁ no material biológico em estudo, mediante a utilização de anticorpos específicos de cada um desses receptores (técnica de *Western Blot*).
8. Estudar a micro-anatomia dos vasos sanguíneos seleccionados recorrendo a técnicas histológicas de rotina e à imunohistoquímica, procurando caracterizar a natureza muscular ou elástica dos mesmos.
9. Complementar os estudos funcionais e moleculares com técnicas de imunohistoquímica de marcação de diferentes subtipos de receptores 5-HT₁ no material biológico em estudo, mediante a utilização de anticorpos específicos de cada um desses receptores, permitindo determinar a localização celular dos mesmos.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização dos indivíduos a partir dos quais foi obtido o material biológico utilizado

Isolaram-se artérias basilares e artérias cerebrais médias a partir de cadáveres submetidos a autópsia, com $24,34 \pm 1,30$ (média \pm erro padrão) horas *post-mortem* para o grupo de experiências com artérias basilares, e com $22,18 \pm 2,00$ (média \pm erro padrão) horas *post-mortem* para o grupo de experiências com artérias cerebrais médias. As causas de morte envolveram essencialmente acidentes de viação, suicídio por enforcamento, afogamento e acidentes cardiovasculares. Foram excluídos casos de suspeita de intoxicação ou envenenamento, bem como suspeita ou declarada doença infecto-contagiosa. O número total de indivíduos no estudo foi de 59 e maioritariamente do sexo masculino (54 homens e 5 mulheres), com uma média de idades de $48,28 \pm 2,79$ anos no estudo da artéria basilar, e uma média de $55,67 \pm 3,56$ anos no estudo da artéria cerebral média. Os tecidos foram obtidos no Serviço de Tanatologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal – delegação de Coimbra, sob um protocolo estabelecido para esse efeito e de acordo com as directivas que, em Portugal, regulamentam a utilização de material biológico humano obtido em cadáver para fins de ensino e de investigação científica (Decreto-Lei nº274/99 de 22 de Julho).

As artérias uterinas foram isoladas a partir de peças operatórias de 33 mulheres normotensas, com idades compreendidas entre os 35 e os 60 anos (média de $47,55 \pm 1,00$ anos), submetidas a histerectomia por miomatose no Instituto Maternal Bissaya Barreto em Coimbra. Os tecidos foram obtidos mediante um protocolo estabelecido entre o Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina de Coimbra e a referida instituição hospitalar. Em todas as intervenções a

indução anestésica foi obtida com propofol e a anestesia continuada com sevoflurano. Utilizou-se como miorreaxante periférico o atracurium.

2.2. Preparação dos tecidos

Após o isolamento do cérebro do cadáver no decurso normal das autópsias, artérias basilares e artérias cerebrais médias, macroscopicamente normais, foram isoladas e colocadas imediatamente numa solução fisiológica gelada e oxigenada de Krebs-Henseleit¹. As experiências ocorreram num prazo de 48 horas após a morte para as artérias basilares e de 24 horas para as artérias cerebrais médias, por termos verificado experimentalmente, em estudos preliminares, a perda de reactividade vascular dos referidos tecidos à 5-HT após os respectivos períodos de tempo.

A dissecação das artérias uterinas, com diâmetro externo *in situ* de cerca de 3 mm, ocorreu dentro dos trinta minutos após a extracção do útero, desprezando as que não tinham aspecto macroscopicamente normal ou que tinham sido danificadas pelos instrumentos cirúrgicos. Os vasos sanguíneos foram colocados imediatamente numa solução fisiológica de Krebs-Henseleit fria e transportados para o laboratório num recipiente isotérmico com gelo moído.

Já no laboratório, procedeu-se à remoção do tecido adiposo e tecido conjuntivo adjacente, após o que as artérias foram cortadas em anéis vasculares de aproximadamente 3 mm. Não se usaram segmentos vasculares contendo lesões ateroscleróticas distintas e macroscopicamente visíveis. Os anéis vasculares foram suspensos entre duas ansas de platina sob a tensão óptima basal de 19,6 mN (uma massa de um grama sob condições gravitacionais exerce uma força de 9,8 mN) (Lew e McPherson, 1996) para anéis de artéria basilar e cerebral média, e de 29,4 mN para

¹ Solução de Krebs-Henseleit (composição em mmoles/L): NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO₄·7H₂O 0,57; CaCl₂ 1,90; KH₂PO₄·2H₂O 0,90; NaHCO₃ 25,0; glucose 11,1 e pH 7,4.

anéis de artéria uterina, em banhos de órgãos de 15 ml com solução Krebs-Henseleit, arejada com carbogênio (mistura de 5% de anidrido carbônico e 95% de oxigênio) e mantida a 37°C (termóstato GFL), de acordo com a metodologia descrita por Fontes Ribeiro e colaboradores (1991). A tensão ótima basal para cada órgão foi determinada em experiências preliminares, nas quais se estudou, sob diferentes tensões, a reactividade da artéria basilar e cerebral média a uma curva cumulativa concentração-resposta à 5-HT e a reactividade da artéria uterina a uma curva de adições independentes concentração-resposta a 50 mM de cloreto de potássio. A tensão basal em cada experiência foi aquela que ocorreu espontaneamente no tecido submetido à tensão ótima, após o período de equilíbrio que se segue à montagem do órgão.

2.3. Protocolo experimental – estudos funcionais

Após um período de 2 horas de equilíbrio das preparações e lavagens periódicas de forma a neutralizar o efeito de fármacos, registaram-se com transdutores de força da Leticia Scientific Instruments, num oscilógrafo de quatro canais (Polygraph 4006 – Leticia Scientific Instruments), as contracções isométricas de curvas cumulativas concentração-resposta de 5-HT, sumatriptano, naratriptano ou zolmitriptano, na presença de 10 µM de cloridrato de cocaína para inibir a captação neuronal (Guimarães et al., 1978), 40 µM de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) para inibir a captação extraneuronal (Head et al., 1986) e 250 µM do éster metílico de N^G-Nitro-L-arginina (*N^G-Nitro-L-arginine methylester*, L-NAME) como inibidor da sintetase do NO (Rees et al., 1990), os quais foram adicionados ao banho de órgão trinta minutos antes de cada curva cumulativa concentração-resposta. Nas experiências fizeram-se 2 curvas cumulativas concentração-resposta. Trinta minutos antes da última curva concentração-resposta foram adicionados fármacos antagonistas de diferentes subtipos de receptores de 5-HT: cianopindolol

(antagonista dos receptores 5-HT_{1A/1B}), SB 224289 (antagonista dos receptores 5-HT_{1B}), BRL 15572 (antagonista dos receptores 5-HT_{1D}) ou cetanserina (antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}). Em todos as experiências foram utilizados anéis vasculares controlo, aos quais se adicionou apenas os solventes apropriados para cada fármaco antagonista.

As respostas contrácteis à última curva concentração-resposta do agonista foram expressas em percentagem da contracção máxima obtida na curva concentração-resposta imediatamente anterior (curva controlo do respectivo anel). Os resultados finais de cada experiência foram expressos em percentagem da resposta obtida nos anéis controlos.

Os resultados foram igualmente analisados em termos de mN de tensão como forma de traduzir em valores absolutos a capacidade contráctil dos diferentes agonistas testados. As potências dos agonistas nos diferentes vasos sanguíneos estudados foram traduzidas em termos de pCE₅₀ (logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pCE₅₀ foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa concentração-resposta em escala semilogarítmica (% da contracção máxima versus logaritmo da concentração em mmole/L), usando um programa de computador (CurveExpert, versão 1.3 para Windows). Assim os valores de Emáx e pCE₅₀ representam, respectivamente, a actividade intrínseca (capacidade contráctil máxima) e a potência de cada fármaco em induzir uma resposta, isto é, a contracção vascular.

2.4. Validação da funcionalidade do material biológico *post-mortem* utilizado

No início do estudo impôs-se uma validação em termos funcionais do material biológico *post-mortem* utilizado, nomeadamente a resposta contráctil a fármacos serotoninérgicos. Com esse fim mimetizaram-se

experimentalmente as condições do material biológico *post-mortem* obtido em autópsias e comparou-se a resposta contráctil de artérias uterinas humanas *ex vivo* com diversos tempos de isolamento a três curvas cumulativas concentração-resposta de 5-HT, com a de artérias uterinas humanas *post-mortem*.

Assim, neste conjunto de experiências, paralelamente ao isolamento dos segmentos vasculares de artéria uterina *ex vivo* destinados a ensaio no próprio dia (tempo 0), isolaram-se outros segmentos da mesma artéria, que se conservaram a 4°C sem solução fisiológica, por períodos de 24 e/ou 48 horas. Nestes últimos segmentos efectuaram-se experiências às 24 e/ou 48 horas de isolamento, seguindo a mesma metodologia das efectuadas ao tempo 0. Finalmente utilizou-se a mesma metodologia em artérias uterinas, desta feita isoladas a partir de cadáveres da mesma faixa etária e respeitando os critérios estipulados para a colheita das artérias basilar e cerebral média.

2.5. Avaliação da funcionalidade dos subtipos de receptor 5-HT₁ ao longo do tempo, após isolamento do tecido

Para avaliar a funcionalidade dos receptores do subtipo 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} ao longo do tempo, após isolamento do tecido, efectuaram-se dois conjuntos de ensaios.

Num, efectuaram-se experiências na artéria uterina *ex vivo* avaliando as respostas contrácteis a duas curvas sucessivas e cumulativas concentração-resposta de sumatriptano, ambas efectuadas quer na ausência ou na presença de 10 µM de cianopindolol, antagonista de receptores 5-HT_{1A/1B}. Os resultados foram traduzidos em percentagem da resposta contráctil obtida com 100 mM de KCl.

Noutro grupo de ensaios conduziram-se experiências na artéria uterina *ex vivo*, após 24 horas de isolamento do tecido, com vista igualmente à caracterização farmacológica dos receptores envolvidos na resposta contráctil ao sumatriptano. Assim anéis vasculares da mesma artéria uterina testada às 0 horas, foram conservados a 4°C sem soluto fisiológico e, 24 horas depois, foram montados e testados com cianopindolol ou SB 224289 e BRL 15572 como descrito na secção 2.3.

Finalmente com o objectivo de comparar a resposta contráctil da artéria uterina ao sumatriptano ao longo do tempo, com aquela dos vasos sanguíneos cerebrais, as contracções obtidas em 3 curvas sucessivas cumulativas concentração-resposta de sumatriptano no vaso sanguíneo periférico foram comparadas com aquelas obtidas nas artérias basilar e cerebral média.

2.6. Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais

Avaliaram-se as diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pCE_{50} calculados para cada agonista, bem como as diferenças entre as respostas contrácteis induzidas por cada dose da curva concentração-resposta do agonista executada na ausência (controlo) e na presença dos diferentes antagonistas, com o teste de *Tukey* de comparações múltiplas, uma vez verificada pela análise de variância (ANOVA) que as amostra não provinham da mesma população (SPSS versão 11.0 para Windows). A significância estatística das diferenças entre dois grupos de valores foi calculada pelo teste *t* de *Student* de dados emparelhados ou não emparelhados, consoante as situações. Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicadores de diferenças estatisticamente significativas. Neste trabalho todos os resultados, quer no texto, quer nos gráficos e tabelas, estão apresentados

como médias \pm erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, SEM) do número de experiências (n) indicado.

2.7. Fármacos utilizados nos estudos funcionais

Os reagentes utilizados na preparação da solução de Krebs-Henseleit foram adquiridos na Merck e foram produtos *pro analysi*. Usaram-se os seguintes fármacos neste estudo: acetato de desoxicorticosterona, cloridrato de cocaína e cloridrato de 5-hidroxitriptamina da Sigma (EUA), L-tartarato-L-noradrenalina da Merck (EUA), fumarato de cianopindolol, cloridrato de SB 224289, cloridrato de BRL 15572 da Tocris (GB), tartarato de cetanserina da Janssen Pharmaceutical (Bélgica), succinato de sumatriptano e cloridrato de naratriptano, gentilmente cedidos pela GlaxoWellcome (GB), zolmitriptano, gentilmente cedido pela AstraZeneca (GB), L-NAME da RBI (EUA). As soluções dos fármacos foram preparadas extemporaneamente nos solventes recomendados pelos fabricantes.

2.8. Protocolo experimental – Detecção de proteínas por *Western blot*

Com o objectivo de investigar a presença das proteínas dos subtipos de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nas artérias basilar, cerebral média e uterina humanas, analisámos, por *Western blot*, as proteínas dos extractos de lisados de amostras dos referidos vasos, aos quais fora removido o endotélio, utilizando anticorpos específicos de cada um desses subtipos de receptores. Seguiu-se a metodologia descrita por Geerts e colaboradores, (2000).

Os lisados de amostras congeladas de artéria cerebral média e basilar humanas *post-mortem* (média de 24 horas *post-mortem*) e de artéria uterina humana *ex vivo*, foram obtidos por homogeneização mecânica em *potter* e depois por sonicação (quatro vezes, durante 4 segundos, a média

intensidade, em sonicador VibraCell da Sonics & Materials, Inc) em tampão de lise² gelado, adicionado à razão de 3 mL por grama de tecido. De seguida os lisados foram centrifugados a 10 000 x g (centrífuga Sigma 3k30) à temperatura de 4° C, durante 10 minutos. No sobrenadante foi feita a quantificação das proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Os extractos assim obtidos foram armazenados a -70°C até à aplicação no gel. As proteínas dos extractos foram então desnaturadas por fervura a seco (Stuart Scientific) em solução desnaturante³, e amostras de 60µg de proteína foram separadas por electroforese⁴ em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) no sistema Mini-Protean II Cell da BioRad. De acordo com o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), as proteínas foram separadas conforme o seu peso molecular utilizando um gel de separação com 10% de acrilamida, e posteriormente foram electrotransferidas para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF) previamente activada em metanol, usando o sistema TransBlot Cell da BioRad. A electrotransferência⁵ realizou-se durante a noite, à voltagem constante de 40 V e à temperatura de 10°C. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração das membranas com uma solução aquosa de Ponceau S a 0,2% (m/v) ou por coloração do gel com azul de Coomassie.

Após o bloqueio da membrana, durante uma hora, com 5% (m/v) de leite magro em tampão Tris salino⁶ (*Tris Buffer Saline*, TBS) e com Tween-20 0,1% (v/v) (TBST), com o objectivo de bloquear as ligações não específicas dos anticorpos, as proteínas em estudo foram detectadas por incubação da membrana com os anticorpos primários. Utilizaram-se os anticorpos de coelho anti-5-HT_{1B} humano, na diluição de 1:1000 e/ou de

² Tampão de lise: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4, nonidet P-40 1% (v/v), SDS 0,1% (m/v), desoxicolato de sódio 0,5% (m/v), PMSF 0,574 mM, NaF 10 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, mistura de inibidores de proteases.

³ Solução desnaturante de proteínas: Tris 200 mM, glicina 200 mM, ureia 8 M, SDS 4% (m/v), β-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v)

⁴ Tampão de electroforese: Tris 100 mM, bicina 100 mM, SDS 0,1% (m/v).

⁵ Tampão de electrotransferência: Glicina 96 mM, metanol 20% (v/v), Tris 12,5 mM.

⁶ TBS: Tris 200 mM, NaCl 1,37 M, pH 7,6.

coelho anti-5-HT_{1D} humano, na diluição 1:1000 – 1:500, em 1% (m/v) de leite magro em TBST durante uma hora à temperatura ambiente. Seguiu-se uma incubação com anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina, dirigido contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário, na diluição 1:20 000, em 1% (m/v) de leite magro em TBST durante uma hora à temperatura ambiente. Os anticorpos que não ligaram, quer primários, quer secundários, foram removidos por lavagem da membrana, durante 30 minutos, em 0,5% (m/v) de leite magro em TBST. Os imunocomplexos foram visualizados por fluorescência, utilizando o reagente de ECF (*Enhanced Chemifluorescence*, Quimiofluorescência Melhorada) num detector STORM (Molecular Dynamics). Para demonstrar a presença de igual quantidade de proteína nas diferentes amostras, procedeu-se ao *stripping*⁷ da membrana, durante 30 minutos, a 55°C e com agitação ocasional. Após lavagem das membranas com TBST procedeu-se de novo à técnica de *Western blot*, acima descrita, com o anticorpo contra a proteína actina. A expressão das proteínas em cada situação foi analisada utilizando o programa de computador Adobe Photoshop 7.0.

2.9. Análise estatística dos resultados da técnica de *Western blot*

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (SEM) do número de experiências (n) indicado nas figuras e/ou nas suas legendas. A significância das diferenças entre dois ou mais grupos de valores foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de *Tukey*. Consideraram-se os valores de *p* inferiores a 0,05 (*p*<0,05) como representando diferenças significativas.

⁷ Solução de *stripping*: β-mercaptoetanol 100mM, SDS 2% (m/v), Tris 62,5 mM, pH 6,7.

2.10. Materiais e reagentes usados na técnica de *Western blot*

Anticorpo monoclonal contra actina produzido em murganho, membrana de PVDF, mistura de inibidores de proteases – Roche (Carnaxide, Portugal)

Imunoglobulina de cabra anti-murganho conjugada com a fostatase alcalina Tween-20, SDS, acrilamida – BioRad (Milão, Itália)

Anticorpos policlonais contra receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} humanos produzidos em coelho – Abcam Limited (Cambridgeshire, GB)

Imunoglobulina de murganho anti-coelho conjugada com a fosfatase alcalina e sistema de análise ECF para western blot – Amersham Biosciences (Carnaxide, Portugal)

Todos os outros reagentes – Sigma-Aldrich Química (Madrid, Espanha)

2.11. Protocolo experimental – Técnica de histologia e imunohistoquímica

2.11.1. Micro-anatomia dos vasos sanguíneos em estudo

Com o objectivo de determinar a natureza muscular e/ou elástica das artérias submetidas a estudos farmacológicos *in vitro*, bem como verificar a micro-anatomia das mesmas, foram realizados estudos histoquímicos (coloração com hematoxilina/eosina e coloração das fibras elásticas com orceína ácida) e imunohistoquímicos, recorrendo a marcadores específicos para as células dos neurónios (proteína S100) (Gaynor et al., 1981), células neuroendócrinas (enolase específica neuronal, *Neuronal Specific Enolase*, NSE) (Schmechel et al., 1978) e células endoteliais (Factor VIII ou Factor de Willebrand) (McComb et al., 1982).

Foram isoladas artérias basílares e artérias cerebrais médias a partir de cadáveres submetidos a autópsia com idades compreendidas entre os 41 e os 79 anos (três homens e três mulheres), de acordo com os critérios e

condições ético-legais já descritos anteriormente. As artérias uterinas foram obtidas a partir de peças cirúrgicas de três mulheres (42-51 anos) submetidas a histerectomia, também de acordo com os critérios já descritos.

Segmentos das artérias basilar, cerebral média e uterina humanas, sem tecidos adventícios, foram fixados em formol neutro tamponado a pH 7 e processados de forma convencional, com posterior inclusão em parafina.

Realizaram-se cortes histológicos de 4 μm de espessura que foram primeiramente sujeitos a coloração com hematoxilina/eosina convencional e coloração com orceína ácida.

Para os estudos de imunohistoquímica, com aplicação dos anticorpos primários anti-NSE, anti-proteína S100 e anti-Factor VIII ou Factor de Willebrand, os cortes foram desparafinados, rehidratados (xilol, álcool absoluto, álcool a 95^o) e azulados em água corrente. A peroxidase endógena foi inibida por incubação dos cortes com H₂O₂ a 3%, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada procedeu-se à recuperação antigénica através de microondas, em tampão citrato de sódio 10 mM e a pH 6, durante 20 minutos a 500 Watts. Arrefecido o tampão, e depois de lavar com TBS 0,5 M, procedeu-se à incubação no soro normal da espécie que produziu o soro secundário, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, foi limpo o excesso de solução em volta do tecido, e procedeu-se a outro período de incubação com soro primário, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e em câmara húmida. Como soros primários foram utilizados: anticorpo de ratinho anti-NSE humana, na diluição de 1:25-1:50 (DAKO, Denmark), anticorpo de coelho anti-proteína S100 de vaca, na diluição 1:200-1:400 (DAKO, Denmark) e anticorpo de coelho anti-Factor VIII humano, na diluição 1:200 (DAKO, Denmark).

Em seguida, os cortes foram lavados com TBS 0,5 M e incubados com soro secundário biotilado, durante 45 minutos a 30°C, em câmara húmida. Os cortes foram novamente lavados com TBS 0,5 M e incubados com solução de um complexo de estreptavidina-biotina ligado à peroxidase

(DAKO, Denmark) na diluição de 1:400, durante 60 minutos à temperatura ambiente, em câmara húmida. Após lavagem dos cortes com TBS 0,5 M, estes foram revelados através da solução de diaminobenzidina (DAB) diluída no mesmo tampão e lavagem posterior com água destilada. Por fim procedeu-se à coloração de contraste com hematoxilina de Mayer, diafanização, desidratação e montagem em meio sintético.

2.11.2. Localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nos três vasos sanguíneos em estudo

Com o objectivo de determinar a localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nos três vasos sanguíneos em estudo, foram aplicados anticorpos primários anti-receptor 5-HT_{1B} e anti-receptor 5-HT_{1D} e assim examinada a distribuição das respectivas imunoreactividades.

Nestes estudos com anticorpo primário de cabra anti-receptor 5-HT_{1B} humano, na diluição 1:50 e 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e anticorpo primário de cabra anti-receptor 5-HT_{1D} humano, na diluição 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), foi utilizado tampão fosfato salino⁸ (*Phosphate Buffer Saline*, PBS) e procedeu-se a incubações de uma hora, à temperatura ambiente, em câmara húmida. Não foi utilizado anticorpo secundário mas sim um polímero sintético anti-cabra ligado à peroxidase (Zymed, San Francisco, EUA), com o qual foi feita uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente em câmara húmida, de acordo com as recomendações do fabricante. A revelação foi feita igualmente com DAB.

