

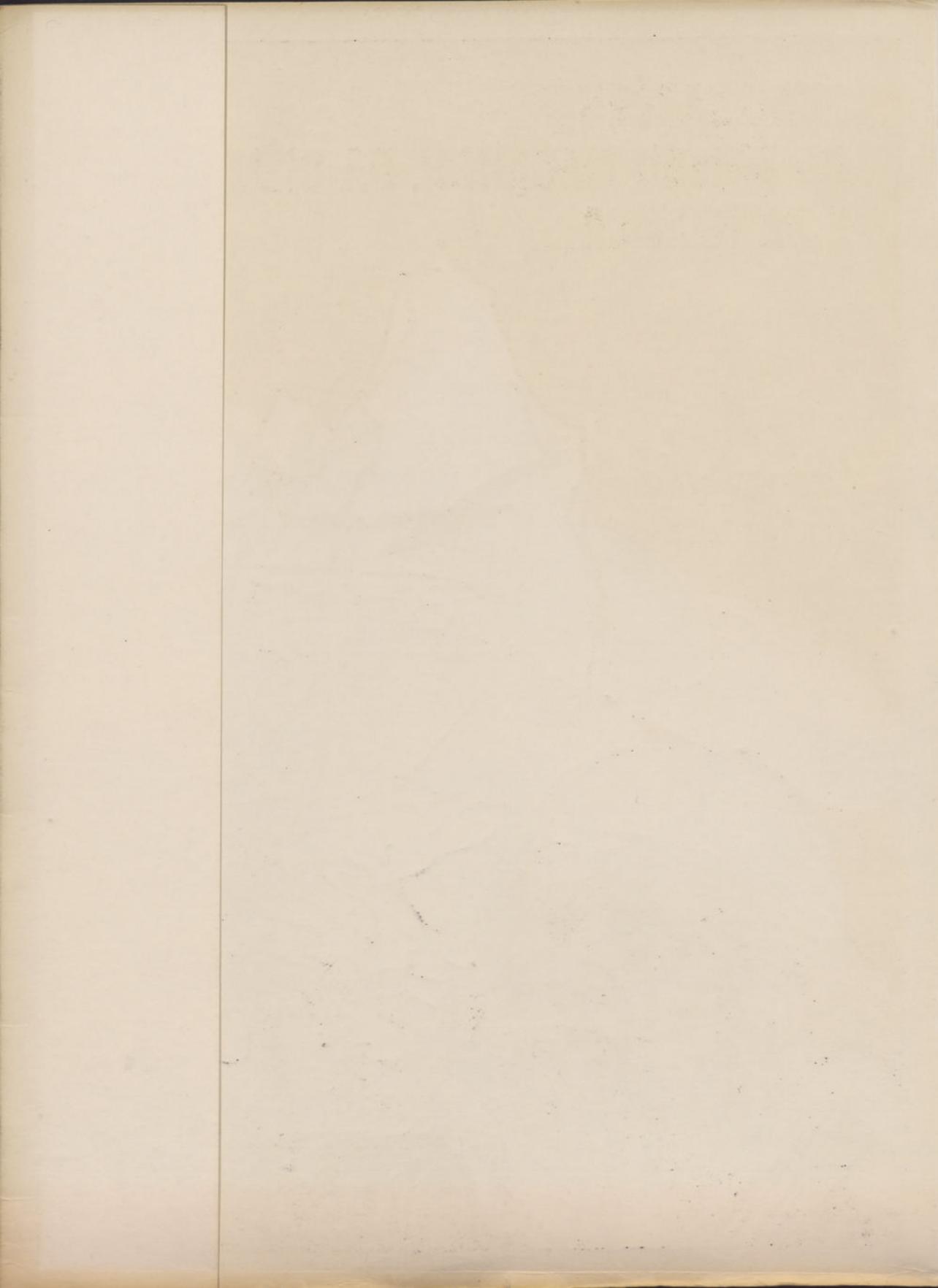
**PUBLICAÇÕES
DO MUSÉU NACIONAL DA CIÊNCIA
E DA TÉCNICA**

*Leonardo
da Vinci*



COIMBRA - 1978

LUIS BONET



PUBLICAÇÕES

PUBLICAÇÕES

DO
MUSEU NACIONAL
DA CIÊNCIA
E DA TÉCNICA



MUSEU
NACIONAL
DA
CIÊNCIA
E DA
TÉCNICA

Director:

Dr. Pedro Mendes de Abreu

Chefe da redacção:

Cruz Diniz

Capa de

Luiz Bonet

Sigla de

Mário Amaral

Redacção e

Administração:

Palacete

Sacadura Bote

R. dos Coutinhos, 23

COIMBRA

Telef. 2 49 22

**MUSEU
NACIONAL
DA
CIÊNCIA
E DA
TÉCNICA**



SUBSIDIOS PARA A HISTÓRIA DA CIÊNCIA
E DA TÉCNICA PORTUGUESAS

PUBLICAÇÕES

DO
MUSEU NACIONAL
DA CIÊNCIA
E DA TÉCNICA



NÚMERO 8

COIMBRA—MCMLXXVIII

Revista de História e Geografia de Coimbra
Volume 10, Número 8, 1978

Editor
Diretor
Conselho Editorial
Editorial Board
Editorial Staff
Editorial Office
Editorial Board
Editorial Staff
Editorial Office

PUBLICAÇÕES

MUSEU NACIONAL DA CIÊNCIA E DA TÉCNICA



Associação
Instituto
Fundação
Comissão

Número
8

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO NEUROQUÍMICO DO EFEITO DOS NEUROLÉPTICOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

ESTUDO EXPERIMENTAL

PRÓLOGO

O trabalho que apresentamos resulta de observações feitas entre 1969 e 1971 sobre o efeito de medicamentos psicotrópicos nas fracções subcelulares do cérebro do rato. Estas experiências foram iniciadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob a orientação do respectivo director Prof. Doutor Carvalho Guerra e do Professor de Farmacologia da Washington University School of Medicine de St. Louis, Pof. Doutor Robert Main Burton. As experiências foram repetidas no Laboratório de Farmacologia da Washington University Medical School e continuadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia do Porto até 1973.

Propomo-nos apresentar argumentos favoráveis à tese de que os medicamentos com acção neuroléptica actuam no sistema nervoso central interferindo com a capacidade de fixação dos intermediários químicos nas vesículas sinápticas das terminações nervosas dos neurónios centrais.

Organizamos a apresentação do nosso trabalho revendo sumariamente os conceitos que antecedem e servem de base à nossa formulação. Assim, propomo-nos examinar rapidamente o que são neurolépticos, o seu efeito clínico sobre as manifestações da esquizofrenia e o seu poder de induzirem síndromas extrapiramidais nos doentes a quem são administrados.

Apresentamos depois um resumo dos conhecimentos acerca da sua distribuição no organismo, acções biológicas e propriedades bioquímicas que mais facilmente pudessem explicar os seus efeitos. Estes aspectos levaram-nos a estudar o efeito dos neurolépticos sobre as membranas biológicas e a sua interacção com os intermediários químicos. Fixámo-nos especialmente neste último ponto. Escolhemos como alvo principal da nossa atenção a região sináptica. Isto levou-nos a rever os fundamentos da sinaptologia, especialmente naquilo que diz respeito à noção de «transmissão química do influxo nervoso» e ao papel das vesículas sinápticas neste processo. Verificámos os fundamentos dessa noção no caso da junção neuromuscular onde ela se originou, e as dificuldades da sua aplicação às sinapses centrais. Referimo-nos depois

aos métodos de estudo das sinapses centrais, especialmente ao método da ultracentrifugação diferencial e aos estudos com microeléctrodos. Desenvolvemos um pouco a descrição dos métodos de ultracentrifugação, dada a sua importância e apresentamos algumas das suas limitações. Finalmente apresentamos as nossas próprias experiências e conclusões que constituem, em nosso entender, um argumento favorável à hipótese de existir um componente pré-sináptico, incidindo sobre as vesículas sinápticas, no mecanismo de acção dos neurolépticos.

Os trabalhos anteriores que foram revistos e que são mencionados constituem uma revisão bibliográfica que se não pretende exaustiva ou razoavelmente completa.

Constituem apenas os marcos do caminho que um clínico teve de percorrer até ser capaz de formular hipóteses e de planificar um trabalho em um campo que lhe não era familiar anteriormente.

A bibliografia citada corresponde apenas aos trabalhos que foram utilizados na construção do texto. As dificuldades encontradas neste aspecto foram muitas, e algumas citações feitas referem-se não ao tema principal do trabalho citado mas a algum aspecto secundário mencionado pelo respectivo autor mas considerado importante para os nossos próprios fins.

* * *

Este trabalho não teria sido possível, em primeiro lugar, sem o interesse demonstrado inequivocamente pelo Professor Doutor Nunes Vicente e a sua constante insistência em que levasse este trabalho até ao fim. Aliás todo ele foi comentado e discutido pelo Professor Doutor Nunes Vicente à medida que os resultados iam sendo conhecidos.

O mesmo se deve dizer dos Professores Carvalho Guerra e Robert Burton. O primeiro, facultando-me a frequência do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia do Porto, mobilizando em meu favor muito dos recursos humanos e materiais aí existentes e executando ele próprio alguns dos passos das experiências; o segundo, criticando a par e passo os resultados que iam sendo obtidos, sugerindo vias alternantes, compartilhando todo o seu saber «de experiência feito», no sentido literal do termo e tendo um papel importantíssimo no aproveitamento da minha preparação essencialmente clínica na fomentação de hipóteses de trabalho de índole bioquímica.

Sem a presença de umas pessoas assim é muito fácil um candidato a investigador perder-se em becos sem saída ou repetir erros anterior-

mente praticados por outros e perfeitamente evitáveis. Pude constatar que em Bioquímica, como na Clínica, existe um conjunto de conhecimentos e de «praxis» que não vêm compendiados, não são facilmente formuláveis, e só se comunicam pelo trabalho participado.

Também ao Dr. Roberto Salema, da Faculdade de Ciências do Porto, agradecemos a sua colaboração interessada na obtenção das imagens de microscopia electrónica.

Finalmente às técnicas do Laboratório de Bioquímica que activamente colaboraram não só no trabalho de rotina mas no resolver de muitas dificuldades que foram surgindo, os meus agradecimentos.

Tantas pessoas colaboraram nestas experiências que me não é possível numerar todos. Mas não posso deixar de mencionar aquelas que mais longamente comigo trabalharam: a Dr.^a Isabel Maria Marques da Cruz, D. Maria Isabel Brandão e D. Maria Luísa Tavares.

A execução dos primeiros cálculos matemáticos foi feita no Laboratório de Física da Universidade de Coimbra onde, graças à boa vontade do Prof. Doutor Alte da Veiga pude utilizar o computador Hewlett-Packard aí existente devendo-se o trabalho de programação à Dr.^a Ana Maria Matos Beja. Mais tarde estes cálculos foram repetidos no centro de Cálculo Científico da Universidade de Coimbra.

À Faculdade de Farmácia do Porto e ao seu Director nessa época, Dr. Vale Serrano, desejo agradecer o acolhimento dispensado.

Também à Fundação Calouste Gulbenkian e ao Instituto para a Alta Cultura apresento os meus agradecimentos pelo auxílio económico prestado.

Finalmente desejaria agradecer à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, onde me licenciiei, e a todos os seus professores, especialmente àqueles que mais fortemente impressionaram o meu espírito e me despertaram a curiosidade e o gosto pelos assuntos neurológicos e psiquiátricos — e lembro com respeito dois nomes: o Prof. Doutor Oliveira e Silva, já retirado das lides docentes, e o Prof. Doutor Correia de Oliveira já falecido.

Termino este prólogo com uma muito livre tradução de uma frase de Hipócrates:

«Para esta arte tão difícil de aprender, a vida é demasiadamente curta».

CAPÍTULO I

NEUROLÉPTICOS. EFEITO CLÍNICO

A família de medicamentos hoje conhecida sob a designação de «Neurolépticos», começou a chamar a atenção do mundo científico em 1946 quando Halpern e Ducrot descreveram os efeitos anti-histamínicos do composto 10-(2 dimetil-amino-etil) fenotiazina, ou diethazina. Este composto mostrou-se eficaz contra alguns dos sintomas da doença de Parkinson.

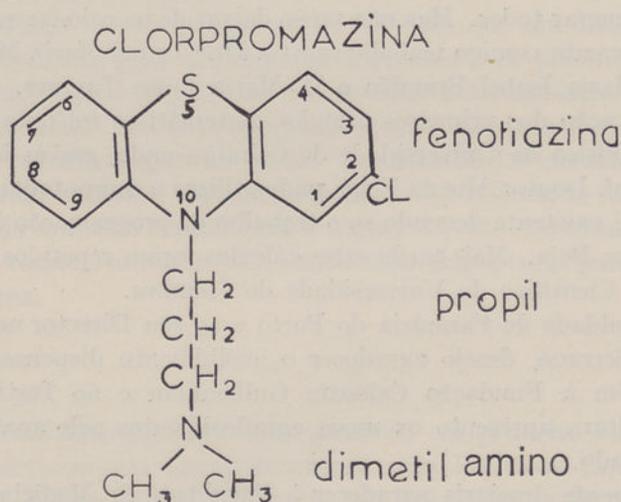


Fig. 1

Um anti-histamínico mais potente foi sintetizado pouco depois: 10-(2 dimetil-amino-propil) fenotiazina, ou prometazina. Notou-se um efeito sedativo com esta última droga. Em 1950 Charpentier sintetizou uma substância destinada a um futuro talvez ímpar na história da medicina: 10-(3 dimetilaminopropil)-2-cloro-fenotiazina, abreviado para clorpromazina (CPZ nas investigações bioquímicas), e catalogada pelo Public Health Service dos Estados Unidos sob 57 nomes diferentes.

Uma primeira revisão de actividade biológica desta substância foi publicado em 1953 por Simone Courvoisier (2) e este trabalho constitui referência obrigatória em todas as revisões subsequentes que encontramos. Aí se refere o uso feito por Laborit desde 1950 com as drogas prometazina e diethazina como potenciadores dos anestésicos gerais, e se

descreve como, deliberadamente, se procuraram sintetizar substâncias com uma actividade sobre o sistema nervoso central cada vez mais pronunciada. A droga mais activa deste ponto de vista ensaiada por Courvoisier *et. al.* foi a clorpromazina. As propriedades farmacológicas notadas pela autora eram as seguintes:

- 1 — Acção ganglioplégica sobre a excitabilidade do vago, com diminuição dos efeitos tensionais da acetilcolina, e dos efeitos secundários à hipersecreção clorídrica;
- 2 — Acção simpaticolítica: — a CPZ inverte a acção da adrenalina sobre a tensão arterial e diminui a acção da noradrenalina;
- 3 — Ligeira acção espasmolítica;
- 4 — Efeito hipotensor, quando aplicada por via endovenosa; efeito antiedematoso;
- 5 — Depressão respiratória com doses elevadas;
- 6 — Fraca acção anti-histamínica;
- 7 — Potencialização dos efeitos dos anestésicos gerais, dos hipnóticos e do efeito curarizante da gallamina. A CPZ potencia os efeitos do álcool e suprime a exaltação psicomotora na intoxicação etílica; contraria a acção convulsivante da nicotina e da coramina, mas não da estriçnina. Apresenta uma acção antitérmica superior à amidopirina e suprime a termorregulação. A acção antiemética é também descrita, bem como a interferência com a conservação de reflexos condicionados pavlovianos. A autora faz a interessante observação de que o rato treinado para trepar ao longo de uma corda ao ouvir o som de uma campainha, conservava a força muscular e a resistência normal à fadiga, mas desorienta-se ao desempenhar a sua tarefa;
- 8 — A CPZ apresentava também forte acção anestésica local, quer em aplicação tópica ao longo do ciático na cobaia quer quando administrada por via geral parentérica no coelho. Nota-se neste caso um reforço da acção anestésica local da procaína sobre a córnea do coelho. Finalmente, faz-se referência ao papel «protector» da clorpromazina em relação ao choque hemorrágico no cão e ao choque traumático no rato.

Em 1952 Laborit descreve o emprego da CPZ no seu «cocktail lítico». Lembremos a noção então corrente de que esta substância interrompia as conexões nervosas, tornando o organismo menos susceptível de reagir

exageradamente a várias tipos de «stress», induzindo um estado semelhante à hibernação. Pela mesma época Delay chamava a atenção para as melhorias observadas em certos doentes psiquiátricos que recebiam este medicamento. O efeito verificado era uma sedação qualitativamente diferente da sedação pelos barbitúricos, notando-se um processo normalizador sob a agitação, diferenciável do efeito hipnótico.

Cole e Davis na sua revisão recente sobre os efeitos da clorpromazina e similares confirmam e procuram quantificar esta impressão clínica (3).

Estes autores fizeram a revisão de vários trabalhos que procuravam definir a eficácia clínica das fenotiazinas no tratamento da esquizofrenia.

Os autores incluem apenas os trabalhos que obedecem às seguintes exigências: população numerosa ($N > 60$), distribuição aleatória dos tratamentos, controlo duplamente cego, avaliação qualitativa e quantitativamente da evolução dos doentes, dose adequada, tratamento prolongado (4 semanas a 6 meses), a análise estatística dos resultados.

A conclusão é de que os neurolépticos (o mais estudado foi a CPZ) são todos eles mais eficazes que um placebo (incluindo placebo activo, contendo escopolamina e anti-histamínicos) no tratamento da esquizofrenia, tanto nos surtos agudos como nas fases menos activas da doença.

Destes estudos porém não parece que haja diferenças muito acentuadas entre a CPZ e outros neurolépticos ensaiados, com excepção de promazina que é sensivelmente menos eficaz. Os outros neurolépticos mencionados são a trifluperazina, tioridazina, proclorperazina, perfenazina, triflupromazina, flufenazina.

Outro aspecto importante destes estudos é a observação de que a melhoria clínica não atinge o máximo senão ao fim de 26 semanas de tratamento contínuo, embora os resultados mais espectaculares se vejam ao fim das primeiras 3-4 semanas.

Em que consistem as melhoras do doente esquizofrénico?

O efeito terapêutico das fenotiazinas difere da simples sedação, como se torna claro em alguns dos estudos revistos em que estes medicamentos são comparados com os barbitúricos.

Nos trabalhos revistos por Cole e Davis nota-se que vários autores, em trabalhos independentes, verificaram uma melhoria notável em sintomas fundamentais da classificação de Bleuler — desorganização do curso do pensamento, indiferença afectiva, comportamento autístico.

Os sintomas secundários como alucinações, ideias paranóides, hostilidade, negativismo, melhoram também consideravelmente.

Os autores fazem a interessante observação de que os sintomas secundários melhoravam só com hospitalização e placebo durante 6 semanas, devendo avaliar-se a acção das fenotiazinas em relação a

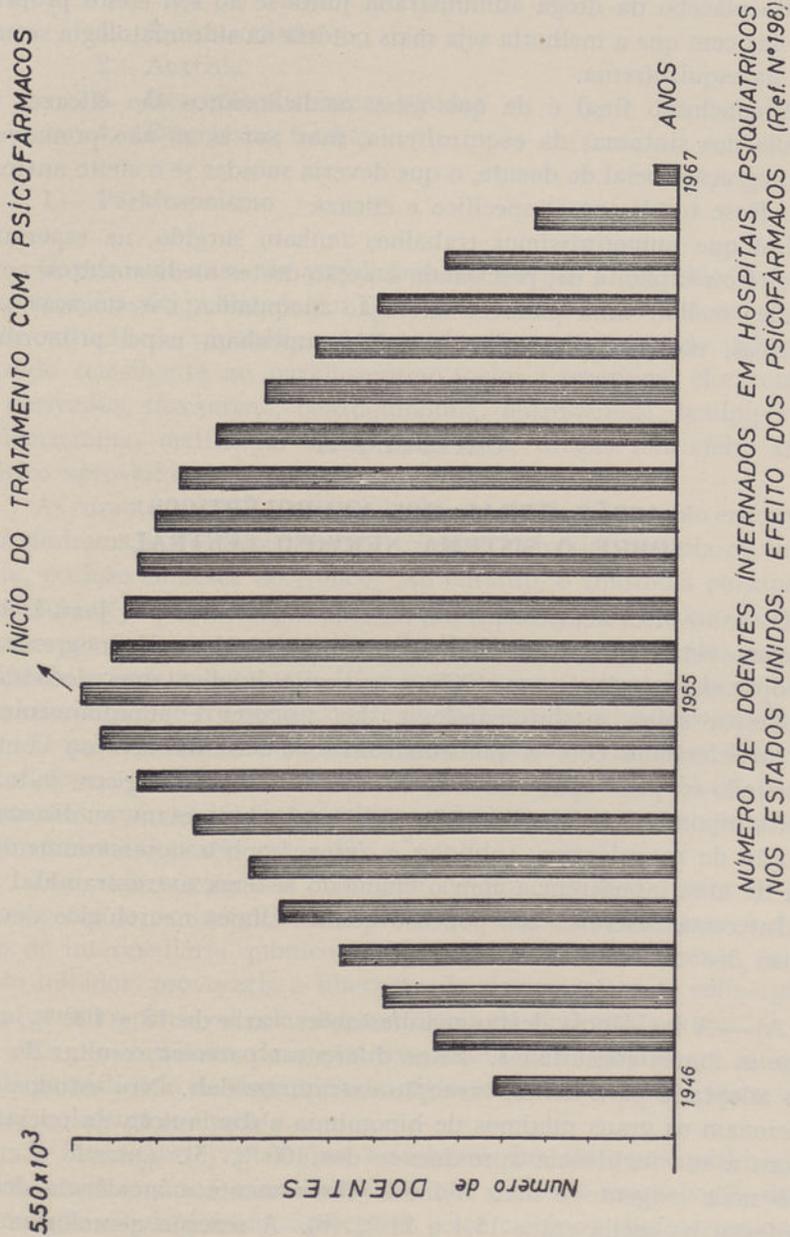


Fig. 2

este efeito. Mesmo assim, o efeito terapêutico das fenotiazinas é estatisticamente significativo em vários estudos.

Quando um doente é internado e tratado com estes medicamentos o efeito placebo da droga administrada junta-se ao seu efeito próprio, o que faz com que a melhoria seja mais notória na sintomatologia secundária da esquizofrenia.

A conclusão final é de que estes medicamentos são eficazes no controlo dos sintomas da esquizofrenia, mas por si só não promovem a reintegração social do doente, o que deveria suceder se o efeito antipsicótico fosse totalmente «específico e eficaz».

Dáí que numerosíssimos trabalhos tenham surgido, na esperança implícita ou explícita de, precisando a acção destes medicamentos, compreender melhor uma possível alteração bioquímica nas doenças psiquiátricas, no tratamento das quais desempenham papel primordial.

CAPÍTULO II

ACÇÃO GERAL DOS NEUROLÉPTICOS SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O termo «neuroléptico» parece ter sido introduzido por Jean Delay. Tal como está expresso na comunicação inaugural do V Congresso de Neuropsicofarmacologia em 1966, o conceito implica uma actividade terapêutica sobre a sintomatologia das psicoses e simultaneamente uma interferência com o funcionamento do sistema nervoso central traduzindo-se pelo aparecimento de síndromas neurológicos, indo da simples hipomímia a manifestações do tipo parkinsoniano ou distónico. A noção de neuroléptico, sublinha o autor, implica necessariamente a ideia de uma interferência com o chamado sistema extrapiramidal (4).

Interessa descrever um pouco o quadro clínico neurológico devido ao uso dos neurolépticos.

A) — A incidência destas manifestações varia de 15 a 100 %, conforme as fontes consultadas. Estas diferenças parecem resultar do critério adoptado para definir «reação extrapiramidal». Nos estudos que mencionam os graus mínimos de hipomímia e diminuição da iniciativa motora a sua incidência aproxima-se dos 100 % (5). Quando o critério é mais exigente e mais definido clinicamente a incidência destas manifestações oscila entre 15,4 e 21 % (6). A reacção neurológica dos

neurolépticos pode tomar aspectos muito diferentes. Duvoisin (5) classifica-a em 4 grupos com a nota de que as formas de transição são frequentes:

1. Parkinsonismo
2. Acatísia
3. Reacções distónicas agudas
4. Discinésias tardias

1 — Parkinsonismo

O primeiro caso de parkinsonismo devido à ingestão de drogas psicótropicas foi publicado por Debs na Índia em 1946. O doente tomava um extracto de rauwolfia. A lista de drogas capazes de induzir um estado semelhante ao parkinsonismo inclui a reserpina, clorpromazina e derivados, tioxanteno, benzoquinolina, butirofenona, fenilpiperazina, dibenzamina, metildopa. Nem todas estas drogas têm efeito antipsicótico aproveitável clinicamente.

As características principais da doença de Parkinson são encontradas no síndrome iatrogénico: tremor, rigidez, acinésia, amimia ou hipomimia, posição simiesca do tronco. No entanto, o síndrome parkinsoniano dos neurolépticos é mais variável que a doença de Parkinson, aparecendo por vezes tremor intencional. Estão em curso estudos tendentes a estabelecer semelhanças e diferenças entre a fisiopatologia do tremor parkinsoniano e do tremor existente no síndrome parkinsoniano iatrogénico.

O parkinsonismo devido aos neurolépticos é também susceptível de melhoria pelos medicamentos atropínicos e pela L-DOPA (7); os medicamentos com efeito colinérgico tendem a piorar a sintomatologia extrapiramidal nestes casos (5).

Tem sido sugerida a existência de um equilíbrio entre as fibras estriopetas dopaminérgicas e as fibras estriofugas colinérgicas. A depleção do intermediário químico (dopamina) no sistema aferente, considerado inibidor, provocaria a liberação do sistema eferente colinérgico, o qual seria responsável pela sintomatologia do síndrome parkinsoniano (8).

As possibilidades de acção terapêutica consistiriam em aumentar a disponibilidade de dopamina no sistema aferente ou em inibir o sistema colinérgico eferente.

É interessante notar que a inibição dos sintomas parkinsonianos pelos medicamentos anticolinérgicos não provoca exarcebção da sintomatologia esquizofrénica, apreciável pelos critérios clínicos usuais.

2 — Acatísia

É um síndrome de inquietação, que se manifesta pela necessidade imperiosa experimentada pelo doente de executar movimentos. O termo refere-se especialmente à impossibilidade de permanecer sentado, ou de pé, e imóvel. Estes doentes levantam-se, sentam-se, caminham, comunicando ao observador uma impressão de ansiedade.

O termo parece ter sido introduzido na literatura médica por Has-kowec, neurologista checo do princípio deste século.

A acatísia era considerada então como um sintoma histérico, e descrita no contexto da Neurastenia e Histeria (10).

O síndrome aparece na doença de Parkinson e no parkinsonismo iatrogénico. É considerada como uma reacção contra a imobilidade imposta pelas diminuídas possibilidades de expressão motora.

No entanto a impressão clínica é de que a acatísia devida a neuro-lépticos pode aparecer dominando por completo o quadro clínico, sendo a sintomatologia parkinsónica relativamente discreta (5).

3 — Reacções distónicas agudas

Estas reacções tomam o aspecto de torticolis, tortipelvis, abertura forçada da boca, contracção de grupos musculares isolados (especialmente músculos abdominais). Por vezes tomam o aspecto de uma distonia muscular deformante. Estas manifestações são em geral passageiras mas alarmantes, provocando por vezes dificuldades respiratórias, devida à discinésia dos músculos respiratórios. Apareceram com mais frequência após a introdução das fenotiazinas piperazínicas, do tipo da proclorpromazina e perfenazina.

Os antiparkinsónicos anticolinérgicos de síntese corrigem esta sintomatologia.

4 — Discinésias tardias

As situações clínicas acima mencionadas caracterizam-se principalmente pela sua reversibilidade. Suspendendo a droga, diminuindo a dose a sintomatologia desaparece. No entanto desde o advento do uso dos neurolépticos se manifestou o receio de que estas alterações não fossem sempre reversíveis. Entre nós Correia de Oliveira expressou por mais de uma vez essa opinião e em França, desde 1959, Sigwald vinha

estudando certos casos de discinésia oro-linguo-facial que se mantinha meses e anos após tratamento pela clorpromazina (12). O síndrome descrito por Sigwald consiste em uma protusão involuntária da língua acompanhada de movimentos faciais e das extremidades semelhantes aos das coreias. O início é insidioso, e a sintomatologia tende a agravar-se quando se diminui a dose ou suspende o neuroléptico. Considerava-se que o efeito anticolinérgico destes medicamentos tende a diminuir a expressividade clínica da alteração neural por eles provocada.

O síndrome é mais frequente nas pessoas idosas e no sexo feminino. Não encontramos referências à persistência indefinida de outros síndromas extrapiramidais.

Como nota suplementar, mencionaremos outros efeitos neurotóxicos, menos sistematicamente observados: — indução de actividade convulsiva em certos epiléticos, de alterações cerebelosa, de neuropatias periféricas.

B) — Expressão anatomopatológica do síndrome dos neurolépticos.

Os estudos anatomoclínicos destas situações pareceram-nos escassos, o que se explica pela sua benignidade. Os casos de Pourseines (1959) e de Grunthal (1962) aparecem mencionados repetidas vezes na literatura:

O primeiro (14) tratava-se de um síndrome depressivo tratado com clorpromazina em um doente do sexo feminino de 64 anos que veio a falecer com um acidente vascular cerebral. A doente apresentava clinicamente um síndrome parkinsonico. Encontravam-se lesões «atingindo electivamente os neurónios palidais e, em menor grau, as grandes células neuronais do putamen: alterações degenerativas, depósitos amilóides e lipopigmentares associados a uma hiperplasia reaccional glial, provavelmente responsáveis pelo quadro parkinsonico constatado clinicamente».

O caso de Grunthal (15) refere-se a um doente do sexo masculino com 21 anos de idade e diagnóstico de esquizofrenia catatónica, tratado com trilafon (perphenazina).

O doente apresentou uma reacção distónica oro-cervical, com morte em hipertermia atribuída a pneumonia intercorrente.

Encontrou-se uma atrofia primária muito intensa ao nível das olivas inferiores.

Roizin (1961) (16) descreve 14 casos originais de doentes tratados com clorpromazina e com reserpina. As alterações histopatológicas consistiam em cromatólise em várias regiões corticais, núcleos cinzentos de base, tálamo, hipotálamo e cerebello. Roizin fornece o diagnóstico

e causas de morte em 10 casos destes. O grupo é muito heterogéneo: 6 esquizofrénicos, 1 oligofrénico com epilepsia, 1 caso de psicose maníaco-depressiva, 1 caso de doença de Parkinson e 1 caso de coreia de Huntington.

Refere-se a dados de três outras autópsias descritas na literatura e conclui não se poderem estabelecer correlações anatomoclínicas visto o número de casos ser reduzido e aparecerem associados a processos patológicos que poderiam mascarar ou intensificar as alterações histológicas devidas aos neurolépticos usados. As causas de morte eram também variadas e inexpressivas: «colapso cardiovascular, pneumonia, edema pulmonar, enfisema, hiperpirexia, pancreatite aguda».

Em uma discussão recente (17), Camermeyer referindo-se ao efeito da clorpromazina e reserpina diz que muitos dos efeitos descritos anatomopatologicamente são inespecíficos ou devidos a artefactos induzidos pelos métodos de conservação das peças.

Descreve no entanto uma lesão que considera «inquestionável e característica» — a hipertrofia generalizada dos astrócitos após tratamento prolongado com clorpromazina, tanto no homem como no macaco rhesus.

Os efeitos histopatológicos dos neurolépticos têm sido também estudados do ponto de vista experimental em animais.

Roizin (16) descreve as alterações encontradas no rato após doses de clorpromazina variando de 10 a 50 mgrs por kilo de peso, com períodos de tratamento de 24 horas a 3 meses.

As alterações histológicas centrais descritas incluem: «reação glial», neuronofagia ocasional, cromatólise, observadas em todo o sistema nervoso central, com referência especial ao córtex cerebral, núcleo lenticular, e hipotálamo.