⁸PBS: Na₂HPO₄ 9,1 mM, NaH₂PO₄ 1,7 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

2.12. Materiais e reagentes usados nos estudos histológicos e imunohistoquímicos

Anticorpo monoclonal de ratinho anti-NSE humana, DAKO-M0873; anticorpo de coelho anti-proteína S-100 de vaca, DAKO-Z311; anticorpo de coelho anti-Factor von Willebrand humano, DAKO-A082; diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO, EUA); anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{1B} humano, sc-1460 e anticorpo de cabra anti-receptor 5-HT_{1D} humano, sc-5393 (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, EUA).

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

3. Resultados

3.1. Respostas contrácteis à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano da

3.1.1. Artéria basilar humana

Na artéria basilar humana todos os agonistas, testados em concentrações entre 0,1 e 30 μM , induziram contracções concentração-dependentes (Fig. 3.1), com a seguinte ordem de actividade intrínseca (Emáx): 5-HT \geq sumatriptano > zolmitriptano = naratriptano (Tabela 3.1). As respostas contrácteis induzidas pelos triptanos testados sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano, foram, respectivamente, 88%, 67% e 50% da resposta máxica obtida com a 5-HT. A ordem de potência dos agonistas foi ($p\text{CE}_{50}$): zolmitriptano = 5-HT = sumatriptano > naratriptano (Tabela 3.1).

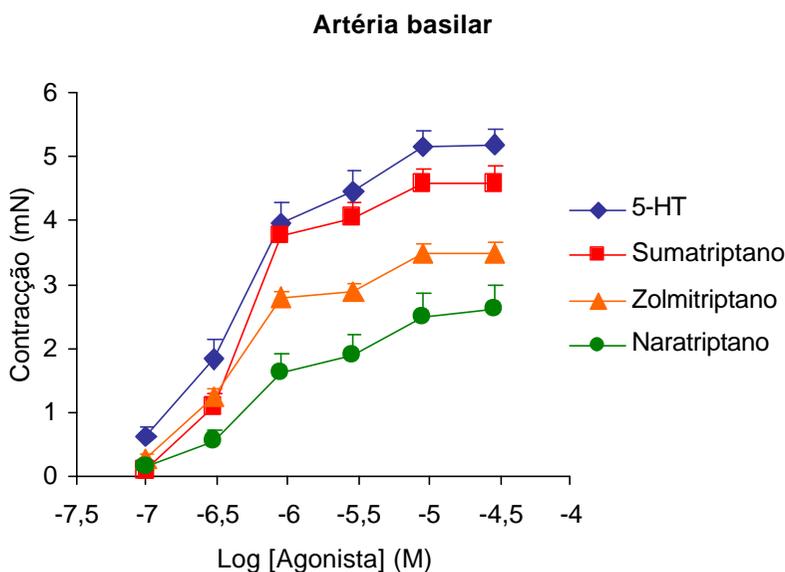


Figura 3.1. Respostas contrácteis da artéria basilar humana à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 16 experiências para a 5-HT, de 24 experiências para o sumatriptano, de 20 experiências para o zolmitriptano e de 15 experiências para o naratriptano. As barras verticais representam o S.E.M.

3.1.2. Artéria cerebral média humana

Na artéria cerebral média humana todos os agonistas, testados em concentrações entre 0,01 e 30 μM , induziram contrações concentração-dependentes (Fig. 3.2), com a seguinte ordem de actividade intrínseca ($E_{\text{máx}}$): 5-HT > sumatriptano = naratriptano > zolmitriptano (Tabela 3.1). As respostas contrácteis induzidas pelos triptanos testados sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano, foram, respectivamente, 54%, 34% e 52% da resposta máxima obtida com a 5-HT. A ordem de potência dos agonistas foi ($p\text{CE}_{50}$): 5-HT > naratriptano = zolmitriptano > sumatriptano (Tabela 3.1).

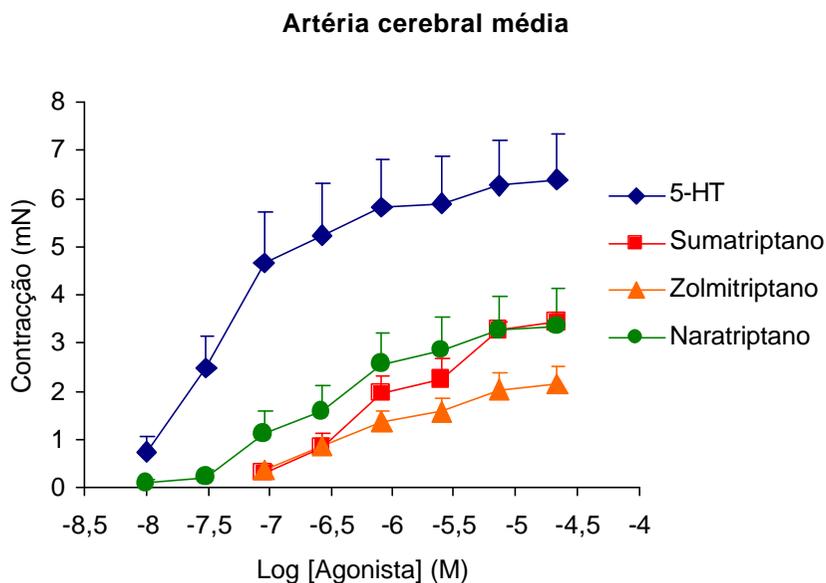


Figura 3.2. Respostas contrácteis da artéria cerebral média humana à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 10 experiências para a 5-HT, de 5 experiências para o sumatriptano, de 8 experiências para o zolmitriptano e para o naratriptano. As barras verticais representam o S.E.M.

3.1.3. Artéria uterina humana

Na artéria uterina humana todos os agonistas, testados em concentrações entre 0,1 e 30 μM , induziram contrações concentração-dependentes (Fig. 3.3), com a seguinte ordem de actividade intrínseca (Emáx): 5-HT \geq sumatriptano > zolmitriptano = naratriptano (Tabela 3.1). As respostas contrácteis induzidas pelos triptanos testados sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano, foram, respectivamente, 71%, 29% e 16% da resposta máxima obtida com a 5-HT. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos valores de pCE_{50} dos diferentes agonistas, verificando-se a seguinte ordem de potência (pCE_{50}): zolmitriptano = naratriptano = 5-HT = sumatriptano (Tabela 3.1).

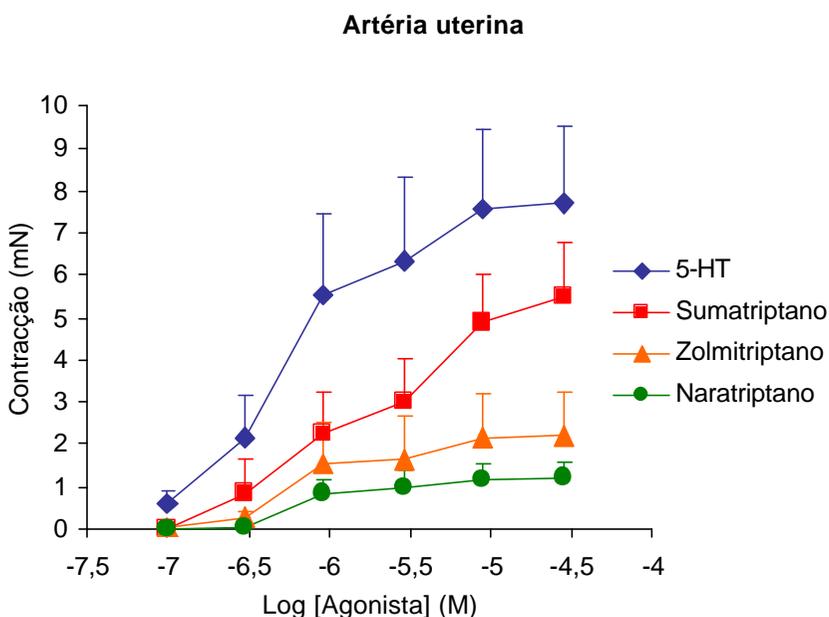


Figura 3.3. Respostas contrácteis da artéria uterina humana à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 6 experiências para a 5-HT, de 8 experiências para o sumatriptano e naratriptano e de 7 experiências para o zolmitriptano. As barras verticais representam o S.E.M.

Em conclusão, verifica-se que o agonista com maior actividade intrínseca em termos de contracção vascular, nos três vasos sanguíneos estudados, é a 5-HT, verificando-se ainda que tem maior actividade intrínseca na artéria periférica comparativamente com as artérias centrais. Dos triptanos, o com maior actividade intrínseca foi o sumatriptano, e o naratriptano foi o com menor.

Relativamente à potência, à excepção do vaso periférico estudado, no qual não existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de pCE_{50} dos diferentes agonistas, nos vasos sanguíneos cerebrais verifica-se que o sumatriptano e o naratriptano são os que apresentam menor potência, respectivamente na artéria cerebral média e na artéria basilar. De salientar ainda a excepcional diferença de potência que a 5-HT apresenta relativamente aos triptanos, na artéria cerebral média, comparativamente com os outros vasos sanguíneos.

Tabela 3.1. Respostas contrácteis dos três vasos sanguíneos estudados à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano.

	Emáx (mN)	pCE ₅₀	n
<i>Artéria basilar</i>			
5-HT	5,20 ± 0,25	6,37 ± 0,08	16
Sumatriptano	4,58 ± 0,26	6,33 ± 0,04	24
Zolmitriptano	3,49 ± 0,16 ^b	6,40 ± 0,02	20
Naratriptano	2,62 ± 0,37 ^b	6,00 ± 0,07 ^c	15
<i>Artéria cerebral média</i>			
5-HT	6,38 ± 0,95	7,12 ± 0,18	10
Sumatriptano	3,42 ± 0,21 ^a	6,02 ± 0,18 ^a	5
Zolmitriptano	2,14 ± 0,36 ^b	6,29 ± 0,08 ^a	8
Naratriptano	3,34 ± 0,76 ^a	6,51 ± 0,12 ^b	8
<i>Artéria uterina</i>			
5-HT	7,71 ± 1,84	5,92 ± 0,17	6
Sumatriptano	5,50 ± 1,27	5,76 ± 0,15	8
Zolmitriptano	2,21 ± 1,02 ^a	6,02 ± 0,17	7
Naratriptano	1,22 ± 0,38 ^b	5,99 ± 0,06	8

^a $p < 0,05$ versus 5-HT e vice-versa

^b $p < 0,05$ versus 5-HT e sumatriptano e vice-versa

^c $p < 0,05$ versus 5-HT, sumatriptano e zolmitriptano e vice-versa

Emáx = contracção máxima em mN de tensão; pCE₅₀ =logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da contracção máxima; n = número de experiências. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

3.2. Validação da funcionalidade do material biológico *post-mortem* utilizado

Porque a manutenção do órgão isolado a 4°C sem soluto fisiológico de Krebs-Henseleit (K-H) se aproxima mais das condições em que se encontra o material biológico humano obtido em autópsia, procedeu-se à validação funcional do material biológico utilizado neste estudo, comparando a resposta contráctil à 5-HT de artérias uterinas *ex vivo* com 0, 24 e 48 horas de isolamento, mantidas a 4°C sem K-H, com aquela obtida com artérias uterinas *post-mortem*. A 5-HT, testada em concentrações entre 0,01 e 30 μM , induziu contracções concentração-dependentes, quer após 24 horas, quer após 48 horas de isolamento do órgão (Fig. 3.4), não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$, teste ANOVA) na potência do agonista ($p\text{CE}_{50}$), entre as diferentes condições experimentais (Tabela 3.2). Verifica-se, no entanto, uma redução da capacidade contráctil da 5-HT (segundo o $E_{\text{máx}}$) comparativamente com aquela das 0 horas, tornando-se essa redução significativa nas 48 horas de isolamento do material *ex vivo* e no material obtido em autópsia, com cerca de 31 horas *post-mortem* (Tabela 3.2).

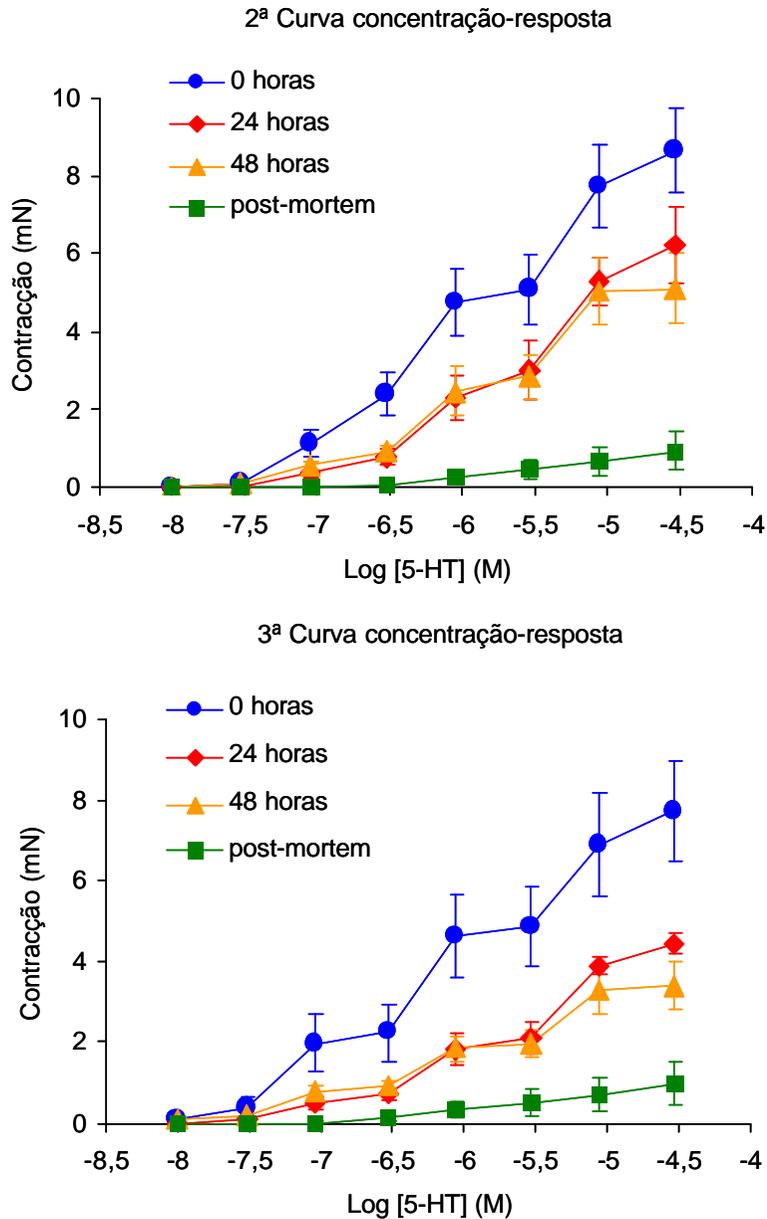


Figura 3.4. Respostas contrácteis da artéria uterina humana à 5-HT em condições *ex vivo*, com diferentes tempos de isolamento do órgão (0, 24 e 48 horas) e em condições *post-mortem* – 2ª e 3ª curvas concentração-resposta.

Tabela 3.2. Respostas contrácteis da artéria uterina humana à 5-HT em condições *ex vivo*, com diferentes tempos de isolamento do órgão (0, 24 e 48 horas) e em condições *post-mortem*.

5-HT	Emáx (mN)		pCE ₅₀		n
	2 ^a curva	3 ^a curva	2 ^a curva	3 ^a curva	
0 Horas	8,67 ± 1,08	7,74 ± 1,23	6,02 ± 0,17	6,04 ± 0,17	17
24 Horas	6,22 ± 0,96	4,44 ± 0,28	5,69 ± 0,08	5,63 ± 0,12	7
48 Horas	5,12 ± 0,89	3,40 ± 0,59 ^a	5,92 ± 0,11	6,02 ± 0,12	8
<i>Post-mortem</i>	0,93 ± 0,50 ^a	0,97 ± 0,54 ^a	5,55 ± 0,06	5,70 ± 0,22	3

^ap<0,05 *versus* 0 horas e vice-versa

Emáx = contracção máxima em mN de tensão; pCE₅₀ =logaritmo negativo da concentração molar de 5-HT capaz de induzir metade da contracção máxima na 2^a e 3^a curvas concentração-resposta; n = número de experiências. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

Em conclusão, estes resultados indicam que é possível recorrer-se a material biológico humano *post-mortem* para estudar as respostas contrácteis a fármacos serotoninérgicos, não se verificando alterações estatisticamente significativas na potência da 5-HT (pCE50), embora com uma acentuada redução da sua actividade intrínseca (Emáx).

3.3. Acções do cianopindolol, BRL 15572 e cetanserina nas respostas contrácteis da artéria basilar humana à 5-HT e aos triptanos

Com o fim de caracterizar farmacologicamente o subtipo de receptor de 5-HT que medeia a resposta contráctil a triptanos da artéria basilar humana *post-mortem*, foi utilizado inicialmente o cianopindolol, um antagonista não selectivo de receptores 5-HT_{1A/1B}, na concentração 10 µM, com o qual se verificaram alterações estatisticamente significativas na curva concentração-resposta do sumatriptano, com um desvio para a direita da mesma com manutenção do efeito máximo (pCE₅₀ da curva concentração-resposta do sumatriptano: 6,32 ± 0,07, n=8; pCE₅₀ da curva concentração-resposta sumatriptano na presença de 10 µM de cianopindolol: 5,83 ± 0,09, n=9, *p*=0,001, teste *t* de *Student*), sugerindo um antagonismo do tipo competitivo. Para os restantes agonistas, não se verificaram alterações das respectivas curvas concentração-resposta, na presença deste antagonista (Fig. 3.5).

Como mencionado anteriormente, a 5-HT induziu contracções dependentes da dose neste vaso sanguíneo cerebral (pCE₅₀: 6,37 ± 0,08; Emáx: 5,20 ± 0,25 mN, n=16), que foram antagonizadas de forma não competitiva, pela cetanserina (1 µM, n=5), um antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, e pelo antagonista dos receptores 5-HT_{1D}, o BRL 15572 (10 µM, n=11). Ambos os antagonistas atenuaram significativamente a contracção máxima obtida com a 5-HT em cerca de 26% e 39%, respectivamente.

Embora a cetanserina tenha alterado significativamente as contracções induzidas pela 5-HT, não alterou a resposta contráctil aos triptanos. Por outro lado, 10 µM de BRL 15572 também antagonizaram de forma não competitiva, as respostas contrácteis induzidas pelos três triptanos testados, provocando uma redução da resposta máxima ao sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano de 41,2%, 40,5% e 36,5%, respectivamente. É de salientar ainda que a redução da resposta máxima

ao sumatriptano e ao zolmitriptano foi obtida apenas na presença de 10 μM de BRL 15572, mas não de 0,1 ou 1 μM de BRL 15572 (Fig. 3.6), concentrações do antagonista igualmente testadas no grupo de experiências com estes dois fármacos representativos da primeira e segunda geração de triptanos.

Em conclusão, na artéria basilar humana *post-mortem* a 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano têm um perfil farmacológico muito semelhante, sendo as respostas contrácteis por eles induzidas antagonizadas de forma não competitiva por 10 μM do antagonista dos receptores 5-HT_{1D}, o BRL 15572, com idênticas percentagens de redução das respectivas respostas máximas. De salientar que, ao contrário da 5-HT, as respostas contrácteis aos triptanos não foram alteradas na presença de 1 μM de cetanserina, antagonistas de receptores 5-HT_{2A/2C}.