O mesmo autor (18) descreve alterações reversíveis nas mitocôndrias «in situ» do cérebro no rato e no macaco após tratamento pela proclorperazina na dose de 50 mgrs por quilo (compazina, S. K. F.). Estas alterações consistem em uma acentuação das propriedades osmíofílicas das membranas limitantes da mitocôndria, do arranjo morfológico das cristas mitocondriais e da osmiofilia da matriz. Observa-se densificação da matriz e as cristas mitocondriais são dificilmente reconhecíveis. Algumas mitocôndrias apresentam-se tumefactas. Estes fenómenos são reversíveis, diminuindo de intensidade gradualmente 24 e 48 horas após cessação do tratamento. Estas alterações são também observáveis em mitocôndrias isoladas por ultracentrifugação.

Cazzulo (19) utilizando técnicas histológicas clássicas (hematoxilina-

-eosina, Nissl, Una-Pappenhein, Feulgen) conduziu uma importante série de estudos histológicos incidindo sobre vários neurolépticos e tranquilizantes. Em doses elevadas (1/2 a 1/50 da DL₅₀ durante um a dez dias) os neurolépticos ensaiados, no rato e no coelho, provocaram hiperchromia e disformismo do núcleo dos neurónios.

Estas lesões eram irreversíveis. Em doses mais baixas (até 25 mgrs por quilo para a clorpromazina) aparecem lesões semelhantes, porém reversíveis. Os neurolépticos ensaiados foram a CPZ, clorprotioxeno (Taractan), propericiazina (8909 RP — Neulactil), o haloperidol (butirofenona) e a reserpina.

Os efeitos da CPZ, clorprotioxeno e propericiazina eram mais evidentes no córtex e mesencéfalo. Os efeitos do haloperidol notavam-se ao nível do tálamo e mesencéfalo. Os da reserpina predominavam no diencéfalo.

Os efeitos dos derivados diazepínicos eram predominantemente corticais e incidiam, a nível celular, sobre o citoplasma, traduzindo-se por tumefacção das células neuronais que se apresentavam hipocrómicas. O núcleo conservava a sua aparência normal.

Em 1968 Delay (20) revendo as manifestações neurológicas dos medicamentos psicotrópicos, aproxima os quadros neurológicos dos neurolépticos, das manifestações de encefalite letárgica, e tenta por outro lado descrever um aspecto psicológico específico destes quadros.

O autor segue uma classificação um pouco diferente da que apresentamos: gradua os síndromas neurológicos desde o chamado síndrome vegetativo (hipotensão ortostática, sialoreia, disritmias cardíacas) até aos síndromas hiperkinéticos duradouros, passando pela acinesia sem hipertonia, hiperkinésia paroxística, acinesia com hipertonia (síndrome parkinsonóide). Ao síndrome neurológico «vegetativo» corresponde o síndrome mental «sonolência»; ao estado acinesico sem hipertonia corresponde o síndrome psíquico de indiferença, diminuição das reacções afectivas, astenia; o síndrome de hiperkinésia paroxística seria acompanhado de sugestibilidade exagerada, ansiedade, insónia; o síndrome parkinsonico acompanha-se de tendência depressiva; finalmente a hiperkinésia duradoira é acompanhada de insónia, inquietação negativismo.

O autor chama a atenção para a «actividade subcortical» desta substância e sugere o nexa entre os síndromas motores, as correlações psíquicas apontadas que lhe são concomitantes, e o efeito terapêutico, sobre as psicoses.

Os locais e modos de actuação das drogas capazes de provocarem «efeito neuroléptico» e «efeito terapêutico» deveriam estar estruturalmente próximas e ou serem funcionalmente semelhantes.

Com o avanço das investigações bioquímicas a atenção dos observadores voltou-se para o possível papel das catecolaminas nestes fenómenos.

CAPÍTULO III

DISTRIBUIÇÃO E ACÇÃO BIOLÓGICA

A multiplicidade de acções biológicas das fenotiazinas dificultou a interpretação da sua acção sobre o sistema nervoso central.

1 — a) A distribuição da clorpromazina nos tecidos foi estudada utilizando clorpromazina marcada pelo isótopo S^{35} .

Christensen e Wase (21) encontram uma concentração elevada de CPZ- S^{35} no cérebro 30 minutos após a injeção intraperitoneal no rato. A radioactividade mantém-se com valores elevados durante 48 horas. Notam também uma acumulação importante e precoce no pulmão e no rim.

A radioactividade pulmonar atinge o máximo ao fim de duas horas, declinando progressivamente para valores muito baixos ao fim de 48 horas.

A radioactividade renal é inicialmente alta, atinge um valor baixo duas horas após a injeção, depois aumenta progressivamente até às 24 horas, voltando a diminuir depois.

Este fenómeno prende-se com a excreção de metabólitos radioactivos pela urina. A presença de radioactividade cerebral coincide com o efeito sedativo sobre os animais.

Wase, Christensen e Polley estudam no rato (22) a distribuição de clorpromazina S^{35} em várias regiões do sistema nervoso central após injeções intraperitoneais diárias desta droga. Os animais foram sacrificados após 2, 3 e 4 dias de tratamento. A radioactividade atinge os maiores valores no hipotálamo, onde continua a aumentar ao 4.º dia de experiência. Os valores mais baixos correspondem ao córtex cerebral no 1.º e 2.º dia de tratamento, e ao cerebelo. Os autores notam também que a quase totalidade da CPZ injectada era recuperada associada aos lípidos cerebrais. Apenas 5 a 10% aparece ligada às proteínas, tendendo a aumentar esta percentagem nos animais tratados durante mais tempo. A incorporação de fósforo marcado (P^{32}) nos fosfolípidos cerebrais destes animais estava afectada, notando-se diminuição no córtex e ligeiro aumento na ponte, bolbo e mesencéfalo, fenómeno este de interpretação difícil.

Merkulov (23) no rato encontrou uma concentração de clorpromazina-S³⁵ na substância cinzenta dupla da existente na substância branca.

Outros autores não encontram diferenças significativas entre várias regiões do sistema nervoso central. Estudos electroencefalográficos sugerem uma acção na formação reticulada, diminuindo a excitabilidade do sistema activador ascendente e do sistema vasomotor descendente (23).

A auto-radiografia (24) por Tadro e Wahab mostrou uma maior deposição de droga na parte central do tronco cerebral, de um e outro da linha média, no gato. O hipotálamo e cerebelo mostraram menos actividade. O córtex cerebral mostrou-se muito activo nos primeiros 20 minutos, diminuindo depois. Estes autores estudam também estes fenómenos no macaco e no homem (em um doente agónico) com resultados semelhantes. Concluíram ser a CPZ uma droga que actua fundamentalmente na substância reticulada e no córtex cerebral, sugerindo uma acção selectiva sobre o córtex sensorial.

Cassano, Sjöstrand e Hausson chamam a atenção para a deposição electiva da CPZ nas formações do hipocampo no gato, onde a sua presença perdura vários dias. Notaram maior acumulação no córtex e nos corpos geniculados. Os autores chamam a atenção para a importância do sistema límbico, incluindo hipocampo, nas manifestações afectivas, e discutem o papel que a vascularização e as diferentes intensidades das trocas metabólicas em várias áreas do cérebro possam ter na determinação da deposição do isótopo. É evidente que a deposição de um composto em determinada estrutura não implica que esta seja funcionalmente relevante para o efeito farmacológico (25). Os mesmos autores (26) descrevem a acumulação de CPZ-S³⁵ no pulmão, fígado, intestinos e bexiga urinária fetais, quando a droga é administrada a ratas grávidas. Referem observações semelhantes no homem.

Em suma, os estudos empregando isótopos radioactivos embora não dando sempre resultados sobreponíveis, evocam a imagem de uma droga lipófila, acumulando-se em vários órgãos e tecidos, com certa afinidade para o cérebro. Neste predomina a sua localização na porção axial do tronco cerebral, tubérculos quadrigémios e sistema límbico, especialmente hipocampo.

Estudos electro-encefalográficos no homem e no animal são também interpretados como mostrando uma acção «subcortical» destas drogas.

b) Quando a CPZ-S³⁵ é administrada por via intraperitoneal a ratos encontram-se produtos radioactivos na urina e nas fezes.

Ao fim de 24 horas 80 % de dose administrada pode ser identi-

ficada nos excreta, em quantidades relativamente semelhantes na urina e nas fezes.

A radioactividade encontrada corresponde a CPZ livre e alguns derivados metabólicos: sulfóxido de clorpromazina, e as aminas primária e secundária do derivado sulfóxido (27).

Os estudos metabólicos no homem revelam a presença de mais de duas dezenas de produtos metabólicos (28) na urina sob forma livre ou conjugada, predominando nestes os derivados monoglucurono-conjugados.

Durante a sua permanência no organismo a CPZ e similares exibem um grande número de acções biológicas, de que os trabalhos de Courvoisier em 1953, já citados, nos deram uma primeira visão.

c) A recente revisão de Domino (1) completa as acções descritas por Courvoisier mencionando a facilitação de descargas epilépticas, alterações endócrinas, efeito antipruriginoso, efeito anti-serotonínico, bloqueio da captação das chamadas aminas biogénicas pelos tecidos, alterações pigmentares especialmente a nível da retina, fotossensibilização cutânea, depressão da leucopoise.

Os efeitos bioquímicos são numerosos: descreve-se a formação de complexos com a flavina dinucleotídeo, com o sulfato de condroitina, e com um gangliosídeo cerebral de localização cortical (Strandina).

No homem, o consumo de oxigénio pelo cérebro após a injeccção endovenosa de CPZ não sofre alteração. As diferenças arteriovenosas cerebrais em ácido pirúvico e cetoglutárico, sódio, potássio, cálcio e cloro não apresentam também desvios do normal. Pelo contrário, a utilização da glicose pelo cérebro melhora, paralelamente com a diminuição observada nos valores da resistência vascular.

Nota-se também diminuição do débito sanguíneo cerebral que se correlaciona com a queda de tensão arterial periférica.

A CPZ interfere com a fosforilação oxidativa, o que se relaciona com as observações de Roizin sobre a morfologia das mitocôndrias.

Conforme as concentrações utilizadas obtém-se um efeito inibidor traduzindo-se por uma diminuição de consumo de oxigénio pelos tecidos ou um efeito dissociativo sobre o acoplamento fosforilação-oxidação, traduzindo-se por uma inibição da síntese de compostos fosforados energéticos, sem que a fixação de oxigénio molecular pelos tecidos seja afectada no mesmo grau (31).

2 — M. SPIRITES *et. al.* (32) descrevem o efeito inibidor da CPZ sobre a entrada de água na mitocôndria previamente tratada pelo cianeto. Esta entrada de água na mitocôndria traduz-se por uma tumefac-

ção deste organelo (mensurável pela diminuição da densidade óptica de uma suspensão de mitocôndrias), e que se observa quando o cianeto bloqueia a acção da citocromo-oxidase na região terminal de cadeia de transporte de electrões. A tumefacção assim provocada é inibida pelo tratamento das preparações pela CPZ, o que os autores atribuem a uma acção directa sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial. No entanto a CPZ não impede a saída de água das mitocôndrias já tumefeitas.

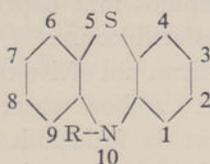
3 — Efeito sobre as adenosina-trifosfatases:

Estes enzimas, que provocam a cisão do composto energético adenosina trifosfato libertando adenosina-difosfato e fosfato inorgânico e a energia necessária para muitas reacções biológicas, são inibidas pelas fenotiazinas em graus diversos.

Existem vários tipos de adenosina-trifosfatase (ATP-ases) que se distinguem pela necessidade de metais específicos para atingirem a sua actividade máxima.

A ATP-ase dependente de NA^+ e K^+ localiza-se na superfície da membrana axonal e a sua actividade decompondo a adenosina trifosfato parece importante para a manutenção da distribuição assimétrica de iões de um e de outro lado da membrana (Katz 1966) fornecendo a energia necessária para a extrusão do NA^+ e acumulação intracelular de K^+ (29 e 30).

O efeito inibidor das fenotiazinas sobre este enzima foi extensivamente estudado (1) por Davis e Brody: quando no anel fenotiazínico:



se introduzem os grupos H, CL, CF_3 em posição 2 verifica-se um aumento progressivo da acção inibidora sobre a ATP-ases que vimos considerando. Este aumento de inibição enzimático é paralelo ao aumento de actividade central do tipo extrapiramidal.

A cadeia alquilpiperazina na posição 10 (por exemplo a cadeia $(\text{CH}_2)_3\text{—N}$  N—CH_2 característica da thioproperazina ou majeptil) é mais activa que a cadeia aminoalifática (ex. a cadeia $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ da CPZ).

A inibição do enzima catalizador manifestar-se-á por um decrés-

cimo da energia disponível para as acções biológicas mencionadas. Em especial, no nosso caso seria de esperar uma acção perturbadora sobre a manutenção do potencial transmembranoso do axónio e terminação nervosa, e sobre a propagação da corrente de acção. Não encontramos porém estudos que ligassem a inibição das ATP-ases a alteração do potencial de membrana quer no sentido da hiperpolarização quer no sentido da despolarização.

4 — Efeito sobre os fosfolípidos:

Os estudos de Wase atrás citados descreviam já o efeito da CPZ sobre a incorporação do fósforo marcado (P^{32}) nos fosfolípidos do cérebro.

Ansell (33) passa em revista os trabalhos dos seus antecessores: Ansell e Dohmen, Ansell e Marshall tinham demonstrado (1963) que a CPZ deprimia a transferência do P^{32} do ortofosfato para a fosfatidilcolina e fosfatidil etanolamina, «in vivo». Com as doses usadas (10 a 20 mgr por quilo de peso correspondendo a uma concentração cerebral de 10^{-5} molar) não se observava o efeito inibidor sobre a formação de ATP atrás mencionada, sendo portanto o efeito depressor sobre a incorporação de P^{32} nos precursores da fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina independente desse processo.

As experiências «in vitro» por Magee e outros deram resultados contraditórios: as concentrações elevadas de CPZ (10^{-3} molar) deprimiam a incorporação de P^{32} — ortofosfato em todos os fosfolípidos do cérebro. Concentrações mais baixas de CPZ (10^{-4} molar) estimulava a incorporação de P^{32} em vários fosfolípidos mas deprimia ainda a incorporação de P^{32} — ortofosfato na fosfatidilcolina.

Em resumo, não se verificou um efeito constante e unívoco de CPZ sobre os fosfolípidos cerebrais, embora pareça haver uma interferência mais específica com a síntese da fosfatidilcolina.

Neste contexto devem lembrar-se as interessantes experiências de Guttman e Friedmann descritas por Ansell: estes autores observaram que a CPZ em concentração de 10^{-4} M. immobilizava o protozoário «*Tetrahymena pyriformis*». O efeito immobilizador é paralelo à intensidade da acção sobre o sistema nervoso central no homem, quando se comparam vários derivados fenotiazínicos. Após algum tempo de actuação a membrana celular do protozoário rompe-se. Adicionando fosfatidilcolina ao meio, consegue-se proteger o protozoário do efeito disruptivo da CPZ.

O interesse destas observações reside na esperança de se demonstrar um efeito específico sobre as membranas celulares. Sabe-se com efeito que os fosfolípidos entram na composição dos sistemas membra-

nosos celulares e subcelulares. No entanto os resultados até agora obtidos não permitem relacionar facilmente as observações laboratoriais com os dados clínicos e farmacológicos.

5 — Os piridinonucleotídeos (nicotina, adenina-dinucleotídeo) e seus fosfatos são coenzimas das desidrogenases, enzimas que catalizam as reacções de oxidação-redução.

Quando ao homem ou ao animal se administra nicotinamida em excesso assiste-se a uma elevação notável do nível dos piridinonucleotídeos no sangue e nos tecidos, especialmente no fígado. Paralelamente os sujeitos mostram sedação acentuada, que tem sido utilizada terapêuticamente (Burton).

O mecanismo íntimo deste efeito sedativo não está esclarecido. No entanto quando simultaneamente se administra aos sujeitos a clorpromazina ou reserpina (mas não barbitúricos) constata-se que os níveis elevados de piridinonucleotídeos se mantêm durante muito mais tempo e atingem níveis mais altos; o efeito sedativo é também mais acentuado e mais duradouro.

Foi demonstrado neste contexto que a CPZ diminuía a afinidade do enzima nicotinamida metil transferase para o seu substrato, a nicotinamida.

Este enzima cataliza a metilação e consequente inactivação da nicotinamida (35) (36).

É possível que não sejam os níveis altos de piridinonucleotídeos o factor directamente responsável pelo efeito tranquilizante.

A inibição do sistema enzimático, atrás citado, poderia efectivamente inibir a inactivação por metilação de algumas substâncias mais directamente relacionadas com a transmissão do influxo nervoso, tal como a noradrenalina (34).

6 — Efeito sobre o ácido desoxirribonucleico (DNA):

É conhecido o efeito depressor da CPZ sobre a hemopoiese, e foi descrito um efeito antitumoral tanto da reserpina como da CPZ (37) sobre certos sarcomas experimentais do rato e sobre a leucemia linfóide do mesmo animal.

Este efeito só se nota com doses que provocam uma depressão acentuada do sistema nervoso central, não sendo possível dissociar o efeito antitumorígeno do efeito depressor central. Anthony Pisciotta descreveu neste contexto uma acção inibidora de CPZ sobre os enzimas necessários à síntese do ácido desoxirribonucleico.

Em particular a incorporação de H^{-3} — timidina na molécula de DNA era consideravelmente afectada. Estas observações foram feitas em tecidos relativamente intactos e também em sistemas acelulares. O efeito inibidor era muito nítido com a CPZ e thioridazina e menos acentuado com CPZ — sulfóxido (38), (39) e (40). Quaisquer considerações que se fizessem tentando estabelecer um nexo entre esta fenotiazina e sua eventual repercussão na síntese do ácido ribonucleico e por via destes mecanismos na memória e aprendizagem, devem ser temperadas pelas dúvidas acerca do papel verdadeiro das proteínas e do RNA nos processos mnésticos (41).

7 — Outras acções bioquímicas das fenotiazinas.

As acções acima indicadas permitem fazer uma ideia da extrema complexidade bioquímica destes compostos.

A lista de funções bioquímicas deprimidas ou inibidas pela acção da CPZ inclui (1):

- 1 — Captação de NA^{+} e K^{+} pelos tecidos «in vivo.»
- 2 — Concentração de grupos SH no fígado.
- 3 — Conteúdo do cérebro em ácido ascórbico.
- 4 — Conteúdo em K^{+} dos eritrócitos.
- 5 — Actividade da peroxidase.
- 6 — Actividade da desidrogenase alcoólica.
- 7 — Reacção de des-aminação.
- 8 — Síntese da ribose.
- 9 — Utilização da glicose pelos tecidos.
- 10 — Captação da glicose e dos fosfatos orgânicos pelos tecidos neurais.
- 11 — Captação do ácido gama aminobotírico e glutâmico pelo cérebro.
- 12 — Des-metilação (função da d-amino-oxidase).
- 13 — Tumefacção mitocondrial.
- 14 — Peroxidação dos lípidos.
- 15 — Sensibilidade dos tecidos tireoideus à hormona tireotropa.
- 16 — Tensão superficial das interfaces.

Estas informações parcelares não são facilmente integráveis em uma explicação unitária do efeito da CPZ sobre o cérebro.

Acontece que algumas destas acções, estudadas em sistemas biológicos simplificados pelas necessidades experimentais, são em certa

medida contraditórios. Por exemplo, no que respeita aos compostos energéticos fosforados (especialmente o ATP), a dissociação do acoplamento fosforilação-oxidação levaria por si só a uma diminuição nos níveis da ATP. No entanto, a inibição da ATP-ases contraria esta tendência. Neste aspecto, o saldo final consiste em uma elevação dos níveis da ATP cerebral nos animais tratados, tal como sucede na anestesia geral.

A clorpromazina e outros derivados psicoactivos compartilham aliás com os anestésicos gerais ou locais de propriedades físicas comuns.

Os autores sublinham (1) a pouca solubilidade na água e solubilidade nos lípidos, a acção depressora sobre a energia das interfaces, baixando a tensão superficial. A CPZ comporta-se como um detergente muito potente, sendo neste aspecto superior à Dibucaína, por exemplo. A acção lítica sobre as membranas que já mencionámos a respeito das mitocôndrias (Roizin) e das membranas celular do protozoário *Tetrahymena* (Guttman, citado por Ansell) correlaciona-se com esta propriedade.

Também aqui se nota uma graduação das propriedades tensioactivas de acordo com os grupos químicos introduzidos na molécula fenotiazínica, especialmente no carbono 2 do anel fenotiazínico. Neste aspecto observa-se que a acção tensioactiva aumenta gradualmente quando se introduz $-H$, $-Cl$ ou CF_3 na molécula. A acção central de tipo extrapiramidal aumenta paralelamente. Pelo contrário os produtos metabólicos sulfóxido não mostram acções centrais ou tensioactivas.

Nota-se que em muitos dos estudos revistos parece haver um fosso excessivamente largo entre aquilo que o clínico, o psicólogo e o neurofisiologista observam no comportamento humano ou animal, e os modelos experimentais do laboratório bioquímico.

Os efeitos sobre membranas são tão generalizados que é difícil correlacionar com eles o efeito farmacológico da droga.

Uma ideia mais justa do efeito destes medicamentos surgiu quando os estudos farmacológicos começaram a incidir sobre estruturas funcionais melhor definidas do sistema nervoso central do homem e dos animais.

O efeito extrapiramidal destes medicamentos parecia prestar-se especialmente a estes estudos. Com efeito desde a década de 1950-60 começava a construir-se uma constelação de conhecimentos que viriam a estabelecer maior precisão nos nossos conhecimentos acerca da doença de Parkinson, especialmente no que respeita ao papel das catecolaminas na sua patogenia. Em breve alguns autores tentam estender essas conclusões do estudo do síndrome extrapiramidal dos neurolépticos.

É do que trataremos a seguir.

CAPÍTULO IV

PAPEL DAS CATECOLAMINAS NO FUNCIONAMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL. INTERACÇÃO COM OS MEDICAMENTOS PSICOTRÓPICOS

A) — DISTRIBUIÇÃO DE CATECOLAMINAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

Os estudos sobre a embriogénese da medula suprarrenal e das células ganglionares simpáticas que mostraram serem estas formações derivadas da crista neural, a descrição da reacção «cromafim» por Henle (coloração castanha dos grãos citoplasmáticos após oxidação pelos sais de crómio) na medula suprarrenal, o isolamento de adrenalina deste órgão por Furth e Abel em 1898, constituem os antecedentes das ideias actuais sobre o papel das catecolaminas no funcionamento do sistema nervoso (Blaschko, 42) (Thoyne e Goldfien, 43). O papel da adrenalina como possível intermediário químico do sistema nervoso vegetativo periférico encontra-se descrito nos trabalhos de Elliot no princípio deste século. O autor descreve a acção sobre a musculatura lisa de vários vertebrados tanto da estimulação dos nervos simpáticos como da administração de adrenalina, sublinhando as semelhanças entre ambos (44). No entanto os trabalhos de Von Euler (46) vieram demonstrar que a noradrenalina e não a adrenalina era o intermediário químico libertado por todas as terminações simpáticas periféricas. Esta é a conclusão geralmente aceite desde 1946.

A presença de nor-adrenalina no sistema nervoso central dos mamíferos foi descrita em 1954 por Martha Vogt (46) e desde então numerosos autores confirmaram esta observação (44).

A distribuição de serotonina no sistema nervoso central foi descrita, por Bogdanski e outros, notando-se a sua predominância nos invertebrados e nas regiões filogeneticamente mais antigas. Estas observações foram feitas pouco depois das de Martha Vogt e são quase contemporâneas dos trabalhos de Bertler, Rosengren e Carlsson descrevendo a presença de dopamina no neo-striatum de várias espécies de animais e no homem (47).

A contribuição da Escola Sueca na elucidação destes problemas foi fundamental. Os progressos registados foram possíveis graças à possibilidade de transformar as catecolaminas em compostos fluorescentes

após tratamento dos tecidos pelos vapores de formol. Os cortes histológicos são observados ao microscópio de fluorescência. A técnica permite a inclusão em parafina e o uso de solventes orgânicos sem difusão do composto fluorescente.

As reacções químicas pertinentes foram estudadas por Corrodi e o método mostra especificidade, permitindo distinguir a nor-adrenalina e dopamina (fluorescência amarela intensa) da adrenalina e serotonina. Não é possível porém separar por este modo a dopamina da noradrenalina (48), (49) e (50). A perda de fluorescência neuronal após tratamento dos animais pela reserpina, d-metiltirosina ou pela clorfenilalanina, permite identificar neurónios contendo respectivamente 5-hidroxitriptamina, nor-adrenalina ou dopamina.

A aplicação destas técnicas ao sistema nervoso permite identificar zonas cerebrais diferenciadas em que aparecem neurónios contendo uma ou outra catecolamina ou 5-hidroxitriptamina. A nível dos órgãos periféricos (coração, rim) as técnicas de fluorescência vieram levantar novamente a questão de a adrenalina poder ser o intermediário químico dos nervos simpáticos, ideia sugerida por Elliot, e que encontrou uma formulação mais precisa com os trabalhos de Loewi sobre o coração de rã, em que se observava libertação de adrenalina após estimulação da inervação simpática (50).

Pelo que respeita à distribuição de neurónios contendo catecolaminas no sistema nervoso central parece poder concluir-se o seguinte:

1) A dopamina aparece (no rato) em neurónios mesencefálicos que se reúnem em três grupos anatomicamente distintos: um grupo localizado na região ventrolateral da formação reticulada na sua porção mesencefálica rostral, um grupo constituindo grande parte da «substantia nigra» (locus niger) particularmente na sua zona compacta, e um grupo rodeando a porção cranial (anterior) do núcleo interpeduncular.

As lesões supramesencefálicas experimentais associadas aos métodos histoquímicos referidos permitem concluir que os axónios destas células do «locus niger» terminam no neo-estriado. Esta conclusão não é confirmada (1968) pelos métodos histológicos clássicos, mas é aceite por muitos autores.

Encontram-se também terminações nervosas fluorescentes nos núcleos septais e nos tubérculos olfactivos, que desaparecem após lesões na área imediatamente caudal à comissura anterior. Não encontramos referências descrevendo as origens destas terminações.

Fora do mesencéfalo só se encontram neurónios contendo dopamina no «nucleus arcuatus» da região infundibular hipotalâmica.

2) A noradrenalina encontra-se principalmente em corpos celulares do bulbo e da ponte.

O grupo mais numeroso encontra-se no «locus coeruleus», e pensa-se que as suas fibras se encaminham rostralmente.

Dois grupos mais pequenos encontram-se associados ao feixe rubro espinhal na vizinhança do núcleo olivar superior. Outro grupo situa-se na formação reticular da ponte, por baixo do pedúnculo cerebeloso inferior. Encontram-se também neurónios contendo noradrenalina no núcleo reticular do bulbo.

Em todas estas regiões, com excepção do «locus coeruleus», os neurónios fluorescentes estão dispersos entre os neurónios não fluorescentes.

Muitos dos neurónios da formação reticular são origem de fibras descendentes reticulo-espinhais, terminando na ponta lateral (já referidos) ou na ponta anterior. Encontram-se na medula espinhal fibras fluorescentes até ao nível lombar.

Além dos grupos celulares mencionados encontram-se no bulbo e ponte terminações nervosas fluorescentes cuja origem se desconhece.

Os neurónios contendo catecolaminas parecem pois distribuir-se em dois sistemas, um contendo dopamina e de projecção predominante rostral, outro contendo noradrenalina e de projecção predominantemente caudal.

3) Os neurónios contendo serotonina (5-hidroxitriptamina) encontram-se quase exclusivamente no raphe mediano.

A sua localização mesencefálica inclui o núcleo dorsal do raphe e o núcleo do raphe mediano caudal, e células dispersas em volta do «lemniscus medialis». As projecções destes núcleos e elementos celulares atingem o hipotálamo lateral, os núcleos do septo, «globus pallidus», núcleo amígdalino e neocórtex.

Encontram-se também células contendo serotonina no bulbo, incluindo a área postrema, em volta do núcleo do nervo facial e na região do núcleo «arcuatus ventralis».

Na medula espinhal encontram-se fibras e terminações com fluorescência amarela característica da serotonina, tendo a mesma distribuição das fibras contendo noradrenalina (47) (Fig. 3).

Precedendo em parte, e contemporaneamente com este trabalho de localização topográfica dos neurónios contendo catecolaminas e

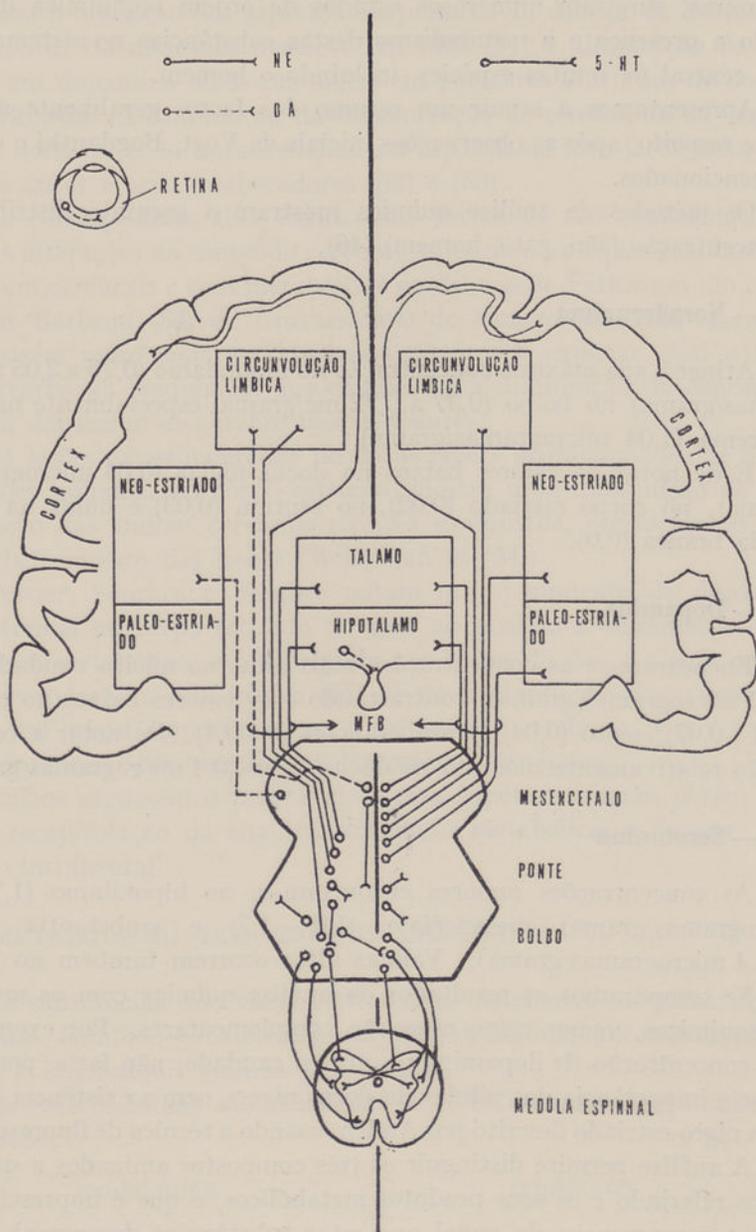


Fig. 3

Núcleos e vias adrenérgicas, dopaminérgicas, serotoninérgicas (1966).

serotonina, surgiram numerosos estudos de ordem bioquímica descrevendo a presença e o metabolismo destas substâncias no sistema nervoso central de muitas espécies, incluindo o homem.

Apresentamos a seguir um resumo dos factos geralmente aceites a este respeito, após as observações iniciais de Vogt, Bogdanski e outros já mencionados.

Os métodos de análise química mostram a seguinte distribuição e concentração (cão, gato, homem) (46).

1 — Noradrenalina

Atinge a sua máxima concentração no hipotálamo (0,76 a 2,05 microgramas/grama) no bolbo (0,37 a 0,72 mc/grama) especialmente na área portrema (1,04 microgramas/grama).

É de notar os valores baixos no «locus niger» (0,04 microgramas/grama), no corpo estriado (0,02), no septum (0,03) e nulos na substância branca (0,0).

2 — Dopamina

Encontram-se as concentrações mais altas no núcleo caudado (3,1 a 8,0 microgramas/grama); contrastando com valores baixos no tálamo (0,01—0,07), septo (0,04), protuberâncias (0—0,1). De notar a concentração relativamente modesta no «locus niger» (0,4 microgramas/grama).