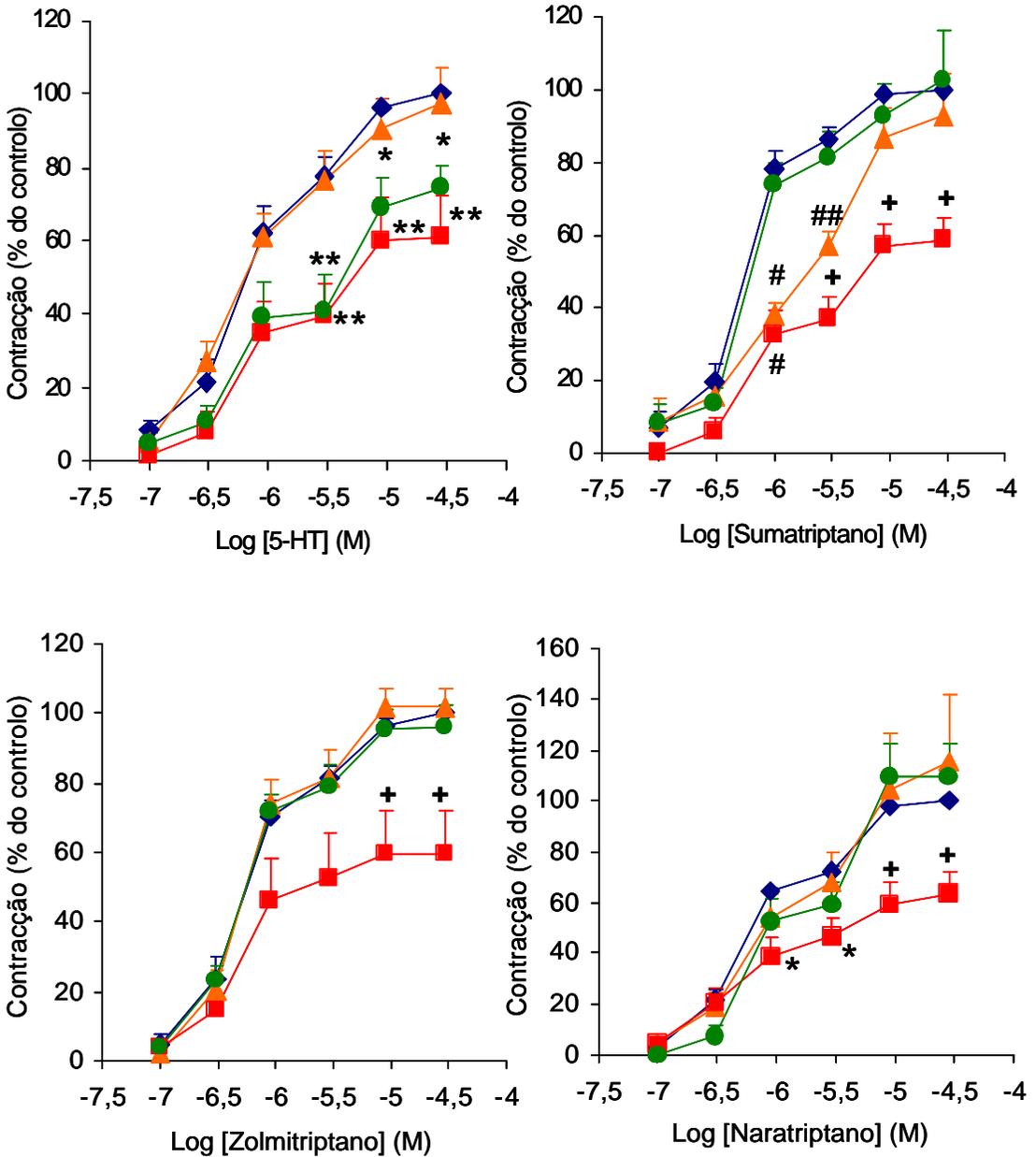


Figura 3.5. Efeitos de diferentes agonistas e antagonistas na resposta contráctil da artéria basilar humana. As respostas contrácteis aos diferentes agonistas, 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano foi obtida na ausência (◆ controlo) e na presença de antagonistas (● 1 µM de cetanserina; ▲ 10 µM de cianopindolol; ■ 10 µM de BRL 15572). Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M de 4 a 7 experiências para a 5-HT, de 5 a 11 experiências para o sumatriptano, de 3 a

6 experiências para o zolmitriptano e de 4 a 12 experiências para o naratriptano. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

* $p < 0,05$ versus controlo e vice-versa

** $p < 0,05$ versus controlo e cianopindolol e vice-versa

$p < 0,05$ versus controlo e cetanserina e vice-versa

$p < 0,05$ versus controlo, cetanserina e BRL 15572 e vice-versa

* $p < 0,05$ versus controlo, cetanserina e cianopindolol e vice-versa

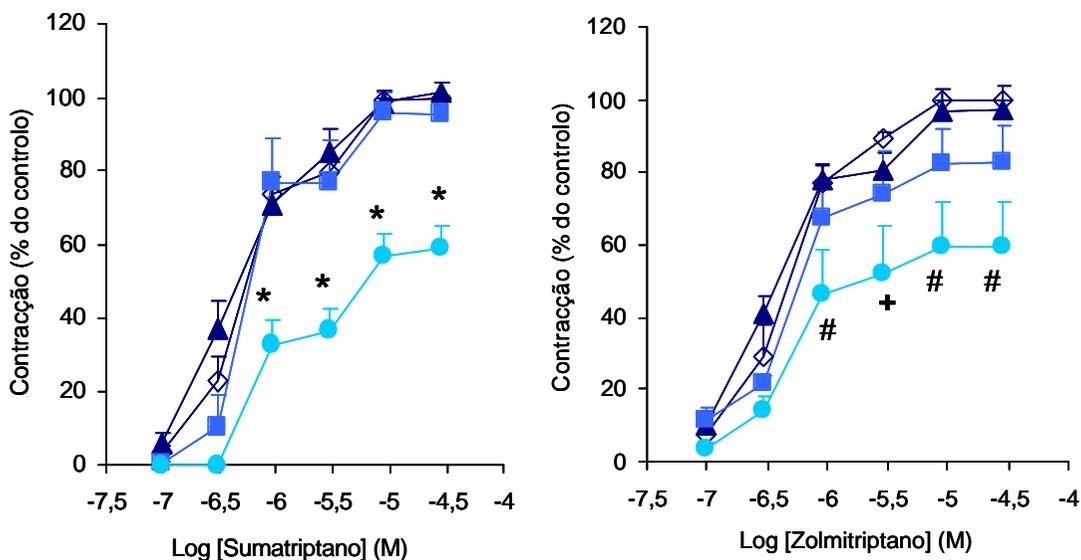


Figura 3.6. Respostas contrácteis da artéria basilar humana ao sumatriptano e zolmitriptano, na ausência (◇ controlo) e na presença de 0,1 μM (▲), 1 μM (■) e 10 μM (●) de BRL 15572. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M de 7 a 11 experiências para o sumatriptano e de 6 a 9 experiências para o zolmitriptano. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

* $p < 0,05$ versus controlo, 0,1 μM e 1 μM de BRL 15572 e vice-versa

+ $p < 0,05$ versus controlo e vice-versa

$p < 0,05$ versus controlo e 0,1 μM de BRL 15572 e vice-versa

3.4. Acções do cianopindolol, BRL 15572 e cetanserina na resposta contráctil da artéria cerebral média humana ao sumatriptano

Com o fim de caracterizar farmacologicamente o subtipo de receptor de 5-HT que medeia a resposta contráctil a triptanos da artéria cerebral média humana *post-mortem*, foi utilizado inicialmente o cianopindolol, um antagonista não selectivo de receptores 5-HT_{1A/1B}, na concentração 10 µM (n=9), com o qual se verificaram alterações estatisticamente significativas na curva concentração-resposta do sumatriptano, com uma redução da respectiva resposta máxima em cerca de 27%, indicando um antagonismo do tipo não competitivo (Fig. 3.7).

Não se verificaram, neste vaso sanguíneo, alterações da curva concentração-resposta do sumatriptano, quer na presença do antagonista dos receptores 5-HT_{1D}, o BRL 15572 (10 µM, n=6), quer na presença de cetanserina (1 µM, n=6), antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C} (Fig. 3.7).

Na artéria cerebral média resolvemos testar ainda a possível mediação da resposta contráctil ao sumatriptano por receptores α -adrenérgicos. Assim foi utilizada a prazosina, que na concentração de 10 µM é um antagonista dos receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos (MacKinnon et al., 1994; Willems et al., 2003), com a qual também não se verificaram alterações na curva concentração-resposta do triptano neste vaso sanguíneo (Fig. 3.8).

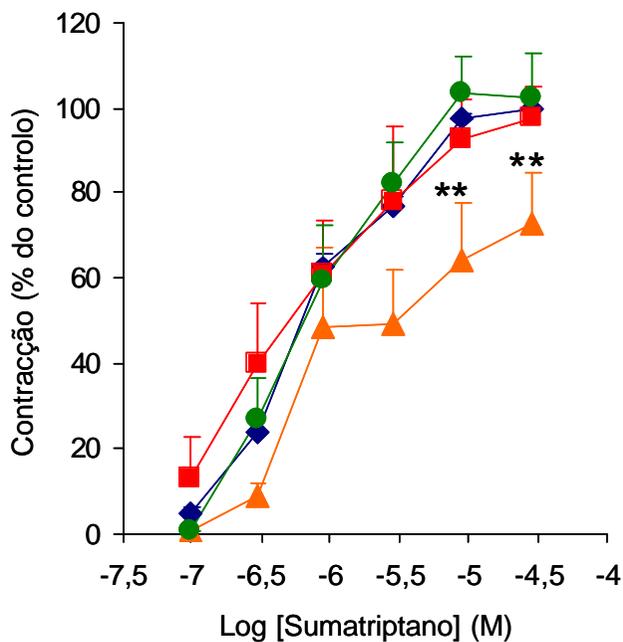


Figura 3.7. Acções de diferentes antagonistas na resposta contráctil da artéria cerebral média humana ao sumatriptano. A resposta contráctil ao sumatriptano foi obtida na ausência (◆ controlo) e na presença de antagonistas (● 1 µM de cetanserina; ▲ 10 µM de cianopindolol; ■ 10 µM de BRL 15572). Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 6 a 15 experiências. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

** $p < 0,05$ versus controlo e cetanserina e vice-versa

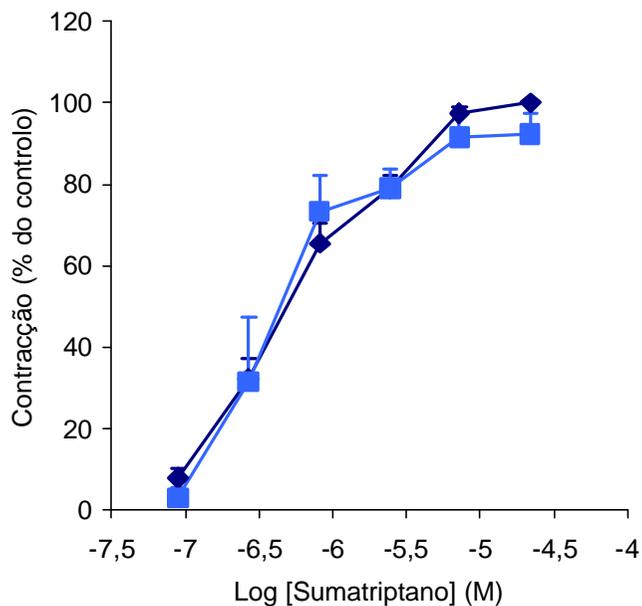


Figura 3.8. Respostas contrácteis da artéria cerebral média humana ao sumatriptano, na ausência (◆ controlo) e na presença de 10 µM de prazosina (■), antagonista de receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 5 a 8 experiências. As barras verticais representam o S.E.M.

Em conclusão, na artéria cerebral média humana *post-mortem*, ao contrário do que se observou na artéria basilar, o BRL 15572 na concentração 10 µM não induziu alterações na curva concentração-resposta do sumatriptano. Mais uma vez a resposta contráctil ao triptano não foi alterada na presença de 1 µM de cetanserina, antagonistas de receptores dos subtipos 5-HT_{2A/2C}.

3.5. Acções do cianopindolol e do BRL 15572 na resposta contráctil da artéria uterina humana ao sumatriptano

Com o fim de caracterizar farmacologicamente os subtipos de receptores 5-HT₁ que medeiam a resposta contráctil a triptanos da artéria uterina humana *ex vivo*, e a verificar a funcionalidade desses receptores após 24 horas de isolamento do órgão, de forma a mimetizar as condições *post-mortem* dos outros dois vasos sanguíneos em estudo, foi utilizado inicialmente o cianopindolol, um antagonista não selectivo de receptores 5-HT_{1A/1B}. O cianopindolol na concentração 10 µM produziu alterações estatisticamente significativas na curva concentração-resposta do sumatriptano às 0 horas, indicando um antagonismo de tipo não competitivo. Com efeito, verificou-se uma redução da resposta máxima ao sumatriptano de 53,5% na presença do cianopindolol (n=11). O mesmo se verificou na presença do antagonista dos receptores 5-HT_{1D}, o BRL 15572 (10 µM, n=5), com uma redução ainda maior da resposta máxima ao agonista de 64,6% (Fig. 3.9-A).

É de salientar ainda que a redução da resposta máxima ao sumatriptano foi obtida tanto na presença de 10 µM de BRL 15572, como na presença de 0,1 µM (Fig. 3.10), concentração do antagonista igualmente testada no grupo de experiências com este triptano de referência.

Nas experiências que se efectuaram em artérias uterinas *ex vivo* com 24 horas de isolamento verificou-se uma alteração no perfil farmacológico descrito: o cianopindolol (10 µM, n=6) não alterou significativamente a resposta contráctil ao sumatriptano, mas o BRL 15572 (10 µM, n=4) continuou a antagonizar a mesma, de forma não competitiva, com uma menor redução da contracção máxima induzida pelo triptano de cerca de 46% (Fig. 3.9-B).

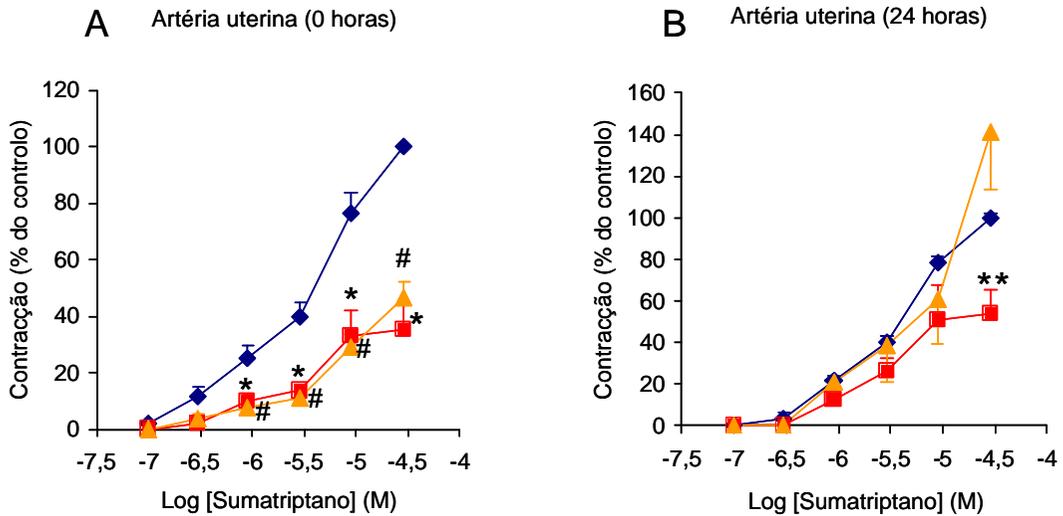


Figura 3.9. Acções de diferentes antagonistas na resposta contráctil da artéria uterina humana *ex vivo* ao sumatriptano, às 0 (A) e 24 horas (B) de isolamento do órgão. A resposta contráctil ao sumatriptano foi obtida na ausência (◆ controlo) e na presença de antagonistas (▲ 10 μ M de cianopindolol; ■ 10 μ M de BRL 15572). Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 5 a 11 experiências às 0 horas, e de 4 a 7 experiências às 24 horas. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

$p < 0,05$ cianopindolol *versus* controlo e vice-versa

* $p < 0,05$ BRL 15572 *versus* controlo e vice-versa

** $p < 0,05$ BRL 15572 *versus* controlo e cianopindolol e vice-versa

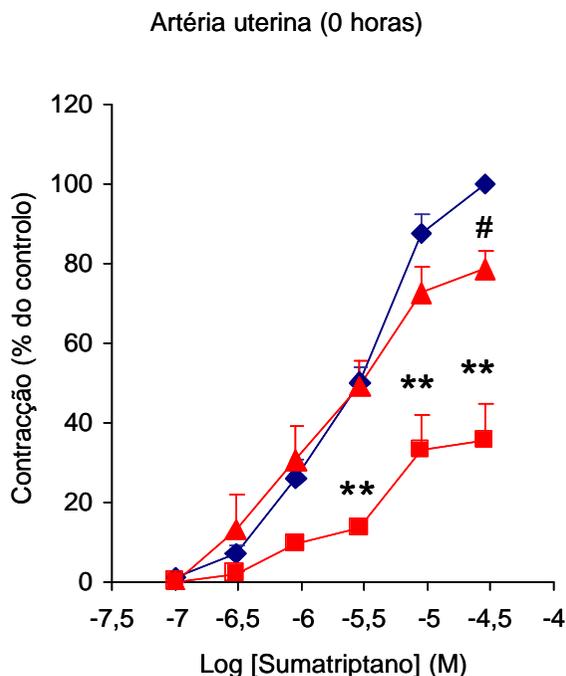


Figura 3.10. Resposta contráctil da artéria uterina humana *ex vivo* ao sumatriptano, na ausência (◆ controlo) e na presença de 0,1 µM (▲) e 10 µM (■) de BRL 15572. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 4 a 6 experiências. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

** $p < 0,05$ versus controlo e 0,1 µM de BRL 15572 e vice-versa

$p < 0,05$ versus controlo e 10 µM de BRL 15572 e vice-versa

Em conclusão, os resultados dos estudos funcionais efectuados na artéria uterina *ex vivo* com 24 horas de isolamento, comparativamente aos obtidos às 0 horas, e com os quais se pretende mimetizar as condições *post-mortem*, sugerem a perda de funcionalidade dos receptores do subtipo 5-HT_{1B}.

3.6. Acção do SB 224289 na curva concentração-resposta do sumatriptano nas artérias basilar, cerebral média e uterina humanas

Como já referido, com o fim de caracterizar farmacologicamente o subtipo de receptor 5-HT₁ que medeia a resposta contráctil a triptanos nas artérias em estudo, foi utilizado inicialmente o cianopindolol, um antagonista não selectivo 5-HT_{1A/1B}, para discriminar os receptores do subtipo 5-HT_{1B}. Contudo, pareceu-nos importante confirmar os resultados obtidos com este antagonista β-adrenérgico com aqueles obtidos com fármacos não adrenérgicos que, embora sejam antagonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} pela semelhança dos seus perfis farmacológicos, permitem a sua discriminação pela diferença significativa de potência que demonstram ter sobre cada um deles. O SB 224289 é considerado um antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, sendo 60 vezes mais potente sobre receptores 5-HT_{1B} comparativamente aos receptores 5-HT_{1D} (pKi de 8,16 ± 0,06 para receptores 5-HT_{1B} e pKi de 6,27 ± 0,09 para receptores 5-HT_{1D}) (Selkirk et al., 1998).

O SB 224289 foi testado nas três artérias em estudo, na concentração 63 nM, 10 vezes o K_i do fármaco para receptores 5-HT_{1B}. Verificou-se que o SB 224289 antagonizou de forma não competitiva a curva concentração-resposta do sumatriptano quer na artéria basilar, quer na artéria uterina, tendo provocado uma redução da resposta máxima de 18,5% e 44,7%, respectivamente (Fig. 3.11 e 3.12-A). Na artéria cerebral média, não se observaram alterações da curva concentração-resposta do sumatriptano na presença deste antagonista (Fig. 3.11). Nas experiências que se efectuaram em artérias uterinas *ex vivo* com 24 horas de isolamento, e ao contrário do observado às 0 horas neste mesmo vaso sanguíneo, o SB 224289 também não induziu alterações na curva concentração-resposta do sumatriptano (Fig. 3.11-B).

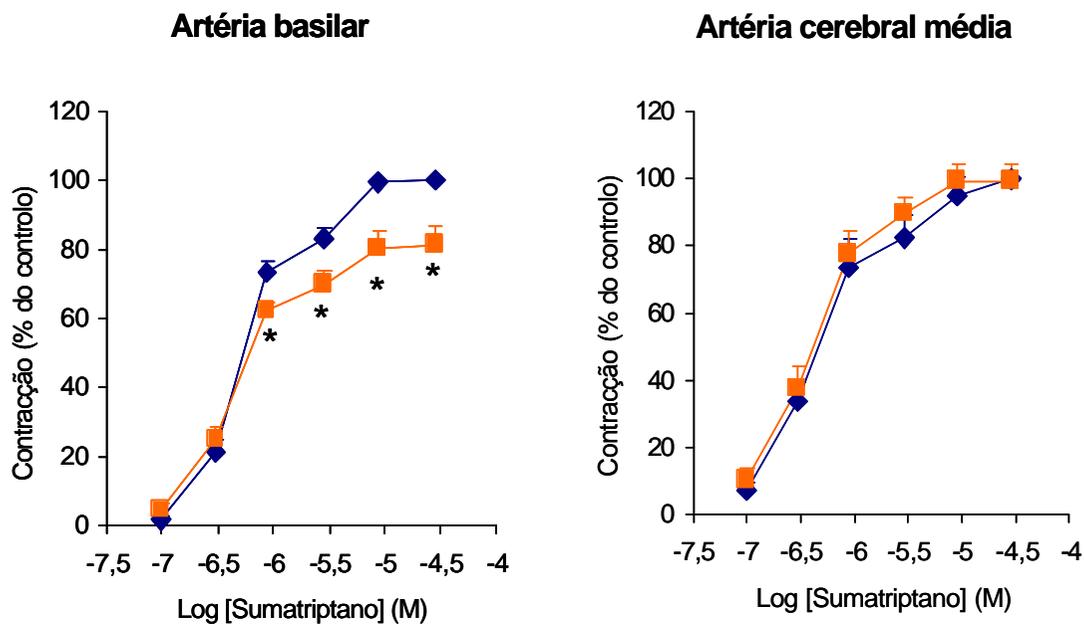


Figura 3.11. Respostas contrácteis das artérias basilar e cerebral média ao sumatriptano, na ausência (◆ controlo) e na presença de 63 nM de SB 224289 (■), antagonista dos receptores 5-HT_{1B}. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M de 4 a 6 experiências para a artéria basilar e de 5 a 7 experiências para a artéria cerebral média. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes.