3 — Serotonina

As concentrações maiores encontram-se no hipotálamo (1,7—2,0 microgramas/grama) mesencéfalo (1,0 — 1,7) e «substantia nigra» (1 — 4 microgramas/grama). Valores altos ocorrem também no bolbo.

Se comparamos os resultados da análise química com os métodos histoquímicos, vemos como estes são complementares. Por exemplo a alta concentração de dopamina no núcleo caudado, não faria, por si só, supor a importância das células do «locus niger», nem a existência do sistema nigro-estriado descrito por Anden, usando a técnica de fluorescência.

A análise permite distinguir os três compostos aminados a que nos vimos referindo e os seus produtos metabólicos, o que é imprescindível para a compreensão do papel que estas substâncias desempenham no funcionamento do sistema nervoso.

Estas investigações cedo tiveram aplicação prática, com as investigações no homem da Escola Vienense e Canadiana que abriram cami-

nho para a descrição dos aspectos bioquímicos da doença de Parkinson. Com efeito, Hornikiewicz descreve em 1963 (51) a diminuição de conteúdo em dopamina do «locus niger» em pacientes afectados de doença de Parkinson. A diminuição da concentração de serotonina no cérebro destes doentes, e de noradrenalina no hipotálamo fora já descrita pelo mesmo autor e seus colaboradores (52) e (53).

As conseqüências terapêuticas daí derivadas são conhecidas.

As alterações no conteúdo cerebral, urinário e no liquor cefalorraquidiano em cerebrais e seus metabólitos na doença de Parkinson são revistos por Barbeau (54) da Universidade de Montreal. Não encontramos porém referências a trabalhos tendentes a explicar qual a lesão ou perturbação bioquímica que condiciona a diminuição da concentração em dopamina no cérebro destes doentes.

As lesões experimentadas do «locus niger», acompanhados de determinações químicas no corpo estriado, mostra uma diminuição de concentração das aminas cerebrais na área examinada, pouco tempo após o estabelecimento das lesões (McLennan in (54)).

Poirier, Sourkes e Boudier notam que o aumento da dopamina e serotonina no corpo estriado do gato ao qual fora administrado um precursor metabólico, era suprimido por lesões do «locus niger», ou rostrais em relação a este núcleo (55). Este conjunto de observações faz supor um papel importante para as aminas cerebrais possivelmente como intermediário químico na transmissão sináptica.

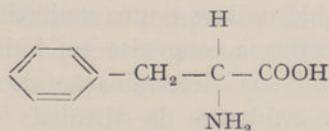
Outros argumentos favoráveis a esta hipótese exigem porém uma breve recapitulação da sua transformação metabólica, e da sua localização intraneural.

B) — METABOLISMO DOS ANIMAIS CEREBRAIS

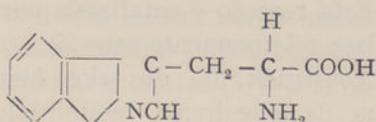
As substâncias que viemos estudando distribuem-se quimicamente por duas famílias: — catecolaminas (noradrenalina, adrenalina, dopamina) e indol-alquil aminas (serotonina).

As catecolaminas são derivadas da fenilalanina, a serotonina do triptófano.

fenilalanina

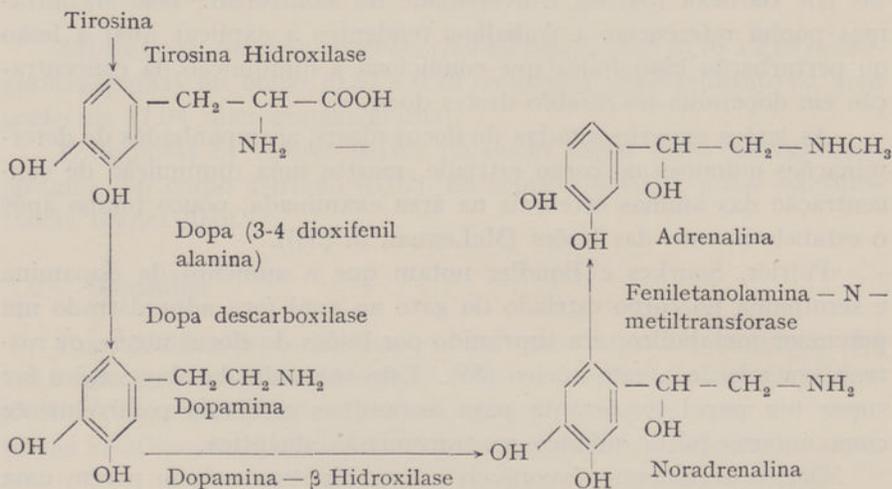


triptófano



A fenilalanina existente no organismo em um dado momento converte-se quase totalmente em tirosina, ou é incorporada nas proteínas. Apenas uma pequena percentagem sofre transformação em outros compostos (ácido fenil-láctico).

A partir da tirosina o quadro complica-se consideravelmente (evolução para as hormonas tireoideias, por exemplo). Nos tecidos neurais a evolução da tirosina faz-se no sentido da transformação em DOPA, dopamina, noradrenalina e adrenalina:



No sistema nervoso central a dopamina, noradrenalina e adrenalina são oxidados nos respectivos derivados — ácidos homovanílicos e mandélicos.

Na circulação geral as catecolaminas sofrem oximetilação, com formação dos chamados metoxi-derivados, seguido de oxidação destes em vários compostos ácidos.

Convém considerar em mais detalhe algumas destas reacções e os enzimas nelas envolvidos (55).

O passo inicial é dado no fígado onde a fenilalanina é oxidada formando tirosina.

Esta reacção é catalizada por uma hidroxilase e uma aminoácido-oxidase relativamente específica. A deficiência congénita em hidroxilase constituía um dos elos fundamentais na determinação do síndrome da oligofrenia fenilpirúvica. A oxidação da tirosina (quer

desta origem, quer de origem alimentar) dando origem a dioxifenilalanina é catalizada pela tirosina hidroxilase, que se encontra no cérebro. Este enzima mostra a sua maior actividade em preparação do tronco cerebral na cobaia e no núcleo caudado de outras espécies. Em experiências de centrifugação diferencial nota-se que a actividade enzimática é maior nos sedimentos contendo partículas figuradas que no liquido sobrenadante. Alguns destes elementos figurados são identificáveis como terminações sinápticas arrancadas pela homogeneização (56).

A oxidação da tirosina pela tirosina hidroxilase é o factor limitante na sequência metabólica que vem a dar noradrenalina.

A tirosina hidroxilase pode ser inibida «in vitro» e «in vivo» pela noradrenalina. A elevação dos níveis de noradrenalina por meios farmacológicos (inibição da monoaminoxidase) provoca uma diminuição acentuada da síntese de noradrenalina «de novo» a partir da tirosina, mas não a partir da DOPA. O uso de droga metil tirosina, mostra também acção inibidora sobre a tirosina hidroxilase (57).

O enzima que se encontra no corpo estriado e «globus pallidus» (no macaco Rhesus) sofre acentuada diminuição após lesões ipsilaterais da «substantia nigra» (58).

O passo seguinte nesta sequência metabólica é a descarboxilação da DOPA, dando origem a dopamina e anidrido carbónico.

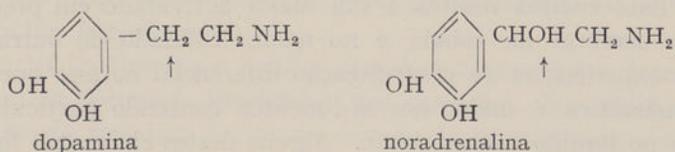
A reacção é catalizada pelo enzima dopa-decarboxilase.

É um enzima relativamente inespecífico, catalizando a descarboxilase de muitos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano, 5-hidroxitriptófano e histidina). Encontra-se também associado às terminações nervosas, ou solubilizado.

Existem numerosos inibidores deste enzima, o qual porém existe em tão grande quantidade que não é fácil obter diminuição de produção de catecolaminas por este meio. Citemos a deficiência em vitamina B₆ e alfametildopa. Esta última substância provoca diminuição do conteúdo em noradrenalina nos nervos simpáticos e é útil no tratamento da hipertensão arterial.

Constatou-se que isto não é devido a inibição enzimática mas ao facto de a metildopa sofrer ela própria descarboxilação vindo o produto formado a competir com a noradrenalina na sua função de intermediário químico. Como o derivado da metildopa é fisiologicamente inerte assiste-se a um bloqueio da transmissão sináptica (57), pelo mecanismo chamado do «falso intermediário».

A noradrenalina deriva da dopamina por hidroxilação da cadeia lateral.



O enzima necessário a esta reacção é a dopamina-beta-hidroxilase.

É uma proteína contendo cobre, que se tem isolado na medula supra-renal, cérebro, coração, gânglios e nervos simpáticos.

Pelos métodos de separação correntes acompanha as fracções sub-celulares, contendo mitocôndrias (no caso de medula supra-renal) ou terminações nervosas nos outros casos. Parece estar ligado às membranas celulares de onde é libertado por detergentes.

O enzima é inibido pelos queladores do cobre, ou usando compostos semelhantes na configuração molecular ao substrato fisiológico.

A noradrenalina obtida pela acção deste enzima sofre em seguida a acção da feniletanolamina-n-metil transferase, para dar adrenalina (n-metil-feniletanolamina).

O dador de grupos metil é a S-adenosil metionina. A degradação das catecolaminas faz-se através da monoaminoxidase e da catecol-oximetil transferase (COMT).

A catecol-oximetil transferase cataliza a introdução de um grupo CH_3O na posição 3 do anel fenólico dando origem a um metoxi-derivado (3 oximetil noradrenalina, por exemplo). Este derivado sofre a perda do grupo NH_2 (desaminação) pela monoaminoxidase, dando origem a um derivado aldeídico, o qual é depois transformado em ácido por uma aldeído desidrogenase (59).

Estas reacções são observáveis com qualquer das catecolaminas cerebrais (dopamina, noradrenalina e adrenalina). A reacção de desaminação pela monoaminoxidase não exige necessariamente a prévia acção da catecol-oximetil-transferase.

Existem razões para crer que a catecol-oximetil-transferase (COMT) actua principalmente sobre as aminas livres e em circulação, ao passo que a monoaminoxidase actuará sobre as aminas ligadas aos tecidos (60).

A monoaminoxidase (MAO) encontra-se associada às mitocôndrias. Tem-se descrito vários isoenzimas, que parecem ter afinidades diferentes para as catecolaminas e indolaminas (59) e que existiriam em áreas diferenciadas do sistema nervoso central (59).

Os aldeídos provenientes da reacção de desaminação são convertidos em ácidos pela aldeído-desidrogenase. Este é um enzima de localização mitocondrial, tal como a MAO. A velocidade da reacção catalizada pelo aldeído-desidrogenase é no entanto menor que no caso da MAO, e o enzima existe em excesso relativamente à quantidade de substrato. O catabolismo das aminas depende pois essencialmente da MAO. A inibição deste enzima provoca um aumento da concentração de todas as aminas cerebrais, o que é acompanhado de excitação nos animais de experiência. As aplicações deste facto à clínica psiquiátrica são por demais conhecidos.

A evolução metabólica do triptófano que conduz à produção de serotonina (5-hidroxitriptamina) é muito semelhante):

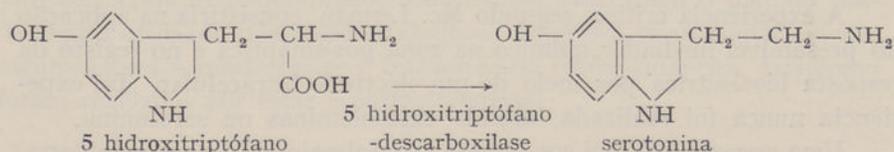
O triptófano de origem alimentar sofre a acção do enzima triptófano-hidroxilase que dá origem ao 5-hidroxitriptófano.

Este enzima foi isolado e purificado do tronco cerebral do coelho, e encontra-se também associado às terminações nervosas, nas experiências de fraccionação celular.

Como no caso da tirosina hidroxilase, a reacção catalizada por este enzima é o passo crítico na cadeia de reacções que vem a dar serotonina.

A inibição deste enzima pela fenilalanina ou pela clorfenilalanina conduz à depleção dos tecidos em serotonina.

A reacção seguinte, que é a descarboxilação do 5-hidroxitriptófano é catalizado por uma descarboxilase que é em tudo idêntica ao enzima que cataliza a descarboxilação da DOPA, necessitando piridoxina como cofermento. Desta reacção resulta a serotonina:



A descarboxilase, relativamente inespecífica (1-aminoácido descarboxilase), encontra-se nas suspensões de terminações nervosas, provavelmente no citoplasma.

A monoaminoxidase cataliza a transformação da serotonina em um aldeído instável, sendo o produto final desta cadeia de reacção o ácido 5-hidroxiindolacético (61).

Os trabalhos recentes de Laverty e Taylor vieram porém mostrar



que os produtos finais destas reacções seriam não produtos ácidos, mas alcoóis.

Os ácidos hidroxindolacético e vanilmandélico seriam obtidos quando se administravam catecolaminas aos animais de experiência. O metabolismo das catecolaminas endógenas conduziria a produtos finais de natureza alcoólica (62).

Estes estudos devem ter-se em consideração na apreciação de resultados das experiências que demonstraram uma aceleração do metabolismo das aminas cerebrais por efeito das drogas psicotrópicas, o que é deduzido de um aumento da concentração dos produtos do metabolismo amínico em animais tratados com estas substâncias.

C) — FUNÇÃO DAS CATECOLAMINAS E SEROTONINAS COMO MEDIADORES QUÍMICOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A atribuição da função de intermediário químico a estas substâncias é em larga medida uma transposição para o sistema nervoso central de factos conhecidos a nível dos nervos adrenérgicos periféricos. A demonstração cabal de um papel de mediador químico para as aminas cerebrais não foi ainda feita (Mc. Lennan) 1970 (63). No entanto tal hipótese é muito provável e assenta nos seguintes argumentos: presença de aminas fluorescentes no interior dos neurónios, e nas ramificações pré-terminais, presença dos enzimas necessários ao metabolismo com a mesma localização topográfica, supressão de aminas e enzima nas zonas de terminação de feixes nervosos após lesões nos núcleos de origem, aparecimento de aminas cerebrais no líquido de perfusão do espaço subaracnoideu após excitação do cérebro subjacente.

A experiência crítica, segundo Mc. Lennan, consistiria na aplicação do presumível mediador químico na zona pós-sináptica e no registo da resposta bioeléctrica por meio de um eléctrodo intracelular. Tal experiência nunca foi realizada, usando catecolaminas ou serotonina.

Uma aproximação foi conseguida por Salmoiraghi e seus seguidores. Usando micropipetas de vidro de diâmetro de 8,5 a 10 micra, estes e outros autores conseguiram aplicar as substâncias a examinar na vizinhança imediata de alguns neurónios centrais, e ao mesmo tempo registar os parâmetros bioeléctricos pertinentes. É possível, usando esta técnica, penetrar uma célula com um eléctrodo registador e projectar por outra micropipeta o produto a estudar. Esta técnica foi utilizada por Curtis para estudar as células motrizes da ponta anterior da medula; no entanto a sua aplicação a outras células de menores dimensões não foi possível (64).

A aplicação de catecolaminas e serotonina através das micro-eléctrodos de Salmoiraghi na vizinhança imediata das células nervosas centrais generalizou-se.

Os resultados não parecem ser concludentes (Mc. Lennan). De um modo geral obtém-se uma resposta inibitória nos parâmetros estudados.

Havia depressão na amplitude dos registos de potencial obtido na vizinhança das células, após aplicação das catecolaminas ou serotonina. Não se pode porém concluir que o efeito destas substâncias seja apenas a de inibição. Na verdade em alguns casos obtém-se facilitação, sem que a razão destas discordâncias esteja bem esclarecida (65).

O efeito inibidor parece particularmente nítido no que respeita à acção da dopamina sobre os neurónios do núcleo caudado; a estimulação do «locus niger», que liberta dopamina, provoca inibição da actividade eléctrica destes núcleos, o mesmo sucedendo com a aplicação tópica de dopamina (66).

Outra linha de argumentação tendendo a atribuir a função de mediador químico a estas substâncias deriva das experiências de fracção celular, através das quais é possível obter preparações contendo quase exclusivamente terminações nervosas arrancadas dos seus axónios de origem. Estas contêm acetilcolina associada a colinaacetilase e acetilcolinesterase, catecolaminas e serotonina acompanhadas do mesmo modo dos enzimas importantes para o seu metabolismo, além de muitas substâncias biologicamente relevantes.

Os métodos de fracção celular seguidos de centrifugação diferencial que permitem a obtenção de organitos subcelulares (núcleos, membranas, ribosomas, mitocôndrias, terminações sinápticas, etc.), revestem-se porém de uma tal importância na biologia moderna que necessitam de exame mais detalhado. Constituem além disso o método fundamental utilizado nos nossos trabalhos. Interessa rever sumariamente alguns aspectos morfológicos e funcionais da região sináptica, tais como foram revelados por estas e outras técnicas.

CAPÍTULO V

ESTUDO DA REGIÃO SINÁPTICA, CONCEITOS GERAIS

O termo sinapse foi introduzido por Sherrington em 1897. A análise da condução do influxo nervoso em troncos nervosos periféricos e em certos reflexos revelava um certo número de diferenças que, segundo

o autor, seriam explicáveis pela existência de «superfícies de separação» a nível da substância cinzenta «entre neurónio e neurónio».

O arco reflexo exhibe as seguintes propriedades, diferentes das dos troncos nervosos:

- Velocidade de condução mais lenta;
- Correspondência menos perfeita entre ritmo de excitação e frequência de resposta;
- Somação temporal, irreversibilidade de direcção, maior fatigabilidade, maior dependência de oxigénio, maior sensibilidade a drogas, etc.

O autor postula a existência de «membranas transversais» que impedissem ou dificultassem a transmissão do influxo nervoso que considerava dependente dos componentes líquidos do neurónio «mesmo que essas membranas não sejam visíveis ao microscópio» (67). Entretanto CAJAL expusera as suas ideias sobre a «polarização dinâmica» da condução nervosa. Com singular clareza descreve a condução nervosa como indo necessariamente do neurónio sensitivo para o neurónio intercalar e deste para o neurónio effector, toda a orientação dinâmica determinada pela necessidade de o impulso nervoso chegar pela via mais rápida ao axónio do neurónio effector. O caminho e a direcção do influxo nervoso dentro de cada neurónio não seria determinado pelas características estruturais deste, mas pela organização espacial das «portas de entrada e saída» oferecidas ao influxo nervoso, isto é, dos contactos interneuronais (68). Sherrington, em 1900, precisa melhor esta ideia descrevendo a sinapse como uma válvula que permitia a passagem da «corrente» nervosa apenas em uma direcção.

1 — Observações morfológicas

a) *Microscopia óptica.*

As observações microscópicas utilizando técnicas de impregnação metálica, ou o azul metileno, permitiram fazer uma ideia bastante precisa da morfologia, localização e número das terminações sinápticas.

CAJAL descreve quatro tipos de terminações: arborizações em massas terminais («pés terminais» de Held, botões terminais), arborizações reticuladas, terminações em neurofibrilhas livres, anéis terminais. Aí se faz referência ao conteúdo em um líquido claro, incolor, ou levemente cianófilo de algumas. destas terminações a que chama neuro-

plasma. Held havia descrito desde 1897 partículas granulosas a que chamou neurosomas no interior do neuroplasma. Estes neurosomas foram posteriormente identificados como mitocôndrias por Bodian e outros (71). Utilizando este género de técnicas fizeram-se observações quantitativas sobre a densidade de contactos sinápticos. Assim Barr descreve em células das pontas anterior e posterior da medula do gato uma densidade de contactos sinápticos de ordem dos 16 por 100 micra quadrados.

O mesmo autor verificou que 30 % da superfície celular era ocupada por contactos sinápticos. O número de terminações sinápticas por células varia entre 1 500 e 10 000 (observações feitas em células do núcleo de Deiters, *in situ* e em cultura). As dimensões dos botões terminais dos neurónios da ponta anterior da medula eram de 0,3 a 4-5 micra. A área de contacto relativa e cada terminação em botões ou em massa terminal é estimada de 1 a 100 micra quadrados variando muito com o tipo de terminação considerada (71). O número de contactos sinápticos por grama do tecido cortical foi calculado em 4×10^{11} para o cérebro da cobaia.

A microscopia electrónica veio precisar os nossos conceitos sobre estes assuntos e permitiu tentar relacionar estrutura e função a um nível anteriormente insuspeitado: também do ponto de vista farmacológico as técnicas de ultramicroscopia e separação subcelular tornaram possível a tentativa de situar a acção das drogas em estruturas do complexo sináptico morfológicamente bem definidas e funcionalmente relevantes.

As primeiras descrições de ultraestrutura da região sináptica vêm datadas de 1953 a 1956, e devem-se a Pease, Sjöstrand e de Robertis, não nos sendo possível esclarecer qual o autor que primeiro obteve imagens electromicrográficas destas estruturas. Destas observações iniciais ressalta o facto de não haver relações de continuidade entre os neurónios. As superfícies em contacto são separadas, na generalidade dos casos, por uma fenda (fenda sináptica) medindo nas observações iniciais cerca de 600 \AA , número que veio a ser reduzido para 325 \AA e 200 \AA , 120 \AA , para as sinapses do sistema nervoso central com o aperfeiçoamento dos métodos de fixação (74). Em áreas discretas do contacto sináptico podem encontrar-se justapostas as membranas pré- e pós-sináptica, sem a existência de uma fenda sináptica. Esta justaposição pode ocupar toda a superfície de contacto em certas sinapses.

A membrana revestindo a terminação nervosa é a continuação da membrana axonal pré-terminal, que já perdeu o seu revestimento miélico no caso das fibras mielinizadas, e tem portanto as características

gerais das membranas celulares. Nos pontos em que a membrana da terminação nervosa entra em contacto directo com a membrana da célula à qual se destina existem diferenciações morfológicas sob a forma de espessamentos da membrana com aumento de densidade electrónica. Também se observam espessamentos semelhantes do lado pós-sináptico por vezes com certo grau de complexidade morfológica.

O significado destas formações é obscuro mas o conjunto de duas membranas com espessamentos assimétricos separados por uma fenda, com formações vesiculares na vizinhança de uma das membranas constitui o critério morfológico para a identificação da sinapse nos tecidos, Fig. 4 (86).

A adesão das membranas pré- e pós-sináptica é muito firme, contribuindo provavelmente para isso não só o íntimo contacto já referido como a presença de filamentos extremamente delicadas que atravessam a fenda sináptica. Nas experiências de fragmentação celular levadas a cabo no sistema nervoso central nota-se que as terminações nervosas se separam dos respectivos axónios e trazem quase sempre consigo um fragmento de membrana pós-sináptica (Figs. 6 e 7).

b) *Sinaptosomas.*

É a este conjunto que Wittaker chamou de sinaptosoma (73). Ao separar-se por ruptura, do axónio, a membrana lacerada do sinaptosoma colapsa rapidamente formando um espaço fechado contendo no seu interior alguns neurofilamentos e neurotúbulos, mas especialmente citoplasma, mitocôndrias e as vesículas sinápticas, que descrevemos a seguir.

Os sinaptosomas assim constituídos e isolados mantêm todas as suas possibilidades metabólicas, incluindo a capacidade de manter uma distribuição assimétrica de iões de um e outro lado da membrana limitante. As vesículas que se encontram no interior do sinaptosoma (e também no interior da terminação nervosa no cérebro intacto), merecem desde já algumas referências.

c) *Vesículas sinápticas.*

Foram descritas originariamente por De Robertis e Bennet em 1954, nos gânglios simpáticos da rã e no neuropilo da lombriga, e quase simultaneamente por Palade e Palay no sistema nervoso central de outras espécies, e por Engstrom, e Sjöstrand, nas terminações do nervo coclear e nas sinapses retinianas (74).

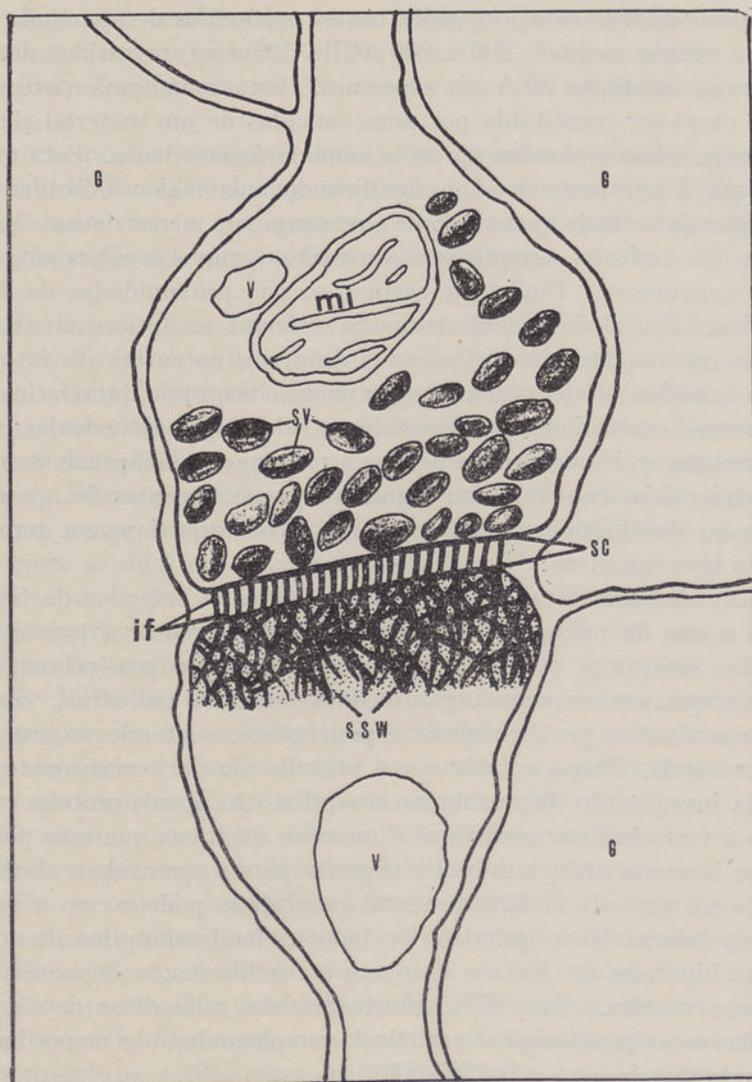


Fig. 4

Sinapse central, segundo De Robertis

- g — Glia
- mi — Mitocôndrias
- sv — Vesículas sinápticas
- if — Filamentos intercelulares
- sc — Superfície celular
- ssw — Rede subsináptica (aparelho subsináptico)

Apresentam-se estes organelos como corpúsculos de aparência esférica ou ovóide medindo 200 a 600 Å de diâmetro, revestidos de uma membrana medindo 80 Å de espessura. Esta membrana parece em alguns casos ser constituída por duas camadas de um material electro-nicamente denso separadas por uma camada menos densa. Esta menor densidade é interpretada como significando uma maior hidrofília (75). O interior da vesícula aparece como electricamente menos denso. A morfologia das vesículas sinápticas é um tanto variável e a sua origem é ainda controversa. Tendem a agrupar-se nas proximidades da fenda sináptica. E. G. Gray (76) descreve vesículas sinápticas no sistema nervoso central dos peixes (*Carassius Auratus*), no córtex do rato e de outras espécies. Refere-se a uma primeira dicotomia já referida por Uchrizono — existiriam fundamentalmente dois tipos de vesículas: as de configuração esférica estariam ligadas a terminações sinápticas de natureza excitatória, enquanto um segundo tipo de vesículas de aparência ovóide ou de elipsóide muito achatada encontrar-se-iam em terminações do tipo inibitório.

Gray descreve também (77) utilizando vários métodos de fixação e com o uso do microscópio electrónico estereocópico, a presença de vesículas sinápticas revestidas de uma camada de possível natureza proteica que assume uma organização geométrica poliédrica, com as faces constituídas por hexágonos e pentágonos, contendo no seu interior a vesícula. Pensa o autor que a vesícula e o seu revestimento nascem da invaginação da membrana sináptica. A cápsula proteica envolvendo a vesícula determinaria as dimensões máximas que esta poderia atingir, havendo assim um limite superior para a quantidade do fluido contido na vesícula sináptica. Esta quantidade poderia ser o «quantum» do intermediário químico libertado na fenda sináptica de acordo com as hipóteses de Katz e outros sobre a libertação de acetilcolina na placa motora. Gray (77) admite também a hipótese de algumas vesículas se poderem originar a partir do complexo de Golgi no perikarion, migrando depois para o botão sináptico.

J. Taxi (78) distingue 3 tipos morfológicos de vesículas sinápticas, nas fibras do sistema nervoso autónomo periférico:

a) Vesículas sinápticas propriamente ditas, medindo 300 a 600 Å de diâmetro que parecem vazias ou cheias de um líquido claro.

Há argumentos fortes que levam a pensar serem portadores de acetilcolina.

b) Pequenas vesículas densas, ou pequenas vesículas granulosas;

têm dimensões semelhantes às anteriores e apresentam no interior um grânulo fortemente osmiófilo. Esta osmiofilia desaparece pela acção da reserpina administrada «in vivo», o que sugere serem compostas de serotonina.

c) Grandes vesículas densas, ou grandes vesículas granulosas, medindo 600 a 1 000 Å cujo conteúdo não desaparece pela acção da reserpina in vivo, e que aparecem em terminações de fibras colinérgicas pré-ganglionares ou de fibras adrenérgicas.

Taxi acrescenta a esta descrição as «vesículas achatadas» descritas por Gray e Uchizono cujas descrições no entanto se referem ao sistema nervoso central. Gray insiste por mais de uma vez em que a possibilidade de distinguir vesículas globóides e vesículas elipsóides («achatadas» ou «polimorfos») depende da fixação dos tecidos em formaldeído ou glutaraldeído. Seria da interacção destas substâncias com o conteúdo da vesícula ou com um factor citoplasmático que resultaria a possibilidade de distinguir entre as duas populações de vesículas (79). A fixação em aldeídos afectaria de forma diferente o conteúdo da vesícula, modificando a geometria desta consoante a terminação nervosa em causa tivesse uma função excitória ou inibitória.

De Robertis, descreve também a presença de noradrenalina em uma preparação de vesículas sinápticas do sistema nervoso central do rato, sugerindo a sua localização nas vesículas granulosas por ele descritas nos neurónios hipotalâmicos «in situ» (80).

O mesmo autor (81) refere-se a trabalhos de Maynert *et al.* descrevendo a presença de 5 hidroxitriptamina e noradrenalina em preparações de vesículas sinápticas e às observações de Laverty descrevendo a presença de dopamina associada a preparações de terminações nervosas (sinaptosomas) obtidos a partir do núcleo caudado.

Não é porém clara a associação destas últimas substâncias (5-hidroxitriptamina e dopamina) com tipos morfológicos específicos de vesículas sinápticas e Whittaker em 1966 (82) não considera provado que a dopamina esteja associada com as fracções cerebrais contendo as vesículas sinápticas. Encontra porém dopamina ligada a sinaptosomas na percentagem de 25 % do total em um peso determinado de uma preparação de núcleo caudado do cão.

Como nota Stjärne (83) os autores falam por vezes em vesículas e granulações sem precisarem convenientemente o seu local de origem. Muitas das observações de natureza bioquímica e farmacológica foram feitas em granulações extraídas das células cromafins da medula suprar-

renal, dos nervos esplênicos, do tecido cardíaco ou dos nervos da glândula pineal do rato (84), pressupondo-se uma identidade entre estes vários grãos e as granulações extraídas das sinapses centrais. Não são do nosso conhecimento estudos sistemáticos comparando os mesmos parâmetros nas vesículas de origem central e periférica.

d) *Origem das vesículas sinápticas.*

Já mencionámos as descrições de Gray sobre a origem das vesículas centrais por invaginação de membrana do botão sináptico e a suposição deste mesmo autor acerca do papel do aparelho de Golgi neste processo. Observações em neurónios centrais de ciclóstomos (85) mostram vesículas claras de dimensões e aparência morfológica semelhante a vesículas sinápticas, distribuídas ao longo do axoplasma em associação de vizinhança com microtúbulos, aumentando o seu número ao avizinhar-se a região do contacto sináptico.

Na espécie considerada (larva de *Petromyzon Marinus*) as vesículas rodeiam os microtúbulos na proximidade da sinapse. Mais próxima do contacto simpático as vesículas perdem este arranjo regular, acumulando-se perto das zonas de contacto como fora descrito por De Robertis e outros.

Os autores sugerem que as acumulações de vesículas na vizinhança dos contactos sinápticos resultam do transporte desses organelos ao longo dos microtúbulos axoplásmicos (que serviriam de guia). As vesículas sinápticas não seriam portanto obrigatoriamente de origem sináptica.

Experiências levadas a cabo na escola de De Robertis por A. Pellegrini de Iraldi e por outros, em que se procedeu à constrição por ligadura do nervo ciático do rato mostram a neoformação de grande número de vesículas a montante da constrição, onde se acumulavam. Os autores pensam que estas vesículas (cujas aparências ultramicroscópicas é semelhante à das vesículas sinápticas) se originam nos neurotúbulos (78). É mais provável porém que a sua origem seja o retículo endoplásmico visto a estrutura lipoproteica da parede da vesícula ser mais próxima da estrutura da parede do retículo endoplásmico que da parede do neurotúbulo (78).

As observações de Agahjanian e Bloom sobre as sinapses do córtex parietal do rato em crescimento (desde o 12.º dia pós-natal até aos 3 meses) mostram um aumento considerável de contactos sinápticos

entre o 12.^o e o 26.^o dia pós-natal, que se correlaciona com a maturação dos traçados electroencefalográficos, do comportamento motor e de outros parâmetros. Nota-se a presença de vesículas sinápticas desde o 12.^o e 13.^o dias (86). Bunge *et al.* (87) descrevem o aparecimento de vesículas sinápticas fazendo parte de complexos sinápticos que se constituem em culturas de tecidos neurais (medula espinhal do feto do rato com 14 dias de vida intra-uterina). Os contactos sinápticos apresentando vesículas, fenda sináptica e espessamentos assimétricos das membranas opostas, aparecem ao fim de 54 horas de incubação. O número de vesículas pré-sinápticas aumenta com a maturação das culturas. Alguns sinais de organização bioeléctrica detectam-se nestas culturas a partir das 48-72 horas de incubação: «aparecimento de complexos de pontas e de ondas lentas como resposta a breves estímulos eléctricos aplicados aos tecidos (88).

e) *Modificação da posição das vesículas sinápticas em circunstâncias experimentais.*

Experiências de estimulação eléctrica dos nervos esplâncnicos mostraram nas células cromafins da medula suprarrenal um aumento do número de vesículas sinápticas e a sua acumulação junto da membrana sináptica (De Robertis (89)). A verdade porém é que não são descritas imagens de vesículas sinápticas na fenda sináptica ou abrindo-se nela.

Williams e Grossman (90) observaram a posição das vesículas sinápticas relativamente à fenda sináptica, no cérebro isquémico do gato, quando a anemia cerebral atingia o grau suficiente para provocar o bloqueio da transmissão sináptica (avaliado pela desapareção de um potencial pós-sináptico evocado). Verificaram estes autores que as vesículas sinápticas em alguns casos se apresentavam mais afastadas que normalmente da fenda sináptica. Havia também imagens de botões terminais sem vesículas. Os autores equacionam o afastamento das vesículas da fenda sináptica (ou a sua ausência) com a desapareção do potencial evocado pós-sináptico e do electrocorticograma. No entanto apenas 10 % dos contactos sinápticos examinados exibiam a alteração considerada característica (vesículas agrupadas e afastadas da fenda) havendo também um aumento do número de botões terminais sem vesículas. Parece-nos no entanto difícil fazer depender exclusivamente das alterações observadas os efeitos bioeléctricos descritos.

CAPÍTULO VI

**A MEDIAÇÃO QUÍMICA DO REFLEXO NERVOSO.
PAPEL DAS VESÍCULAS SINÁPTICAS**

O papel atribuído às vesículas sinápticas como locais de acumulação do **mediador** químico prestes a ser utilizado, ou mesmo como **portadores** dos «quanta» de intermediário químico postulados pelas teorias correntes da transmissão sináptica já foi mencionado. Interessa examinar em mais detalhe algumas das observações que fundamentam esta posição.

Neste aspecto são fundamentais os trabalhos de Katz sobre a placa motora da junção neuromuscular, de onde deriva a noção da vesícula sináptica como expressão morfológica do quantum de acetilcolina, as experiências de separação de elementos subcelulares por homogeneização e ultracentrifugação diferencial que permitiram verificar a associação de acetilcolina, aminas biogénicas e outras substâncias, com os sinaptosomas e seus constituintes, além dos estudos morfológicos. Os trabalhos de Von Euler, Axelrod, Glowinski e outros vieram precisar melhor a função e a localização intracelular das catecolaminas, e a sua alteração por diversos fármacos. A nossa própria contribuição situa-se nesta linha.

**A) — A VESÍCULA SINÁPTICA COMO «QUANTUM» DE ACETILCOLINA,
NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**

— A junção neuromuscular pode ser homologada a uma sinapse com as suas terminações nervosas contendo vesículas sinápticas, membrana pré-sináptica, fenda e membrana pós-sináptica. A fenda é dividida por uma membrana basal (Katz, 91). Alguns autores preferem não usar a designação de sinapse que reservam para as conexões entre neurónios. No músculo estriado as terminações nervosas motoras ramificam-se ao chegarem à fibra muscular seguindo as ramificações uma direcção aproximadamente paralela ao eixo maior da fibra muscular. Os ramúsculos terminais, desmielinizados (telodendria), poisam no fundo de goteiras com a mesma orientação, e que são revestidas pela membrana celular que limita a fibra muscular (sarcolema em sentido estrito). Esta membrana apresenta numerosas pregas medindo $1/2$ a 1 micron de comprimento, perpendiculares ao eixo maior da goteira sináptica. A sua disposição e forma variam com as espécies consideradas, e com o

tipo de fibra muscular estudada. O complexo neuromuscular apresenta em corte 5 camadas (Fig. 5).

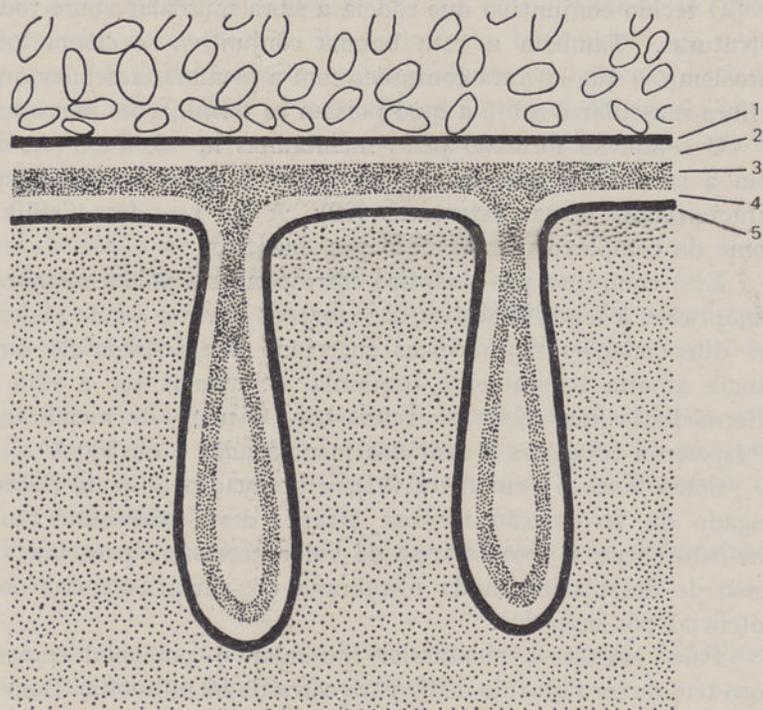


Fig. 5

- 1 — Membrana celular do axónio terminal ou axolema, com a estrutura típica («Unit membrane») com duas camadas osmiofílicas tendo entre elas uma fina camada osmiofóbica, medindo 70 a 80 Å de espessura;
- 2 — Uma camada osmiofóbica externa de 100 a 150 Å de espessura, e cuja constituição e funções não vemos descrita, mas que sofre alterações importantes, juntamente com a camada (1) quando o nervo motor é seccionado e degenera;
- 3 — Uma camada intermediária de densidade electrónica média, com cerca de 200 Å de espessura e que penetra nas profundidades das pregas do sarcolema juntamente com a camada seguinte;
- 4 — Camada osmiofoba interna de 100 a 150 Å de espessura;
- 5 — Sarcolema, de 70-80 Å de espessura, mostrando a constituição considerada «típica» das membranas: 2 camadas densas separadas com uma electronicamente menos densa.

Este conjunto é coberto pelo citoplasma das células de Schwann que rodeiam o nervo.

O tecido conjuntivo que rodeia a fibra muscular cobre todas estas estruturas. Também a esta bainha conjuntiva se chama por vezes sarcolema, o que levanta confusões com a membrana celular que limita a fibra muscular e sobre a qual poisam as terminações nervosas.

O complexo formado pelas membranas n.ºs 3, 4 e 5 não degenera com a secção dos nervos motores e neles se situa a acetilcolinesterase características destas estruturas (92). A ela se refere Csillik com o nome de complexo membranoso pós-sináptico.

Este complexo pós-sináptico corresponderia pois à membrana pós-sináptica e à fenda sináptica das sinapses centrais (onde podem aparecer diferenciações morfológicas sugerindo a existência de uma substância amorfa ligeiramente osmiófila). Supomos ser a esta camada intermediária que Katz se refere com o nome de membrana basal. A espessura total das 5 camadas mencionadas é de 500 Å.

Como Katz o demonstra (91), a atenuação do sinal eléctrico propagado da terminação nervosa através desta barreira é tão intensa que não chega a aproximar-se do valor necessário para iniciar o processo de despolarização da membrana pós-sináptica e dar origem ao potencial pós-sináptico.

Para excitar a membrana muscular o potencial transmembranoso tem de ser reduzido de 90 para cerca de 50 milivolts. Demonstra-se que, para uma fibra muscular da rã com 150 micra de diâmetro a impedância à entrada da corrente (potencial de acção de fibra nervosa) é de 50 000 ohms sendo necessária uma intensidade de 10^{-6} ampère para deslocar o potencial da forma descrita.

Electricamente, considerando uma terminação nervosa de 1 mm de diâmetro e uma superfície sináptica de $2,3 \times 10^{-5}$ cm², a intensidade fornecida pela fibra nervosa seria de $2,3 \times 10^{-8}$ amp. Esta corrente integralmente aplicada à fibra muscular deslocaria o potencial apenas de 1 a 2 milivolts. A situação ainda é mais desfavorável, dada a existência da fenda sináptica e da impedância das formações membranosas pós-sinápticas. A corrente eléctrica entrando na fibra é de ordem de 10^{-11} ampere, deslocando o potencial da membrana menos de 1 microvolt.

Katz, tendo demonstrado a ineficácia da condução eléctrica através deste tipo de sinapses, descreve-nos depois o atrazo de 0,5 a 0,8 milisegundos de um sinal eléctrico pós-sináptico induzido por um sinal pré-sináptico, e como o sinal pós-sináptico pode ser eliminado pelo curare, pela baixa de cálcio ou pela elevação da concentração de magné-

sio. A natureza deste atraso de condução é devida à intervenção de um outro processo, v. g., a produção e libertação de acetilcolina, tal como foi demonstrada por Henry Dale e colaboradores, os quais demonstram ser a acetilcolina libertada pela estimulação do nervo motor e que esta substância é um estimulante do músculo estriado. A atribuição à acetilcolina ou a qualquer outra substância do papel de mediador químico deve satisfazer três postulados mencionados por Katz (91):

- 1 — Libertação de um local pré-sináptico;
- 2 — Acção em um local pós-sináptico;
- 3 — Libertação pelo nervo em quantidade suficiente para iniciar a acção fisiológica.

Estas três condições são plenamente satisfeitas pelo que se sabe acerca da acetilcolina na junção neuromuscular, mas não tão perfeitamente pelo que diz respeito às catecolaminas e indolaminas do sistema nervoso central.

A libertação de acetilcolina do lado pré-sináptico foi demonstrada de várias maneiras:

- 1 — A estimulação do músculo desinervado cronicamente não liberta acetilcolina no líquido de perfusão;
- 2 — A estimulação do nervo motor no músculo curarizado não provoca a activação das fibras musculares, mas permite a obtenção da quantidade habitual de acetilcolina;
- 3 — A estimulação do nervo em uma preparação neuromuscular na qual a fibra muscular foi dissecada da placa motora ainda provoca a libertação da acetilcolina.

Por outro lado, a baixa do cálcio ou a elevação do magnésio impede a libertação de acetilcolina e a activação da fibra muscular, ainda que o potencial de acção continue a invadir as terminações nervosas. Nestas encontram-se os enZimas colina-acetiltransferase (colina acetilase) necessário à síntese de acetilcolina e no complexo pós-sináptico a acetil-colinesterase como já foi dito e cuja inibição pela eserina é conhecida.

A acção pós-sináptica da acetilcolina ficou demonstrada pela aplicação desta substância por meio de micropipetas ao complexo pós-sináptico da junção neuromuscular. Verificou-se que, com uma

colocação correcta das micropipetas na zona pós-sináptica bastavam concentrações da ordem de 10^{-16} a 10^{-15} mol para excitar a fibra muscular (Del Castilho, citado por Katz (91)). Pequenas deslocações da pipeta fazem desaparecer esta sensibilidade da preparação, a qual se verifica em locais específicos. A sensibilidade do músculo à acetilcolina, nestas circunstâncias é também muito diminuída pelo curare e seus alcalóides.

É possível fazer o estudo quantitativo destas acções curarizantes. Os resultados sugerem que a acetilcolina e o curare competem entre si para a fixação em uma molécula receptora pós-sináptica.

Esta relação antagonica tem características de inibição competitiva, e pode ser descrita pelas equações de Michaelis-Menten. Um trabalho recente de De Robertis (93) sobre o órgão eléctrico de peixes do género «Torpedo» ou «Electrophorus», onde existem numerosas terminações colinérgicas na electroplaca (esta é uma fibra muscular modificada) permitiu isolar um proteolípido que exhibe afinidade para a acetilcolina.

Este proteolípido é diferenciável da acetilcolinesterase, continuando a apresentar todas as suas propriedades mesmo após remoção da proteína enzimática. O mesmo autor isolou a partir de membranas sinápticas extraídas do sistema central um outro proteolípido com grande afinidade para a d-tubo — curarina, atropina, clorpromazina, serotonina propanolol...

O autor pensa que estes proteolípidos constituem, em parte ou no todo, o receptor pós-sináptico para a acetilcolina.

A propriedade que exibem de formarem arranjos paracristalinos sob a influência de certas drogas, como a atropina e acetilcolina, sugere a possibilidade de estarem implicados nos fenómenos bioeléctricos pós-sinápticos. É possível, diz o autor, que os arranjos paracristalinos induzidos nos proteolípidos (e que são reversíveis) permitam ou facilitem a translocação de iões através da membrana celular.

O efeito da acetilcolina (Katz) a nível das trocas iónicas traduz-se por um aumento da permeabilidade da membrana pós-sináptica, simultaneamente para o Na^+ a K^+ mas não para o Cl^- .

Isto é acompanhado de um aumento localizado da condutância da membrana medindo-se o valor de 2 a 3×10^{-5} ohm. (91). A manifestação bioeléctrica concomitante desta translocação iónica constitui o potencial da placa sináptica («end plate potential»), também designado por PSP (post-sináptic potential), o qual pode ser excitatório quando facilita

a despolarização da membrana muscular adjacente, ou inibitório no caso contrário.

Em músculos curarizados pode-se isolar o PPS (iniciais da designação portuguesa) do potencial de acção que habitualmente se lhe segue, o que se deve ao facto de a sua amplitude diminuir abaixo do valor necessário para iniciar o processo da despolarização da membrana muscular. Aumentando a concentração do agente curarizante a amplitude do PPS diminui até desaparecer.

Nestas circunstâncias a aplicação de acetilcolina directamente ao complexo pós-sináptico não provoca a despolarização da membrana muscular. Se utilizarmos em vez de curare o aumento da concentração de magnésio ou a diminuição do cálcio (que provocam uma diminuição da secreção de acetilcolina pelas terminações nervosas) observa-se do mesmo modo uma diminuição do PPS. Esta diminuição faz-se por quantidades discretas, o que veio revelar um aspecto novo dos fenómenos de transmissão sináptica a qual apresentava um aspecto «quântico» e não «contínuo» (91). Nestas circunstâncias a fibra muscular contínua excitável pela acetilcolina aplicada directamente.

Quando se procede ao registo da actividade bioeléctrica da junção neuromuscular em repouso, verifica-se a existência à superfície da placa motora, de oscilações muito diminutas de potencial, cuja configuração é em tudo semelhante ao PPS, mas de muito menor amplitude e duração. Estas variações de potencial surgem em pontos localizados ao longo das terminações nervosas. Têm a amplitude média de 0,5 milivolt, sendo a distribuição no tempo imprevisível, com a frequência média de cerca de 1 por segundo (no rato). As alterações eléctricas são equivalentes a um aumento da condutância da membrana de aproximadamente 10^{-7} /ohm e a uma corrente dirigida para o interior da membrana de cerca de 10^{-8} amp. (Katz (94)).

Estes potenciais pós-sinápticos «miniatura» como vieram a ser conhecidos são suprimidos pelo curare a aumentam de amplitude e duração pela acção da eserina. Eventualmente surge o potencial pós-sináptico com as dimensões usuais (em geral 100 vezes maior que o potencial-miniatura).

As características dos PPS-miniatura permitem eliminar a hipótese que sejam devidos à simples difusão de moléculas de acetilcolina com origem nas terminações nervosas: a forma e o perfil temporal do potencial pressupõe a interacção de um grupo compacto de alguns milhares de moléculas com uma área limitada da membrana pós-sináptica. O máximo de difusão compatível com a produção de um potencial mensurável seria de cerca de 1 micra.

Quando se baixa a concentração do cálcio a nível da junção, e se aumenta o magnésio, observa-se uma diminuição acentuada do número de PPS, paralelamente a uma diminuição da produção de acetilcolina após estimulação eléctrica da fibra nervosa. A diminuição do PPS dá-se da forma quântica que já mencionámos; se aplicarmos a uma preparação destas (com poucos PPS miniaturas) uma série de estímulos repetitivos notamos que o PPS varia muito da amplitude, de forma imprevisível. O carácter aleatório do aparecimento destas variações e a particularidade já referida da variação ser descontínua fizeram suspeitar ser o PPS formado pela soma de várias unidades. Esta unidade seria a amplitude média do PPS miniatura. A análise estatística do aparecimento num dado intervalo de tempo destes PPS de amplitude descontinuamente variável foi feita por vários grupos de investigadores. Os resultados são concordantes com uma distribuição de Poisson (Katz (94), Fatt (96)), o que significa que não há interdependência das unidades que compõem o PPS, não sendo a probabilidade da ocorrência de cada unidade afectada pelo número total de unidades que compõe a resposta ao estímulo em cada momento.

A distribuição de Poisson pode apresentar-se sob a forma de uma soma com um número infinito de termos:

$$1 = e^{-z} \left(1 + z + \frac{z^2}{2!} + \frac{z^3}{3!} + \frac{z^4}{4!} + \frac{z^5}{5!} + \dots \right)$$

onde e é a base dos logaritmos naturais e z a expectativa média da ocorrência.

Cada fracção exprime a probabilidade de se observar a ocorrência z um certo número de vezes ao longo de um contínuo (de tempo por exemplo), bastando conhecer para tanto a expectativa média (95) da ocorrência z . No nosso caso, z foi obtido dividindo a amplitude média do PPS evocado pela amplitude média do PPS-miniatura espontâneo. O facto de as observações serem concordantes com a distribuição de Poisson constitui argumento muito forte a favor da hipótese considerada, isto é — de o PPS ser determinado pela libertação de um certo número de «quanta» de acetilcolina, cujos efeitos (PPS miniatura) na membrana pós-sináptica se vão somando até constituírem o PPS.

Procurou-se depois esclarecer qual seria a estrutura subcelular correspondente aos «quanta» de acetilcolina. A membrana pré-sináptica foi excluída, por motivos que se depreendem de experiências do tipo da anterior. Com efeito a despolarização da membrana por meios eléc-

tricos ou químicos (aumento da concentração de K^+ por exemplo) não altera a forma ou a amplitude dos PPS miniatura, o que seria de esperar se estes fossem devidos a quantidades variáveis de acetilcolina passando através da membrana pré-sináptica com a sua permeabilidade alterada.

Como entretanto se tinham descrito as vesículas sinápticas nas terminações nervosas, incluindo as terminações nervosas da junção neuromuscular, e iam surgindo os trabalhos de De Robertis, Whittaker e outros descrevendo o isolamento de vesículas sinápticas, membranas sinápticas, etc., no sistema nervoso central e periférico, e se verificou que essas preparações eram ricas em acetilcolina e nos enzimas pertinentes, surgiu a convicção generalizada de que as vesículas sinápticas seriam os «quanta» de acetilcolina. A quantidade de acetilcolina por «quanta» foi calculada em 900 moléculas, por Birks (97), para as vesículas da junção neuromuscular. Outros investigadores mencionam números muito mais elevados.

O tipo de experiências e deduções atrás mencionadas, não pôde porém ser repetido senão parcialmente no sistema nervoso central. É certo que Katz e Miledi (94) descrevem potenciais-miniatura espontânea nos neurónios motores da medula espinhal, em 1963, mas não identificam o intermediário correspondente. Eccles (98) e outros descreveram no sistema nervoso central, com eléctrodos intracelulares a presença de potenciais pós-sinápticas espontâneos e de pequena amplitude. No entanto estes potenciais parecem ser devidos em parte à actividade assíncrona dos múltiplos contactos sinápticos que revestem as arborizações dendríticas e o soma das células estudadas, e não são portanto homólogos dos PPS miniatura da junção neuromuscular. Creutzfeldt e outros, no córtex do gato fazem observação semelhante acentuando a impossibilidade de ajustar as concepções teóricas aos resultados das observações, «como fora o caso dos trabalhos de Fatt e Katz sobre o PPS da fibra muscular» (99). A atribuição às vesículas sinápticas centrais do papel de depósito de «quanta» de acetilcolina depende principalmente dos resultados das experiências de ultracentrifugação diferencial conjugadas com a microscopia electrónica.

B) — VESÍCULAS SINÁPTICAS E CATECOLAMINAS

Alguns dos argumentos que favorecem a hipótese de as catecolaminas e serotonina (Aminas Biogénicas) actuarem como intermediários químicos, e a sua existência em certos tipos de vesículas

sinápticas centrais e periféricas, já foram mencionadas em páginas anteriores.

Veremos agora algumas das razões que levam a atribuir à mediação na sinapse adrenérgica um carácter «quântico».

O papel das «pequenas vesículas densas» de De Robertis terá de ser considerado nesta perspectiva.

Se tentarmos aplicar ao problema presente os mesmos raciocínios que usamos para atribuir às vesículas sinápticas o papel de portadores do «quanta» da acetilcolina, logo nos deparamos com a relativa independência morfológica da musculatura lisa em relação às fibras simpáticas pós-ganglionares (100). Não encontramos estruturas semelhantes à junção neuromuscular da fibra estriada (100) (101).

A inervação da musculatura lisa parece ser feita pelas ramificações das fibras adrenérgicas pós-ganglionares que se estendem até à vizinhança de cada uma das células musculares lisas.

O mediador químico atinge a sua célula efectora por difusão. As terminações nervosas apresentam dilatações terminais e na sua porção pré-terminal, bem como ao longo de outras porções do trajecto, mostrando varicosidades que seriam outros tantos pontos de libertação do mediador (101). No entanto podem registar-se potenciais pós-sinápticos miniatura dependentes da inervação adrenérgica da musculatura lisa do canal deferente da cobaia. Estes PPS miniatura são notáveis pela sua longa duração de mais 100 mili-segundos. Sob a acção da reserpina e pela desinervação parcial não mudam as suas características de amplitude e duração, mas diminui a sua frequência. Sob a acção da reserpina, tanto a noradrenalina como o número dos potenciais miniaturas sofrem uma redução de 90 % (Burn e Rand, Burnstak e Holman em (98)).

A impossibilidade de transmissão eléctrica directa fica demonstrada pela dificuldade de excitar directamente a fibra muscular lisa por esse meio.

A distribuição das catecolaminas dentro do neurónio depreende-se das observações mencionadas por Von Euler (101):

Essencialmente o método usado consiste em determinar o conteúdo de um órgão em mediador (noradrenalina) e de verificar a sua diminuição ou desaparecimento após desinervação, e o seu aparecimento após regeneração das fibras nervosas. O mediador está concentrado nas terminações (nervo esplénico, baço de boi), o que se depreende de se encontrar no órgão inervado uma concentração muito elevada de noradrenalina inexplicável pelo número de terminações nervosas presentes, se estas mantivessem a mesma concentração de noradrenalina observada nos troncos

nervosos. A noradrenalina não desaparece espontaneamente dos órgãos isolados durante longo tempo, o que supõe estar armazenada fora do contacto com os enzimas inactivadores. Estes depósitos devem ser estruturas subcelulares, uma vez que é possível preparar suspensões de nervos adrenérgicos por homogenização e centrifugação que não mostram a presença da noradrenalina no líquido de suspensão, senão baixando o pH de preparação para pH 4 ou por outros meios. Esta observação sugere que as estruturas contendo noradrenalina estariam rodeadas por uma membrana (101). Estas conclusões tem a sua correlação morfológica nos dados da microscopia electrónica já apontados anteriormente admitindo-se que a noradrenalina está localizada nas «pequenas vesículas densas». As «grandes vesículas densas» (78) parecem também conter catecolaminas (102).

O papel desempenhado pelas granulações contendo noradrenalina (NA) ou outras aminas biogénicas nos fenómenos da mediação química não é inteiramente claro. Tentaremos expor alguns dos problemas que se levantam.

Lennart Stjärne (83) referindo-se às fibras adrenérgicas periféricas é de opinião que as vesículas contendo NA não podem constituir os «quanta» de intermediário. O número de vesículas existindo nas varicosidades da fibra adrenérgica seria demasiadamente pequena para permitir a descarga de grânulos inteiros em cada impulso nervoso. Isso exigiria uma rapidez de síntese das vesículas que o autor não considera possível. Chamando a atenção para o facto de as alterações concomitantes do potencial da acção se passarem a nível de membrana axonal sináptica, propõe a existência de um depósito de NA na membrana, facilmente mobilizável, mas dependentes dos grânulos citoplasmáticos cuja função seria a de sintetizar a noradrenalina a mantê-la disponível. Quanto ao sistema nervoso central aponta-se a dificuldade de haver discrepância entre a quantidade de noradrenalina existente nas fracções cerebrais contendo «vesículas densas» e o número destas presentes nas mesmas fracções (32). Além disso o número de vesículas densas parece variar segundo o método utilizado na sua preparação (103).

Na mesma publicação se nota que a fluorescência (já referida) dos perikaria dos neurónios adrenérgicos centrais não tem relação com o número de grânulos citoplasmáticos que aí se encontrem, e Lenn (103) nega que as monoaminas contidas no perikarion destes neurónios estejam contidas em quaisquer tipos de granulações.

Notemos porém que estas últimas observações no sistema nervoso central não se referem às terminações nervosas, nem às vesículas dos

complexos sinápticos. Deve reter-se, em nosso entender, a noção da associação de uma maior concentração de NA com fracções cerebrais contendo vesículas sinápticas, ou sinaptosomas, mencionada por De Robertis (81) ainda que o número de vesículas electronicamente densas presentes nestas fracções seja uma percentagem relativamente pequena do total (82) (81) e (104). A injeccção de noradrenalina marcada (H^3 noradrenalina) no ventrículo lateral do cérebro do rato (Glowinski (105)) mostra uma acumulação dessa substância em uma fracção do homogeneizado cerebral contendo sinaptosomas. Esta distribuição da amina exógena coincide com a distribuição da noradrenalina endógena verificada pelo mesmo autor e outros, e o seu destino metabólico segue os mesmos trâmites.

Isolados dos nervos adrenérgicos ou de medula supra-renal as granulações adrenérgicas apresentam um certo número de propriedades. Interessa-nos focar a sua capacidade de sintetizar NA a partir da DOPA mas não a partir da tirosina. A hidroxilação da tirosina requer a presença de substâncias «extragranulares» sugerindo-se que este passo da via metabólica que vem a dar noradrenalina esteja localizado na membrana axonal (83).

Resta-nos dizer duas palavras introdutórias acerca dos locais de acção das monoaminas na célula efectora e do modo de inactivação do mediador aminérgico.

A frequência da resposta de um effector (frequência cardíaca) à estimulação eléctrica de um nervo ou tronco adrenérgico aumenta com a frequência da estimulação até um valor desta de ± 30 por minuto. A quantidade de NA no efluente venoso é muito baixa nas frequências baixas, aumentando muito nas frequências altas, de estimulação (200 por minuto). Este facto é interpretável como significando uma maior dificuldade dos mecanismos inactivadores em neutralizar da quantidade de intermediário presente, nas frequências altas de estimulação (101).

No sistema nervoso central o uso de certas drogas (entre eles neurolépticos) resulta em um aumento de taxa metabólica de noradrenalina o que se interpreta como um efeito compensador secundário a um bloqueio adrenérgico pós-sináptico (Corrodi, 108). Neste contexto devem lembrar-se as observações de Sara Fisher e De Robertis (109) que isolaram de membranas sinápticas oriundas dos gânglios da base e substância cinzenta mesencefálica no gato, um proteolípido com uma grande afinidade para a 5-hidroxitriptamina sugerindo que este proteolípido aparentemente idêntico ao proteolípido isolado pelos

mesmos autores com afinidade para a d-tubocurarina, seja parte do receptor pós-sináptico central para a 5-hidroxitriptamina.

A inactivação do intermediário adrenérgico oferece algumas características especiais. Segundo Axelrod (110) uma porção é destruída no receptor, uma pequena percentagem é destruída pela catecoloximetil-transferase que tem uma localização predominantemente pós-sináptica, e a maior parte é reabsorvida pelos troncos e terminações adrenérgicas constituindo este o principal mecanismo de inactivação. A captação de noradrenalina pelos nervos adrenérgicos deprende-se de vários tipos de experiências: em um deles noradrenalina radioactiva (H^3) é injectada no animal, demonstrando-se a sua maior concentração no baço. A estimulação dos nervos adrenérgicos esplénicos provoca então a libertação de $NA-H^3$. Esta experiência mostra também que a NA recentemente captada em um nervo é mobilizada de preferência à existente há mais tempo. Experiências de perfusão do coração mostram também a deposição de $NA-H^3$ neste órgão. A captação de aminas pelos nervos adrenérgicos é um processo activo, que requiere uma fonte de energia e equilíbrio iónico adequado (Axelrod (110)).

Nos capítulos seguintes retomaremos alguns destes pontos.

CAPÍTULO VII

O EFEITO DE ALGUNS AGENTES FARMACOLÓGICOS SOBRE AS FUNÇÕES SINÁPTICAS

Grundfest em 1964 (169) comentando as bases teóricas da acção dos agentes farmacológicos sobre o sistema nervoso central, referia-se ao facto de a sinapse ser raras vezes mencionada em trabalhos referentes a este assunto. O autor aborda o problema do ponto de vista electrofisiológico. Chama a atenção para a dificuldade destes estudos no sistema nervoso central onde a organização sináptica é complexa, podendo cada neurónio individual receber terminações nervosas excitatórias e inibitórias, e onde o mesmo intermediário (noradrenalina por exemplo) pode deslocar o potencial pós-sináptico no sentido inibitório (hiperpolarização), ou excitatório (despolarização).