**p* < 0,05 versus controlo

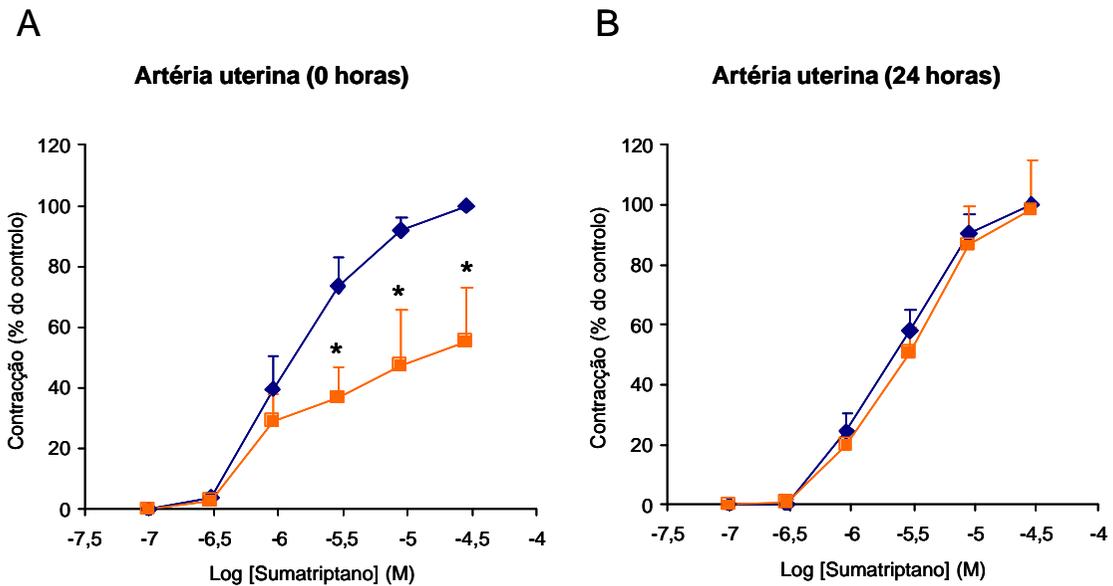


Figura 3.12. Respostas contrácteis ao sumatriptano da artéria uterina *ex vivo*, às 0 (A) e 24 horas de isolamento do órgão (B), na ausência (◆ controlo) e na presença de 63 nM de SB 224289 (■), antagonista dos receptores 5-HT_{1B}. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 5 a 9 experiências. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes.

* $p < 0,05$ versus controlo

Em conclusão, os resultados obtidos no grupo de experiências com o antagonista selectivo dos receptores 5-HT_{1B}, o SB 224289, parece confirmar, em parte, os obtidos com o cianopindolol, antagonista β -adrenérgico e também antagonista dos receptores 5-HT_{1B}. Efectivamente, na artéria uterina, às 0 horas de isolamento do vaso, o SB 224289 antagonizou a resposta contráctil ao sumatriptano, não se verificando qualquer inibição da mesma após 24 horas de isolamento do órgão. Nas artérias basilar e cerebral média o SB 224289 induziu alterações da curva concentração-resposta do sumatriptano completamente opostas àquelas induzidas pelo cianopindolol. Isto é, na artéria basilar o SB 224289

antagonizou de forma não competitiva a resposta contráctil ao sumatriptano e na artéria cerebral média não produziu qualquer alteração da mesma.

3.7. Acções da cetanserina na curva concentração-resposta da 5-HT nas artérias basilar, cerebral média e uterina humanas

Como mencionado anteriormente, a 5-HT induziu contracções dependentes da concentração nos três vasos sanguíneos mencionados: pCE₅₀ de $6,37 \pm 0,08$ e Emáx de $5,20 \pm 0,25$ mN, n=16, na artéria basilar; pCE₅₀ de $7,12 \pm 0,18$ e Emáx de $6,38 \pm 0,95$ mN, n=10, na artéria cerebral média; pCE₅₀ de $5,92 \pm 0,17$ e Emáx de $7,71 \pm 1,84$ mN, n=6, na artéria uterina. As respostas contrácteis à 5-HT, das três artérias, foram antagonizadas de forma não competitiva pela cetanserina, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, na concentração de 1 µM, atenuando significativamente a contracção máxima obtida com a 5-HT em cerca de 26%, 13% e 83%, respectivamente, na artéria basilar, cerebral média e uterina (Fig. 3.13).

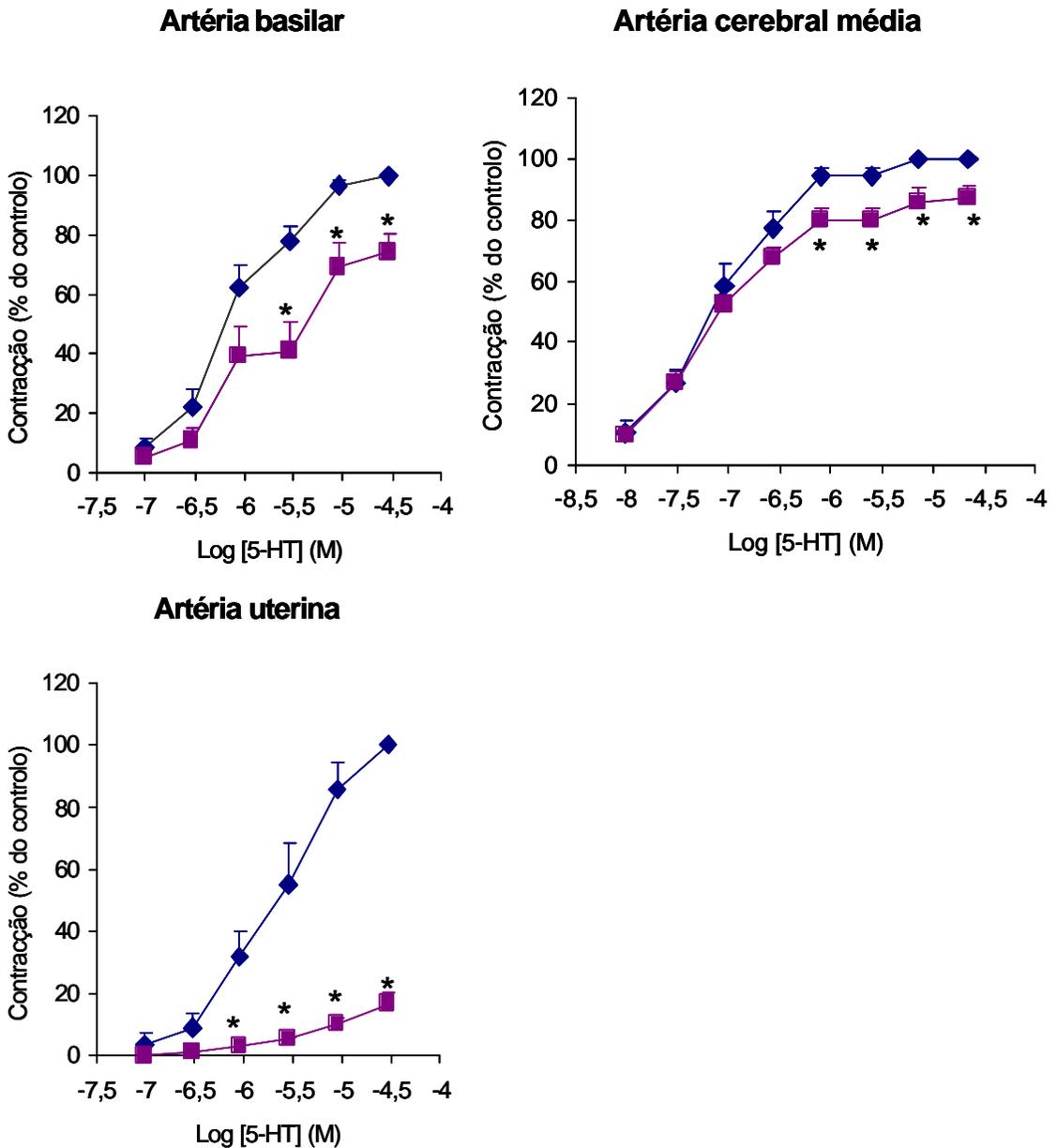


Figura 3.13. Respostas contrácteis à 5HT das artérias basilar, cerebral média e uterina humanas, na ausência (◆ controlo) e na presença de 1 μ M de cetanserina (■), antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 5 a 7 experiências para a artéria basilar, de 6 a 9 experiências para a artéria cerebral média e de 5 a 10 experiências para a artéria uterina. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes. **p* < 0,05 versus controlo

Em conclusão, verifica-se a presença de receptores 5-HT₂ nas três artérias estudadas sendo este tipo de receptor serotoninérgico, o predominante na artéria periférica comparativamente com as artérias centrais.

3.8. Avaliação da resposta contráctil ao sumatriptano, nas três artérias estudadas, ao longo do período pós-colheita

Ao estudar a resposta contráctil ao sumatriptano ao longo do período pós-colheita, em três sucessivas curvas cumulativas concentração-resposta, na ausência de qualquer antagonista, observaram-se alterações na actividade intrínseca do sumatriptano na artéria uterina, com redução estatisticamente significativa da contracção máxima de 80,2%, da primeira para a segunda curva concentração-resposta, e de 77% da segunda para a terceira curva concentração-resposta. Não se verificaram alterações estatisticamente significativas nas curvas concentração-resposta do sumatriptano na artéria basilar e na artéria cerebral média, ao longo do tempo de ensaio (Fig. 3.14). Corroborando os resultados descritos para a artéria uterina, verificou-se para os triptanos e para a 5-HT uma redução estatisticamente significativa quer da resposta máxima (Emáx) quer da potência (pCE₅₀), ao longo do tempo de ensaio, como o demonstram os valores de significância obtidos com a análise estatística de dados emparelhados na tabela 3.3.

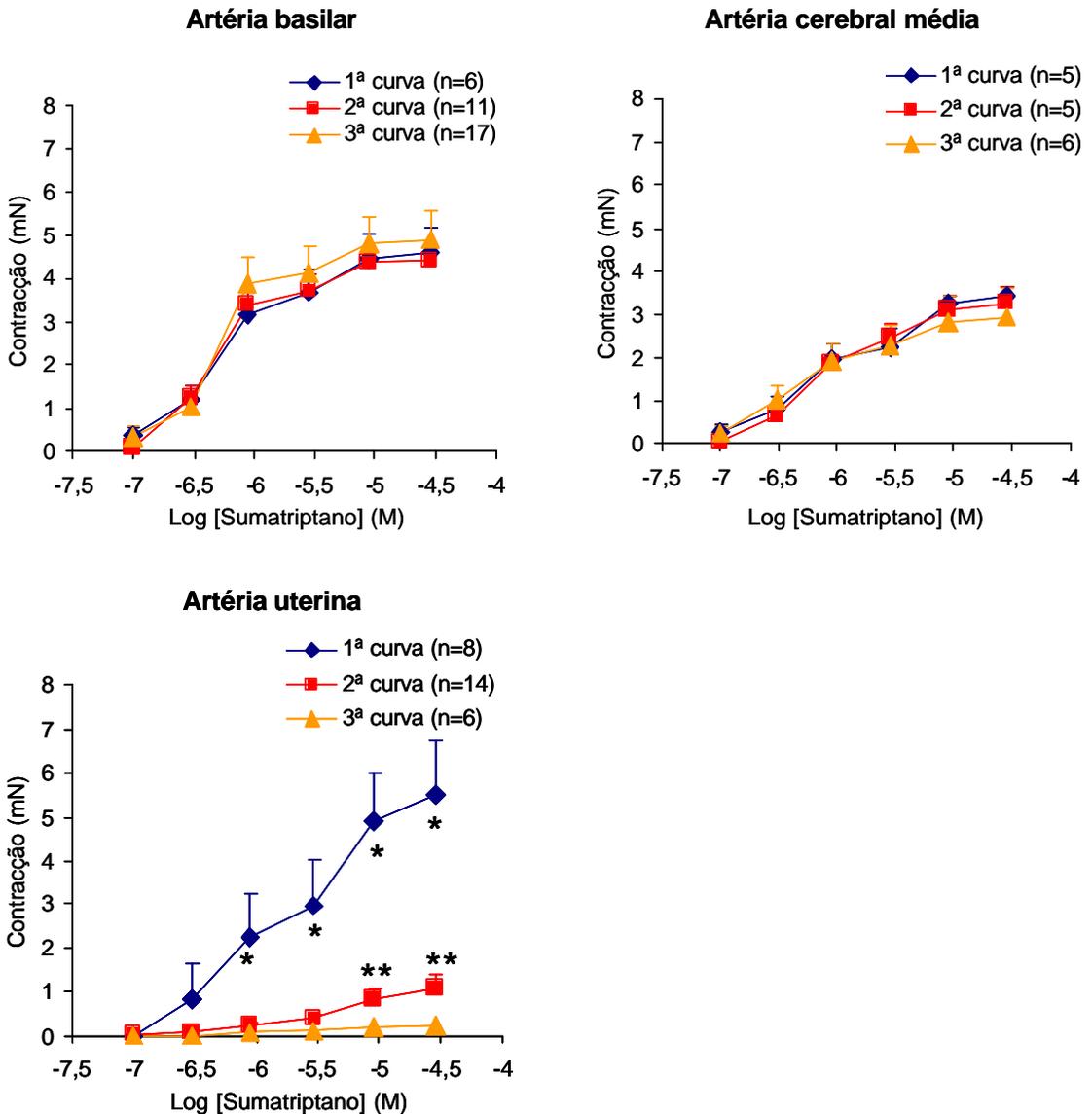


Figura 3.14. Respostas contrácteis das artérias basilar, cerebral média e uterina humanas, a três curvas concentração-resposta sucessivas e cumulativas de sumatriptano, na ausência de qualquer antagonista. Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

* $p < 0,05$ versus 2ª e 3ª curvas concentração-resposta e vice-versa

** $p < 0,05$ versus 3ª curva concentração-resposta e vice-versa

Tabela 3.3. Valores de $E_{máx}$ e de pCE_{50} de 2 curvas sucessivas concentração-resposta para a 5-HT e triptanos na artéria uterina humana em condições *ex vivo*.

	$E_{máx}(mN)$			pCE_{50}		
	1ª curva	2ª curva	p	1ª curva	2ª curva	p
5-HT	7,71 ± 1,84	4,52 ± 1,32	0,012	5,92 ± 0,17	5,71 ± 0,16	0,030
Sumatriptano	5,50 ± 1,27	1,58 ± 0,47	0,004	5,76 ± 0,15	5,42 ± 0,14	0,041
Zolmitriptano	2,21 ± 1,02	1,55 ± 1,10	0,100	6,02 ± 0,17	5,62 ± 0,28	0,019
Naratriptano	1,22 ± 0,38	0,54 ± 0,24	0,011	5,99 ± 0,06	5,74 ± 0,28	0,412

$E_{máx}$ = contracção máxima em mN de tensão; pCE_{50} =logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da contracção máxima na 1ª e 2ª curvas concentração-resposta. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M de 7 experiências para a 5-HT, 8 para o sumatriptano, 7 para o zolmitriptano e 8 para o naratriptano. Apresenta-se o valor de p de dados emparelhados (teste t de *Student*).

Em conclusão, verificou-se taquifilaxia ao efeito contráctil induzido pelos triptanos na artéria uterina mas não nas artérias basilar e cerebral média.

3.9. Avaliação da funcionalidade dos receptores do subtipo 5-HT_{1B} envolvidos na resposta contráctil aos triptanos nos vasos sanguíneos humanos utilizados

Tendo em atenção que os resultados dos estudos funcionais na artéria uterina às 24 horas de isolamento do órgão, comparativamente aos obtidos às 0 horas, sugerem a perda de funcionalidade dos receptores 5-HT_{1B}; e que se verificou taquifilaxia ao efeito contráctil induzido pelos triptanos na artéria uterina mas não na artéria basilar e cerebral média, pretendeu-se avaliar se a taquifilaxia observada naquele vaso periférico estaria ou não associada ao receptor 5-HT_{1B}.

Assim, mais uma vez, efectuaram-se experiências na artéria uterina humana *ex vivo*, expressando os resultados em relação à contracção obtida com 100 mM de KCl, de duas curvas sucessivas e cumulativas concentração-resposta de sumatriptano, ambas efectuadas quer na ausência quer na presença de cianopindolol, antagonista de receptores 5-HT_{1A/1B}. Como se observa no gráfico (Fig. 3.15), mais uma vez está patente a taquifilaxia através de uma redução substancial e estatisticamente significativa da resposta máxima ao sumatriptano, de cerca de 51%, da primeira para a segunda curva concentração-resposta, na ausência do antagonista (curvas-controlo). O facto de a primeira curva concentração-resposta na presença de cianopindolol não apresentar, na resposta máxima, diferenças estatisticamente significativas relativamente à segunda curva-controlo, sugere que a taquifilaxia observada da primeira para a segunda curva-controlo é mediada por receptores 5-HT_{1B}. No entanto, é de salientar que ainda assim se observa, na presença do bloqueador deste subtipo de receptores, uma redução significativa da resposta máxima, da primeira para a segunda curva concentração-resposta de cerca de 43%, indicativa de que o fenómeno de taquifilaxia observada neste vaso periférico pode envolver outro subtipo de receptor 5-HT₁. Verifica-se igualmente uma redução estatisticamente significativa da potência do sumatriptano neste vaso

sanguíneo periférico na presença de cianopindolol, como o comprovam os valores de pCE_{50} na tabela 3.4.

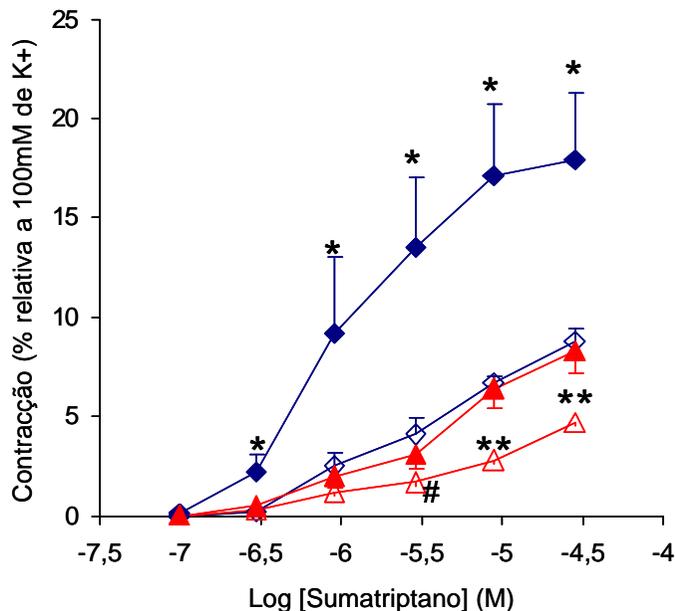


Figura 3.15. Resposta contráctil da artéria uterina humana *ex vivo* ao sumatriptano, ao longo do tempo de ensaio. A resposta contráctil de duas curvas sucessivas concentração-resposta ao sumatriptano foi obtida na ausência (◆ controlo, 1ª curva; ◇ controlo, 2ª curva) e na presença de 10 μ M de cianopindolol (▲ 1ª curva; △ 2ª curva). Os resultados estão expressos em valores médios \pm S.E.M de 5 a 7 experiências. As barras verticais representam o S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

* $p < 0,05$ versus 2ª curva controlo e 1ª e 2ª curvas com cianopindolol e vice-versa

** $p < 0,05$ versus 2ª curva controlo e 1ª curva com cianopindolol e vice-versa

$p < 0,05$ versus 2ª curva controlo e vice-versa

Tabela 3.4. Valores de Emáx e de pCE₅₀ de 2 curvas sucessivas concentração-resposta do sumatriptano na artéria uterina humana em condições *ex vivo*, na presença e na ausência de cianopindolol.

Sumatriptano	Emáx(mN)		pCE ₅₀		n
	(% relativa a 100 mM de K ⁺)				
	1ª curva	2ª curva	1ª curva	2ª curva	
Controlo	17,87 ± 3,43 ^a	8,82 ± 0,54	5,96 ± 0,13 ^c	5,55 ± 0,19	5
Cianopindolol(10µM)	8,32 ± 1,13	4,75 ± 0,21 ^b	5,44 ± 0,06	5,29 ± 0,09	7

^a $p < 0,05$ versus 2ª curva controlo e 1ª e 2ª curvas com cianopindolol e vice-versa

^b $p < 0,05$ versus 2ª curva controlo e 1ª curva com cianopindolol e vice-versa

^c $p < 0,05$ versus 1ª e 2ª curvas com cianopindolol e vice-versa

Emáx = contracção máxima em % relativa à contracção máxima obtida com 100 mM de KCl; pCE₅₀ =logaritmo negativo da concentração molar do sumatripatno capaz de induzir metade da contracção máxima na 1ª e 2ª curvas concentração-resposta; n = número de experiências. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

Em conclusão, a taquifilaxia observada na artéria uterina humana parece ser um efeito mediado pelos receptores 5-HT_{1B/1D}.

3.10. Imunodeteção dos subtipos de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nas artérias basilar, cerebral média e uterina humanas pela técnica de *western blot*

Com o objectivo de investigar a presença da proteína dos subtipos de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nas artérias basilar, cerebral média e uterina humanas, analisámos, por *Wester blot*, os extractos proteicos de lisados de amostras dos referidos vasos, aos quais fora removido o endotélio, utilizando anticorpos específicos de cada um desses subtipos de receptores. Nas diluições testadas tanto o anticorpo anti-5-HT_{1B} como o anticorpo anti-5-HT_{1D} reconheceram uma única banda com um peso molecular aparente de aproximadamente 37 KDal nos lisados das 3 artérias estudadas (Fig.3.16-A). Na análise estatística ANOVA, usando o teste de comparações múltiplas de Tukey, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na expressão de cada um dos dois subtipos de receptores nas três artérias estudadas (Fig.3.16-B).