O uso dos potenciais evocados não permite a análise detalhada das respostas de neurónios individuais e muito menos dos múltiplos contactos sinápticos que ocorrem em cada célula. O uso dos eléctrodos de Salmoiraghi, já referido, permite uma aproximação grosseira, embora, do

desiderato de estudar cada sinapse individualmente. O método, que envolve a passagem de corrente eléctrica através de micropipetas inseridas no córtex, introduz talvez demasiadas variáveis no problema. As correntes usadas para a aplicação iontoforética das drogas a estudar podem por si próprias alterar a resposta eléctrica da célula a estudar. O diâmetro mínimo das micropipetas usadas é de 1 micra, e a sua localização não pode ser exactamente controlada (170). Estamos pois longe de conseguir uma análise dos fenómenos intra-sinápticos por este meio. Na impossibilidade de uma abordagem directa ao problema da acção das drogas sobre as sinapses centrais, os autores procuraram deduzir o local pré- ou pós-sináptico da sua actuação, valendo-se de conceitos geralmente aceites para o sistema nervoso periférico, e de observações de natureza bioquímica. Assim, e pelo que respeita aos neurolépticos clorpromazina e haloperidol, vários autores mostraram que em diversas espécies de animais se observava um aumento da concentração de ácido homovanilmandélico (metabólito da dopamina) e de ácido dihidroxifenilacético (derivado da noradrenalina) nos centros do sistema extrapiramidal, especialmente no núcleo caudado, após tratamento por essas drogas (171), (172), (173) e (174).

A interpretação oferecida pelos autores (Pletscher e da Prada (172)), Van Rossum (174)), consiste em atribuir a estes medicamentos uma acção bloqueadora sobre possíveis receptores dopaminérgicos e adrenérgicos presentes no sistema nervoso central. O aumento da concentração dos derivados metabólicos exprimiria uma estimulação do metabolismo das aminas consideradas. Esta estimulação seria o resultado de um mecanismo de retroacção desencadeada pela ausência ou diminuição da concentração do intermediário químico no receptor pós-sináptico.

O conteúdo do cérebro em catecolaminas ou serotonina não é afectado de modo significativo por estas drogas (175) o que implica necessariamente uma estimulação da sua síntese. Numerosas observações são interpretadas à luz deste conceito. Carlsson e Lindqvist em 1963 notaram que a clorpromazina e o haloperidol (butirofenona), duas drogas de diferente estrutura, mas acção clínica semelhante, tinham ambas o efeito de intensificar a acumulação de normetanefrina e 3-metoxi-tiramina (derivados metabólicos das catecolaminas por O-metilação) provocada pela inibição da monoamino-oxidase. O nível das catecolaminas cerebrais não era alterado. Os autores parecem ter sido os primeiros a referirem-se à possibilidade da existência de uma estimulação da sua síntese. Esta estimulação da síntese das monoaminas estaria ligada a uma «activação neuronal» provocada por um bloqueio do receptor pós-sináptico.

Corrodi, Fuxe and Hökfelt em 1967 (177) demonstram uma diminuição acentuada da fluorescência de terminações aminérgicas do cérebro do rato após tratamento pelo haloperidol ou clorpromazina. Esta diminuição de intensidade de fluorescência porém só era demonstrável se os animais fossem previamente tratados com a droga designada por H 44/68 (metilester de *D*- α -metiltirosina), um inibidor da tirosina hidroxilase. A análise química dos tecidos confirma que, em animais tratados pelo inibidor enzimático, se assiste a uma depleção do cérebro em dopamina e noradrenalina que se torna mais acentuada quando se administram os citados neurolépticos a esses animais.

No mesmo trabalho (177) os autores referem-se à intensificação da fluorescência dos corpos celulares observada nessas experiências, contrastando com a sua diminuição nas terminações. Este fenómeno é interpretado como um aumento da síntese a nível do perikarion, compensatória da depleção distal. Esta depleção, como já foi dito, é interpretado como devida a um hiperfuncionamento neuronal, que aliás não aparece documentada pelos métodos neurofisiológicos usuais. Em 1970 o autor reitera os seus argumentos (178) estendendo as mesmas técnicas e considerações a outros neurolépticos; spiroperidol (derivado butirofenónico), perfenazina, clotiapina. As monoaminas afectadas eram, como anteriormente, a noradrenalina e a dopamina. O uso de um inibidor da triptófano hidroxilase (H₂₂/54) e a administração subsequente dos mesmos medicamentos não provocou alterações nos níveis de serotonina. Parece concluir-se que os neurolépticos não afectam o metabolismo da via triptófano-serotonina, nestas experiências.

Anden e Hökfelt em 1967, trabalhando com o «rato espinhal» haviam já notado que a CPZ e o haloperidol acentuavam a diminuição da concentração em noradrenalina dos tecidos neurais induzida pelo tratamento prévio com alfametiltirosina. Este efeito só era demonstrável na porção cranial da medula seccionada. O bloqueador beta-adrenérgico H 56/28 provocava efeito semelhante e os autores concluem pela similitude de acção dos neurolépticos e do bloqueador beta-adrenérgico (179) e pela necessidade da integridade da função neuronal para que se manifestem estes fenómenos.

A desapareção das catecolaminas após inibição da tirosina hidroxilase na porção cranial da medula seccionada do rato fora aliás notada por Anden, Corrodi, e outros em 1966 (180). Estes autores notaram também que após cessação do efeito do inibidor enzimático se assistia a um reaparecimento precoce da fluorescência característica das catecolaminas nos corpos celulares dos neurónios da porção cranial destas pre-

parações. Conclui-se pelo papel preponderante do perikarion na síntese das catecolaminas.

A estimulação da síntese amínica a nível do corpo celular pela acção dos neurolépticos sobre o complexo sináptico levanta o problema da organização espacial das reacções químicas pertinentes, assunto que está fora do âmbito deste trabalho.

K. F. Gey e A. Pletscher em 1968 (181) referem que no rato tratado com clorpromazina se observa uma aceleração da conversão da tirosina C^{14} injectada por via subcutânea em dopamina C^{14} medida no cérebro. A actividade específica da noradrenalina não sofre porém alterações significativas. Quando ao animal se injecta DOPA $-C^{14}$, o tratamento subsequente com CPZ provoca uma acentuação da desparição da dopamina $-C^{14}$, e também, em menor grau da noradrenalina. O nível de DOPA C^{14} não sofre alterações apreciáveis. Os autores interpretam os seus dados em função do conceito do bloqueio pós-sináptico, que provocaria uma aceleração do catabolismo da dopamina.

O efeito sobre a noradrenalina (aceleração do catabolismo) é muito menos acentuado.

A CPZ nestas experiências não acelerava a conversão de DOPA C^{14} em dopamina C^{14} . O efeito da CPZ parece portanto exercer-se sobre a conversão da tirosina em DOPA (aumentando as disponibilidades desta e subsequentemente a concentração da dopamina nos tecidos) e sobre o catabolismo da dopamina (conversão em ácido homovanílico) e da noradrenalina (este em menor grau).

Na mesma linha de investigações Nyback e Sedvall em 1970 (182) estudam os efeitos dos vários derivados fenotiazínicos sobre a taxa de diminuição de concentração de dopamina C^{14} e noradrenalina C^{14} provenientes de uma única injeção endovenosa de tirosina $-C^{14}$ no rato. Verificaram que os derivados fenotiazínicos com acção neuroléptica (clorpromazina, levomepromazina, perfenazina), aceleravam esse processo o que se não verificava com a droga promazina, fenotiazina não neuroléptica. As drogas com acção neuroléptica mais pronunciada afectavam acentuadamente a dopamina. As drogas de efeito mais sedativo afectavam sobretudo a noradrenalina. Em experiência de perfusão contínua com tirosina C^{14} mostraram os mesmos autores a formação de noradrenalina $-C^{14}$ e dopamina C^{14} a nível do cérebro. A sua concentração aumentava com o tempo, mostrando que a síntese amínica excedia a sua degradação. A acumulação das duas aminas

era positivamente influenciada pelos neurolépticos usados, observando-se uma maior influência dos neurolépticos mais potentes sobre a dopamina e das drogas de efeito mais acentuadamente sedativo sobre a noradrenalina. Deduzem os autores a existência de um processo de estimulação da síntese amínica e de uma aceleração do seu metabolismo que seriam devidos a um bloqueio dos receptores aminérgicos pós-sinápticos.

Os trabalhos de Glowinski e seus colaboradores confirmam estas conclusões, utilizando técnicas diversas. Estes autores medem as variações da quantidade de aminas libertadas de estruturas anatómicas bem definidas, sob a acção de vários agentes farmacológicos. Assim, Cheraamy, Besson e Glowinski (183) incubando cortes de núcleo estriado com tirosina — H^3 verificaram a acumulação de dopamina H^3 nos tecidos e a sua libertação no meio de incubação. Em ratos tratados previamente com tioproperazina (Majeptil-R) a acumulação de dopamina H^3 nos tecidos neurais e no líquido de incubação era significativamente superior relativamente aos animais testemunhos, não tratados.

Observava-se efeito semelhante, mas muito menos acentuado, em animais previamente tratados com clorpromazina.

Javoy, Hamon e Glowinski utilizando uma técnica de micro-injecção estereotáxica injectaram tirosina — H^3 no núcleo caudado, no «locus niger», ou no núcleo ventro-medial do hipotálamo do rato. Não se observou difusão da tirosina injectada, que foi metabolizada «in situ». A formação de catecolaminas a partir de tirosina era cerca de 6-5 vezes mais intensa no núcleo caudado que no núcleo hipotalâmico. As catecolaminas do núcleo caudado eram constituídas por dopamina, que apresenta um tempo de semivida de 105 minutos.

No hipotálamo, 75 % da radioactividade era constituída por noradrenalina — H^3 .

O tratamento prévio com tioproperazina aumentava a concentração de dopamina — H^3 tanto no «locus niger» como no núcleo caudado, significando uma estimulação da sua síntese nos neurónios nigro-estriados dopaminérgicos, que segundo os autores seria compatível com o conceito, já tantas vezes citado, de bloqueio pós-sináptico.

Glowinski na sua revisão (185) de 1970 retoma este tema, introduzindo uma nova técnica a que já fizemos referência — a lavagem de uma zona delimitada do núcleo caudado «in situ» e «in vivo» com uma corrente contínua de soro fisiológico (por meio da chamada cânula de Mitchell), que permite a administração de substâncias a estudar «in loco» e a recolha de produtos no efluente. De novo se observa um

aumento de aminas biogénicas sob a influência de drogas com efeito neuroléptico.

O indeterminismo da interpretação proposta dos dados experimentais torna-se perceptível se considerarmos os trabalhos de Scatton, Cheramy, Besson e Glowinski utilizando o antiparkinsoniano «amantadina». A técnica utilizada consistia em injectar os animais com L-amantadina sob a forma de cloridrato na dose de 40 mgs/kilo de peso, e em examinar duas horas depois a capacidade de fragmentos do núcleo estriado dos animais tratados para transformar a tirosina —H³ em dopamina —H³.

Observaram os autores um aumento da acumulação de dopamina nos tecidos e no meio de incubação relativamente a preparações idênticas de animais não tratados, descrevendo um aumento de síntese e da libertação da dopamina sob o efeito da droga nos neurónios dopaminérgicos. Não concluem porém pela existência de um bloqueio pós-sináptico, propondo em vez disso a existência de um bloqueio do processo de inactivação da amina libertada por captação neuronal, o que se traduziria por um aumento da concentração da dopamina no meio de incubação (e, por inferência, nos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos) (186).

A. Tagliamonte, P. Tagliamonte e C. L. Gessa (142), estudando a acção da clorpromazina no cérebro do coelho chamam a atenção para a depleção em dopamina observada nos gânglios cinzentos da base, acompanhada de um aumento simultâneo do conteúdo destes núcleos em ácido homovanílico. Este efeito era também observável no córtex e no tronco cerebral. Paralelamente, o derivado da dopamina por oximetilação, 3-metoxitiramina, diminuía também a sua concentração nos tecidos. Se aos animais tratados com clorpromazina se injectasse simultaneamente um inibidor da monoaminoxidase, assistia-se a uma elevação espectacular do derivado oximetilado (3-metoxitiramina). Estas acções são em tudo semelhantes às que se observam após tratamento com reserpina, em vez de clorpromazina. A interpretação mais consentânea com os factos, segundo os autores, consistiria em admitir que a clorpromazina, como a reserpina, destrói ou diminui a capacidade de armazenamento da dopamina nos grânulos citoplasmáticos. A amina fica assim exposta à monoaminoxidase intracelular produzindo-se preferentemente o derivado por desaminação. A inibição de monoaminoxidase provoca uma sobrecarga de amina intracelular que extravasando-se fica sujeita à acção da catecoloximetil-transferase extracelular. O ponto de partida do estímulo desencadeador da activação da síntese amínica

seria pois intracelular e não seria necessária a hipótese de um bloqueio pós-sináptico.

Gey e Pletscher em 1961 (175) haviam proposto mecanismo até certo ponto semelhante para explicarem a acção frenadora da clorpromazina e clorprotioxeno sobre a libertação de aminas biogénicas provocadas pela reserpina.

Os neurolépticos anulariam ou diminuiriam a passagem de aminas biogénicas através da parede da vesícula, dificultando a acção libertadora da reserpina.

Axelrod e outros já em 1962 haviam notado que o tratamento com clorpromazina e imipramina reduzia a quantidade de noradrenalina — H^3 fixada no coração do rato após injeccção endovenosa. Este efeito só aparecia se as drogas fossem administradas antes da injeccção de noradrenalina — H^3 . Pelo contrário a reserpina provocava uma diminuição do conteúdo cardíaco em noradrenalina — H^3 quer fosse administrada antes ou depois da noradrenalina. Parece portanto que no sistema nervoso simpático-cardíaco a clorpromazina e a imipramina bloqueiam a captação da amina pela parede dos neurónios, mas não influenciam a libertação da amina. A reserpina (e também a tiramina e oxibenzamina) provocavam o egresso das aminas dos seus locais de armazenamento (187).

H. Thoenen, Hurlimann e Haefely demonstraram o mesmo fenómeno em experiências de perfusão do baço isolado do gato com noradrenalina — H^3 . A concentração desta amina no efluente venoso aumentava notavelmente quando ao perfusado se juntava clorpromazina. Nestas preparações, as concentrações baixas de clorpromazina provocavam um aumento da noradrenalina endógena no efluente venoso (significando um bloqueio do mecanismo inactivador da amina por captação no tronco nervoso). No entanto, para concentrações maiores de clorpromazina a quantidade de noradrenalina endógena no efluente venoso diminuía bruscamente. As concentrações maiores de clorpromazina alteram portanto também o mecanismo de libertação da amina (188).

No cérebro intacto do rato, Glowinski e Axelrod (189) conseguiram mostrar que a imipramina, mas não a clorpromazina diminuía a captação pelo cérebro da noradrenalina — H^3 injectado no ventrículo lateral. É interessante notar que outras drogas dotadas de efeito antidepressor na clínica humana exibiam efeito semelhante no cérebro do rato — desmetilimipramina, amitriptilina. Pelo contrário, compostos derivados da imipramina, estruturalmente muito próximos, mas sem acção antidepressora não mostravam efeito inibidor sobre a captação de noradrenalina pelo cérebro.

Como no sistema nervoso periférico o bloqueio da captação axonal é acompanhada de um aumento da actividade fisiológica da noradrenalina (189) concluem os autores que algo de semelhante se passa a nível do sistema nervoso central explicando-se assim o efeito antidepressivo destes medicamentos. Outros autores descrevem um efeito dos antidepressores deste grupo (imipramina) sobre o metabolismo da serotonina (190) traduzindo-se por um alongamento do tempo de eliminação após uma injeção intracerebral da amina.

Os autores supõem que a acção da imipramina consiste em dificultar a libertação (e promover a captação) da serotonina pelos grânulos de armazenamento, prolongando assim a sua presença no cérebro.

A aplicação dos métodos de ultracentrifugação diferencial com o seu auxiliar obrigatório — a microscopia electrónica — ao estudo destes problemas tem despertado o interesse de vários autores. Assim Coule e Snyder em 1969 (191) estudam o efeito de vários medicamentos anti-parkinsonícos de uso corrente (Cogentin, Artane, Disipal, Benadryl, etc.) sobre a captação de dopamina por uma suspensão de sinaptosomas obtidos do corpo estriado ou do hipotálamo do rato. Os medicamentos tinham uma acentuada acção inibitória sobre a fixação da dopamina pelos sinaptosomas derivados do corpo estriado. Os autores pensam que esta inibição da captação provoca uma maior concentração de dopamina nos receptores pós-sinápticos dopaminérgicos. Daí a sua eficácia clínica na doença de Parkinson, onde existe depleção desta amina. Usando uma técnica semelhante, Symchowicz, Korduba e Veals demonstraram que uma droga com propriedades anti-histamínicas, a clorfeniramina, também inibia a fixação de dopamina nos sinaptosomas do corpo estriado do rato (192). Os autores sugerem que essa droga pode ser útil no controlo dos sintomas da doença de Parkinson.

A fixação de narcóticos no sistema nervoso central tem sido estudada por estes meios. Hub e Oka (193) demonstram que a droga dihidromorfina presente em meios de incubação contendo sinaptosomas, ou outras fracções subcelulares derivadas do córtex cerebral do rato, se acumulava preferentemente nos sinaptosomas, e mais acentuadamente ainda, em uma fracção contendo vesículas sinápticas. Os autores, porém, neste trabalho, não estudam o efeito desta droga sobre os presumíveis mediadores químicos centrais. Mais directamente relacionados com os nossos trabalhos são as observações de Burton (194) sobre a distribuição da reserpina nas fracções subcelulares do cérebro do rato. Nestes trabalhos foi injectada reserpina marcada (reserpina — H^3) por via intraperitoneal em ratos, que foram decapitados durante o período de sedação.

Após fraccionação do cérebro notou-se que a maior parte da radioactividade se localizava nas fracções solúveis. A fracção R_3 contendo predominantemente terminações nervosas continha 6% da radioactividade total. A fracção contendo vesículas sinápticas exhibia também radioactividade, embora em proporções muito pequenas. A quantidade total de reserpina presente na fracção vesicular era de 3×10^{-14} moles, «claramente insuficiente para deslocar o intermediário químico por uma substituição directa, molécula a molécula».

A libertação das aminas pela reserpina será portanto devida a uma acção da reserpina sobre um mecanismo ainda desconhecido de retenção amínica. O mesmo autor pôde verificar (195), que a reserpina não afectava a incorporação do fosfato marcado (P^{32}) nos fosfolípidos, da glucose $-C^{14}$ nos glicolípidos ou de colina $-C^{14}$ nos lípidos contendo colina, não sendo portanto explicável a sua acção por uma interacção com estes componentes celulares.

Parece portanto que a queixa de Grundfest (169) não terá mais razão de ser havendo um esforço no sentido de descrever a acção das drogas psicotrópicas a nível das estruturas sinápticas.

Nesse sentido orientamos a nossa contribuição pessoal.

CAPÍTULO VIII

OS MÉTODOS DE ULTRACENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL E ALGUNS DOS SEUS RESULTADOS. ESBOÇO DE ORGANIZAÇÃO DA REGIÃO SINÁPTICA

Em páginas anteriores focou-se por mais de uma vez a importância e alguns dos resultados obtidos com os métodos de ultracentrifugação diferencial. Interessa aqui examinar com mais detalhe essa técnica, seus resultados e comentar algumas das suas limitações. A literatura pertinente é vastíssima e nós limitar-nos-emos a rever alguns dos aspectos que nos pareceram mais importantes e atinentes aos nossos trabalhos.

A) — MÉTODO.

Essencialmente o método consiste em homogeneizar o órgão a estudar (o cérebro no nosso caso), utilizando para isso uma modificação do tradicional almofariz.

Existem vários modelos de homogeneizadores mas os mais comuns consistem em um tubo de vidro resistente contendo um pistão do mesmo material ou de plástico (teflon). A diferença entre o diâmetro interno do tubo e o diâmetro externo do pistão é variável com os modelos utilizados, e é um factor muito importante na qualidade dos resultados obtidos. Whittaker usava homogeneizadores com uma folga de 0,025 cm (111). O pistão faz movimentos de rotação e excursão no sentido do eixo do tubo, e o movimento de rotação pode ser imprimido por um motor ou manualmente.

O número destas excursões deve manter-se constante em experiências sucessivas. Em muitas experiências de fraccionamento do cérebro este número é de 10.

O movimento rotatório não vem muitas vezes especificado. Whittaker utilizando um rotor mecânico menciona (111) o número de 840 rotações por minuto.

O tecido a homogeneizar é colocado no tubo com uma certa quantidade de um soluto de sacarose 0,35 ou 0,32 mol. adicionado ou não de electrólitos, eserina, etc. (10 c. c. por grama de tecido, em regra). Obtida uma homogeneização satisfatória o conteúdo do tubo é colocado em um ou mais tubos de centrífuga e centrifugado a baixa velocidade durante alguns minutos (900 G—durante 10 minutos por exemplo, sendo G a força da gravidade) (112).

Como resultado, obtém-se um sedimento separado do líquido sobrenadante. Esta operação pode repetir-se, utilizando o sedimento, suspendendo novamente em sacarose e voltando a centrifugar nas mesmas condições. Os sedimentos provindos destas centrifugações iniciais constituem a chamada «Fracção Nuclear» (N) de De Robertis (112), ou «Fracção P¹» de Whittaker (113) e contém predominantemente núcleos celulares, fragmentos de células, eritrócitos, fragmentos de vasos.

O líquido sobrenadante destas primeiras centrifugações é decantado para novos tubos e novamente centrifugado a velocidades superiores e durante mais tempo (20 minutos/11 500 G, 55 minutos (17 000 G)). Resulta um novo sedimento e um novo sobrenadante. O novo sedimento recebeu a designação de «Fracção Mitocondrial» (M), na técnica de Robertis ou de «Fracção P²» na técnica de Whittaker. As duas designações embora homólogas não são exactamente equivalentes. A fracção «M» provém de uma centrifugação a 11 500 G durante 20 minutos, enquanto «P²» provém de uma centrifugação a 17 000 G durante 55 minutos.

Durante algum tempo a fracção «M» ou «P²» foi tratada como se efectivamente contivesse apenas mitocôndrias. O sobrenadante de «M»

ou «P²» submetido a novas centrifugações e a velocidades sucessivamente maiores (da ordem dos 10⁵ G durante 60 minutos) permite obter novos sedimentos contendo predominantemente os chamados «microsomias», que se interpretam como canalículos do retículo endoplásmico cujas paredes colapsaram formando microvesículas, e os ribosomas que se desprendem do sedimento anterior, após nova centrifugação.

A fracção «M» ou «P²», chamada «mitocondrial» pode ser separada em vários constituintes, utilizando uma técnica especial consistindo em colocar a suspensão de «M» ou «P²» em sacarose 0.32 ou 0.55 molar na superfície de um gradiente de sacarose.

Este gradiente é formado por camadas sucessivas de soluções de sacarose de concentrações diferentes. Na técnica de Whittaker usam-se duas camadas: 0.8 molar sobre 1,2 molar. Na técnica de De Robertis usam-se 4 camadas: 1,4; 1,2; 1,0 e 0,8 molar, sendo a suspensão de «M» em sacarose 0.32 molar colocada sobre a camada 0.8 molar.

Após centrifugação destes tubos a alta velocidade (50 000 G durante 2 horas), verifica-se que nas várias interfases acumulam faixas de aspecto leitoso, enquanto no fundo se acumula um sedimento de aspecto acastanhado. Acima da sacarose 0.8 molar aparece uma camada branca brilhante. Esta é constituída predominantemente por melina. No sedimento predominavam as mitocôndrias. Na técnica de Whittaker a camada intermediária contém principalmente sinaptosomas (114).

Whittaker designou as suas camadas por A (mielina), B (sinaptosoma) e C (mitocôndrias).

Nos gradientes de De Robertis aparecem 5 camadas: A (acima da sacarose 0.8 molar) contém mielina; E (no fundo do tubo), é constituído por mitocôndrias. As camadas intermediárias B (acima de 1,0 M sacarose); C (acima da camada de 1,2 M) e D (acima da camada de sacarose 1,4 M) contém terminações nervosas, mostrando vesículas sinápticas no seu interior. A fracção D é a mais rica em terminações nervosas.

Dado o interesse despertado pelas vesículas sinápticas procuraram os autores libertá-las do interior das terminações nervosas. A técnica utilizada consiste em suspender a fracção mitocondrial «M» em água destilada.

Esta entra por osmose dentro dos sinaptosomas provocando a sua lise. Nova centrifugação permite obter um sedimento rico em mitocôndrias e uma fracção líquida sobrenadante. A centrifugação desta permite obter como sedimento a chamada fracção M₂, rica em vesículas sinápticas e contendo também numerosas membranas, presumivelmente de origem sináptica (De Robertis (115)). A fracção M₂ colocada

em um gradiente de sacarose em duas camadas (0.32 M sobre 0.5 M) e submetida a nova centrifugação desdobra-se em um sedimento e uma faixa esbranquiçada colocada em interfase 0.32 M/0.5 M. Esta faixa, aspirada, suspensa em sacarose e novamente centrifugada, constitui a fracção M_2A , enriquecida em vesículas sinápticas. O sedimento extraído do fundo do tubo e submetido a tratamento semelhante permite-nos obter uma preparação enriquecida em membranas sinápticas (116). Whittaker preparou métodos semelhantes a partir da sua fracção P_2 contendo sinaptosomas (117) (118).

Várias modificações deste método permitem separar e purificar mielina (119) e (120), núcleos celulares (a partir da fracção nuclear de De Robertis (121)), lisosomas (167).

A fracção B (ou P_2B) pode ser subdividida em vários componentes isolando-se dela fragmentos de axónios desmielinizados pré-terminais (122). O uso de um gradiente de cloreto de cézio para purificar uma preparação de terminações nervosas é referido por Kornguth e outros. A comparação dos resultados deste método com a centrifugação em gradientes de sacarose sugere que este dissacarídeo é importante para a manutenção da estrutura das membranas sinápticas. Na sua ausência os proteolípidos não se conservam nos complexos sinápticos (123).

O efeito dos iões cálcio contidos nos solutos de sacarose foi estudado por Trotter e Burton entre outros (118).

Em experiência de separação de vesículas sinápticas pelo método atrás descrito (Lapetina (116)) verifica-se que dentro de certos limites uma concentração maior de cálcio facilita a migração das membranas sinápticas para o sedimento no fundo do tubo.

A acetilcolinesterase sofre deslocação concomitante. Com $[Ca^{++}] = 0$ encontram-se numerosas membranas e forte actividade esterásica na zona do tubo acima de M_2A . Com $[Ca^{++}] = 10^{-5}$ M esta actividade diminui aumentando a actividade no sedimento M_2B . A actividade acetilcolinesterásica de M_2A (vesículas) mantém-se constante durante esta variação de $[Ca^{++}]$, e desce bruscamente com $[Ca^{++}] = 10^{-3}$ M, aumentando concomitantemente a actividade enzimática de M_2B .

Os autores chamam a atenção para a facilidade em cometer erros na atribuição de uma topografia precisa a este enzima, e na necessidade de usar condições experimentais rigorosamente controladas.

A identificação das diferentes fracções faz-se pela microscopia electrónica e pela identificação de componentes química ou enzimas característicos de diferentes organelos. Assim a pureza de uma preparação

de núcleos celulares é aferida pelo conteúdo de fracção em D N A, as mitocôndrias são caracterizadas pela desidrogenase succínica, as membranas pela A T Pase dependente de Na^+ e K^+ (126), etc.

B) — DADOS SOBRE A ORGANIZAÇÃO QUÍMICA DA SINAPSE.

1 — Acetilcolina

Um dos primeiros problemas abordados por estes métodos foi o da localização da acetilcolina na terminação nervosa. Whittaker (111) em 1959 descreve a obtenção de acetilcolina e partir de sua fracção P_2 .

Os solutos hipotónicos, congelação e descongelação sucessivas e agitação mecânica libertavam 50 % da acetilcolina total contida nas fracções. Esta é considerada acetilcolina «Lábil». Outros 50 % são libertados pelo aquecimento a 37°C , tratamento com ácidos (pH 2,4) ou tratamento pelos solventes orgânicos. Foi considerada acetilcolina «fixa». O autor observou que a acetilcolinesterase, não tinha acção sobre a acetilcolina (ACH) presente nas partículas P^2 a não ser que estas fossem submetidas a choque osmótico. Concluiu pela existência de acetilcolina em solução dentro das vesículas sinápticas das quais seria libertada pelo choque osmótico (A C H lábil,) e A C H ligada à matriz da vesícula só separável por métodos violentos (A C H fixa).

Da descrição do autor conclui-se, porém, que as suas observações incidiram não sobre vesículas sinápticas mas sobre sinaptosomas que constituem parte importante da fracção P_2 .

A esta mesma conclusão chega Whittakar que em 1969 (124) revê os seus trabalhos até essa data e descreve a localização da acetilcolina «fixa» nas vesículas sinápticas, acetilcolina «lábil» no citoplasma do sinaptosoma e acetilcolina «divre» contida no citoplasma dos corpos celulares. Aduz argumentos a favor da existência de A C H «Lábil» na membrana externa do sinaptosoma. De Robertis em 1962 (112) discute a localização subcelular da acetilcolinesterase, demonstra a sua associação com terminações nervosas colinérgicas, identifica a presença de uma população de terminações não-colinérgicas (fracção D), e conclui não ser possível decidir pela localização pré- ou pós-sináptica do enzima. Rodriguez de Lorez Arnaiz (125) em 1967 descreve novamente associação de A C H-esterase com fracções membranosas sinápticas. Estuda também a presença da glutamina-sintetase, monoamino-oxidase e uma nitrofenolfosfatase, concluindo existirem quantidades significativas destes enzimas nas terminações sinápticas. Lapetina (116) em 1967

volta a descrever a associação da acetilcolinesterase (A CH-E) com uma fracção membranosa do S. N. C. rica também em gangliosídeos.

Como já referimos, Trotter e Burton (118) retomam este tema, chamando a atenção para o efeito do cálcio, em cuja ausência as fracções membranas sinápticas mostram pouca actividade A C H-esterásica e pequena concentração de gangliosídeos.

De Robertis em 1963 (115) descrevera já a presença de colina-acetilase e acetilcolina na fracção M_2 (contendo vesículas sinápticas). Propõe uma organização estrutural com o enzima necessário à síntese da A C H (colina-acetilase) topograficamente muito próxima da A C H, ambos localizados na vesícula sináptica, e o sistema inactivador situado na membrana pré- e/ou pós-sináptica.

Trabalhos recentes de Fonnum voltam a referir a presença de colina-acetilase (colina-acetiltransferase) em populações de terminações nervosas onde também se encontra A C H-esterase (hipocampo do gato).

A ultracentrifugação diferencial desta estrutura revela a presença de ambas enzimas (P_2B de Whittaker). Os autores não isolaram vesículas sinápticas mas notaram predomínio da A C H-esterase em uma subfracção de P_2B contaminada com membranas (127). O mesmo autor verificara anteriormente que a colina-acetiltransferase tinha uma distribuição variável entre fracções vesiculares e fracções membranas segundo as espécies animais estudadas e a presença ou ausência de certos iões (128).

A capacidade de os sinaptosomas sintetizarem acetilcolina a partir da colina foi demonstrada por vários autores (129). A acetilcolina assim sintetizada pode ser libertada aumentando a concentração do K^+ extracelular, que tem também o mesmo efeito na junção neuromuscular. A injeção endovenosa de colina radioactiva no rato é seguida de síntese de A C H nas terminações nervosas. A incubação de uma preparação de sinaptosomas com colina $-C^{14}$ é seguida do aparecimento de acetilcolina $-C^{14}$ nas vesículas sinápticas. Na mesma preparação, substituindo a colina $-C^{14}$ por acetilcolina $-C^{14}$ no meio de incubação observa-se a presença de acetilcolina marcada nas vesículas sinápticas em quantidade 10 vezes menor. Os autores concluem que a vesícula sináptica tem a capacidade de sintetizar acetilcolina (145), a partir da colina, e não apenas a de fixar a acetilcolina já sintetizada e existente no axoplasma da terminação nervosa.

Já foram mencionados os trabalhos de De Robertis, procurando isolar um receptor colinérgico pós-sináptico no sistema nervoso central (93). Hauser, Phillips e Marchbanks (130), fazem porém notar que

é possível isolar das membranas sinápticas do cérebro da cobaia lipoproteínas e lípidos, que exibem afinidade para a D-tubocurarina e atropina mas não para a acetilcolina. Não consideram pois justificável a atribuição de um papel de receptor a uma estrutura baseada apenas na afinidade desta para os antagonistas da acetilcolina.

2 — Catecolaminas, Serotonina, outros possíveis intermediários

Outras substâncias consideradas como possível mediadores químicos têm sido separadas do S N C por estes processos. Por exemplo, Iversen e Snyder separaram duas populações de sinaptosomas, a partir do núcleo estriado e hipotálamo do rato, contendo noradrenalina, dopamina ou ácido gama aminobutírico (131).

Estes autores incubaram fragmentos de cérebros de ratos (hipotálamo, núcleo caudado, putamen, globus pallidus) com misturas de catecolaminas e de ácido gama-aminobutírico marcadas com H^3 ou C^{14} . Após homogeneização e centrifugação diferencial conseguiram obter populações diferentes de sinaptosomas contendo uma ou outra das aminas ou o ácido gama-aminobutírico.

Kular, Shsekan e Snyder (133) por sua vez separaram do hipotálamo e mesencéfalo do rato, cobaia e hamster, populações de sinaptosomas contendo serotonina, noradrenalina ou ácido gama-aminobutírico. Estes resultados foram obtidos incubando fragmentos dos tecidos neurais das regiões mencionadas com serotonina, noradrenalina ou ácido gama-aminobutírico marcadas com o isotópo H^3 , submetendo depois esses fragmentos a centrifugação diferencial e isolando os sinaptosomas.

As observações mostram que as aminas exógenas são captadas e se distribuem nos tubos de centrifugação nas mesmas camadas onde se encontram as aminas endógenas.

Os mesmos autores comentam que esta captação de aminas exógenas (especialmente serotonina) só é específica para concentrações baixas das aminas marcadas no meio de incubação. Concentrações elevadas de uma das aminas tende a tornar a captação inespecífica, estendendo-se a outras populações de sinaptosomas.

Referindo-se especificamente ao caso da serotonina, e comentando observações anteriores, os autores chamam a atenção para o facto de a captação desta indolamina não ser afectada pela 6-hidroxiopamina quando a sua concentração no meio é da ordem de 10^{-7} M.

Acima desta concentração de serotonina a sua captação é afectada negativamente pelo tratamento prévio dos animais com 6-hidroxido-

pamina. Como esta substância destrói as terminações catecolaminérgicas concluem os autores que acima da concentração referida há uma captação de serotonina por terminações nervosas que habitualmente não contém esta indolamina.

Os enzimas necessários ao metabolismo das aminas biogénicas encontram-se todos nas fracções subcelulares contendo sinaptosomas como já dissemos. No entanto a sua localização intra-sináptica não está completamente esclarecida. Pelo que respeita à triptófano-hidroxilase, Grahame-Smith descreve e demonstra a capacidade dos sinaptosomas de sintetizarem serotonina (5-hidroxitriptamina) a partir do L-triptófano, tendo o 5-hidroxitriptófano como intermediário. A cinética da captação do L-triptófano pelo sinaptosomas pressupõe a existência de um mecanismo de transporte activo inibido pelo cianeto e ouabaína, mas independente da $[Na^+]$, atingindo-se uma concentração dentro do sinaptosoma quádrupla da concentração no meio de incubação. A L-fenilalanina provocava inibição competitiva deste processo e vários outros aminoácidos presentes no interior ou no exterior do sinaptosoma interferem também com este mecanismo. O autor sugere que a regulação da síntese da serotonina poderia ser mediada pelo mecanismo de transporte de triptófano através da parede do sinaptosoma, uma vez que a enzima não parece ser saturável mesmo por concentrações elevadas de L-triptófano.

Uma outra forma de controlo da actividade é proposta por Macon, Sokoloff, e Glowinski. Estes autores, por seu lado, demonstraram em 1971 um declínio na síntese de H^3 5-hidroxitriptamina a partir do H^3 5-hidroxitriptófano injectado na cisterna magna de ratos tratados com inibidores da monoaminoxidase. A síntese «de novo» variava reciprocamente com o aumento da concentração da 5-hidroxitriptamina endógena. Os autores postulam a existência de uma inibição da actividade de triptófano hidroxilase pelo produto final de sua actividade — a serotonina. Em nenhum destes estudos, nem nas revisões colectadas por Efron (57) e (60), encontramos referência à localização deste enzima nos componentes sinápticos. A situação é um tanto diferente pelo que diz respeito à tirosina-hidroxilase.

Um trabalho de Fahn em 1969 (135) associa a tirosina-hidroxilase com uma preparação de vesículas sinápticas do núcleo caudado do boi. Os autores usam uma técnica de separação para os sinaptosomas empregando um gradiente em Ficol-sacarose (sendo o Ficoll um polisacarídeo de peso molecular elevado, usado em lugar da sacarose nestas técnicas). As vesículas foram separadas submetendo a choque osmótico a fracção

mitocondrial bruta, segundo De Robertis. A população de vesículas sinápticas parece notavelmente homogénea, apesar de não purificarem a amostra além de M_2 (De Robertis (115)). A tirosina-hidroxilase encontrava-se igualmente distribuída pelas fracções conteúdo sinaptosomas, com excepção de uma fracção «D» contendo sinaptosomas muito densos, logo acima do sedimento mitocondrial. Após choque osmótico a actividade de tirosina-hidroxilase expressa como actividade específica, isto é, em relação ao conteúdo de proteínas presentes nessa fracção, atingia o máximo na fracção M^2 . Outros enzimas presentes em M^2 eram a colina-acetiltransferase e a acetilcolina-esterase.

A dopa-descarboxilase, nestas experiências, atingia a maior actividade nas fracções líquidas «sobrenadantes», especialmente na fracção M^3 , sobrenadante a M^2 . De Robertis tinha já notado a presença deste enzima nas fracções solúveis, embora uma percentagem importante estivesse ligada a partículas sólidas.

A incubação de sinaptosomas contendo NA- H_3 , 5 HT- H_3 ou dopamina H^3 , em um meio rico em L-DOPA, provoca o efluxo das aminas marcadas. Adicionando um inibidor da Dopa-descarboxilase (alfa metil-dopahidrazina) este efeito deixa de se observar. Os autores concluem que os sinaptosomas sintetizam a Dopamina a partir de DOPA e que a Dopamina recém-sintetizada desloca as aminas dos seus locais de armazenamento. A localização intra-sinaptosómica destas reacções não é descrita (146).

A Dopamina-beta-hidroxilase apresenta a sua maior actividade no hipotálamo, núcleo caudado e bolbo, correspondendo em parte às regiões contendo noradrenalina (Mc. Ilwain (137)). No sistema nervoso periférico a dopamina-beta-hidroxilase tem sido isolada de granulações adrenérgicas e tem sido identificada uma forma solúvel e uma forma insolúvel. Durante a estimulação nervosa o enzima é libertado juntamente com as catecolaminas, tanto nas terminações nervosas periféricas como na medula supra-renal.

Após lesões hipotalâmicas, a actividade do enzima desce no córtex ipsilateral. Em animais tratados com 6-hidroxi-dopamina (que destrói as terminações adrenérgicas) a actividade da dopamina beta-hidroxilase desce 20% nas regiões atrás mencionadas (136). Também neste caso não encontramos referências específicas à distribuição intra-sináptica deste enzima no sistema nervoso central. Quanto aos enzimas monoaminoxidase e aldeído-desidrogenase já sabemos ser a sua localização mitocondrial. À catecol-oximetil-transferase, atribui-se uma localização extra-neuronal (139) e (140), em parte deduzido o facto de a administração

de noradrenalina por injeção sistêmica ser rapidamente seguida do aparecimento de metabólitos oximetilados (normetanefrina, metanefrina) nos tecidos. A noradrenalina retida no coração em experiências de perfusão é também libertada de forma multiexponencial, traduzido a existência de formas «lábeis» e «fixas» de localização neuronal da amina. Os metabólitos das formas fixas são predominantemente desaminados (ação da MAO). Os metabólitos das formas lábeis são derivados oximetilados (Axelrod, 139).

No entanto, pelo que respeita ao sistema nervoso central não conhecemos trabalhos localizando a COMT em estruturas pré- ou pós-sinápticas. A sua inibição pelo pirogalol aumenta a noradrenalina no ventrículo lateral e provoca o aparecimento de derivados oximetilados como os principais metabólitos. No entanto a velocidade da reação provocada pelas monoaminoxidases é cerca de 10 vezes maior que a oximetilação. É portanto de prever que este desempenhe papel secundário (Mc. Ilwain, 141) em condições idênticas de concentração e de acessibilidade ao substrato.

3 — Transporte transmembranoso das aminas biogénicas

A inactivação das aminas biogénicas por fixação nos neurónios e consequente degradação pela monoaminoxidase ou armazenamento nas vesículas e grânulos citoplasmáticos (142) pressupõe o transporte de amina através da parede neuronal. Este transporte foi demonstrado em sinaptosomas isolados do sistema nervoso central, por diversos autores (143). As condições experimentais consistem essencialmente em incubar os sinaptosomas em meios contendo as aminas marcadas com isótopos radioactivos, e subsequente centrifugação para isolar novamente os sinaptosomas. Os resultados mostram a importância do Na^+ , K^+ e Ca^{++} nestes processos.

Bogdanski *et al* (143,144), verificaram que a presença de Na^+ no líquido de suspensão dos sinaptosomas era importante para a captação e retenção da noradrenalina no sinaptosoma. Diminuindo a $[\text{Na}^+]$ aumentava o efluxo da noradrenalina.

Quanto à serotonina, verificaram os autores que a sua captação pelos sinaptosomas era também dependente de concentração de Na^+ e que incubando os sinaptosomas com esta indolamina na ausência de Na^+ quase não havia produção de ácido 5-hidroxitriptacético. Aumentando progressivamente a concentração de Na^+ os sinaptosomas metabolizavam a serotonina em quantidades cada vez maiores. A inibição da

monoaminoxidase nestas preparações com deficiência em Na^+ impedia como é de esperar a desaminação da 5-hidroxitriptamina conservando-se o bloqueio da captação. Conclui-se que a acção bloqueadora da deficiência em Na^+ não está dependente do metabolismo da serotonina intracelular, situando-se essa acção na membrana sináptica.

A acção do K^+ sobre a captação e libertação da noradrenalina ou serotonina é bimodal (143). Para uma concentração constante de Na^+ , o aumento progressivo de $[\text{K}^+]$ provoca primeiro um aumento e depois uma diminuição de captação e efluxo destas aminas. Para uma concentração constante de K^+ o aumento progressivo de $[\text{Na}^+]$ provoca uma diminuição do efluxo da amina. Supõe-se a existência de um antagonismo entre o Na^+ e o K^+ , a nível de um receptor comum (Bogdanski 143).

O Ca^{++} e Na^+ (Gage, 1967 in 143) mostram também antagonismo frente à libertação do intermediário químico na placa motora. Os iões Ca^{++} libertam o intermediário mais eficientemente em um meio pobre em Na^+ e, inversamente, o aumento da $[\text{Na}^+]$ tende a impedir a acção libertadora dos iões Ca^{++} . Os autores sugerem a extensão deste conceito ao sistema nervoso central e às aminas biogénicas. Bogdanski *et al.* (144) em uma análise mais detalhada da cinética da captação da N e 5-hidroxitriptamina pelos sinaptosomas do tronco cerebral do coelho demonstram a existência de um tipo de captação a baixas concentrações que é saturável e susceptível de ser descrito pelas equações de Michaelis-Menten. Acima de uma certa concentração a captação é linear, e corresponde a um simples processo de difusão, fenómeno já notado com preparações usando fragmentos de cérebro em lugar de sinaptosomas (133).

4 — Outros aspectos bioquímicos

Além dos presumíveis intermediários químicos e seus enzimas, e dos iões mencionados, muitas outras substâncias de interesse para o funcionamento da sinapse têm sido descritas.

a) *Proteínas.*

O conteúdo em *proteínas* e *lipídios* das membranas e vesículas sinápticas foi estudado por De Robertis, Burton e outros.

De Robertis (115) menciona para a fracção M_2 (vesículas sinápticas com algumas membranas) um conteúdo proteico de 4,29 mgr. por grama

de órgão fresco, mas em outras publicações da mesma escola este número é consideravelmente maior: 15 mg/grama (125). As técnicas de separação empregadas influem consideravelmente nestes valores (125). O conteúdo em proteínas das fracções contendo sinaptosomas intactos é também variável encontrando-se valores das ordens de 7,6 mgr. por grama de órgão fresco (115), 5,4 mg/gr., 2,47 mg/g. (116). Os resultados são variáveis conforme as técnicas utilizadas (125).

Dos números apresentados por Lapetina *et al* (116) conclui-se que a fracção M^2 contém 8,15 miligramas de proteína por grama de órgão fresco. Nas fracções M_2A e M_2B (vesículas sinápticas e membranas sinápticas) observa-se uma distribuição de proteínas contendo M^2A 56 % e M^2B 44 % do total. Não se refere porém, ao conteúdo em proteínas das fracções líquidas sobrenadantes às fracções vesiculares e membranosas. Trotter e Burton (118) apresentam os seguintes valores, em percentagem, do total de proteínas (obtido pela soma das determinações em cada uma das fracções de M_2 cujos valores absolutos não são mencionados):

M_2A -S (sobrenadante à faixa M_2A)	29,2 %
M_2A - (vesículas sinápticas)	36,3 %
M_2B -S (sobrenadante entre M_2A e M_2B)	3,7 %
M_2B - (membranas sinápticas)	30,6 %

Considerando como 100 % o valor mencionado em Lapetina (8,6 mg/grama) obteríamos:

M_2A -S	2,52 mg/grama
M_2A	3,18 mg/grama
M_2B -S	0,31 mg/grama
M_2B	2,5 mg/grama

Os resultados que nós próprios observámos são muito menores que os acima mencionados.

b) *Lípidos.*

O conteúdo de lípidos das fracções subcelulares, não mereceu a atenção dos pioneiros neste campo. Em 1964, Burton e Gibbons (147) estudam o conteúdo em lípidos de preparações de sinaptosomas e vesículas sinápticas. Os autores notam a presença de colesterol e lecitina em ambas as fracções; 43 a 45 % do peso dos materiais em estudo era constituído por lípidos. Destes, 22 a 28 %, eram gangliosídeos.

A possível importância desta observação será comentada depois. Kornguth (123) menciona para duas fracções contendo complexos sinápticos um conteúdo em fosfolípidos de 55 e 64 microgramas para 100 microgramas de proteínas.

Burton (148) apresenta algumas das suas observações sobre a composição em lípidos da terminação nervosa. O autor encontra diferenças entre ácidos gordos da molécula dos fosfolípidos (esfingomielina) presentes na mielina ou nas terminações nervosas e vesículas sinápticas. Nos sinaptosomas e vesículas predominam os ácidos gordos em C_{18} . Na mielina predominam os ácidos gordos de cadeia mais longa, C_{24} . Estas observações prendem-se com a propriedade de os fosfolípidos formarem camadas monomoleculares nas interfases (água-ar por exemplo), cujas características dependem em parte da porção hidrofóbica (ácidos gordos) da molécula fosfolipídica.

O aumento da cadeia hidrocarbonada implica uma maior resistência à penetração de moléculas através da camada monomolecular (Lakshminarayanaia H. (149).

A aplicação destes conceitos ao transporte iónico transmembranoso e aos mecanismos de transmissão sináptica está em estudo em vários centros.

Burton (148) descreve a presença de gangliosídeos nas terminações nervosas e vesículas mencionando-se a sua facilidade em formar micelas e a sua solubilidade na água e noutros lípidos. O autor propõe um modelo de vesícula sináptica (contendo acetilcolina) em cujas paredes entrariam gangliosídeos em percentagem importante.

A parede vesicular ao contacto com os componentes lipídicos da membrana pré-sináptica sofreria um processo de desagregação das moléculas de gangliosídeo, permitindo a libertação de acetilcolina através da membrana. A regularização da membrana provocaria uma repulsão dos restos da vesícula, afastando-se da membrana. A vesícula recompor-se-ia devido à agregação de moléculas de gangliosídeos, «procurando» a interfase entre o axoplasma interterminal e a matriz proteica da vesícula sináptica. A capacidade demonstrada pelos gangliosídeos de formarem ligações de baixa energia com as moléculas de acetilcolina e de colina completaria o processo. Estas considerações têm sido impugnadas em parte porque a concentração preferencial de gangliosídeos nas vesículas sinápticas não foi confirmada por outros autores (Wiegandt in Mc Ilwain (150) e a sua presença na fracção M_2A (vesículas sinápticas) é negada por Lapetina, Soto e De Robertis (116). Estes autores descrevem a presença de gangliosídeos nas fracções membranosas do com-

plexo sináptico (fracção M_2B) e sugerem que estes glicolípidos poderão fazer parte do mecanismo receptor pós-sináptico, invocando a associação dos gangliosídeos nas fracções subcelulares com a acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina, histamina.

c) *Compostos fosforados energéticos.*

Os sinaptosomas são capazes de metabolizar a glicose, inclusive através do ciclo das pentoses (151) (152) embora o contributo desta última modalidade metabólica seja modesta. O interesse destas observações consiste em que por esta via metabólica, o sinaptosoma fabricaria os seus próprios nicotina-adenina-dinucleotídeos. Os enzimas necessários a esta via metabólica têm sido isolados dos sinaptosomas (Laborit (196)).

Mais directamente relacionada com o problema da transmissão química citaremos a presença de A T P e do A M P cíclico.

O primeiro destes compostos fosforados existe em quantidades apreciáveis nos grânulos da célula cromafim da medula supra-renal, juntamente com uma proteína, Ca^{++} , Mg^{++} , e tem sido isolado de sinaptosomas centrais (153).

Do conteúdo em catecolaminas e A T P deduz-se haver uma relação constante de 4 moléculas de catecolaminas para uma molécula da A T P, nos gânglios supra-renais.

Encontra-se esta mesma relação em grânulos extraídos dos nervos esplênicos no rato e no boi (83) (106). Smythies *et al* (106) propõem um modelo de armazenamento de catecolamina no grânulo supra-renal em que aquela se encontraria associada a uma proteína, Ca^{++} , Mg^{++} , e A T P. A catecolamina ou serotonina estaria associada por um lado às moléculas de asparagina e glutamina que se identificaram na cadeia polipeptídica desta proteína (cromogranina) e por outro às moléculas de A T P que por sua vez estão ligadas também à mesma cadeia polipeptídica. Os iões divalentes ajudariam a estabilizar este complexo. Algumas observações que permitem formular este género de hipóteses são a facilidade de o A T P em formar complexos (em membranas artificiais) com fosfolípidos e Ca^{++} (153), com uma proteína extraída dos sinaptosomas cerebrais (154), e com a cromogranina, proteína solúvel presente nos grânulos da medula supra-renal. Desta proteína conhece-se a presença de 156 resíduos de ácido glutâmico e 56 de ácido aspártico, muitos deles sob a forma de amida. Cada molécula de cromogranina pode fixar várias moléculas de A T P (106).

A presença de adenil-ciclase, enzima que cataliza a formação do A M P cíclico (ácido 3'-5' adenosinamonomofosfórico) a partir do A T P em preparações contendo sinaptosomas, foi notada em 1967 por De Robertis *et al* (155). O A M P cíclico desempenha a função de mediador entre hormonas e o equipamento enzimático da célula efectora, modulando o seu funcionamento (156). A interacção das catecolaminas com o A M P cíclico é relevante para o funcionamento sináptico.

A sua concentração aumenta, excitando os tecidos cerebrais electricamente, o que também liberta noradrenalina. A incubação dos tecidos cerebrais com Na^+ ou K^+ provoca igualmente um aumento da concentração de A M P cíclico (156). A sua localização pós-sináptica e o seu presumível papel como fazendo parte do receptor adrenérgico é comentada por E. Costa e B. Weiss (157). Estes autores mencionam a persistência do A M P cíclico na glândula pineal após desinervação desta, significando uma localização pós-sináptica, e a activação da adenilciclase pelas catecolaminas na mesma glândula. O mediador adrenérgico é visualizado como contendo A T P. O intermediário químico provocaria a activação da adenilciclase, que actuando sobre o A T P daria origem ao A M P cíclico. O mecanismo ligando a produção de A M P cíclico à resposta da célula efectora (v. g. o potencial pós-sináptico) não é porém sugerido nestes trabalhos (15) e (157).

Na concepção defendida por Macafee, Schorderet e Greengard (158), o A M P-cíclico actuaría através de uma proteinquinase cujo substrato seria uma proteína constitutiva das membranas sinápticas, cujas alterações condicionariam a resposta bioeléctrica. Estes autores descrevem a existência de uma proteinquinase dependente do A M P cíclico. Esta proteinquinase promove a transferência de grupos fosfato, do A T P para as proteínas e histonas, originando assim fosfoproteínas. Em experiências de fraccionamento subcelular encontra-se ligada a fracções sólidas e em especial aos sinaptosomas (S. Gaballah e C. Popoff (166)).

Trabalhos sobre os gânglios simpáticos do coelho, de Schorderet e Greengard, demonstram que a estimulação das fibras pré-ganglionares era seguida de um aumento do A M P cíclico pós-ganglionar. A estimulação directa pós-ganglionar, não provocava esta alteração. Os autores descrevem a existência de um neurónio intercalar dopaminérgico entre o terminal da fibra pré-ganglionar acetilcolinérgica e o neurónio adrenérgico pós-ganglionar. O aparecimento do A M P cíclico é acompanhado de uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica, dependente não da acetilcolina mas da dopamina (158). Estabelecer-se-ia assim mais um elo da cadeia de fenómenos que constituem a transmissão

sináptica: libertação do mediador (dopamina); acção sobre um receptor compreendendo activação da adenilciclase e formação do A M P cíclico; activação da proteinquinase; alteração da estrutura proteica da membrana, e influência posterior desta sobre as trocas iónicas; hiperpolarização da membrana; resposta inibitória (potencial pós-sináptico inibitório).

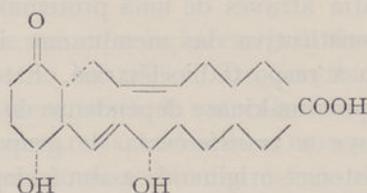
d) *Prostaglandinas e fosfolípidos.*

As prostaglandinas isoladas por Von Euler do líquido seminal, são lípidos ácidos.

São substâncias biologicamente muito activas, provocando, a contração da musculatura uterina. Produzem baixas de tensão arterial, e a sua vida metabólica é efémera (actuam em concentrações de 10^{-9} a 10^{-8} molar (159) e 90 % da dose injectada por via endovenosa é metabolizada em 90 segundos (160).

Quimicamente são ácidos carboxílicos cíclicos e hidroxilados. As prostaglandinas do cérebro contêm cadeias hidrocarbonadas com 20 átomos de carbono, um grupo hidroxil em C_{15} e carbonil ou hidroxil em C_9 . É também variável o número de duplas ligações. Existem numerosas prostaglandinas, diferindo em pormenores da sua estrutura química.

A prostaglandina mais abundante no cérebro total é a prostaglandina F₂:



Prostaglandina F₂

que se considera como uma ciclização do ácido 5,8, 11,14- Eicosatetraenóico (Araquidónico).

O efeito biológico das prostaglandinas, especialmente da prostaglandina E₂, relevante para os problemas da transmissão sináptica consiste na sua actividade frenadora da libertação de noradrenalina (160). Na medula supra-renal a estimulação dos nervos adrenérgicos provoca a libertação de prostaglandina F₁ juntamente com o A T P e a catecolamina. Como não se encontra a prostaglandina nos grânulos citoplásmicos, pensa-se que esteja localizada na membrana celular (106). A ini-

bição da síntese da prostaglandina E_2 é acompanhada de um aumento da concentração de noradrenalina no líquido de perfusão do coração do coelho submetido a estimulação dos nervos simpáticos (160). Por outro lado, pensa-se que os fosfolípidos fornecem as cadeias carbonadas dos ácidos gordes constituintes das prostaglandinas. É portanto possível formular hipóteses, tentando relacionar também a este nível a função sináptica com alterações dos constituintes fosfolipídicos da membrana sináptica. Não encontramos nos trabalhos revistos referência à presença de prostaglandinas nas fracções subcelulares.

Quanto aos fosfolípidos, além do seu papel como elementos estruturais das membranas celulares, têm-se tentado atribuir a alguns deles um papel activo nos mecanismos de transmissão sináptica. Cita-se a este respeito o chamado «efeito acetilcolínico» que consiste na estimulação da incorporação do fósforo inorgânico na molécula de vários fosfolípidos, sob a acção da acetilcolina. Este efeito foi demonstrado por Hokins em 1953 no pâncreas e no cérebro (161), e era inibido pela atropina.

Foi notado que o K^+ na ausência de acetilcolina, tinha um efeito semelhante. O efeito acetilcolínico foi demonstrado também nos gânglios simpáticos, provocado neste caso pela estimulação eléctrica das fibras pré-ganglionares (Larrabee, 1963 e 65 in 161). Não conhecemos trabalhos paralelos utilizando as catecolaminas em lugar da acetilcolina. É possível que este «efeito acetilcolínico» contribua para alterações estruturais da membrana pós-sináptica durante a transmissão nervosa. Certos estudos de Hokins tendem a atribuir aos fosfolípidos (fosfatidil inositol) um papel no transporte do Na^+ para fora da célula, e portanto, na manutenção do potencial transmembranoso. No esquema proposto duas moléculas de sódio seriam transportadas através da membrana celular por uma molécula de ácido fosfatídico, por um mecanismo de difusão. Na superfície externa da membrana, o ácido fosfatídico seria hidrolizado por uma fosfatase específica, libertando fosfato inorgânico e os iões sódio.

O ácido fosfatídico seria sintetizado na face interna da membrana celular, intervindo nesta síntese o ATP, di-glicerídeo e di-glicerídeo-kinase. Os enzimas pertinentes foram isolados de vários tecidos, mas Mc Ilwain observa que a velocidade das reacções propostas para o tecido cerebral apenas justifica 0,02 % da taxa de efluxo dos catiões (161).

5 — Iões metálicos

Dos sinaptosomas e vesículas sinápticas têm sido extraídos também metais em quantidades importantes.

Colburn e Mass (162) notaram em 1965 uma acumulação preferencial de vários iões metálicos em preparações contendo vesículas sinápticas ou sinaptosomas provenientes do cérebro do rato. Os resultados obtidos para as vesículas referem-se ao Mg ($14,05 \pm 0,29$ microgramas/grama) Fe ($1,7 \pm 0,56$ microgramas/grama), Zn ($1,05 \pm 0,05$ microgramas/grama) e Cu ($2,0 \pm 0,16$ microgramas/grama). Os resultados são expressos em relação a um grama de órgão fresco. Os autores usaram o método de centrifugação diferencial de Whittaker, seguido de choque osmótico para obtenção de vesículas sinápticas.

Comparando o conteúdo em metais do homogeneizado de cérebro total com a preparação de vesículas sinápticas verifica-se que a relação $\frac{[\text{metal}] \text{ das vesículas sinápticas}}{[\text{metal}] \text{ no cérebro total}}$, é maior no cobre e magnésio que em qualquer dos outros. Estes metais devem pois desempenhar qualquer função importante.

Os mesmos autores verificaram que a noradrenalina formava quelatos com estes metais, e que este fenómeno era favorecido pela presença de A T P.

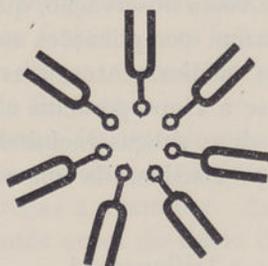
Em outros trabalhos estes autores notaram que estes iões metálicos formavam ligações químicas com vários fosfolípidos cerebrais. Este fenómeno era contrariado pelo A T P (163). Subsequentemente estes autores e outros estudam a formação de complexos entre a noradrenalina, a dopamina e outras aminas relacionadas, com os iões metálicos e o A T P (164), (165).

Observou-se a formação de compostos ternários compreendendo um complexo A T P—Mg⁺⁺, ao qual se junta a amina. A presença de grupos —OH nas posições 3 e 4 do anel benzénico (exemplo: Dopamina) confere maior estabilidade à amina dentro do complexo. Os autores pensam que a destruição do A T P pela A T P-ase provocaria o desequilíbrio destes complexos facilitando a libertação da amina.

Esta poderia então formar complexos idênticos com os fosfolípidos e o catião metálico. É possível imaginar um sistema de armazenamento constituído pelo composto ternário A T P-amina-magnésio na vesícula, de onde o A T P seria removido, permitindo a fixação da amina e magnésio aos fosfolípidos da membrana sináptica, seguido de eventual secre-

ção da amina, por mecanismos ainda não determinados (165). Outro aspecto de interesse que se depreende destes trabalhos (163) é o do efeito dos catiões metálicos sobre a orientação das moléculas de fosfolípidos em camada monomolecular nas interfases.

As moléculas fosfolipídicas podem dispor-se em camadas monomoleculares em toalha ou em esférulas (liposomas). Em relação umas às outras podem dispor-se agrupando-se com as cabeças polares (Grupos fosfato) juntas,



ou na situação inversa.

A quelação de catiões metálicos pelos fosfolípidos promove a primeira destas configurações. Como se pode observar no esquema, entre os grupos fosforados fica um espaço livre hidrofílico.

Esta disposição poderia corresponder aos «canais» membranosos postulados pelas teorias correntes de translocação iónica através das membranas, relacionado com a manutenção do potencial transmembranoso e a corrente de acção.

CAPÍTULO IX

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

I — Introdução

O ponto de convergência entre a doença de Parkinson e o síndrome extrapiramidal devido aos neurolépticos encontra-se pois na diminuição da eficácia da dopamina como intermediário químico.

Os nossos estudos incidiram sobre a distribuição intracelular da radioactividade 30 a 40 minutos após uma injeção intracerebral de DL-DOPA— 2C^{14} no rato e nas alterações desta distribuição introduzidas pelo tratamento prévio dos animais com neurolépticos. Serão também apresentados dados preliminares relativos ao efeito das drogas

estudadas sobre o conteúdo das fracções subcelulares em fósforo-folipídico e proteínas.

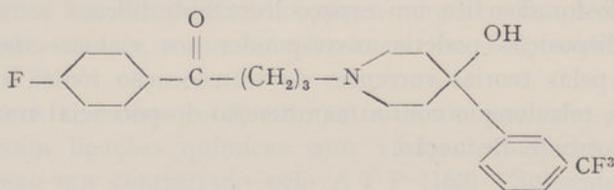
II — Materiais e métodos

a) Escolha dos neurolépticos.

Os medicamentos a ensaiar foram escolhidos informalmente por consulta feita a clínicos que trabalham em meio hospitalar psiquiátrico. A pergunta feita foi: — na vossa observação, quais os medicamentos que mais frequentes vezes trazem complicações neurológicas? As respostas incluíam vários outros medicamentos, mas a maior parte das opiniões expressas referiram-se à Tioproperazina e ao Trifluperídol. Foram portanto escolhidas estas duas drogas incluindo-se também a Clorpromazina (CPZ) como droga considerada «menos activa», pelo mesmo grupo informal:

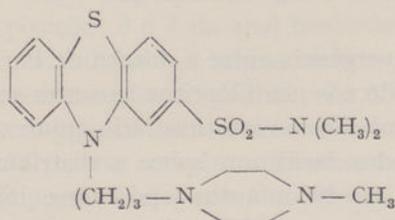
Trifluperídol (TFP)
(Psicoperídol)

4' — Fluoro — 4 — [4 — hidroxi — 4 — (3' Trifluormetilfenil) piperidina] — butiroferona.



Tioproperazina
(Majeptil)

N, N — Dimetil — 10 — [3 — (4 metil — 1 piperazinil) propil] — Fenotiazina — 2 — sulfonamida.



Utilizaram-se as preparações comerciais injectáveis correntes destas drogas.

As doses utilizadas foram:

Clorpromazina (CPZ)	12,5 mg/kilo
Trifluoperidol (TFP)	0,12 mg/kilo
Tiopropirazina (Majeptil)	2,5 mg/kilo

b) *Esquema de tratamento.*

Três grupos de 15 animais (ratos brancos, machos, Wistar, pesando 100 a 150 gramas, fornecidos pelo Biotério da Fundação Calouste Gulbenkian, Oeiras) foram tratados com injeções diárias intraperitoneais de cada uma das três drogas, durante um período mínimo de 10 dias e um período máximo de 21 dias.