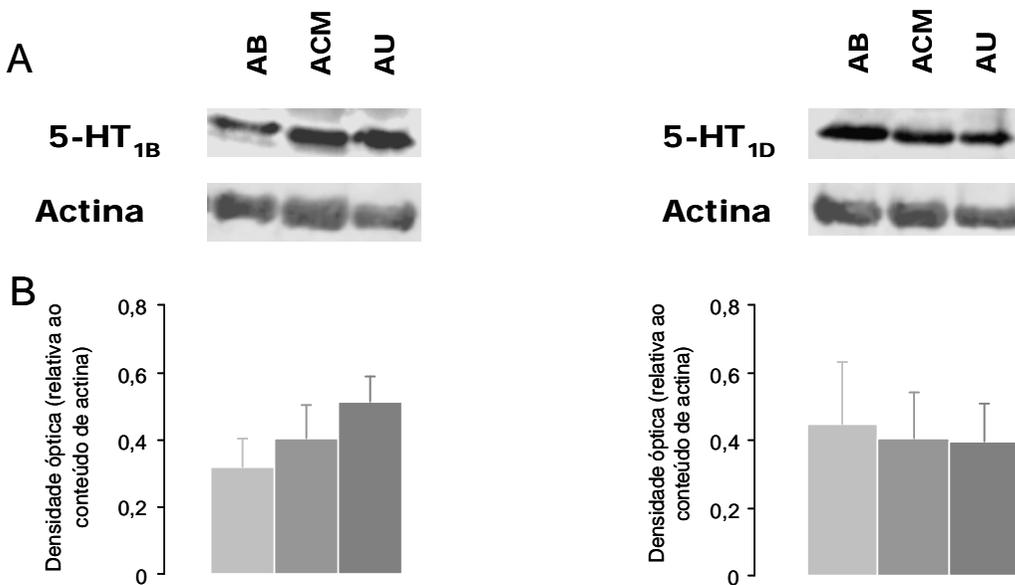


Figura 3.16. (A) Análise de *western blot* dos níveis proteicos de 5-HT_{1B/1D} e actina. Os lisados de amostras congeladas de artéria basilar (AB) e cerebral média (ACM) humanas *post-mortem* (média de 24 horas *post-mortem*) e de artéria uterina (AU) humana *ex vivo*, às quais foi removido o endotélio, foram submetidos a uma electroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana PVDF e submetidos a uma análise de *western blot*, usando anticorpos primários específicos de cada um dos subtipos de receptores (coelho anti-5-HT_{1B} humano na diluição de 1:1000 e coelho anti-5-HT_{1D} humano na diluição 1:1000 – 1:500). Seguidamente, a membrana sofreu um processo de “stripping” e voltou a ser incubada com anticorpo contra a actina para confirmar a igualdade de quantidade proteica em todas as condições de electroforese. A figura apresentada é representativa de quatro experiências efectuadas com resultados semelhantes. (B) Os resultados obtidos em quatro experiências independentes foram quantificados com um analisador de imagem, o programa Adobe Photoshop 7.0 e foram traduzidos em unidades arbitrárias de densidade óptica relativa ao respectivo conteúdo de actina. Estão apresentados os valores médios \pm S.E.M.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem, quer nas artérias cerebral média e basilar (artérias centrais) quer na artéria uterina (artéria periférica), a presença tanto do subtipo de receptor 5-HT_{1B} como do subtipo 5-HT_{1D}.

3.11. Estudos histológicos e imunohistoquímicos das artérias basilar, cerebral média e uterina humanas

Secções representativas de artérias basilares e cerebrais médias *post-mortem* e de artérias uterinas *ex vivo* submetidas a histoquímica e imunohistoquímica são apresentadas nas figuras 3.17-3.45. A imonureactividade foi detectada usando a diaminobenzidina que confere a coloração laranja/acastanhada, e a hematoxilina foi usada como coloração de contraste para detectar os núcleos celulares que coram de púrpura. O padrão de imunoreactividade foi consistente em todas as secções obtidas do número de amostras colhidas para estudo de cada artéria (6 indivíduos para cada uma das artérias centrais e 3 indivíduos para a artéria uterina). Os resultados na artéria uterina sujeita a imunohistoquímica foram consistentes com os obtidos pelos estudos de *western blot* pelo que se passou a considerar aquela marcação na artéria periférica como controlo positivo intrínseco das restantes marcações por imunohistoquímica.

A morfologia demonstrada pela hematoxilina/eosina caracterizou arteriosclerose com deposição de colagénio e proliferação de fibroblastos na camada média, tanto nas artérias colhidas em condições *post-mortem* como nas artérias uterinas *ex vivo*. Tal processo de envelhecimento coaduna-se perfeitamente com o intervalo de idades dos indivíduos a partir dos quais foi obtido este material biológico. No entanto, as células musculares lisas da túnica média, definida pela imunopositividade à NSE, apresentaram maioritariamente uma aparência normal e expressaram, nos três vasos sanguíneos, imunoreactividade aos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}. No entanto, a marcação de ambos os subtipos de receptores foi menos intensa nas artérias cerebrais comparativamente à artéria periférica, e nesta, a marcação dos receptores 5-HT_{1B}, na diluição 1:50 do anticorpo, foi mais intensa do que a marcação dos receptores 5-HT_{1D}, feita com o dobro da concentração do respectivo anticorpo. No que diz respeito às terminações nervosas localizadas junto à adventícia da parede arterial, o

anticorpo marcador dos receptores 5-HT_{1D} revelou imunoreactividade nos três vasos sanguíneos estudados. A imunoreactividade revelada pelo anticorpo anti-receptor 5-HT_{1B} em terminações nervosas, apenas foi detectada na adventícia da artéria uterina, mas não nas artérias basilar e cerebral média.

3.11.1. Micro-anatomia dos vasos sanguíneos em estudo

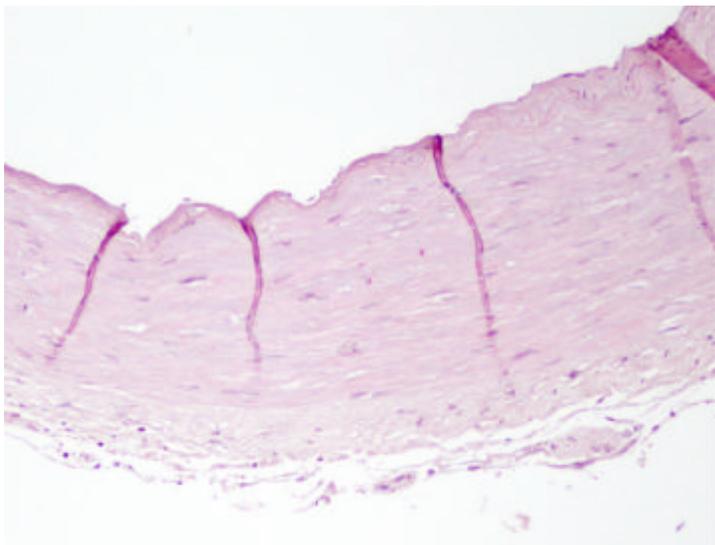


Figura 3.17. Artéria basilar (Mulher/54 anos). H/E X100. Observa-se arteriosclerose da túnica média.

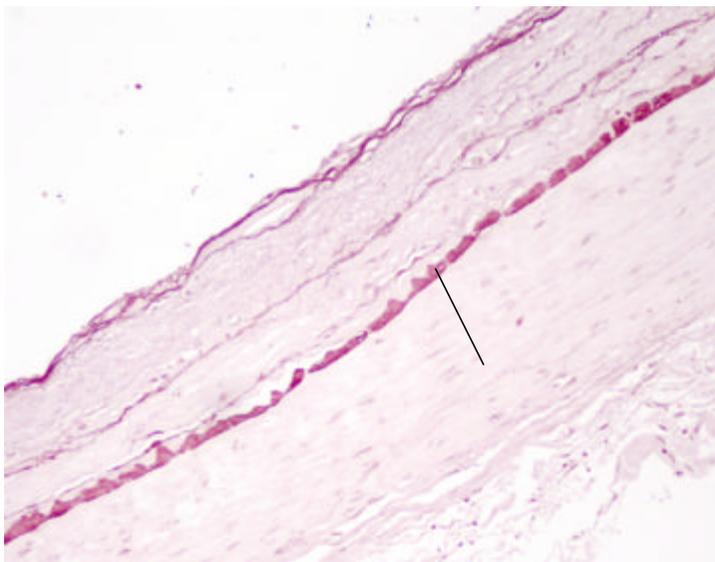


Figura 3.18. Artéria basilar (Homem/70anos). Coloração das fibras elásticas com orceína ácida pela técnica Una-Taenzen X100. Visualização da lâmina elástica interna da intima. As fibras elásticas apresentam uma cor púrpura. O reforço das seguintes lâminas elásticas acompanha-se de calcificação – Medialcalcose (seta).

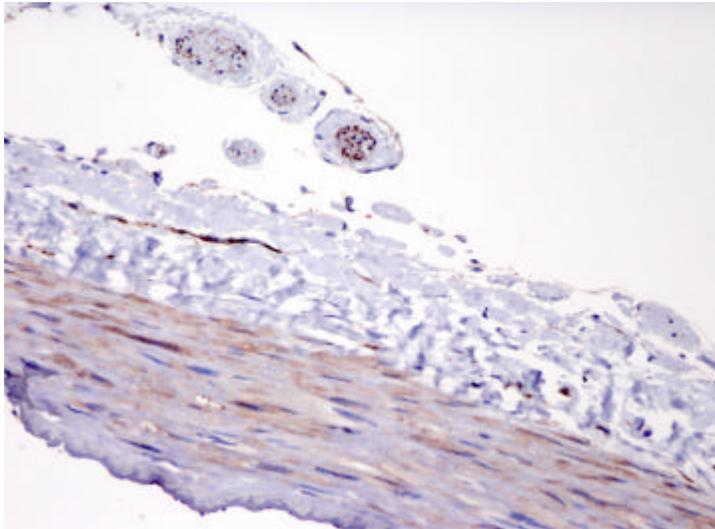


Figura 3.19. Artéria basilar (Mulher/41 anos). Técnica de imunohistoquímica – NSE X200. Visualização da coloração castanha nas células fusiformes da túnica média, apresentando características neuroendócrinas.

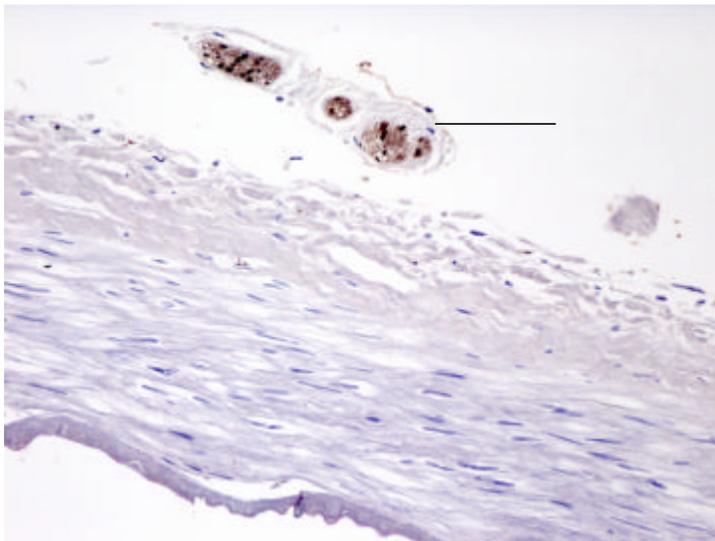


Figura 3.20. Artéria basilar (Mulher/41anos). Técnica de imunohistoquímica – Proteína S-100 X200. Visualização de terminações nervosas na túnica adventícia: formações de contorno arredondado, com coloração castanha (seta).

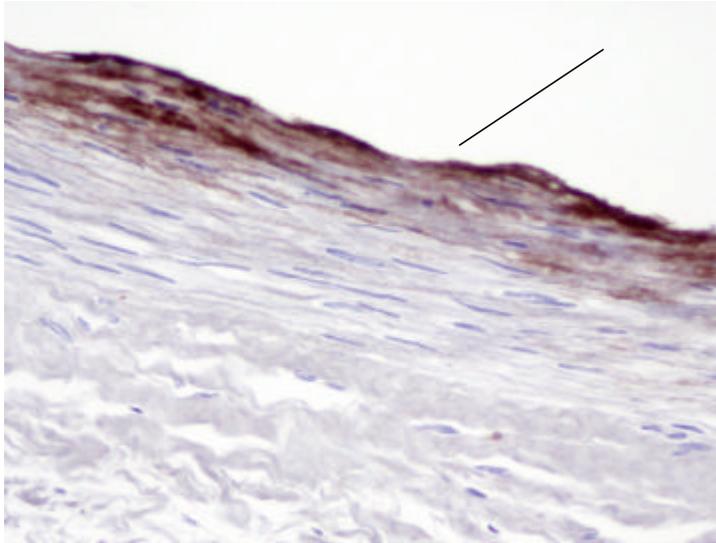


Figura 3.21. Artéria basilar (Mulher/41anos). Técnica de imunohistoquímica – Factor VIII X200. Caracterização das células endoteliais (seta).

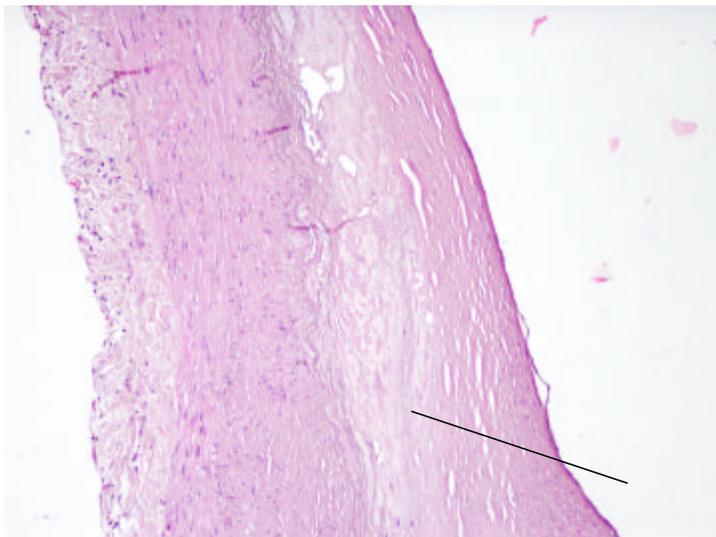


Figura 3.22. Artéria cerebral média (Homem/70anos). H/E X100. Observa-se arteriosclerose da túnica média (seta).

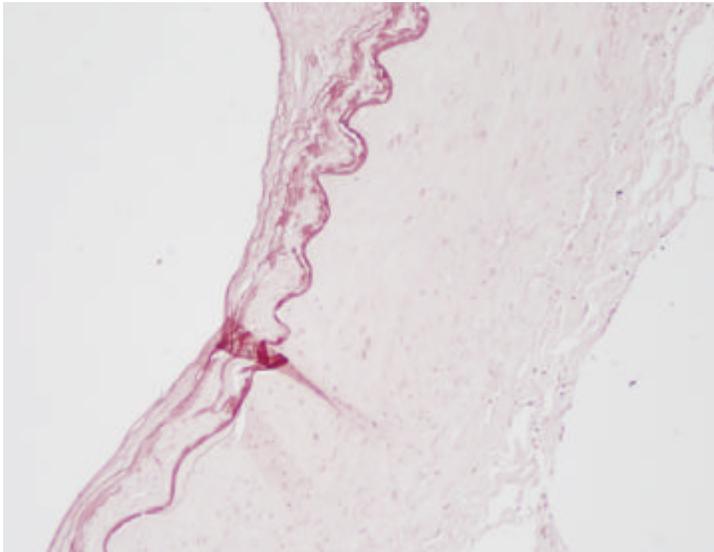


Figura 3.23. Artéria cerebral média (Homem/70anos). Coloração das fibras elásticas com orceina ácida pela técnica de Una-Taenzen X100. Observação da lâmina elástica interna da intima. As fibras elásticas apresentam uma cor púrpura.

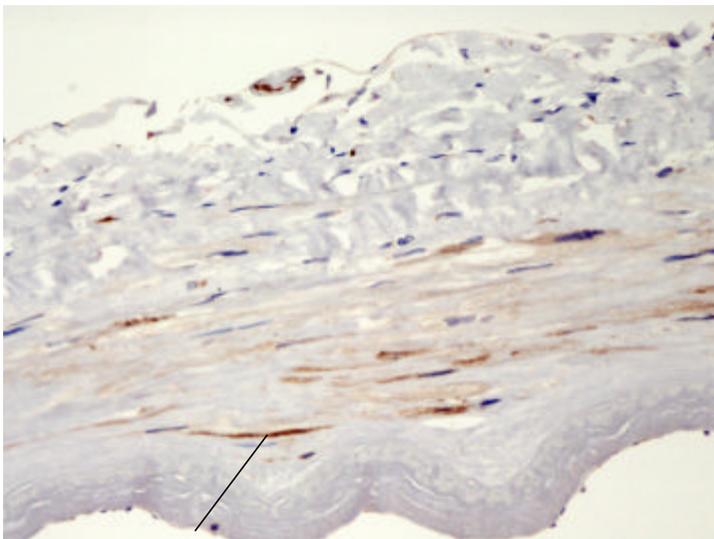


Figura 3.24. Artéria cerebral média (Mulher/41anos). Técnica de imunohistoquímica – NSE X200. Visualização da coloração castanha em células fusiformes da túnica média indicando características neuroendócrinas das células musculares lisas (seta).

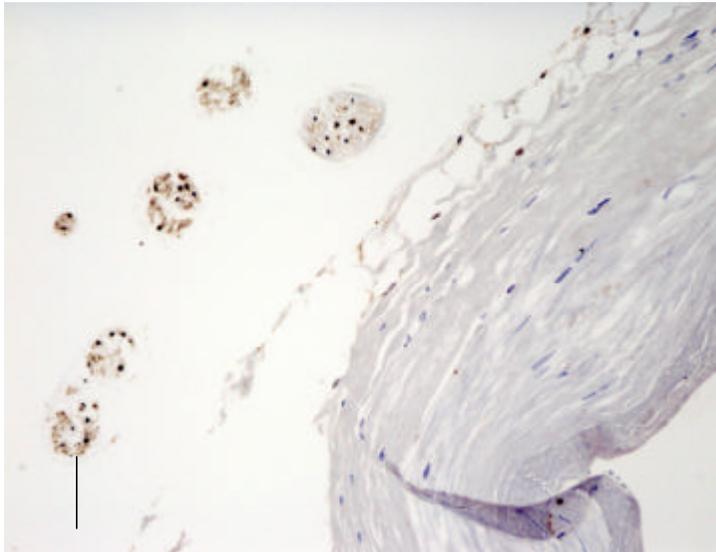


Figura 3.25. Artéria cerebral média (Mulher/41 anos). Técnica de imunohistoquímica – Proteína S-100 X200. Visualização de terminações nervosas na túnica adventícia: formações de contorno arredondado, com coloração castanha (seta).

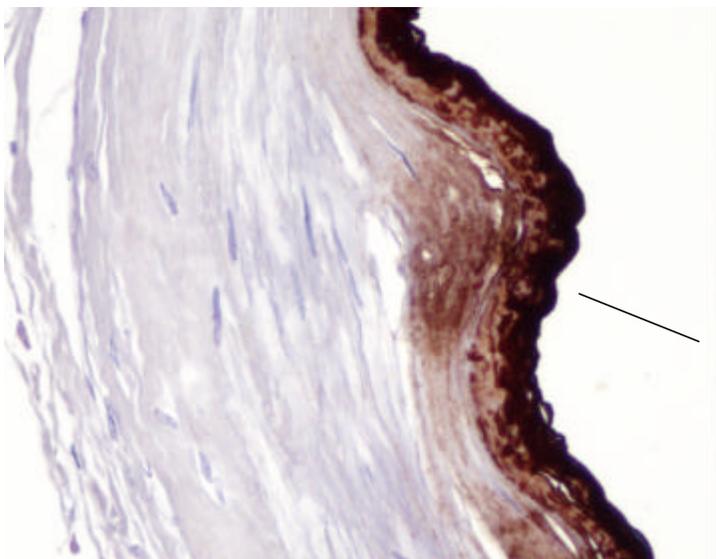


Figura 3.26. Artéria cerebral média (Mulher/41 anos). Técnica de imunohistoquímica para células endoteliais – Factor VIII X200 (seta).

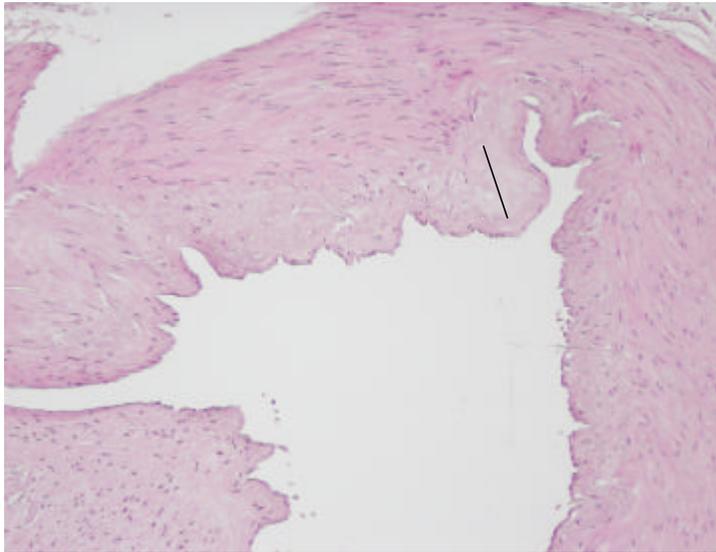


Figura 3.27. Artéria uterina (42 anos). H/E X100. Observa-se esclerose subendotelial da túnica média (seta).

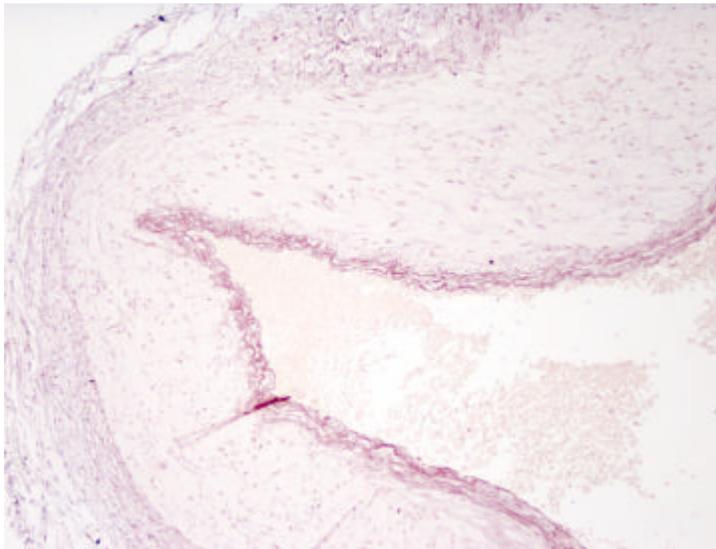


Figura 3.28. Artéria uterina (42 anos). Coloração das fibras elásticas com orceina ácida pela técnica de Una-Taenzen X100. Visualização da lâmina elástica interna da intima. As fibras elásticas apresentam uma cor púrpura.

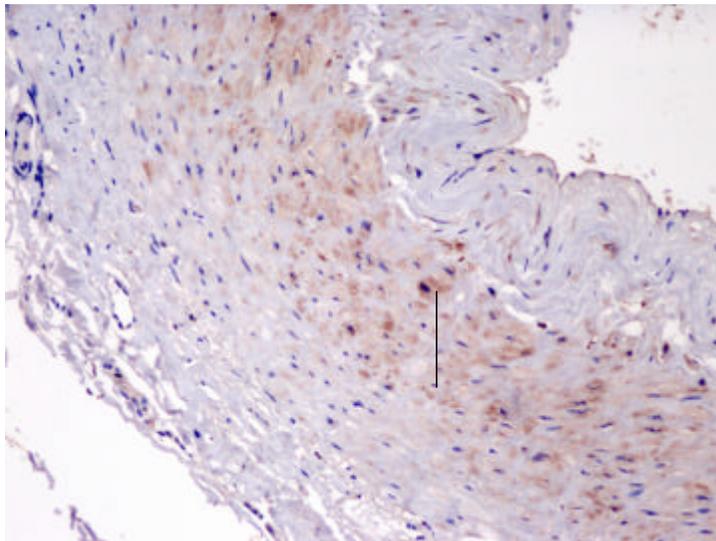


Figura 3.29. Artéria uterina (42 anos). Técnica de imunohistoquímica para NSE X200. Visualização da coloração castanha na túnica média indicando características neuroendócrinas das células musculares lisas (seta).

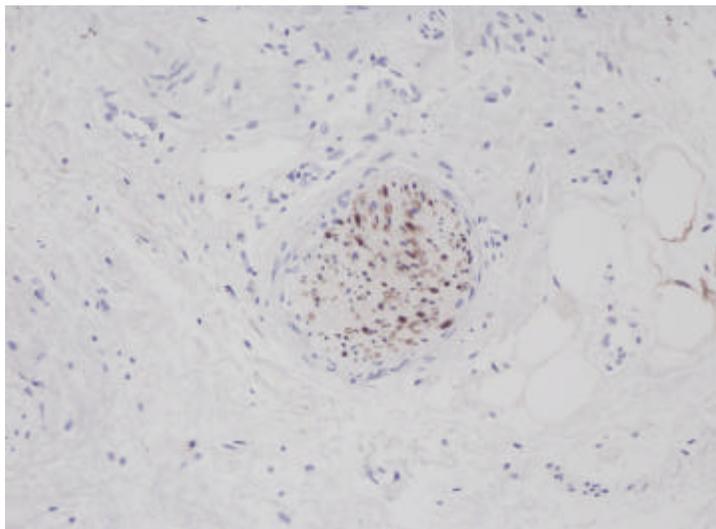


Figura 3.30. Artéria uterina (42 anos). Técnica de imunohistoquímica – Proteína S-100 X400. Visualização de uma terminação nervosa na túnica adventícia: formação de contorno arredondado, com coloração castanha.

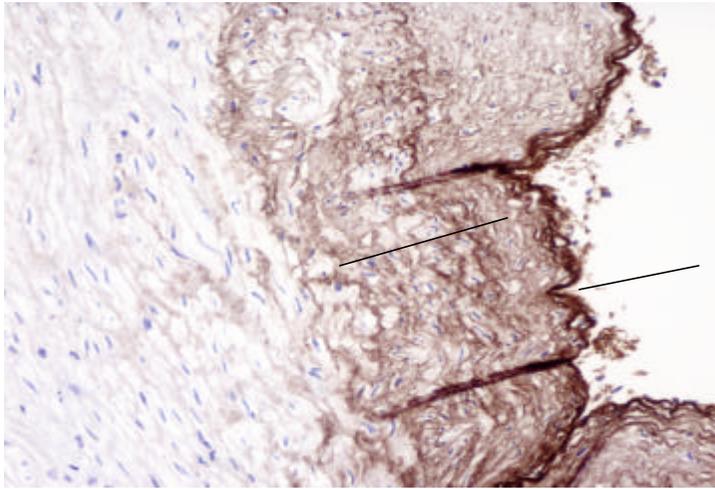


Figura 3.31. Artéria uterina (42 anos). Técnica de imunohistoquímica para células endoteliais – Factor VIII X200. Observa-se hiperplasia de células endoteliais e subendoteliais (setas).

3.11.2. Localização celular dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} nos três vasos sanguíneos em estudo

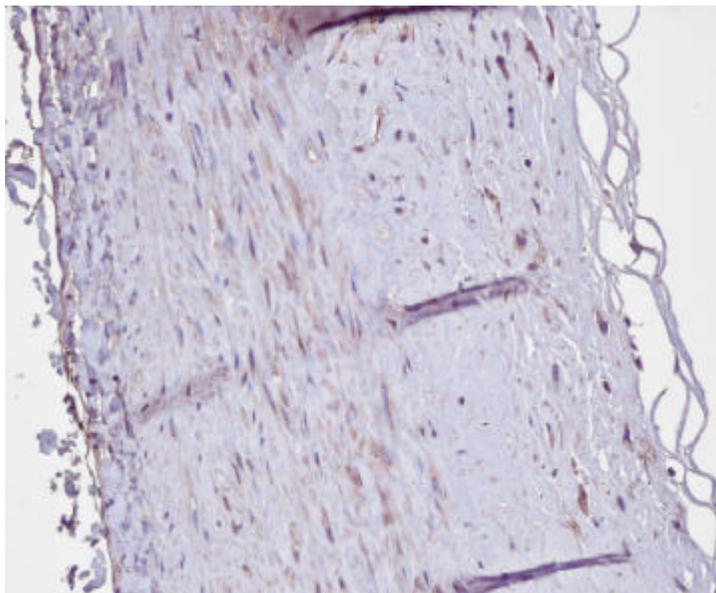


Figura 3.32. Artéria basilar (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1B} X200 (diluição 1:25) presente em células musculares lisas.

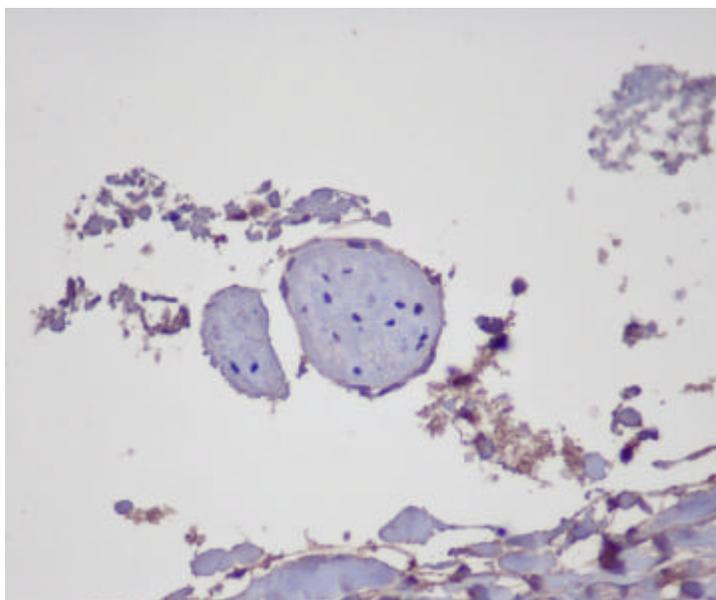


Figura 3.33. Artéria basilar (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1B} X400 (diluição 1:25) – Terminação nervosa sem receptores 5-HT_{1B}.

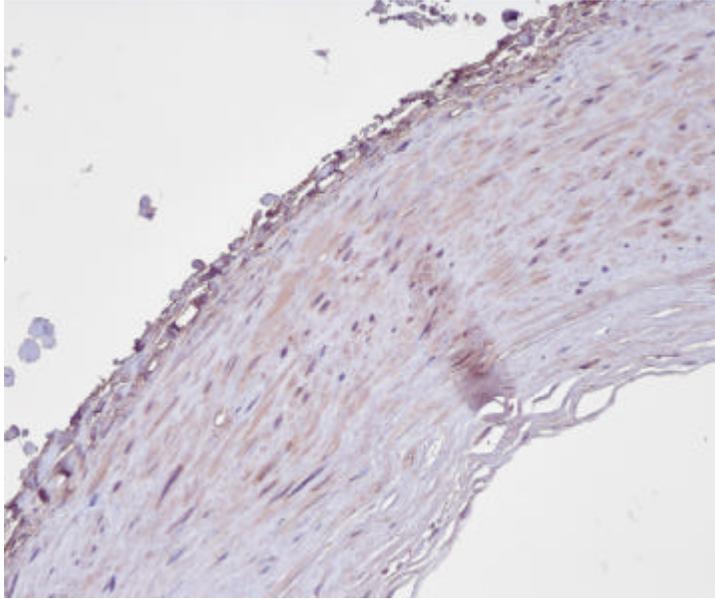


Figura 3.34. Artéria basilar (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1D} X200 (diluição 1:25) presente em células musculares lisas.

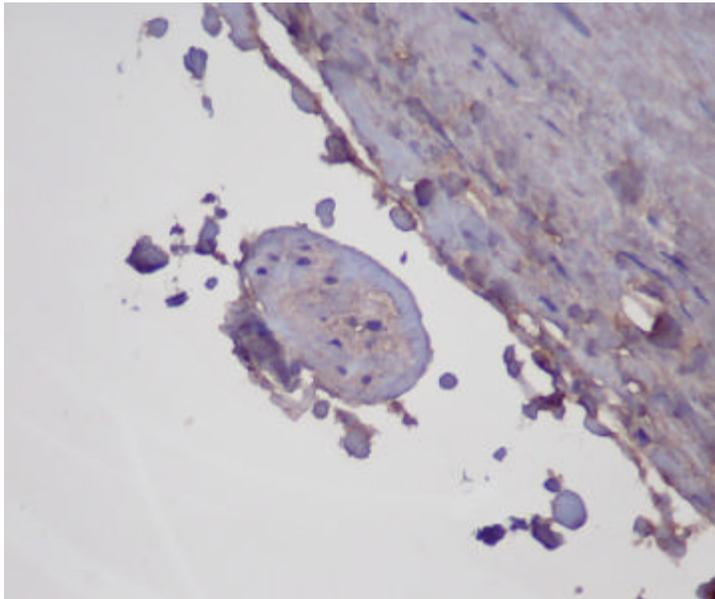


Figura 3.35. Artéria basilar (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: marcação do receptor 5-HT_{1D} X400 (diluição 1:25) numa terminação nervosa.

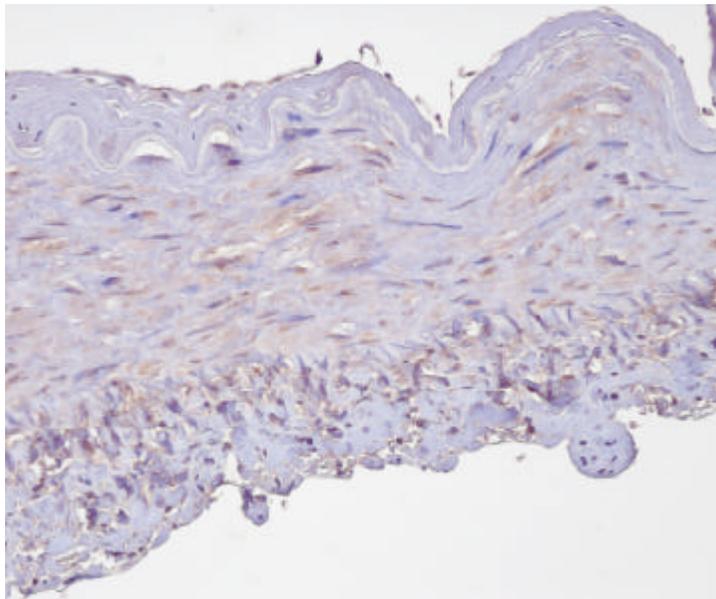


Figura 3.36. Artéria cerebral média (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1B} X200 (diluição 1:25) em células musculares lisas.

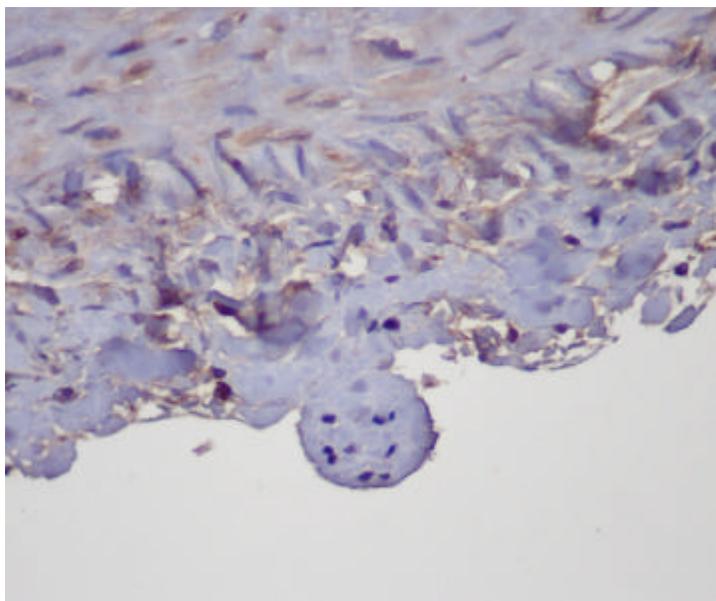


Figura 3.37. Artéria cerebral média (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1B} X400 (diluição 1:25) presente em células musculares lisas e ausente na terminação nervosa visível.

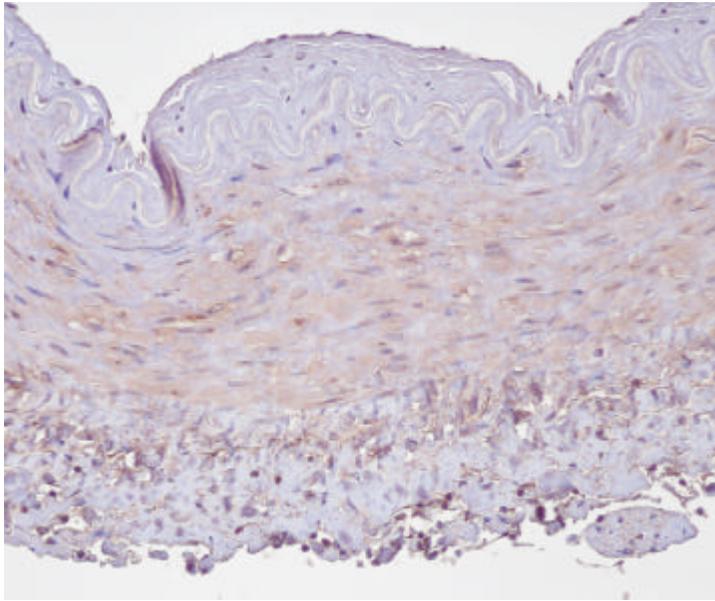


Figura 3.38. Artéria cerebral média (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1D} X200 (diluição 1:25) presente em células musculares lisas.

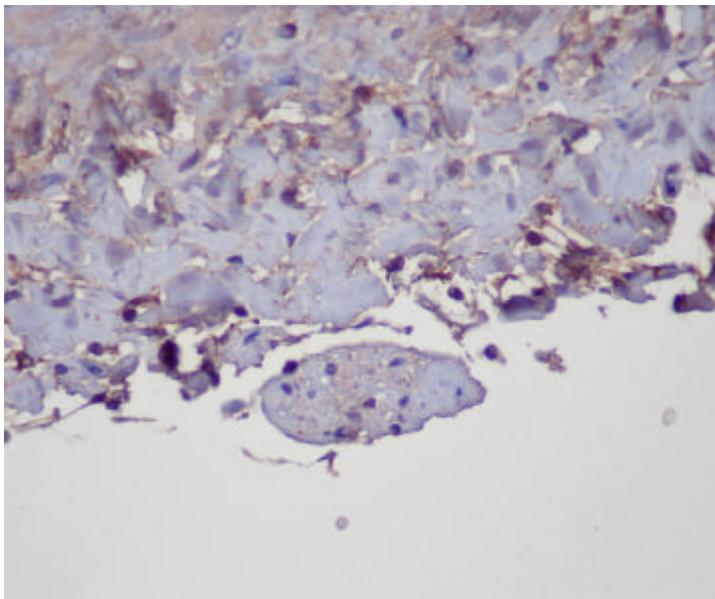


Figura 3.39. Artéria cerebral média (Mulher/56anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5-HT_{1D} X400 (diluição 1:25) visível nas células musculares lisas e na terminação nervosa.

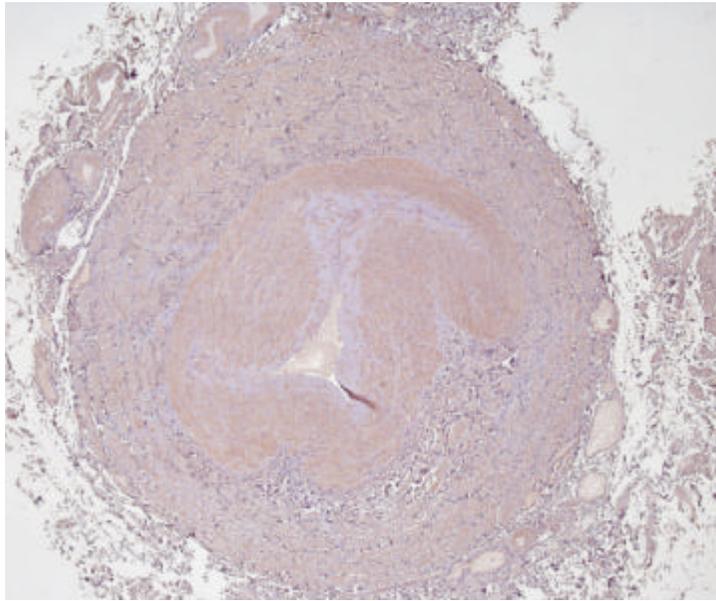


Figura 3.40. Artéria uterina (51anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1B} X40 (diluição 1:50) marcando com intensidade células musculares lisas e fibroblastos.

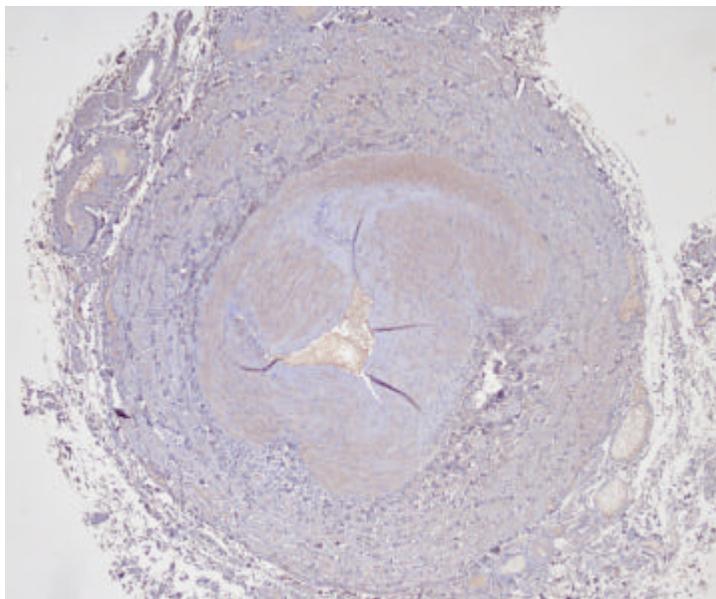


Figura 3.41. Artéria uterina (51anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1D} X40 (diluição 1:25) – marcação menos intensa das células musculares lisas.

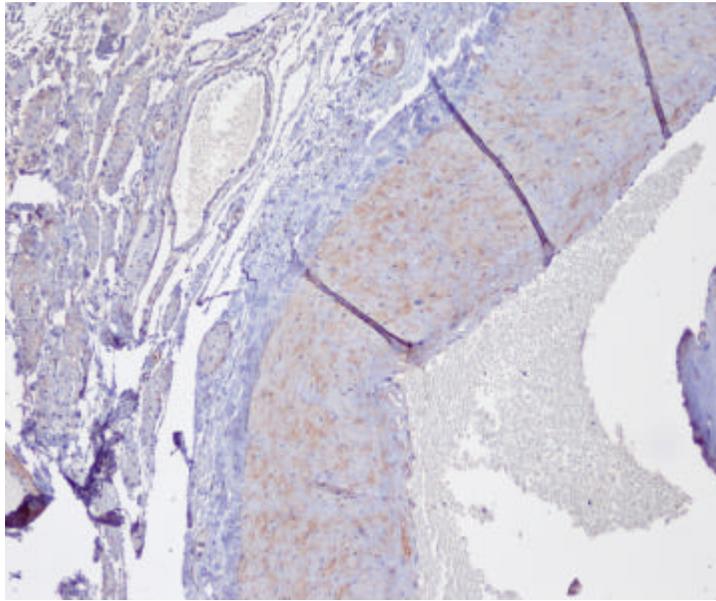


Figura 3.42. Artéria uterina (42anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1B} X100 (diluição 1:50) em células musculares lisas da túnica média.