Um grupo de 15 animais foi tratado com injeções intraperitoneais diárias de soro fisiológico, simultaneamente com cada um dos grupos tratados com uma das drogas a examinar. As últimas injeções foram administradas 45-60 minutos antes do início das experiências.

Os animais receberam o alimento standard do Laboratório e água, sem restrições.

c) *Efeitos do tratamento.*

Os animais tratados com neurolépticos mostravam todos diminuição da iniciativa motora 20-50 minutos após as injeções, certa ataxia da marcha, e tornavam-se menos agressivos e mais fáceis de manejar. A inibição da motricidade era mais aparente com a clorpromazina, mantendo-se os animais imóveis e de olhos fechados, situação parcialmente reversível com o manusear dos animais. Não se observaram tremores. As alterações do tónus avaliadas pelo movimento passivo das articulações dos membros ou da cauda, eram pouco nítidas.

Os animais tratados com soro fisiológico não mostravam este comportamento, tendendo pelo contrário a tornarem-se agressivos após a primeira semana de injeções diárias.

d) *Injeções intracerebrais.*

A injeção intracerebral de DL-DOPA-2 C¹⁴ foi administrada durante o período em que os animais mostravam a sintomatologia descrita o que correspondia a 40-60 minutos após a última injeção do neuroléptico. O mesmo intervalo de tempo foi observado para os animais tratados com soro fisiológico. As injeções foram feitas sequencialmente

começando ora pelos animais tratados com as drogas estudadas ora pelos animais injectados com soro fisiológico.

e) A DOPA-C¹⁴ injectada provinha da New England Nuclear Corporation e exhibia uma radioactividade específica de 0.16 milicurie por miligrama. O conteúdo da embalagem (5,2 miligramas) foi diluído em 2 c. c. de água destilada. O volume injectado no cérebro de cada animal era de 50 microlitros, a que corresponde uma actividade de aproximadamente 2 milimicrocuries ou $4,44 \times 10^6$ decomposições por minuto (DPM).

f) *Técnica da injeção intracerebral.*

O animal é seguro com a mão esquerda fixando a cabeça entre o polegar e o indicador e aplicando simultaneamente o corpo e a cabeça do animal contra a superfície da mesa, o mais firmemente possível. Utilizou-se uma agulha de diâmetro 25 com $\frac{1}{4}$ de polegada de comprimento, montada em uma seringa de tuberculina com 0,25 mililitros de capacidade, que deve permitir injectar 5 animais. A agulha é introduzida imediatamente à direita da linha média (evitando o seio longitudinal superior) a nível da linha interauricular. A ponta da agulha é orientada na direcção de um ponto correspondente ao centro da cavidade craniana do animal. A introdução da agulha não costuma oferecer dificuldades em animais jovens, e é facilitada por um movimento de rotação daquela.

O produto radioactivo é injectado lentamente. Em geral os animais suportam bem a injeção, apresentando no entanto uma hemiparésia contralateral que desaparece ao fim de poucos minutos.

Quando a imobilização da cabeça não é perfeita podem surgir hemorragias intracranianas, em regra fatais. A dificuldade mais frequente consiste na oclusão da agulha, que se manifesta por um ligeiro aumento na resistência oferecida à descida do êmbolo e pelo aparecimento do soluto injectável no rebordo da agulha. Estes animais devem ser substituídos e repetir-se o processo com outra agulha.

g) *Homogeneização.*

30-40 minutos após a primeira injeção intracerebral os animais começaram a ser decapitados pela mesma ordem pela qual tinham sido injectados, de forma a manter tanto quanto possível semelhante o

intervalo de tempo decorrido entre a injeção intracerebral e a morte. A decapitação foi feita com uma tesoura ou uma guilhotina. A cavidade craniana foi aberta introduzindo um dos ramos da tesoura no buraco occipital e seccionando a calote óssea primeiro no sentido anteriormente e depois no sentido lateral. Os fragmentos ósseos resultantes são removidos com pinças dente-de-rato, e o conteúdo do crânio incluindo bolbo raquidiano e cerebelo foi removido com uma espátula, rapidamente libertado de meninges e vasos, colocado sobre gelo, pesado, e imeditamente colocado em um homogeneizador manual juntamente com 10 c. c. de sacarose 0.32 molar contendo cálcio na concentração de 10^{-5} M por litro (sacarose L).

Procedeu-se imediatamente à homogeneização com 10 excursões verticais do êmbolo do homogeneizador, sendo então o conteúdo colocado em um tubo de centrifugação previamente colocado em gelo. No momento em que o cérebro libertado de meninges era colocado na balança procedia-se à decapitação do animal seguinte, tentando-se desta maneira diminuir o período durante o qual o cérebro removido estaria exposto ao ar antes da homogeneização. Damos a seguir o apontamento do protocolo de uma das experiências até esta fase.

N — animais tratados com soro fisiológico.

L — Animais tratados com Largactil, injeções intracerebrais.

N

Rato n.º 1 injectado às 10.05 horas
 Rato n.º 2 injectado às 10.07 horas
 Rato n.º 3 injectado às 10.10 horas

L

Rato n.º 1 injectado às 10.11 horas
 Rato n.º 2 injectado às 10.13 horas
 Rato n.º 3 injectado às 10.14 horas

MORTE DOS ANIMAIS

N

Tempo após injeção intracerebral

N.º 1	10.45	40 minutos
N.º 2	10.46	39 minutos
N.º 3	10.49	39 minutos

L

N.º 1	10.50	49 minutos
N.º 2	10.53	40 minutos
N.º 3	10.55	41 minutos

Pequenas demoras imprevisíveis tornam difícil alcançar o desiderato de manter idênticos os tempos de sobrevivência após a injeção intracerebral.

h) *Centrifugação diferencial.*

O esquema das centrifugações usadas nos nossos trabalhos é apresentado a seguir.

Uma vez obtido o homogeneizado inicial (H) retira-se uma pequena porção (0.5 c. c.) para determinação de proteínas, fosfolípidos e contagens de radioactividade. Os tubos contendo «H» são então centrifugados a baixa velocidade (2 200 rpm, 500 G, 10 minutos). O sedimento é desprezado e o sobrenadante S_1 é novamente homogeneizado em um homogeneizador mecânico ($1500 \times G$, 3.500 rpm, 10 minutos), tirando-se uma amostra de 1 c. c., e ajustando o volume da amostra para 25 c. c. com sacarose 0.25 M contendo cálcio (sacarose-L).

A centrifugação de S_1 ($1500 \times G$ 3.500 rpm, 10 minutos) dá-nos um novo sedimento (R_2) que não é utilizado e um novo sobrenadante (S_2), cujo volume é outra vez ajustado para 25 c. c.

A centrifugação de S_2 ($12.000 \times G$, 10.000 rpm, 15 minutos) — fornece-nos a fracção R_3 contendo sinaptosomas, mielina, mitocôndrias. Esta fracção é depois suspensa em 10 c. c. de água destilada, homogeneizada no homogeneizador mecânico (5 excursões do êmbolo) e deixada em repouso durante 10 minutos. Este passo (choque osmótico) é fundamental, dele dependendo em grande parte a quantidade de vesículas sinápticas obtidas.

A suspensão de R_3 em água (R_3H_2O) é depois centrifugada (ultra-centrífuga, $12.000 \times G$, 10.000 rpm, 20 minutos), dando origem a um sedimento enriquecido em mitocôndrias e a um sobrenadante cuja ulterior centrifugação ($105.000 \times G$, 40.000 rpm, 30 minutos) permite obter um sedimento (M_2) rico em vesículas e membranas sinápticas. O sedimento « M_2 » é suspenso em 7 c. c. de sacarose — L 0,25 M e homogeneizado com um pequeno homogeneizador manual Tenbrock, aspirado com uma pipeta Pasteur e depositado lentamente sobre sacarose L—0,50 M, com o tubo de centrifuga ligeiramente inclinado e deixando o homogeneizado escorre-

gar ao longo da parede interna do tubo. Este gradiente descontínuo é centrifugado ($105.000 \times G$ 40.000 rpm, 30 minutos) não utilizando o travão da centrífuga. O rotor pára por inércia sendo então os tubos retirados cuidadosamente. Em cada tubo nota-se a existência de um sedimento (M_2B) constituído principalmente por membranas sinápticas e na zona de separação das duas fases de sacarose uma acumulação de material branco acinzentado. Esta interfase é aspirada, diluída em 10 c. c. de água por agitação e novamente centrifugada ($105.000 \times G$, 40.000 rpm, 15 minutos). Desta centrifugação resulta um sedimento branco e translúcido, muito delgado, medindo 1 a 2 milímetros de diâmetro e constituído por uma mistura de vesículas sinápticas e alguns fragmentes membranosos, por vezes com alguma contaminação mitocondrial (M_2A).

i) *Preparação dos espécimens para microscopia electrónica.*

O sedimento foi agitado com uma suspensão de ácido ósmico e entregue ao Laboratório de Microscopia Electrónica.

j) *Determinação de proteínas.*

O conteúdo em proteínas foi determinado pelo método de Lowry descrito em (31).

k) *Determinação de fosfolípidos (fósforo lipídico).*

O fósforo lipídico foi doseado pelo método de Fiske e Subbarow, após extracção dos lípidos pelo clorofórmio-etanol.

l) *Determinação da radioactividade nas fracções subcelulares.*

Uma amostra com volume conhecido (0,1 c. c.) de cada uma das fracções, foi lançada em frascos de poliestireno com dioxano ou tolueno contendo omnifluor na concentração de 4 gramas por litro. «Omnifluor» é uma mistura de p-bi (0-methylstyryl) benzeno, e 2-5 difeniloxazol na proporção de 2 % e 98 % respectivamente. Os frascos numerados foram colocados no transportador do contador de cintilações em meio líquido Packard-Tricarb, e contados durante 24 horas. O tempo de contagem para cada frasco individual foi ajustada para 20 minutos. O resultado das contagens vem expresso em «contagens por minuto» (CPM).

Cada cérebro dá origem a 8 amostras ou seja 48 amostras em cada experiência, comportando 6 animais. Em cada fracção fez-se a determinação proteínas, fosfolipídios e a contagem da radioactividade.

RESULTADOS

1.º — Expressão dos resultados

Os resultados são expressos em miligramas de proteínas ou microgramas de fósforo por grama de órgão. A radioactividade está expressa em contagens por minuto por grama de órgão (CPM). Os mesmos resultados são também expressos em percentagens dos valores encontrados no homogeneizado inicial.

Nos quadros seguintes apresentamos esses dados correspondendo a cada fracção subcelular e a cada uma das drogas estudadas.

Em cada quadro comparam-se animais tratados (Trat.) com animais não tratados (Cont.), estando indicado o número de animais. Cada coluna vertical compara um animal tratado com um animal não tratado estudado na mesma experiência.

Os resultados porcentuais são expressos do seguinte modo:

$$1.º \quad S_1, R_3, \frac{ETC}{H} \times 100 = \frac{CPM \text{ da Fracção estudada}}{CPM \text{ da Fracção inicial}} \times 100$$

$$2.º \quad AE = \text{Actividade Específica} = \frac{CPM \text{ da fracção estudada}}{\text{miligramas de proteína da mesma fracção}}$$

$$3.º \quad AER: \text{Actividade Específica Relativa} = \frac{CPM \text{ da fracção estudada}}{CPM \text{ do homogeneizado inicial}} \times 100 \\ = \frac{\text{miligramas de proteína da fracção estudada}}{\text{miligramas de proteína da fracção inicial}} \times 100$$

Os valores afectados do sinal (—) denotam *aumento* de radioactividade nos animais tratados relativamente aos animais não tratados. As diferenças positivas, inversamente, significam *diminuição* de radioactividade.

Em cada quadro está mencionada a diferença média, DIF, entre TRAT. e CONT., o desvio padrão das diferenças (SD), o critério T de Student para as diferenças entre pares de observações e a probabilidade P de DIF = 0. Prova unilateral.

Os gráficos ilustram a variabilidade e a distribuição dos valores encontrados para duas das drogas utilizadas (Trifluoperidol e Majep-til), comparando os efeitos sobre as fracções subcelulares iniciais S_1 e sobre as fracções $M_2 A$ (vesículas sinápticas e membranas sinápticas). Cada ponto corresponde à diferença entre um par de animais (CONT. e TRAT.) da mesma experiência.

Os pontos estão marcados nos gráficos da esquerda para a direita, pela mesma ordem em que os valores de que resultam se encontram nos quadros respectivos, e que é aleatória.

Os pontos acima da linha horizontal significam o aumento da radioactividade nos animais tratados e inversamente, para os pontos marcados abaixo da linha horizontal.

A linha vertical separa a fracção inicial S_1 da fracção sináptica $M_2 A$.

Note-se que os valores $\frac{S_1}{H} \times 100$ e $\frac{M_2 A}{H} \times 100$ estão representados nos gráficos em unidades diferentes $\left(\frac{M_2 A}{H} \times 10^4\right)$. Pretende-se neste caso dar uma imagem visual qualitativa do efeito do neuroléptico.

O valor numérico (expresso nas mesmas unidades) encontra-se na legenda.

Esta nota de caução não se aplica aos valores expressos em AE e AER.

Além das experiências mencionadas foram efectuadas 2 experiências de ultracentrifugação diferencial afim de obter material para a microscopia electrónica.

Mostramos aspectos das fracções R_3 (Fig. 6) contendo mitocondrias, terminações nervosas com vesículas e mielina, $M_2 A$ (Fig. 7) enriquecida em vesículas, mas contendo também membranas.

QUADRO N.º 1

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO H

Homogeneizado inicial (valores expressos em contagens por minuto)

C P Z															
CONT	13	141016	416911	134101	385411	281335	663256	56174	872815	27032	39979	168154	89666	21252	$\bar{C} = 253623,230$ $SD = 265693,810$
TRAT	13	590090	304348	584266	13500	443272	773080	524625	121063	48074	71181	93638	58604	16948	$\bar{T} = 280206,850$ $SD = 268572,380$
DIF		Dif = —		26583,615	SD = 338739,250		T = 0,282						P < 0,40		
T F P															
CONT	11	31465	236071	1060909	283233	423615	385911	134106	352465	406955	226085	427789			$\bar{C} = 360782,180$ $SD = 264762,060$
TRAT	11	37168	139440	1114607	506804	841898	539322	414544	344198	330859	361767	438211			$\bar{T} = 460801,640$ $SD = 301107,130$
DIF		Dif = —		100019,450	SD = 159283,720		T = 2,082						P < 0,025		
MAJEPTIL															
CONT	13	141016	416911	588623	147497	9839	22053	167425	970850	533500	207475	777825	967250	1071050	$\bar{C} = 463178,000$ $SD = 382922,630$
TRAT	13	641756	383696	414204	719455	64345	87256	633250	166325	309875	697900	568175	657500	766000	$\bar{T} = 469979,770$ $SD = 248695,970$
DIF		Dif = —		6801,769	SD = 408631,250		T = 0,060						P < 0,475		

QUADRO N.º 2

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO H.

Homogeneizado inicial (actividade especifica)

C P Z															
CONT	13	921,67	2761,00	1824,50	5286,80	250,70	4216,40	1645,20	4392,40	255,00	275,00	1293,50	734,90	178,50	$\bar{C} = 1848,890$ $SD = 1768,685$
TRAT	13	3352,70	2042,60	7578,00	1180,00	2246,00	528,60	3908,90	5719,50	453,50	578,70	821,30	496,60	144,80	$\bar{T} = 2234,707$ $SD = 2311,369$
DIF		Dif = - 385,817		SD = 2571,293		T = 0,541		P < 0,30							
T F P															
CONT	12	260,47	2392,00	1783,00	370,00	7665,00	2344,00	3449,00	1839,00	4200,00	5438,00	2749,00	5133,00	$\bar{C} = 3135,205$ $SD = 2169,874$	
TRAT	12	305,65	89,00	2198,00	151,00	9575,00	4047,00	6940,00	5973,00	3474,00	3477,00	4938,00	4949,00	$\bar{T} = 3843,054$ $SD = 2902,356$	
DIF		Dif = - 707,848		SD = 2012,166		T = 1,218		P < 0,10							
MAJEPTIL															
CONT	13	921,00	2761,00	3503,00	888,00	53,00	210,00	2029,00	12546,00	6097,00	1773,00	6883,00	8713,00	8851,00	$\bar{C} = 4248,307$ $SD = 3983,512$
TRAT	13	3566,00	2339,00	3023,00	5492,00	344,00	421,00	6846,00	1848,00	3541,00	5029,00	5739,00	4808,00	6043,00	$\bar{T} = 3772,230$ $SD = 2111,085$
DIF		Dif = 476,076		SD = 4133,322		T = 0,415		P < 0,35							

QUADRO N.º 5

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO S₁

Primeira fracção sobrenadante (actividade específica)

C P Z															
CONT	9	3539,20	1426,80	1954,90	7107,60	422,30	401,20	1994,00	1309,60	351,10	$\bar{C} = 2056,300$ SD = 2150,570				
TRAT	9	3250,20	5167,20	10319,00	237,00	732,50	805,40	1793,20	776,90	265,10	$\bar{T} = 2594,055$ SD = 3322,540				
DIF		Dif = - 537,755		SD = 4019,108		T = 0,401		P < 0,35							
T F P															
CONT	7	311,80	6067,00	2008,00	5646,00	7158,00	3895,00	6775,00							
TRAT	7	443,60	8099,00	7051,00	5678,00	5927,00	6108,00	6875,00							
DIF		Dif = - 1188,685		SD = 2086,111		T = 1,507		P < 0,10							
MAJEPTIL															
CONT	13	1270,00	3974,00	6655,00	2014,00	232,00	46,00	2029,00	12546,00	6097,00	1773,00	6883,00	8713,00	8851,00	$\bar{C} = 4698,692$ SD = 3897,270
TRAT	13	6246,00	4839,00	6042,00	6896,00	1232,00	558,00	6856,00	1848,00	3541,00	5029,00	5739,00	4808,00	6043,00	$\bar{T} = 4590,538$ SD = 2144,543
DIF		Dif = - 108,153		SD = 4379,431		T = 0,089		P < 0,45							

QUADRO N.º 6

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO S₁

Primeira fração sobrenadante (actividade específica relativa)

C.P.Z															
CONT	9	3,840	0,520	1,070	1,200	1,660	1,450	1,540	1,460	1,930		$\bar{C} = 1,630$ SD = 0,920			
TRAT	9	0,960	2,540	1,360	1,320	1,450	1,780	2,180	1,560	1,830		$\bar{T} = 1,664$ SD = 0,479			
DIF		Dif = -0,034										SD = 1,276	T = 0,080	P < 0,475	
T.F.P															
CONT	7	1,199	1,949	1,932	1,343	1,316	1,413	1,321				$\bar{C} = 1,496$ SD = 0,310			
TRAT	7	1,466	1,997	2,021	1,633	1,569	1,447	1,297				$\bar{T} = 1,632$ SD = 0,277			
DIF		Dif = -0,136										SD = 0,129	T = 2,794	P < 0,0125	
MAJEPTIL															
CONT	13	1,386	1,436	2,123	2,028	0,887	1,041	0,849	0,810	0,858	1,096	0,774	1,176	1,590	$\bar{C} = 1,243$ SD = 0,454
TRAT	13	1,625	2,080	1,258	1,254	2,254	1,970	1,464	1,055	1,433	1,483	1,861	1,658	1,623	$\bar{T} = 1,616$ SD = 0,349
DIF		Dif = -0,381										SD = 0,644	T = 2,135	P < 0,025	

QUADRO N.º 7

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO R₃

Sedimento contendo mielina, mitocôndrias, sinaptosomas e membranas celulares, submetido a choque osmótico
(valores expressos em contagens por minuto)

C P Z											\bar{C} = 32597,692	\bar{T} = 28123,000	
											SD = 31885,238	SD = 25584,289	
CONT 13	13259	31650	18915	65029	10000	83757	48480	100384	16554	5598	16233	11524	2387
TRAT 13	47777	25563	68070	4998	51358	17080	80720	25285	6118	10935	12860	10950	3885
DIF	Dif = -4474,692										SD = 40799,410	T = 0,395	P < 0,35
T F P													
CONT 11	5113	61577	119190	32696	40677	65029	18915	44474	48512	31682	56668	\bar{C} = 47684,818	
TRAT 11	6030	39088	102952	68804	98277	73436	71290	36590	38149	43550	47311	\bar{T} = 56861,545	
DIF	Dif = -9176,727										SD = 27707,852	T = 1,098	P < 0,15
MAJEPIL													
CONT 13	13259	31650	50393	17148	886	949	13497	73862	45200	14410	48131	62507	62920
TRAT 13	50853	43312	39630	69750	6669	9968	51499	11621	23857	46530	32818	43098	45987
DIF	Dif = -3521,153										SD = 31491,660	T = 0,403	P < 0,35

QUADRO N.º 8

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO R₃

Sedimento contendo mielina, mitocôndrias, sinaptosomas e membranas celulares, submetido a choque osmótico

(valores expressos em percentagem $\frac{R_3}{H} \times 100$)

C P Z												\bar{C}	SD					
CONT	13	9,40	7,50	14,10	16,80	17,80	9,50	17,20	15,10	61,20	14,00	9,60	12,80	11,20	16,630	13,795		
TRAT	13	8,00	8,30	11,60	37,00	9,70	14,10	10,30	15,90	12,70	15,30	13,70	18,60	22,90	15,238	7,761		
DIF		Dif = 1,392										SD = 15,989	T = 0,313	P > 0,40				
T F P																		
CONT	11	16,30	19,80	11,20	11,50	9,60	16,80	14,10	12,60	11,90	14,00	13,20					\bar{C} = 13,727	SD = 2,939
TRAT	11	16,20	22,90	9,23	13,57	11,67	13,87	17,20	10,60	11,50	12,00	10,70					\bar{T} = 13,585	SD = 3,917
DIF		Dif = 0,141										SD = 2,333	T = 0,201	P < 0,40				
MAJEPTIL																		
CONT	13	9,40	7,60	8,60	11,60	9,00	4,30	13,50	12,90	13,20	6,90	6,20	8,00	8,90	\bar{C} = 9,238		SD = 2,839	
TRAT	13	7,40	11,30	9,60	9,70	10,40	11,40	13,70	11,70	15,10	6,70	5,60	6,60	6,00	\bar{T} = 9,630		SD = 3,020	
DIF		Dif = -0,392										SD = 2,716	T = 0,520	P < 0,30				

QUADRO N.º 10

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO R_3

Sedimento contendo mielina, mitocôndrias, sinaptosomas e membranas celulares, submetido a choque osmótico (atividade específica relativa)

C P Z												\bar{C}	SD					
CONT	13	0,780	0,740	0,540	0,620	1,830	1,510	0,630	0,560	2,910	0,730	0,850	0,960	1,060	1,055	0,674		
TRAT	13	0,630	0,730	0,420	1,220	1,560	1,780	0,320	0,390	0,360	0,780	0,930	1,700	1,600	0,955	0,550		
DIF		Dif = 0,100										SD = 0,810	T = 0,444	P < 0,35				
T F P																		
CONT	10	0,532	0,912	0,428	0,500	0,375	1,072	0,923	0,320	0,356	0,330						\bar{C}	SD
TRAT	10	0,549	0,662	0,608	0,649	0,543	0,900	0,886	0,153	0,327	0,214						0,574	0,283
DIF		Dif = 0,0257										SD = 0,153	T = 0,529	P < 0,30			\bar{T}	SD
MAJEPTIL																	0,549	0,254
CONT	13	1,150	0,910	0,750	1,260	1,320	0,510	0,690	0,740	1,130	1,120	1,120	1,370	0,950	1,001	0,266		
TRAT	13	0,900	0,880	0,790	1,090	1,890	3,590	0,960	0,940	1,110	1,070	0,670	1,070	0,860	1,216	0,770		
DIF		Dif = -0,215										SD = 0,899	T = 0,862	P < 0,20			\bar{T}	SD

QUADRO N.º 11

RADIOACTIVIDADE

F R A C Ç Ã O M_2

Sedimento contendo vesículas sinápticas, contaminado com membranas sinápticas
(valores expressos em contagens por minuto)

C P Z												\bar{C} = 1336,000		
CONT	10	533	2545	3270	2907	1064	1565	402	505	444	125	SD = 1167,447		
TRAT	10	1570	3864	1052	1603	1592	2279	409	593	282	121	\bar{T} = 1336,500	SD = 1132,881	
DIF		Dif = -0,500										SD = 1067,587	T = 0,0014	P < 0,495
T F P														
CONT	11	258	160	3900	1421	1175	3270	2545	3547	4695	3196	SD = 2905,636	SD = 2204,601	
TRAT	11	75	89	2102	4104	4985	5201	1345	2531	2443	6290	\bar{T} = 3044,272	SD = 2089,467	
DIF		Dif = -138,636										SD = 2401,698	T = 0,191	P < 0,40
MAJEPTIL														
CONT	10	533	1176	2977	9964	54566	29088	688	1812	3948	3477	\bar{C} = 10822,900	SD = 17617,699	
TRAT	10	1442	1066	1498	31278	9000	17832	1886	1725	1699	2398	\bar{T} = 6982,400	SD = 10057,521	
DIF		Dif = 3840,500										SD = 16734,660	T = 0,725	P < 0,25

QUADRO N.º 12

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO M₂

Sedimento contendo vesículas sinápticas, contaminado com membranas sinápticas

(valores expressos em percentagem $\frac{M_2}{H} \times 100$)

C P Z											\bar{C} = 0,654		
CONT	10	0,370	1,800	0,800	0,300	0,300	1,400	0,200	0,300	0,490	0,580	SD = 0,536	
TRAT	10	0,500	0,600	7,700	0,300	0,300	0,800	0,200	0,630	0,480	0,710	\bar{T} = 1,222	SD = 2,284
DIF			Dif = -0,568							T = 0,791			P < 0,25
T F P													
CONT	11	0,819	1,445	0,367	0,501	0,277	1,897	0,847	1,000	1,153	1,413	\bar{C} = 1,049	SD = 0,554
TRAT	11	0,201	0,996	0,188	0,809	0,592	0,324	0,964	0,735	0,738	1,738	\bar{T} = 0,751	SD = 0,443
DIF			Dif = 0,297							T = 1,700			P < 0,05
MAJEPTIL													
CONT	10	0,370	0,280	0,500	1,410	1,040	1,250	0,330	0,230	0,500	0,320	\bar{C} = 0,623	SD = 0,438
TRAT	10	0,220	0,270	0,360	1,200	1,080	1,400	0,270	0,300	0,250	0,310	\bar{T} = 0,566	SD = 0,463
DIF			Dif = 0,057							T = 1,400			P < 0,10

QUADRO N.º 15

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO M₂A

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente vesículas sinápticas
(valores expressos em contagens por minuto)

C P Z											\bar{C} = 63,540					
CONT	10	53,000	63,000	78,000	118,000	168,000	46,000	93,000	7,600	6,400	2,400	SD = 53,235				
TRAT	10	72,000	37,000	128,000	5,000	159,000	35,000	183,000	12,200	7,000	1,400	\bar{T} = 63,960	SD = 68,414			
DIF													T = 0,025	P < 0,49		
T F P																
CONT	11	48,000	160,000	3198,000	247,000	106,000	118,000	481,000	60,200	43,600	49,600	161,900	\bar{C} = 424,845	SD = 928,515		
TRAT	11	12,800	89,000	103,000	107,000	102,000	505,000	443,000	39,600	31,200	77,400	112,500	\bar{T} = 147,500	SD = 165,435		
DIF														T = 0,974	P < 0,15	
MAJEPITIL																
CONT	13	53,000	63,000	208,000	18,000	17,000	0,000	0,000	11,000	20,000	7,000	29,000	30,000	\bar{C} = 35,076	SD = 55,505	
TRAT	13	14,000	44,000	96,000	112,000	0,000	0,000	18,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	\bar{T} = 21,846	SD = 38,742	
DIF															T = 1,070	P < 0,15

RADIOACTIVIDADE

F R A C Ç Ã O M_{2A}

Sedimento purificado, derivado de M_2 , contendo principalmente vesículas sinápticas

(valores expressos em percentagem $\frac{M_{2A}}{H} \times 100$)

C P Z												\bar{C} = 0,069		
												SD = 0,105		
												\bar{T} = 0,043		
												SD = 0,075		
CONT	10	0,0370	0,0150	0,0580	0,0300	0,2990	0,0050	0,2320	0,0047	0,0071	0,0112			
TRAT	10	0,0120	0,0120	0,0220	0,0370	0,0300	0,0280	0,2570	0,0136	0,0119	0,0082			
DIF		Dif = 0,026										SD = 0,087	T = 0,969	P < 0,15
T F P														
CONT	11	0,1520	0,0510	0,3010	0,0870	0,0250	0,0300	0,3580	0,0170	0,0100	0,0210	0,0370	\bar{C} = 0,099 SD = 0,121	
TRAT	11	0,0340	0,0520	0,0090	0,0210	0,0120	0,0930	0,1060	0,0110	0,0090	0,0210	0,0250	\bar{T} = 0,035 SD = 0,034	
DIF		Dif = 0,063										SD = 0,112	T = 1,859	P < 0,05
MAJEPTIL														
CONT	13	0,0370	0,0150	0,0350	0,0120	0,0770	0,0000	0,0000	0,0010	0,0060	0,0016	0,0048	0,0000	\bar{C} = 0,0149 SD = 0,0224
TRAT	13	0,0020	0,0110	0,0220	0,0150	0,0000	0,0000	0,0040	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	\bar{T} = 0,0041 SD = 0,0072
DIF		Dif = 0,0108										SD = 0,0222	T = 1,755	P < 0,05

QUADRO N.º 17

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO M₂A

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente vesículas sinápticas
(atividade específica)

C P Z														
CONT	10	2120,000	3500,000	557,100	655,500	2896,500	867,900	281,800	316,600	172,900	77,400			$\bar{C} = 1144,570$ SD = 1235,696
TRAT	10	3789,000	1608,000	256,000	8,900	13250,000	426,800	653,500	271,100	166,600	26,900			$\bar{T} = 2045,680$ SD = 4101,943
DIF				Dif = -901,110		SD = 3436,508			T = 0,829					P < 0,20
T F P														
CONT	10	218,000	571,000	26650,000	3528,000	1177,000	845,000	267,000	6760,000	705,000	2900,000			$\bar{C} = 4362,100$ SD = 8093,474
TRAT	10	21,000	89,000	1471,000	1300,000	1700,000	505,000	260,000	1210,000	1536,000	1492,000			$\bar{T} = 958,400$ SD = 661,562
DIF				Dif = 3403,700		SD = 7868,572			T = 1,367					P < 0,10
MAJEPTIL														
CONT	13	2120,000	3500,000	3466,000	300,000	188,000	0,000	230,000	196,000	0,000	176,000	775,000	422,000	$\bar{C} = 874,846$ SD = 1285,634
TRAT	13	777,000	1692,000	2400,000	800,000	0,000	0,000	104,000	0,000	0,000	0,000	0,000	10,000	$\bar{T} = 444,846$ SD = 780,222
DIF				Dif = 430,000		SD = 645,109			T = 2,403					P < 0,025

QUADRO N.º 18

RADIOACTIVIDADE

F R A C Ç Ã O M₂A

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente vesículas sinápticas
(atividade específica relativa)

C P Z											\bar{C} = 1,851				
CONT	10	2,312	1,363	0,580	0,120	11,960	0,200	1,045	0,277	0,233	0,423	SD = 3,617			
TRAT	10	1,200	1,250	0,034	0,050	0,857	0,800	1,168	0,358	0,342	0,113	\bar{T} = 0,617	SD = 0,493		
DIF				Dif = 1,234									T = 1,115	P < 0,15	
T F P															
CONT	8	0,844	0,300	3,762	1,740	0,357	1,700	0,123	0,954			\bar{C} = 1,222	SD = 1,193		
TRAT	8	0,069	0,525	0,150	0,300	0,300	0,333	0,473	0,262			\bar{T} = 0,276	SD = 0,122		
DIF				Dif = 0,946										P < 0,025	
MAJEPTIL															
CONT	13	2,312	1,363	0,972	0,307	12,833	0,000	0,000	0,033	0,029	0,000	0,089	0,046		
TRAT	13	0,200	0,733	0,758	0,142	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	\bar{T} = 0,141	SD = 0,275
DIF				Dif = 1,243										T = 1,270	P < 0,10