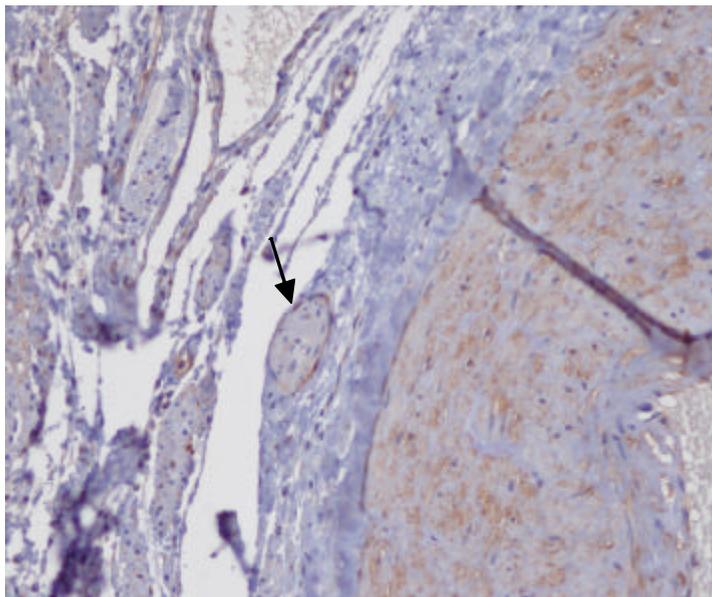


Figura 3.43. Artéria uterina (42anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1B} X200 (diluição 1:50) Para além das células musculares lisas da túnica média, também se identifica positividade numa terminação nervosa.

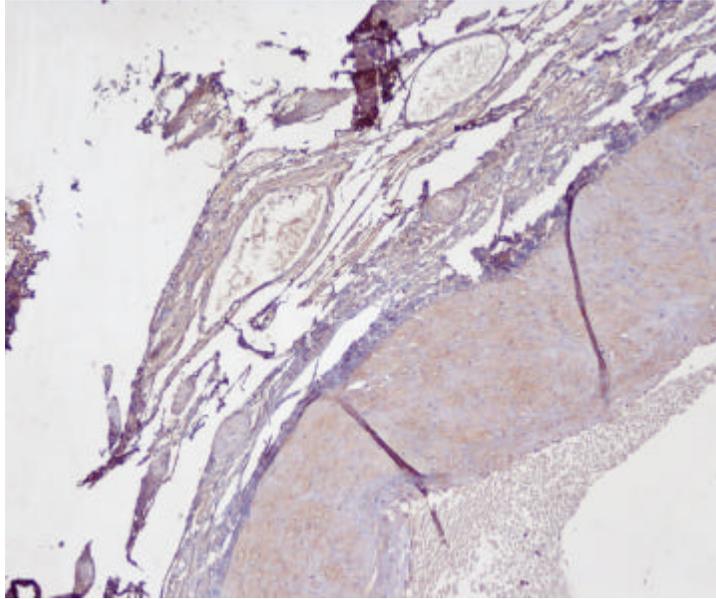


Figura 3.44. Artéria uterina (42anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1D} X100 (diluição 1:25) com positividade nas células musculares lisas da túnica média.

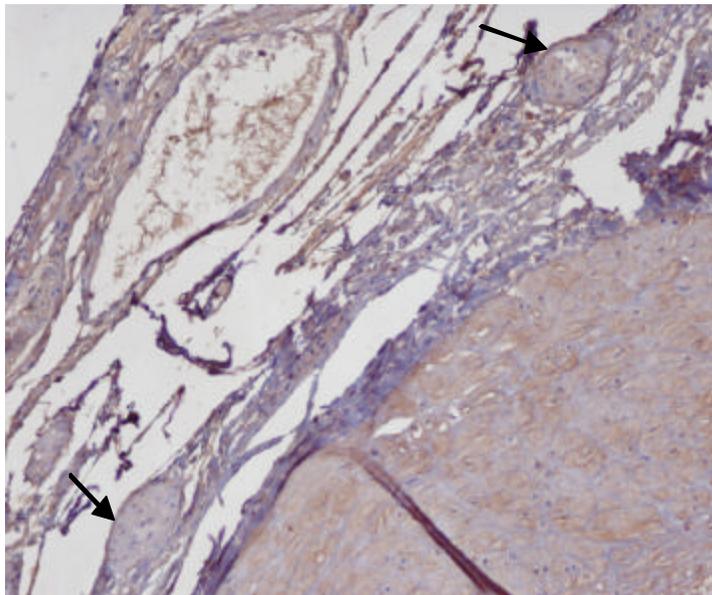


Figura 3.45. Artéria uterina (42anos). Técnica de imunohistoquímica: receptor 5 HT_{1D} X200 (diluição 1:25) identificando também duas terminações nervosas.

4. Discussão

4.1. Efeitos contrácteis dos triptanos na artéria basilar, cerebral média e uterina humanas

Todos os triptanos (sumatriptano, naratriptano e zolmitriptano) em estudo, testados entre 0,1 e 30 μM , induziram contracções dependentes da concentração tanto nas artérias cranianas (artéria basilar e cerebral média), como na artéria periférica (artéria uterina), utilizadas respectivamente como modelos experimentais *in vitro* de actividade antiemética e de potenciais efeitos laterais. Os estudos histoquímicos revelaram que os três vasos sanguíneos em estudo apresentavam morfologias idênticas e características de artérias musculares.

A potência (pCE_{50}) dos três triptanos foi maior nos vasos sanguíneos centrais do que no vaso sanguíneo periférico (ver tabela I), tendo-se verificado inclusive diferenças estatisticamente significativas entre o valor de pCE_{50} na artéria uterina e o pCE_{50} obtido na artéria basilar para o sumatriptano e para o zolmitriptano. Relativamente à capacidade contráctil, verificou-se que o sumatriptano foi dos triptanos o com maior actividade intrínseca ($E_{\text{máx}}$) e, comparativamente aos outros dois triptanos, demonstrou maior actividade intrínseca na artéria periférica do que nas artérias centrais, enquanto o oposto se verificou para os triptanos de segunda geração, zolmitriptano e naratriptano (ver tabela I). No entanto, é de salientar que as variâncias dos efeitos máximos dos triptanos na artéria uterina foram muito superiores aos observados nas artérias centrais (como se pode calcular pelos valores de S.E.M), o que evidencia uma grande variabilidade na resposta contráctil aos triptanos do vaso sanguíneo periférico. Mais ainda, como descrito nos Resultados, a respeito da validação da funcionalidade do material biológico *post-mortem* utilizado, não se verificaram alterações estatisticamente significativas na potência da 5-HT (pCE_{50}), mas sim uma acentuada redução da sua actividade intrínseca

(Emáx) ao longo do tempo de isolamento do órgão. Posto isto, será de esperar que os triptanos tenham maior actividade intrínseca em artérias cranianas do que aquela efectivamente observada nas nossas condições experimentais.

Estes resultados confirmam a cranioselectividade dos triptanos, sobretudo os da segunda geração, e estão de acordo com os resultados de outros estudos que compararam os efeitos dos triptanos em vasos sanguíneos centrais e periféricos (van den Broek et al., 2002; Razzaque et al., 2002; Edvinsson et al., 2005).

Na avaliação da eventual eficácia antiemética dos triptanos, através da actividade intrínseca dos mesmos na contracção vascular da artéria cerebral média, modelo experimental biológico *in vitro* de actividade antiemética (Friberg et al., 1991), verificámos que o sumatriptano e o naratriptano foram igualmente eficazes, e o zolmitriptano o menos eficaz. O naratriptano foi também o mais potente em induzir vasoconstricção tendo sido igualmente mais potente neste vaso sanguíneo central do que nos restantes vasos sanguíneos estudados.

Na avaliação de potenciais efeitos laterais dos triptanos, nomeadamente os efeitos adversos isquémicos, embora possam ser devidos à sua capacidade vasoconstritora, concluímos, à luz dos nossos resultados nas artérias estudadas, que é pouco provável que os triptanos causem acidentes isquémicos graves em indivíduos saudáveis, nomeadamente os triptanos da segunda geração que demonstraram ter uma capacidade contráctil significativamente inferior ao sumatriptano, quer a nível de vasos sanguíneos centrais, quer a nível de vasos sanguíneos periféricos. Acresce que os valores de CE_{50} calculados das nossas experiências são superiores às concentrações plasmáticas terapêuticamente eficazes utilizadas na prática clínica (Perry e Markham, 1998; Maassen VanDenBrink et al., 1998), sendo pouco provável que os triptanos provoquem uma vasoconstricção clinicamente relevante na ausência de doença vascular. Isto apesar das concentrações de

sumatriptano (o fármaco de referência em todo o estudo) testadas, abrangerem as concentrações plasmáticas atingidas com doses clinicamente eficazes (100 mg *per os* de sumatriptano implicam uma $C_{m\acute{a}x}$ de 54-78 $\mu\text{g/L}$, equivalente a 0,1-0,2 μM) (Perry e Markham, 1998; Maassen VanDenBrink et al., 1998), pelo que considerámos que os fenómenos eventualmente observados nas nossas experiências ocorrem nas doses utilizadas na prática clínica. No entanto, e apesar do descrito se poder traduzir numa maior segurança cérebro e cardiovascular da segunda geração de triptanos, todos os triptanos são contraindicados na presença de doenças cardiovasculares (Ferrari et al., 2002). Tanto mais que actualmente, e apesar de na génese dos sintomas no peito, os efeitos adversos mais alarmantes dos triptanos, se colocar a hipótese de outros mecanismos não envolvendo vasoconstrição e isquémia (Miller et al., 1981, Lafitte et al., 1996; Houghton et al., 1994; Boska et al., 2000), têm sido relatados efeitos adversos de natureza isquémica, com outras localizações anatómicas e envolvendo tanto o sumatriptano, como os triptanos da segunda geração (Cavazos et al., 1994; Witting, 1996; Knudsen et al., 1998; Vijayan e Peacock, 1999; Liu e Ardolf, 2000).

Tabela I

Respostas contrácteis dos três vasos sanguíneos estudados à 5-HT, sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano.

	Emáx (mN)	pCE ₅₀	n
<i>Artéria basilar</i>			
5-HT	5,20 ± 0,25	6,37 ± 0,08	16
Sumatriptano	4,58 ± 0,26	6,33 ± 0,04	24
Zolmitriptano	3,49 ± 0,16 ^b	6,40 ± 0,02	20
Naratriptano	2,62 ± 0,37 ^b	6,00 ± 0,07 ^c	15
<i>Artéria cerebral média</i>			
5-HT	6,38 ± 0,95	7,12 ± 0,18	10
Sumatriptano	3,42 ± 0,21 ^a	6,02 ± 0,18 ^a	5
Zolmitriptano	2,14 ± 0,36 ^b	6,29 ± 0,08 ^a	8
Naratriptano	3,34 ± 0,76 ^a	6,51 ± 0,12 ^b	8
<i>Artéria uterina</i>			
5-HT	7,71 ± 1,84	5,92 ± 0,17	6
Sumatriptano	5,50 ± 1,27	5,76 ± 0,15	8
Zolmitriptano	2,21 ± 1,02 ^a	6,02 ± 0,17	7
Naratriptano	1,22 ± 0,38 ^b	5,99 ± 0,06	8

^a $p < 0,05$ versus 5-HT e vice-versa

^b $p < 0,05$ versus 5-HT e sumatriptano e vice-versa

^c $p < 0,05$ versus 5-HT, sumatriptano e zolmitriptano e vice-versa

Emáx = contracção máxima em mN de tensão; pCE₅₀ = logaritmo negativo da concentração molar do agonista capaz de induzir metade da contracção máxima; n = número de experiências. Os resultados estão expressos em valores médios ± S.E.M. A significância das diferenças estatísticas foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.2. Caracterização farmacológica do subtipo de receptor 5-HT₁ envolvido no efeito contráctil dos triptanos em vasos sanguíneos humanos

4.2.1. Na artéria basilar humana

Pretendeu-se investigar que receptores de 5-HT, nomeadamente que subtipos de receptores 5-HT₁, estão envolvidos na resposta contráctil aos triptanos de vasos sanguíneos humanos.

Nos estudos funcionais realizados na artéria basilar, demonstrámos que a 5-HT e o sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano induziram contracções dependentes da concentração. Estes resultados são consistentes com os previamente publicados por Parsons e colaboradores (1989), para a 5-HT e o sumatriptano neste mesmo vaso sanguíneo cerebral. No que diz respeito aos receptores de 5-HT que medeiam a resposta contráctil da artéria basilar à 5-HT e aos triptanos, os resultados apontam para o envolvimento de mais de um tipo de receptor de 5-HT.

Primeiro, o envolvimento de receptores 5-HT_{1B/1D} na mediação da resposta contráctil à 5-HT é claramente confirmado pelo facto do sumatriptano, zolmitriptano e naratriptano, que são agonistas selectivos dos receptores 5-HT_{1B/1D} desprovidos de afinidade para receptores 5-HT₂ (Tfelt-Hansen et al., 2000), terem induzido uma resposta vasoconstritora naquele vaso sanguíneo. De forma a identificar o subtipo de receptor 5-HT₁ envolvido, isto é, se é 5-HT_{1B} ou 5-HT_{1D}, foram usados conhecidos antagonistas selectivos destes dois subtipos de receptores de 5-HT: o cianopindolol, bloqueador β -adrenérgico e antagonista de receptores 5-HT_{1A/1B}, cujo pK_i em receptores 5-HT_{1B} humanos recombinados expressos em linhas celulares de células gliais Cos-7 foi de 6,97 (Pauwels et al., 1998); o SB 224289, antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, cujos pK_i para receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} humanos recombinados expressos em linhas celulares CHO (*Chinese Hamster Ovary cell line*) foram $8,16 \pm 0,06$ e

6,27 ± 0,09, respectivamente (Selkirk et al., 1998); e o BRL 15572, antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, cujo pK_i foi de 7,90 em receptores 5-HT_{1D} humanos comparado com o pK_i de 6,10 em receptores 5-HT_{1B} humanos, ambos expressos em linhas celulares CHO (Price et al., 1997). Enquanto que as contracções induzidas por todos os agonistas em estudo foram resistentes a 10 µM de cianopindolol, excepto no caso do sumatriptano, cuja curva concentração-resposta sofreu um significativo desvio para a direita, 10 µM de BRL 15572 causou um antagonismo de tipo não competitivo em todos os agonistas testados, com uma redução da resposta máxima de cerca de 40%. Estudos anteriores de Parsons e colaboradores (1989) demonstraram que a resposta contráctil à 5-HT e ao sumatriptano foi resistente a 0,1 µM de cianopindolol, neste mesmo vaso sanguíneo humano e Connor e colaboradores (1989b) observaram que os efeitos contrácteis do sumatriptano não eram modificados por 1µM de cianopindolol, na artéria basilar de cão. No entanto, as concentrações do antagonista utilizadas por estes investigadores, nomeadamente Parsons e colaboradores (1989), embora suficiente para bloquear receptores 5HT_{1B} de rato (pK_B de 8,2) (Hoyer et al., 1994) pode não ter sido suficiente para bloquear receptores 5-HT_{1B} humanos, seus homólogos de espécie (Hartig et al., 1996), mas com perfil farmacológico distinto, nomeadamente no que diz respeito à afinidade para fármacos bloqueadores β-adrenérgicos, que é inferior comparativamente aos 5-HT_{1B} dos roedores (Parker et al., 1993). Pretendendo-se investigar este comportamento contraditório do cianopindolol face a agonistas com um perfil farmacológico bastante semelhante e definitivamente despistar a hipótese da presença de receptores do subtipo 5-HT_{1B}, recorremos a um fármaco não β-adrenérgicos, o SB 224289, com a desvantagem de este ser um antagonista em ambos os subtipos de receptores que pretendemos discriminar, e cuja selectividade depende da utilização de uma gama de concentrações muito estreita. O SB 224289 é cerca de 75 vezes mais potente em receptores 5-HT_{1B} comparativamente aos receptores 5-HT_{1D}

(Selkirk et al., 1998). Sendo na concentração utilizada de 63 nM (10 vezes o respectivo K_i para receptores 5-HT_{1B}) selectivo para receptores 5-HT_{1B} e uma vez que antagonizou significativamente a resposta contráctil ao sumatriptano, confirmando os resultados com o cianopindolol, concluímos que na artéria basilar humana existem receptores do subtipo 5-HT_{1B} a mediar a resposta contráctil a triptanos. O facto do cianopindolol ter antagonizado apenas a resposta contráctil ao sumatriptano e não aos outros triptanos testados, pode ter a ver com o facto da segunda geração de triptanos, e nomeadamente o zolmitriptano, ter muito menor afinidade para receptores do subtipo 5-HT_{1B} do que para receptores do subtipo 5-HT_{1D}, comparativamente ao sumatriptano (Martin, 1997; Tfelt-Hansen et al., 2000).

No que diz respeito ao subtipo de receptores 5-HT_{1D} e porque o BRL 15572 nas concentrações de 0,1 e 1 μ M não produziu alterações significativas nas curvas concentração-resposta do sumatriptano e do zolmitriptano, representantes da primeira e segunda geração de triptanos, utilizámos a concentração 10 vezes superior, a qual causou um antagonismo de tipo não competitivo nos efeitos contrácteis de todos os agonistas testados. Contudo, nesta concentração o BRL 15572 perde a sua selectividade para os receptores 5-HT_{1D} podendo bloquear igualmente receptores 5-HT_{1B} (Price et al., 1997), isto é, passa a comportar-se como um antagonista não selectivo 5-HT_{1B/1D}, e o efeito observado pode traduzir um bloqueio de receptores 5-HT_{1B} e não de receptores 5-HT_{1D}. No entanto, a redução de 40% da resposta máxima aos triptanos testados não nos parece totalmente explicada pelo antagonismo unicamente de receptores 5-HT_{1B}, uma vez que por um lado, o SB 224289, utilizado numa concentração na qual é selectivo para este subtipo de receptores, apenas provocou uma redução de 18,5% na resposta máxima ao sumatriptano, e por outro o cianopindolol, antagonista de receptores 5-HT_{1A/1B}, não antagonizou as respostas contrácteis ao zolmitriptano e ao naratriptano.

Os resultados destes estudos farmacológicos sugerem que na artéria basilar humana poderá haver uma população mista de receptores 5-HT_{1B} e

5-HT_{1D} a mediar o efeito vasoconstritor dos triptanos, o que é corroborado pelos resultados dos estudos moleculares, nos quais foram detectadas as proteínas de ambos os subtipos de receptores, e pelos resultados dos estudos imunohistoquímicos, com os quais foi possível localizar em que estruturas celulares estes subtipos de receptores se encontram. Com efeito, as células musculares lisas da túnica média expressaram neste vaso sanguíneo imunoreactividade aos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}

Finalmente não podemos excluir a possibilidade da intervenção de outro subtipo de receptores 5-HT₁ na resposta contráctil da artéria basilar humana aos triptanos, para além dos subtipos 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}. Com efeito, todos os agonistas mantiveram uma resposta contráctil residual de cerca de 60% na presença da concentração de 10 µM de BRL 15572, na qual este se comportará como um antagonista não selectivo 5-HT_{1B/1D}. Embora os receptores 5-HT_{1F} estejam também expressos em vasos sanguíneos humanos (Bouchelet et al., 1996), e os triptanos apresentem afinidade para este subtipo de receptor (Adham et al., 1993), não nos parece provável a intervenção deste receptor na mediação de resposta contráctil aos triptanos da artéria basilar humana, pois são diversos os estudos nos quais se demonstra que os receptores 5-HT_{1F} não medeiam vasoconstrição (Johnson et al, 1997; Cohen et al, 1999; Razzaque et al, 1999; Bouchelet et al, 2000). No entanto enquanto não estiverem disponíveis antagonistas selectivos para este subtipo de receptor não será possível excluir funcionalmente tal hipótese.

Relativamente aos receptores do tipo 5-HT₂, embora o seu envolvimento na artéria basilar humana não tenha sido provado por outros investigadores, usando cetanserina na concentração de 0,1 µM (Parsons et al., 1989), as nossas experiências sugerem a presença de receptores do subtipo 5-HT_{2A/2C}, uma vez que a cetanserina, na concentração 1 µM (pK_i de 8,9 e 7,0 em receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, respectivamente) (Baxter et al., 1995), causou uma depressão significativa na resposta máxima à 5-HT, sem ter alterado a resposta contráctil aos triptanos. Para além disto, o facto

do sumatriptano induzir uma resposta máxima que é 88% da obtida com a 5-HT, e o facto da cetanserina produzir uma redução da resposta máxima da 5-HT de 26%, reflecte muito provavelmente que o efeito contráctil da 5-HT na artéria basilar humana é mediado tanto por receptores 5-HT_{1B/1D}, como por receptores 5-HT₂. Efectivamente o efeito vasoconstritor da 5-HT em preparações vasculares de artéria basilar isoladas a partir de diferentes espécies animais, nomeadamente de coelho (Parsons e Whalley, 1989), de cavalo (Miyamoto et al., 1996), de porco (Miyamoto et al., 1994), de cão (Frenken, 1989; Connor et al., 1989b), de rato (Deckert e Angus, 1992) e de primatas (Connor et al., 1989b), tem sido atribuído a uma população mista de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂.

De referir ainda que, para além da amplitude do efeito máximo do sumatriptano relativamente ao da 5-HT, obtido nas nossas experiências, ser semelhante às amplitudes de contracção obtidas noutros estudos com artéria basilar humana ($71,4 \pm 6,4\%$) (Parsons et al., 1989) e artéria basilar de primatas ($78,3 \pm 1,9\%$) (Connor et al., 1989b), a falta de afinidade dos triptanos para receptores 5-HT₂ foi também observada noutros estudos da artéria basilar (Parsons et al., 1989; Parsons e Whalley, 1989; Connor et al., 1989b) e noutras preparações vasculares humanas, nomeadamente na artéria pulmonar (Cortijo et al., 1997) e artéria umbilical (Karlsson et al., 1999).

Uma vez que nos estudos de Parsons e colaboradores (1989), a resposta contráctil à 5-HT e ao sumatriptano foi resistente ao antagonismo pelo GR 38032, um antagonista de receptores 5-HT₃, excluindo a hipótese de activação deste tipo de receptores, achámos desnecessário testar a sua presença nas nossas preparações, embora seja um receptor ligado ao aumento dos níveis de cálcio intracelular necessário à vasoconstricção (Hoyer et al., 1994). Mais ainda, os receptores 5-HT₃ não foram encontrados em preparações não humanas de artéria basilar (Connor et al., 1989b; Deckert e Angus, 1992; Miyamoto et al., 1996). Pela mesma razão também não testámos a possível mediação da resposta à 5-HT e aos triptanos pelos

receptores α -adrenérgicos, uma vez que no estudo de Parsons e colaboradores (1989) a fentolamina foi um fraco antagonista do efeito de ambos. Não obstante, não excluimos a presença e receptores adrenérgicos na nossa preparação, uma vez que a noradrenalina induziu contracções da artéria basilar dependentes da concentração com um efeito máximo de $3,01 \pm 0,30$ mN e com um pCE_{50} de $7,00 \pm 0,16$.

Ainda que limitados pela dificuldade em obter material biológico humano *post-mortem* de uma forma sistemática, como estes estudos de farmacologia experimental o exigem, o que nos impediu de realizar em tempo útil protocolos experimentais onde se associassem dois ou mais dos antagonistas selectivos utilizados, concluimos que este estudo farmacológico evidencia pela primeira vez que o então designado receptor 5-HT_{1-like}, que medeia a resposta contráctil aos triptanos na artéria basilar humana, e previamente descrito por Parsons e colaboradores (1989), é de facto uma população mista de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}. No entanto, existe também neste vaso sanguíneo uma população de receptores 5-HT₂, para os quais esta classe de fármacos usados no tratamento agudo da enxaqueca aparenta não ter afinidade. Concluimos ainda que triptanos de diferentes gerações parecem ter basicamente e funcionalmente o mesmo perfil farmacológico, sendo de facto as suas características farmacocinéticas ou o seu perfil de tolerabilidade, os factores a ter em conta aquando das decisões terapêuticas.

4.2.2. Na artéria cerebral média humana

Na artéria cerebral média humana *post-mortem*, paradoxalmente, o BRL 15572, na concentração 10 μ M, na qual se comporta como um antagonista não selectivo 5-HT_{1B/1D}, não induziu alterações na curva concentração-resposta do sumatriptano, que é essencialmente um agonista 5-HT_{1B/1D}, embora tenha afinidade para outros subtipos de receptores serotoninérgicos (ver tabela II adaptada de Tfelt-Hansen et al., 2000). Uma

vez mais a resposta contráctil ao triptano não foi alterada na presença de 1 μM de cetanserina, antagonista de receptores do subtipo 5-HT_{2A/2C} (Baxter et al., 1995). Por isto, neste vaso sanguíneo craniano, exclui-se a activação pelo sumatriptano quer de receptores 5-HT_{1B/1D}, quer de receptores 5-HT_{2A/2C}. Mais ainda, o SB 224289 na concentração de 63 nM (Selkirk et al., 1998) também não alterou a resposta ao triptano neste vaso sanguíneo confirmando o não envolvimento de receptores 5-HT_{1B}. Resultados semelhantes foram os obtidos por Roon e colaboradores (1999) na artéria cerebral média de bovinos. Com efeito, estes autores verificaram que, enquanto o sumatriptano contraía a referida artéria via receptores 5-HT_{1B/1D}, a contracção induzida pela 5-HT era parcialmente mediada por receptores 5-HT_{2A} e por um outro receptor não 5-HT_{1B/1D}. É de salientar, inclusive, que os valores de potência obtidos por estes autores para os diferentes triptanos (pD_2 : 7,0 \pm 0,1; 6,8 \pm 0,1; 6,2 \pm 0,1; 6,0 \pm 0,2; respectivamente para a 5-HT, naratriptano, zolmitriptano e sumatriptano) foram muito semelhantes aos nossos, constantes na tabela I. Uma vez que a prazosina não alterou a resposta contráctil ao sumatriptano exclui-se igualmente o envolvimento de receptores α -adrenérgicos (MacKinnon et al., 1994; Willems et al., 2003). Como é pouco provável o envolvimento de receptores β -adrenérgicos, não só porque fisiologicamente não têm sido descritos como mediadores de contracção vascular e sim relaxamento (Guimarães e Moura, 2001), como também porque o pindolol (10 μM), antagonista não selectivo β -adrenérgico (Guimarães e Moura, 2001), não induziu qualquer alteração nas curvas concentração-resposta do sumatriptano e zolmitriptano em experiências preliminares realizadas na artéria basilar humana (dados não apresentados), resta-nos especular sobre o possível envolvimento de receptores 5-HT_{1A}. Efectivamente o cianopindolol foi o único antagonista a induzir uma alteração significativa na curva concentração-resposta do sumatriptano e é um antagonista não selectivo 5-HT_{1A/1B} (pK_B de 8,1 e 8,2, respectivamente em receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} de hipocampo de bezerro) (Hoyer et al., 1994). Acresce que nas nossas experiências na artéria

cerebral média, o naratriptano foi dos triptanos testados o mais potente em induzir contracção (pCE_{50} : $6,51 \pm 0,12$) e é dos triptanos o que apresenta maior afinidade para este subtipo de receptor de 5-HT (Tfelt-Hansen et al., 2000). Mais ainda, um estudo recente (Boers et al., 2004) atribuiu a receptores 5-HT_{1A} centrais, para além dos receptores 5-HT_{1B/1D}, a mediação do efeito inibitório do naratriptano em neurónios trigémino-vasculares. O facto é que são poucos os estudos que se têm debruçado sobre o papel deste subtipo de receptor a nível vascular. Enquanto Frenken (1989) sugere que o receptor que medeia a resposta contráctil a baixas concentrações de 5-HT na artéria basilar do cão pertence à subpopulação de receptores 5-HT_{1A}, Perren e colaboradores (1991) descartam de todo a possibilidade do efeito contráctil da 5-HT, sumatriptano e 8-OH-DPAT (agonista selectivo dos receptores 5-HT_{1A}) (Hoyer et al., 1994) ser mediado por receptores 5-HT_{1A} na veia safena e na artéria carótida de cão. No entanto, é sabido o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} em diferentes mecanismos de transdução celular e a existência de diferenças na actividade intrínseca e na potência de fármacos agonistas selectivos deste subtipo de receptor em função da região cerebral, o que sugere a existência de uma heterogeneidade dentro da subclasse de receptores 5-HT_{1A} (Zifa e Fillion, 1992; Hoyer et al., 1994).

Dada a preponderância da artéria cerebral média na determinação *in vitro* da actividade antiemética, como modelo biológico (Friebert et al., 1991), julgamos ser importante a identificação futura deste receptor, que não é 5-HT_{1B/1D} nem 5-HT_{2A}, e que pode constituir um novo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos destinados ao tratamento agudo da enxaqueca.

4.2.3. Na artéria uterina humana

Na artéria uterina humana estudada em condições *ex vivo* a 5-HT e os triptanos induziram contracções dependentes da concentração, o que

está de acordo com a resposta à 5-HT deste vaso sanguíneo em estudos realizados anteriormente tanto na presença (Karlsson et al., 1997; Razzaque et al., 2002), como na ausência de endotélio (Fontes Ribeiro et al., 1991).

No que diz respeito aos receptores que medeiam a resposta contráctil à 5-HT na artéria uterina humana, não se tendo verificado por Karlsson e colaboradores (1997) qualquer interacção entre a 2-metil-5-HT e o MDL 72222, respectivamente, agonista e antagonista dos receptores 5-HT₃ (Hoyer et al., 1994), excluindo-se a hipótese da presença daquele tipo de receptores de 5-HT, interessou verificar a contribuição dos receptores dos tipos 5-HT₁ e 5-HT₂. Os resultados deste estudo sugerem que a população de receptores serotoninérgicos que medeiam contracção neste vaso sanguíneo periférico são maioritariamente do tipo 5-HT₂ dado que a cetanserina (Baxter et al., 1995), na concentração de 1 µM, reduziu significativamente a resposta máxima à 5-HT em cerca de 83%. No entanto, paradoxalmente, o efeito máximo do sumatriptano ($5,50 \pm 1,27$, n=8) foi 71% do efeito máximo da 5-HT ($7,71 \pm 1,84$, n=6), embora estes resultados, pelos respectivos valores do S.E.M., traduzam uma grande variabilidade de resposta deste vaso sanguíneo periférico. Esta variabilidade de resposta está patente também nos resultados de estudos de outros investigadores. Enquanto que no estudo de Karlsson e colaboradores (1997) a contracção máxima obtida com o sumatriptano foi 16% da contracção máxima induzida pela 5-HT, no estudo de Razzaque e colaboradores (2002) foi de 47%. Tais resultados demonstram uma contribuição minoritária dos receptores do tipo 5-HT₁ para a resposta contráctil da artéria uterina humana.

No que respeita à caracterização do subtipo de receptor 5-HT₁ envolvido na resposta contráctil aos triptanos, tanto os resultados obtidos no grupo de experiências com o antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, o SB 224289 (Selkirk et al., 1998), como os obtidos com o fármaco adrenérgico, o cianopindolol, também antagonista de receptores 5-HT_{1B} (Pauwels et al., 1998), sugerem a presença deste subtipo de receptor, pelo

menos às 0 horas de isolamento do órgão. Os resultados dos estudos, com os mesmos antagonistas, mas efectuados na artéria uterina com 24 horas de isolamento, e com os quais se pretendeu mimetizar as condições *post-mortem*, sugerem a perda de funcionalidade daquele subtipo de receptor. No entanto, não excluimos a hipótese da presença igualmente de receptores do subtipo 5-HT_{1D} na artéria uterina, dado que uma redução significativa da resposta máxima ao sumatriptano foi obtida às 0 horas de isolamento do órgão, tanto na presença da concentração não selectiva de 10 µM de BRL 15572, como na presença da concentração 0,1 µM, na qual o BRL 15572 se comporta como um antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1D} (pK_i do BRL 15572 de 7,9 e 6,1 respectivamente em receptores 5-HT_{1D} e 5-HT_{1B} humanos expressos em linhas celulares CHO) (Price et al., 1997). Este subtipo de receptores parece subsistir funcionalmente após 24 horas de isolamento do órgão, pois o BRL 15572, na concentração 10 µM, na qual é um antagonista não selectivo 5-HT_{1B/1D}, mantém uma redução significativa da resposta máxima ao sumatriptano de 46% na ausência de qualquer efeito quer do cianopindolol, quer do SB 224289, antagonistas selectivos dos receptores 5-HT_{1B}.

Apesar dos estudos em vasos sanguíneos periféricos, nomeadamente na artéria uterina (Razzaque et al., 2002), suportados na sua maioria por estudos moleculares e imunohistoquímicos, sugerirem fortemente que a contracção induzida pelo sumatriptano é mediada por receptores 5-HT_{1B} e não por receptores 5-HT_{1D}, os nossos resultados na artéria uterina sugerem a presença, pela sua funcionalidade, tanto do subtipo de receptor 5-HT_{1B} como do subtipo 5-HT_{1D}. Daqui se conclui que deve haver alguma reserva ao considerarem-se os receptores 5-HT_{1B} o único subtipo de receptores 5-HT₁ a mediar a resposta contráctil a triptanos, tanto em vasos sanguíneos centrais como periféricos, com base maioritariamente em estudos moleculares. No entanto, curiosamente, as conclusões dos nossos estudos farmacológicos são corroboradas pelos resultados dos nossos estudos moleculares, nos quais foram detectadas as

proteínas de ambos os subtipos de receptores, e pelos nossos estudos imunohistoquímicos, nos quais houve marcação de ambos os subtipos de receptores em células musculares lisas, tendo sido a marcação dos receptores 5-HT_{1B} mais intensa do que a marcação dos receptores 5-HT_{1D}, feita com o dobro da concentração do respectivo anticorpo.

Relativamente à funcionalidade dos receptores 5-HT_{1B/1D} ao longo do tempo, no período pós-colheita do órgão, verificou-se ainda que o fenómeno de taquifilaxia ao efeito contráctil induzido pelos triptanos, que foi observado na artéria uterina humana, mas não na artéria basilar e cerebral média, parece ser um efeito mediado mais uma vez principalmente por receptores 5-HT_{1B}, não se excluindo a hipótese do envolvimento de outro subtipo de receptor 5-HT₁, nomeadamente o subtipo 5-HT_{1D}, uma vez que o sumatriptano é um agonista de receptores 5-HT_{1B/1D} (Perry e Markham, 1998). Mesmo que os receptores 5-HT_{1B} já não estejam todos funcionais nas condições experimentais nas quais os vasos sanguíneos centrais foram testados (aproximadamente com 24 horas *post-mortem*), como é sugerido pelos resultados na artéria uterina *ex vivo* 24 horas após o isolamento do órgão, não se observa nenhuma redução no efeito máximo do sumatriptano nas artérias basilar e cerebral média ao longo de três curvas concentração-resposta sucessivas do agonista.

Esta taquifilaxia observada na artéria periférica envolvendo, pelo menos, os receptores 5-HT_{1B}, sugere o envolvimento de mecanismos adicionais na contracção de vasos sanguíneos periféricos induzida pelos triptanos. Por exemplo, Longmore e colaboradores (1997b), num estudo comparativo da actividade intrínseca do rizatriptano e do sumatriptano na artéria coronária humana, observaram um fenómeno que classificaram como dessensibilização agonista. Outros resultados inesperados em vasos sanguíneos periféricos foram observados por outros investigadores: van den Broek e colaboradores (2002) verificaram que, inesperadamente, o SB 224289 se comportava como um fraco antagonista na artéria coronária humana onde os receptores 5-HT_{1B} têm uma grande expressão nas células

musculares lisas; Guk e Yildiz (2002) verificaram que as contracções induzidas pelo sumatriptano na artéria mesentérica humana variavam grandemente e dependiam de um estado de pré-contracção dos segmentos arteriais utilizados, sugerindo que a isquémia induzida pelo sumatriptano na vasculatura mesentérica humana depende da presença de factores de risco contrácteis.

Assim, à semelhança destes mecanismos adicionais, também a taquifilaxia por nós observada na artéria uterina humana na sequência de curvas sucessivas concentração-resposta de sumatriptano, poderá condicionar a resposta contráctil de vasos sanguíneos periféricos aos triptanos, independentemente da contracção induzida por estes fármacos ser mediada por receptores do subtipo 5-HT_{1B} ou do subtipo 5-HT_{1D}. O estudo destes mecanismos adicionais parece-nos determinante para a compreensão da acção vasoconstritora dos triptanos, tanto a nível periférico como central, tanto mais que os estudos imunohistoquímicos com anticorpos anti-NSE evidenciaram que, nas três artérias musculares estudadas, as células musculares lisas da túnica média apresentaram uma coloração castanha sugestiva da presença da actividade neuroendócrina.

Conclui-se que, uma vez que o subtipo de receptores envolvido na contracção de vasos sanguíneos periféricos tem sido classificado como 5-HT_{1B}, a taquifilaxia observada na artéria uterina humana, associada a este subtipo de receptores, pode contribuir para a segurança cardiovascular dos triptanos.

Tabela II

Afinidade dos triptanos para receptores da 5-HT (valores de pK_i). Todos os valores referem-se a receptores humanos, excepto quando assinalada outra espécie animal. (Adaptado de Tfelt-Hansen et al., 2000)

Receptor	Triptano		
	Sumatriptano	Zolmitriptano	Naratriptano
5-HT _{1A}	6,4 ¹	6,5 ³	7,6 ²
	6,9 ²		7,1(rato) ⁴
5-HT _{1B}	7,8 ¹	8,3 ³	7,1 ⁵
			8,7 ⁴
5-HT _{1D}	8,5 ¹	9,2 ³	8,1 ⁵
			8,3 ⁴
5-ht _{1E}	5,8 ¹	7,7 ⁵	8,4 ⁵
5-ht _{1F}	7,9 ¹	7,2 ³	7,7 ⁵
	7,9 ⁵	7,5 ⁵	8,2 ⁵
5-HT _{2A}	<5,0(pCE ₅₀) ¹	<5,5 ⁵	<5,5 ⁵
5-HT _{2B}	6,9 ^b	7,2 ^b	
5-HT _{2C}	<5,0(pCE ₅₀ , porco) ¹	F4,1(cobaio) ³	<5,5 ⁵
5-HT ₃ (ratinho)	<5,0(pCE ₅₀) ¹	<5,5 ⁵	<5,5 ⁵
5-HT ₄ (cobaio)	<5,0(pCE ₅₀) ¹	<5,5 ⁵	<5,5 ⁵
5-ht _{5A}	5,5 ^a ; <5,5(rato) ⁵	6,4(rato) ^b	5,5(rato) ⁵
5-ht ₆	<5,5 ⁵	<5,5 ⁵	<5,5
5-HT ₇	5,9 ⁵	7,0 ⁵	<5,5 ⁵

a Pauwels PJ, comunicação pessoal; b Gupta P, comunicação pessoal; ¹ Leysen et al., 1996; ² Newman-Tancredi et al., 1997; ³ Martin et al., 1997; ⁴ Connor et al., 1997; ⁵ Napier et al., 1999

A extrapolação para a artéria cerebral média da perda de funcionalidade de receptores do subtipo 5-HT_{1B}, observada na artéria uterina em condições experimentais que mimetizam as condições *post-mortem*, pode ajudar a explicar a contradição entre os resultados dos estudos funcionais e os dos estudos moleculares e imunohistoquímicos

naquela artéria craniana. Com efeito as experiências na artéria cerebral média tiveram que ocorrer num prazo de 24 horas *post-mortem* por termos verificado experimentalmente, em estudos preliminares, a perda de reactividade vascular deste vaso sanguíneo à 5-HT após este período de tempo. Assim, enquanto nos estudos moleculares foram detectadas as proteínas dos receptores dos subtipos 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, e nos estudos imunohistoquímicos houve marcação de ambos os subtipos de receptores em células musculares lisas, os estudos farmacológicos *in vitro* não sugerem de todo a sua presença.

A eventual perda de funcionalidade de receptores coloca algumas questões pertinentes relativamente à origem do material biológico utilizado neste estudo farmacológico. No entanto, segundo Toda e colaboradores (1985), as respostas contrácteis em artérias cerebrais humanas obtidas em autópsia mantêm-se por 24 horas, e os nossos resultados demonstraram igualmente que é possível recorrer-se a material biológico humano *post-mortem* para estudar as respostas contrácteis a fármacos serotoninérgicos, pois não se verificaram alterações estatisticamente significativas na potência da 5-HT (pCE₅₀), mas sim uma acentuada redução da sua actividade intrínseca (Emáx).

É ainda de referir que quanto à localização celular dos subtipos de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, e à excepção da presença do subtipo de receptores 5-HT_{1D} nas células musculares lisas dos três vasos sanguíneos estudados, os nossos estudos imunohistoquímicos estão de acordo com o que tem sido descrito na literatura quanto à distribuição preferencialmente pré-sináptica do subtipo 5-HT_{1D} (Bouchelet et al., 1996; Longmore et al., 1997a), e pós-sináptica do subtipo 5-HT_{1B} (Hamel et al., 1993; Bouchelet et al., 1996; Longmore et al., 1997a). De facto o anticorpo marcador dos receptores 5-HT_{1D} revelou imunoreactividade nas terminações nervosas localizadas junto à adventícia da parede dos três vasos sanguíneos estudados. A imunoreactividade revelada pelo anticorpo anti-receptor 5-HT_{1B} em terminações nervosas, apenas foi detectada na adventícia da

artéria uterina, mas não nas artérias basilar e cerebral média. Nos três vasos sanguíneos a imunopositividade ao receptor 5-HT_{1B} foi detectada nas células musculares lisas da túnica média.

Em conclusão, para além da cranioselectividade dos triptanos, os resultados obtidos sugerem que nas artérias cerebral média e basilar (artérias centrais) o receptor serotoninérgico predominante é dos subtipos 5-HT_{1B/1D}, enquanto que na artéria uterina (artéria periférica) é do tipo 5-HT₂, para o qual os triptanos não aparentam ter afinidade.

Acresce ainda que, o facto de se ter verificado na artéria uterina um fenómeno de taquifilaxia ao efeito contráctil induzido pelos triptanos mediado pelos receptores 5-HT_{1B/1D}, mas não nas artérias basilar e cerebral média, constitui um factor adicional de segurança, no que diz respeito aos efeitos adversos cardiovasculares descritos para este grupo de fármacos, resultantes da vasoconstrição concomitante que induzem, e que é, a nível cerebral, fundamental para a sua eficácia clínica na enxaqueca, como apontam as mais recentes evidências clínicas.