QUADRO N.º 19

RADIOACTIVIDADE

F R A C Ç Ã O M₂B

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente membranas sinápticas
(valores expressos em contagens por minuto)

C P Z											\bar{C}	\bar{T}					
CONT	11	171,000	258,000	925,000	785,000	63,000	242,000	355,000	187,000	109,000	87,000	14,000	290,545	297,026			
TRAT	11	405,000	172,000	753,000	511,000	179,000	79,000	287,000	196,000	89,000	77,000	25,000	252,090	222,762			
DIF		Dif = 38,454										SD = 139,963		T = 0,911		P < 0,20	
T F P																	
CONT	11	29,700	437,000	162,000	1084,000	268,000	785,000	925,000	2257,000	1848,000	1563,000	2616,000	1088,609	877,304			
TRAT	11	31,000	525,000	334,000	389,000	327,000	862,000	621,000	665,400	1231,000	2953,000	1501,000	858,127	812,785			
DIF		Dif = 230,480										SD = 782,754		T = 0,976		P < 0,15	
MAJEPTIL																	
CONT	13	171,000	258,000	170,000	176,000	11,000	0,000	127,000	572,000	382,000	99,000	314,000	776,000	781,000			
TRAT	13	300,000	296,000	323,000	633,000	35,000	59,000	344,000	109,000	268,000	404,000	325,000	245,000	420,000			
DIF		Dif = 5,846										SD = 293,518		T = 0,071		P < 0,475	
													295,153	263,481			
													289,307	159,833			

QUADRO N.º 20

RADIOACTIVIDADE

FRACÇÃO M_2B

Sedimento purificado, derivado de M_2 , contendo principalmente membranas sinápticas

(valores expressos em percentagem $\frac{M_2B}{H} \times 100$)

C P Z											\bar{C} = 0,123	SD = 0,396	
CONT	11	0,120	0,060	0,680	0,200	0,110	0,020	1,310	0,490	0,060	0,090	0,060	
TRAT	11	0,060	0,050	0,130	3,770	0,030	0,060	0,590	0,270	0,090	0,130	0,140	\bar{T} = 0,483 SD = 1,101
DIF				Dif = -0,192				SD = 1,150		T = 0,555			P < 0,30
T F P													
CONT	11	0,090	0,180	0,020	0,540	0,090	0,200	0,690	0,640	0,450	0,690	0,610	\bar{C} = 0,381 SD = 0,267
TRAT	11	0,080	0,370	0,040	0,110	0,060	0,160	0,150	0,190	0,370	0,810	0,340	\bar{T} = 0,243 SD = 0,223
DIF				Dif = 0,138				SD = 0,245		T = 1,868			P < 0,05
MAJEPTIL													
CONT	13	0,120	0,060	0,020	0,120	0,050	0,000	0,120	0,100	0,120	0,040	0,040	\bar{C} = 0,123 SD = 0,184
TRAT	13	0,040	0,070	0,070	0,080	0,050	0,100	0,090	0,100	0,160	0,060	0,050	\bar{T} = 0,074 SD = 0,032
DIF				Dif = 0,049				SD = 0,192		T = 0,921			P < 0,45

QUADRO N.º 25

PROTEÍNAS

FRACÇÃO S₁

Primeira fracção sobrenadante (valores expressos em percentagem $\frac{S_1}{H} \times 100$)

C P Z

CONT	7	32,20	25,00	55,90	53,60	40,10	40,50	44,40				$\bar{C} = 41,671$ SD = 10,982						
TRAT	7	28,30	42,00	48,80	51,20	49,60	37,50	49,50				$\bar{T} = 43,842$ SD = 8,456						
DIF				Dif = -2,171				SD = 8,685		T = 0,661		P < 0,25						
T F P																		
CONT	11	42,13	54,95	51,30	41,69	77,24	85,12	89,14	33,06	31,00	30,83	29,19	$\bar{C} = 51,422$ SD = 22,56					
TRAT	11	45,77	50,32	52,23	46,89	74,39	77,92	82,39	29,47	32,99	26,56	27,93	$\bar{T} = 49,714$ SD = 20,500					
DIF				Dif = 1,708				SD = 4,155		T = 1,363		P < 0,10						
MAJEPTIL																		
CONT	16	32,02	29,13	20,23	22,89	26,72	31,42	20,14	14,07	21,25	42,00	46,60	50,60	32,10	37,70	38,90	28,50	$\bar{C} = 30,891$ SD = 10,222
TRAT	16	29,94	32,31	27,00	32,06	30,43	23,18	25,53	32,20	22,38	28,10	41,44	28,36	27,10	25,40	29,30	24,70	$\bar{T} = 28,714$ SD = 4,597
DIF				Dif = 2,177					SD = 10,021		T = 0,869		P < 0,20					

PROTEÍNAS

FRACÇÃO M₂

Sedimento contendo vesículas sinápticas, contaminado com membranas sinápticas (valores expressos em miligramas de proteína por grama de órgão)

C P Z		Dif = 6,186							SD = 15,580	T = 1,122	P < 0,15				
CONT	8	2,30	46,60	5,10	1,76	3,56	4,93	5,39	1,58	$\bar{C} = 8,902$ SD = 15,308					
TRAT	8	1,10	1,98	2,32	1,66	4,07	2,75	5,87	1,98	$\bar{T} = 2,716$ SD = 1,546					
DIF									SD = 15,580	T = 1,122	P < 0,15				
T F P		Dif = 3,477							SD = 9,700	T = 1,133	P < 0,15				
CONT	10	2,97	2,61	5,39	3,60	3,40	2,80	35,40	24,60	2,80	3,10	$\bar{C} = 8,667$ SD = 11,554			
TRAT	10	2,36	2,40	3,74	2,30	3,50	3,10	4,40	23,40	3,40	3,30	$\bar{T} = 5,190$ SD = 6,433			
DIF		Dif = 3,477							SD = 9,700	T = 1,133	P < 0,15				
MAJEPTIL		Dif = 0,630							SD = 1,440	T = 1,578	P < 0,05				
CONT	13	1,20	0,30	2,80	5,40	5,20	1,90	8,90	9,50	8,20	1,80	1,50	2,20	1,90	$\bar{C} = 3,907$ SD = 3,179
TRAT	13	2,20	0,30	2,50	5,40	3,50	1,60	4,60	9,40	5,50	1,90	1,90	2,10	1,70	$\bar{T} = 3,276$ SD = 2,412
DIF		Dif = 0,630							SD = 1,440	T = 1,578	P < 0,05				

PROTEÍNAS

F R A C Ç Ã O M₂B

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente membranas sinápticas
(valores expressos em miligramas de proteínas por grama de órgão)

C P Z		Dif = -0,187										T = 1,289		P < 0,10		
		SD = 0,436														
CONT	9	0,980	0,590	0,800	0,900	0,400	0,530	1,950	1,240	0,750						
TRAT	9	1,100	0,980	1,730	0,600	0,940	0,940	2,110	0,760	0,670						
DIF												T = 1,289		P < 0,10		
T F P																
CONT	8	3,000	0,300	1,950	1,300	0,700	0,800	1,300	1,500							
TRAT	8	3,900	0,600	1,270	0,800	1,200	0,700	1,600	0,200							
DIF												T = 0,285		P < 0,40		
MAJEPTIL																
CONT	9	0,980	0,590	0,040	1,520	0,640	0,740	0,900	0,300	1,020						
TRAT	9	0,730	0,960	1,050	1,160	0,710	0,400	2,400	1,500	0,800						
DIF												T = 1,367		P < 0,10		

$\bar{C} = 0,904$
SD = 0,466

$\bar{T} = 1,092$
SD = 0,504

$\bar{C} = 1,356$
SD = 0,839

$\bar{T} = 1,283$
SD = 1,144

$\bar{C} = 0,747$
SD = 0,430

$\bar{T} = 1,078$
SD = 0,585

FOSFOLÍPIDOS

F R A C Ç Ã O H

Homogeneizado inicial (valores expressos em microgramas de fósforo lipídico por grama de órgão)

C P Z													
CONT	11	1787,50	1371,20	1614,00	1847,00	1867,00	1378,00	1473,00	1387,00	1536,00	1212,00	968,00	$\bar{C} = 1494,609$ $SD = 276,163$
TRAT	11	1246,80	1280,00	1525,00	1706,00	1523,00	1391,00	1416,00	1334,00	1480,00	1553,00	1101,00	$\bar{T} = 1414,163$ $SD = 168,510$
DIF													$T = 1,171$ $P < 0,15$
T F P													
CONT	12	958,10	1654,00	1614,00	1847,00	1867,00	1528,00	1228,00	1270,00	1387,00	1536,00	1593,00	$\bar{C} = 1501,675$ $SD = 258,888$
TRAT	12	936,10	1743,00	1609,00	1920,00	1580,00	1464,00	1741,00	1586,00	1091,00	1426,00	1566,00	$\bar{T} = 1509,175$ $SD = 272,785$
DIF													$T = 0,114$ $P < 0,45$
M A J E P T I L													
CONT	4	1212,00	968,000	1800,00	2131,000								$\bar{C} = 1527,750$ $SD = 532,618$
TRAT	4	1234,00	1133,00	2089,00	109,600								$\bar{T} = 1385,500$ $SD = 472,786$
DIF													$T = 0,470,$ $P < 0,35$

QUADRO N.º 35

FOSFOLÍPIDOS

F R A C Ç Ã O S₁

Primeira fracção sobrenadante (valores expressos em microgramas de fósforo lipídico por grama de órgão)

C P Z

CONT	8	710,90	738,00	274,60	376,20	588,00	705,00	446,60	139,50	$\bar{C} = 497,350$ SD = 223,536
TRAT	8	615,90	769,00	202,20	221,10	740,00	786,60	166,30	164,50	$\bar{T} = 458,200$ SD = 293,243
DIF			Dif = 39,150			SD = 139,374		T = 0,794		P < 0,25
T F P										
CONT	9	513,40	765,60	738,80	536,90	494,60	588,10	705,00	296,40	$\bar{C} = 548,766$ SD = 172,820
TRAT	9	518,00	825,30	729,60	352,40	490,20	792,00	849,00	261,80	$\bar{T} = 571,744$ SD = 231,303
DIF			Dif = -22,977			SD = 110,244		T = 0,625		P < 0,30
MAJEPTIL										
CONT	4	446,00	139,00	355,00	394,00					$\bar{C} = 333,500$ SD = 134,918
TRAT	4	136,00	148,00	301,00	339,00					$\bar{T} = 231,000$ SD = 104,048
DIF			Dif = 102,500			SD = 141,535		T = 1,448		P < 0,10

QUADRO N.º 36

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO S₁

Primeira fracção sobrenadante (valores expressos em percentagem $\frac{S_1}{H} \times 100$)

CPZ	Primeira fracção sobrenadante (valores expressos em percentagem $\frac{S_1}{H} \times 100$)													
CONT	8	53,80	41,50	19,90	25,50	42,30	45,80	36,80	14,40			C = 35,000 SD = 13,687		
TRAT	8	49,30	60,00	12,70	15,80	50,00	50,60	15,10	12,10			T = 33,200 SD = 20,902		
DIF		Dif = 1,800										SD = 12,194	T = 0,417	P < 0,35
TFP														
CONT	9	53,59	46,31	41,61	35,14	40,30	42,17	45,89	19,24	18,83		C = 38,120 SD = 11,924		
TRAT	9	55,34	47,33	42,86	24,04	28,14	46,83	59,53	38,09	20,88		T = 38,115 SD = 15,549		
DIF		Dif = 0,0044										SD = 7,8264	T = 0,0017	P < 0,4995
MAJEPTIL														
CONT	4	36,79	14,36	19,72	19,49							C = 22,337 SD = 9,903		
TRAT	4	11,02	13,17	14,40	30,93							T = 17,380 SD = 9,140		
DIF		Dif = 4,957										SD = 15,816	T = 0,626	P < 0,30

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO S₁

Primeira fração sobrenadante (valores expressos em percentagem de fosfolípidos sobre percentagem de proteínas)

C.P.Z	Primeira fração sobrenadante (valores expressos em percentagem de fosfolípidos sobre percentagem de proteínas)										
CONT	6	1,142	0,496	0,756	0,819	1,034	1,328	$\bar{C} = 0,929$ SD = 0,298			
TRAT	6	1,742	1,428	1,068	0,988	1,209	1,314	$\bar{T} = 1,291$ SD = 0,272			
DIF		Dif = -0,362						SD = 0,345	T = 2,567	P < 0,025	
TFP											
CONT	9	1,272	0,902	0,998	0,454	0,474	1,578	1,480	0,624	0,648	$\bar{C} = 0,936$ SD = 0,426
TRAT	9	1,219	0,906	0,914	0,324	0,360	1,589	1,804	0,681	0,747	$\bar{T} = 0,949$ SD = 0,508
DIF		Dif = -0,0126						SD = 0,139	T = 0,271	P < 0,40	
MAJEPTIL											
CONT	4	0,828	0,343	0,458	0,398						$\bar{C} = 0,507$ SD = 0,219
TRAT	4	0,324	0,196	0,423	0,767						$\bar{T} = 0,428$ SD = 0,245
DIF		Dif = 0,079						SD = 0,359	T = 0,440	P < 0,35	

QUADRO N.º 38

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO R₃

Sedimento contendo mielina, mitocôndrias, sinaptosomas e membranas celulares, submetido a choque osmótico (valores expressos em microgramas de fósforo lipídico por grama de órgão)

C P Z													
CONT	8	361,90	1014,30	504,20	143,60	165,00	501,10	501,80	231,00				$\bar{C} = 427,862$ SD = 281,215
TRAT	8	337,70	165,40	607,90	101,90	74,90	433,10	206,00	194,00				$\bar{T} = 265,112$ SD = 182,171
DIF			Dif = 162,750			SD = 298,428		T = 1,542					P < 0,10
T F P													
CONT	10	349,50	430,20	504,20	330,30	349,00	320,00	501,10	501,80	165,00	154,20		$\bar{C} = 360,530$ SD = 128,593
TRAT	10	316,60	484,00	536,00	199,50	229,40	281,80	413,30	435,60	154,20	237,70		$\bar{T} = 328,810$ SD = 130,514
DIF			Dif = 31,720			SD = 72,248		T = 1,388					P < 0,10
MAJEPTIL													
CONT	4	231,00	197,00	229,00	476,00								$\bar{C} = 283,250$ SD = 129,440
TRAT	4	204,00	220,00	231,00	318,00								$\bar{T} = 243,250$ SD = 51,051
DIF			Dif = 40,000			SD = 81,293		T = 0,984					P < 0,20

QUADRO N.º 39

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO R₃

Sedimento contendo mielina, mitocôndrias, sinaptosomas e membranas celulares, submetido a choque osmótico

(valores expressos em percentagem $\frac{R_3}{H} \times 100$)

C.P.Z													
CONT	8	20,20	73,70	28,30	10,40	11,20	36,10	32,60	19,00				$\bar{C} = 28,937$ SD = 20,361
TRAT	8	27,00	13,70	34,20	7,30	5,20	29,20	18,70	14,20				$\bar{T} = 18,687$ SD = 10,534
DIF			Dif = 10,250				SD = 21,213		T = 1,366				P < 0,10
T F P													
CONT	10	36,50	25,90	28,30	21,50	28,40	25,10	36,10	10,70	9,60			$\bar{C} = 25,470$ SD = 9,358
TRAT	10	33,80	27,70	31,40	13,60	13,10	17,70	37,80	30,50	10,60	15,10		$\bar{T} = 23,130$ SD = 10,083
DIF			Dif = 2,340				SD = 6,273		T = 1,179				P < 0,15
MAJEPTIL													
CONT	4	19,05	20,35	12,72	22,33								$\bar{C} = 18,612$ SD = 4,153
TRAT	4	16,53	19,59	11,05	29,01								$\bar{T} = 19,045$ SD = 7,523
DIF			Dif = -0,432				SD = 4,226		T = 0,204				P < 0,45

QUADRO N.º 41

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO M₂

Sedimento contendo vesículas sinápticas, contaminado com membranas sinápticas (valores expressos em microgramas de fósforo lípidico por grama de órgão)

C P Z													
CONT	7	94,60	30,30	39,30	5,70	11,60	41,00	23,00					$\bar{C} = 35,071$ SD = 29,378
TRAT	7	90,20	31,30	22,90	41,10	6,30	8,00	41,00					$\bar{T} = 34,400$ SD = 28,374
DIF				Dif = 0,671			SD = 22,29		T = 0,08				P < 0,475
T F P													
CONT	8	94,60	22,40	19,80	15,60	5,80	11,60	50,80	11,20				$\bar{C} = 28,975$ SD = 29,866
TRAT	8	89,40	14,50	26,90	16,40	3,70	9,40	41,20	58,80				$\bar{T} = 32,537$ SD = 29,234
DIF				Dif = - 3,562			SD = 18,540		T = 0,543				P < 0,30
MAJEPTIL													
CONT	4	41,00	23,00	18,50	46,00								$\bar{C} = 32,103$ SD = 13,420
TRAT	4	24,00	25,90	27,80	64,70								$\bar{T} = 35,600$ SD = 19,462
DIF				Dif = - 3,475			SD = 15,113		T = 0,459				P < 0,35

QUADRO N.º 42

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO M₂

Sedimento contendo vesículas sinápticas, contaminado com membranas sinápticas
(valores expressos em percentagem $\frac{M_2}{H} \times 100$)

C P Z												
CONT	7	5,20	2,10	2,60	0,40	0,70	3,30	2,90				$\bar{C} = 2,475$ SD = 1,627
	7	7,20	2,00	1,30	2,60	0,40	0,50	3,70				$\bar{T} = 2,528$ SD = 2,367
DIF				Dif = -0,071			SD = 1,782		T = 0,105			P < 0,45
T F P												
CONT	8	5,86	1,46	1,61	1,22	0,41	0,75	3,30	0,26			$\bar{C} = 1,858$ SD = 1,874
	8	4,55	0,99	1,54	1,03	0,33	0,65	2,88	3,75			$\bar{T} = 2,090$ SD = 1,818
DIF				Dif = -0,231			SD = 1,325		T = 0,493			P < 0,30
MAJEPTIL												
CONT	4	3,38	2,38	1,03	2,16							$\bar{C} = 2,237$ SD = 0,964
	4	1,94	2,31	1,33	5,90							$\bar{T} = 2,870$ SD = 2,060
DIF				Dif = -0,633			SD = 2,202		T = 0,574			P < 0,30

QUADRO N.º 45

FOSFOLÍPIDOS

F R A C Ç Ã O M₂A

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente vesículas sinápticas

(valores expressos em percentagem $\frac{M_2A}{H} \times 100$)

C P Z											\bar{C} = 0,438		
CONT	7	1,94	0,52	0,01	0,05	0,37	0,12	0,06			SD = 0,688		
TRAT	7	0,65	0,64	0,06	0,03	0,03	0,08	0,08			\bar{T} = 0,224		
											SD = 0,288		
DIF				Dif = 0,214					SD = 0,50			T = 1,142	P < 0,15
T F P													
CONT	9	1,46	0,05	0,10	0,01	0,14	0,37	0,18	0,17	0,11	\bar{C} = 0,287		
TRAT	9	2,99	0,05	0,75	0,22	0,12	0,10	0,04	0,12	0,12	SD = 0,451		
											\bar{T} = 0,501		
											SD = 0,958		
DIF				Dif = -0,213								T = 1,146	P < 0,15
MAJEPTIL													
CONT	3	0,06	0,05	0,11							\bar{C} = 0,073		
TRAT	3	0,03	0,04	0,37							SD = 0,032		
											\bar{T} = 0,146		
											SD = 0,193		
DIF				Dif = -0,073								T = 0,784	P < 0,25

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO M₂A

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente vesículas sinápticas (valores expressos em percentagem de fosfolípidos sobre percentagem de proteínas)

C P Z									
CONT	4	3,700	0,480	3,058	2,621				
TRAT	4	0,046	0,040	3,368	5,416				
DIF		Dif = 0,247		SD = 2,658		T = 0,19		P < 0,45	
T F P									
CONT	7	8,111	0,294	1,250	0,200	2,000	2,428	1,833	
TRAT	7	6,102	0,312	12,500	3,142	3,000	1,714	4,000	
DIF		Dif = - 2,093		SD = 4,373		T = 1,266		P < 0,15	
MAJEPIL									
CONT	3	3,750	1,388	2,820					
TRAT	3	3,000	1,379	12,758					
DIF		Dif = - 3,059		SD = 5,968		T = 0,887		P < 0,20	
								$\bar{C} = 2,464$ $SD = 1,395$ $\bar{T} = 2,218$ $SD = 2,646$	
								$\bar{C} = 2,302$ $SD = 2,696$ $\bar{T} = 4,395$ $SD = 4,002$	
								$\bar{C} = 2,652$ $SD = 1,190$ $\bar{T} = 5,712$ $SD = 6,155$	

QUADRO N.º 47

FOSFOLÍPIDOS

F R A C Ç Ã O M₂B

Sedimento purificado, derivado de M₂, contendo principalmente membranas sinápticas (valores expressos em microgramas de fósforo lípidico por grama de órgão)

C P Z													
CONT	9	25,70	24,90	31,80	5,40	12,60	20,70	29,70	25,60	12,80			$\bar{C} = 21,022$ SD = 8,888
TRAT	9	13,60	16,00	39,80	14,70	14,60	22,60	16,90	26,00	26,10			$\bar{T} = 20,033$ SD = 8,469
DIF			Dif = 0,988			SD = 8,290			T = 0,357				P < 0,35
T F P													
CONT	8	10,96	31,80	31,10	18,20	20,20	20,27	28,80	28,90				$\bar{C} = 23,702$ SD = 7,408
TRAT	8	15,45	39,80	15,90	36,20	25,70	53,62	11,60	1,40				$\bar{T} = 24,958$ SD = 17,215
DIF			Dif = -1,255			SD = 20,003			T = 0,177				P < 0,45
MAJEPTIL													
CONT	4	25,60	12,80	11,10	28,80								$\bar{C} = 19,575$ SD = 8,927
TRAT	4	14,50	17,20	25,60	22,20								$\bar{T} = 19,875$ SD = 4,974
DIF			Dif = -0,300			SD = 11,489			T = 0,0522				P < 0,475

FOSFOLÍPIDOS

FRACÇÃO M₂BSedimento purificado, de M₂ contendo principalmente membranas sinápticas(valores expressos em percentagem $\frac{M_2B}{H} \times 100$)

CPZ												
CONT	9	1,40	1,80	1,70	0,40	0,80	1,40	1,80	2,10	1,30		$\bar{C} = 1,411$ SD = 0,532
TRAT	9	1,89	1,20	2,50	1,10	1,00	1,60	1,10	1,40	1,10		$\bar{T} = 1,422$ SD = 0,484
DIF				Dif = -0,011			SD = 0,586			T = 0,056		P < 0,475
TFP												
CONT	8	1,14	1,79	2,03	1,48	1,59	1,46	1,82	1,82			$\bar{C} = 1,641$ SD = 0,280
TRAT	8	1,65	2,33	1,08	2,07	1,62	4,91	0,80	0,08			$\bar{T} = 1,817$ SD = 1,441
DIF				Dif = -0,176			SD = 1,582			T = 0,315		P < 0,40
MAJEPTIL												
CONT	4	2,11	1,32	0,61	1,35							$\bar{C} = 1,347$ SD = 0,612
TRAT	4	1,17	1,53	1,22	2,02							$\bar{T} = 1,485$ SD = 0,390
DIF				Dif = -0,1375			SD = 0,746			T = 0,368		P < 0,35

Nos gráficos 1, 2, 3, 4, 5 que se seguem, comparamos a distribuição dos valores da radioactividade na fracção S_1 e na fracção vesicular M_2A , no caso do Majeptil e Trifluperidol. (Ver pág. 87).



MAJEPTIL

$$\frac{S_1}{H} \times 100$$

$$\overline{DIF} = 10,061$$

$$SD = 4,676$$

$$P < 0,0125$$

MAJEPTIL

$$\frac{M_2 A}{H} \times 100$$

$$\overline{DIF} = 0,0108$$

$$SD = 0,0222$$

$$P < 0,05$$



MAJEPTIL

AE

S_1

$\overline{DIF} = 108,153$

$SD = 4379,431$

$P < 0,45$

MAJEPTIL

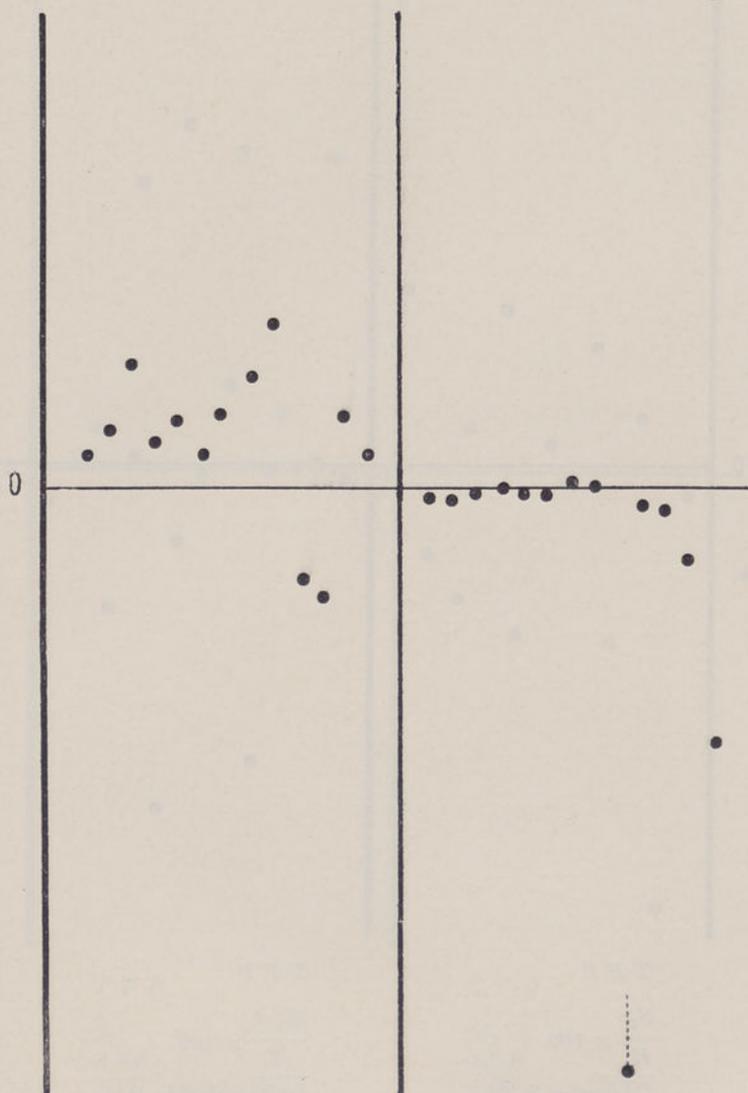
AE

M_2A

$\overline{DIF} = 430,000$

$SD = 645,109$

$P < 0,025$

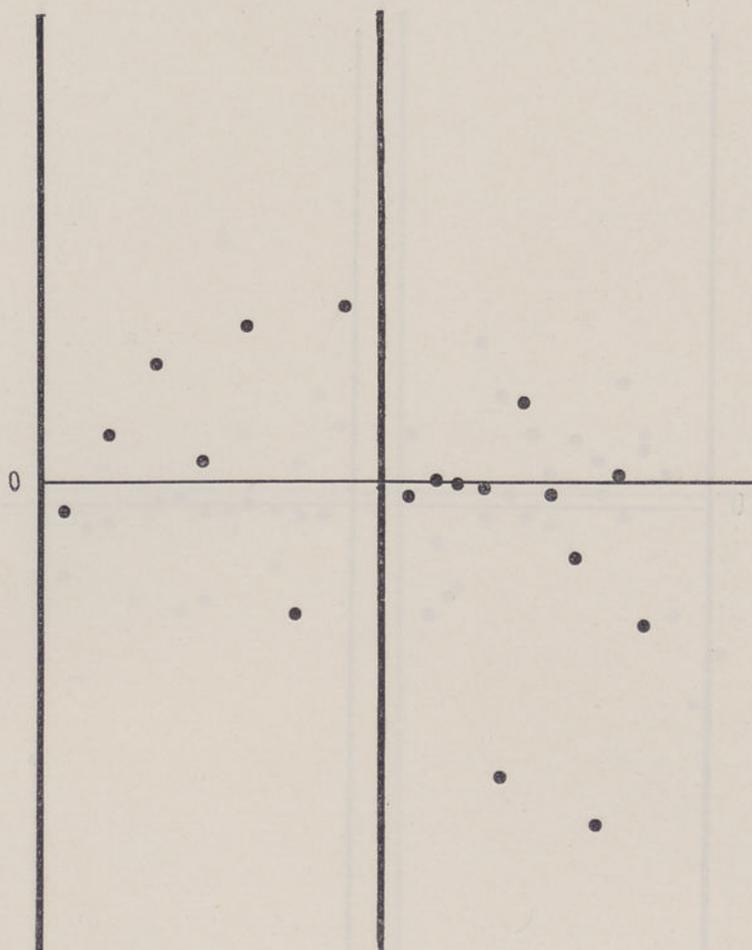


MAJEPTIL

$\frac{S_1}{AER}$
 $\overline{DIF} = -0,381$
 $SD = 0,644$
 $P < 0,025$

MAJEPTIL

$\frac{M_2 A}{AER}$
 $\overline{DIF} = 1,243$
 $SD = 3,530$
 $P < 0,10$



T F P

$$\frac{S_1}{H} \times 100$$

$$\overline{DIF} = -2,201$$

$$SD = 4,676$$

$$P < 0,15$$

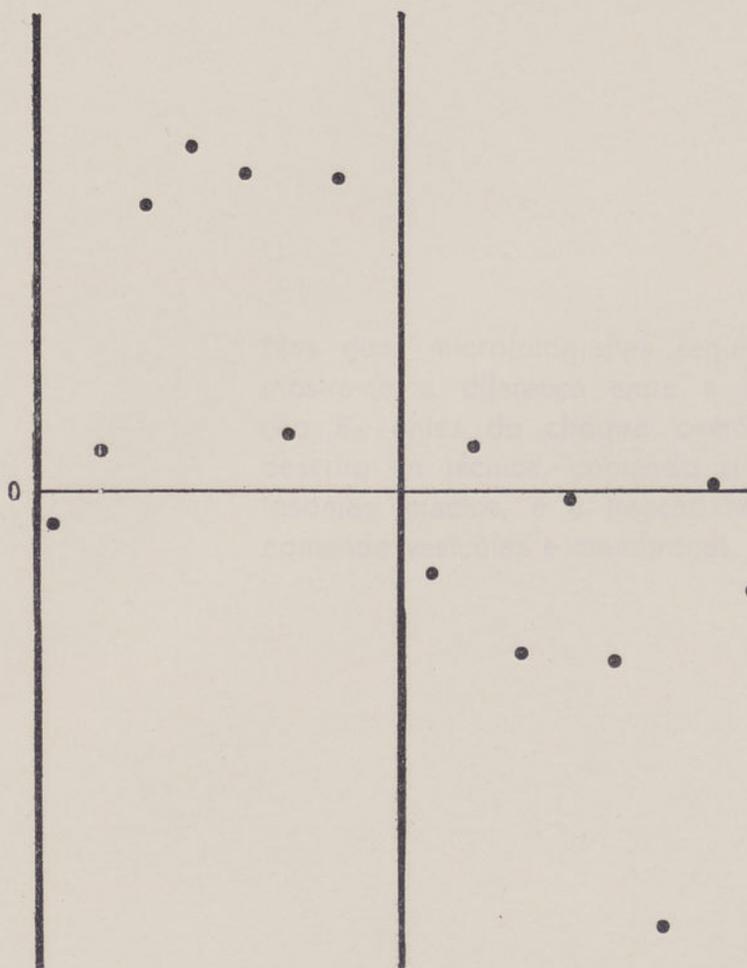
T F P

$$\frac{M_2 A}{H} \times 100$$

$$\overline{DIF} = 0,063$$

$$SD = 0,112$$

$$P < 0,05$$



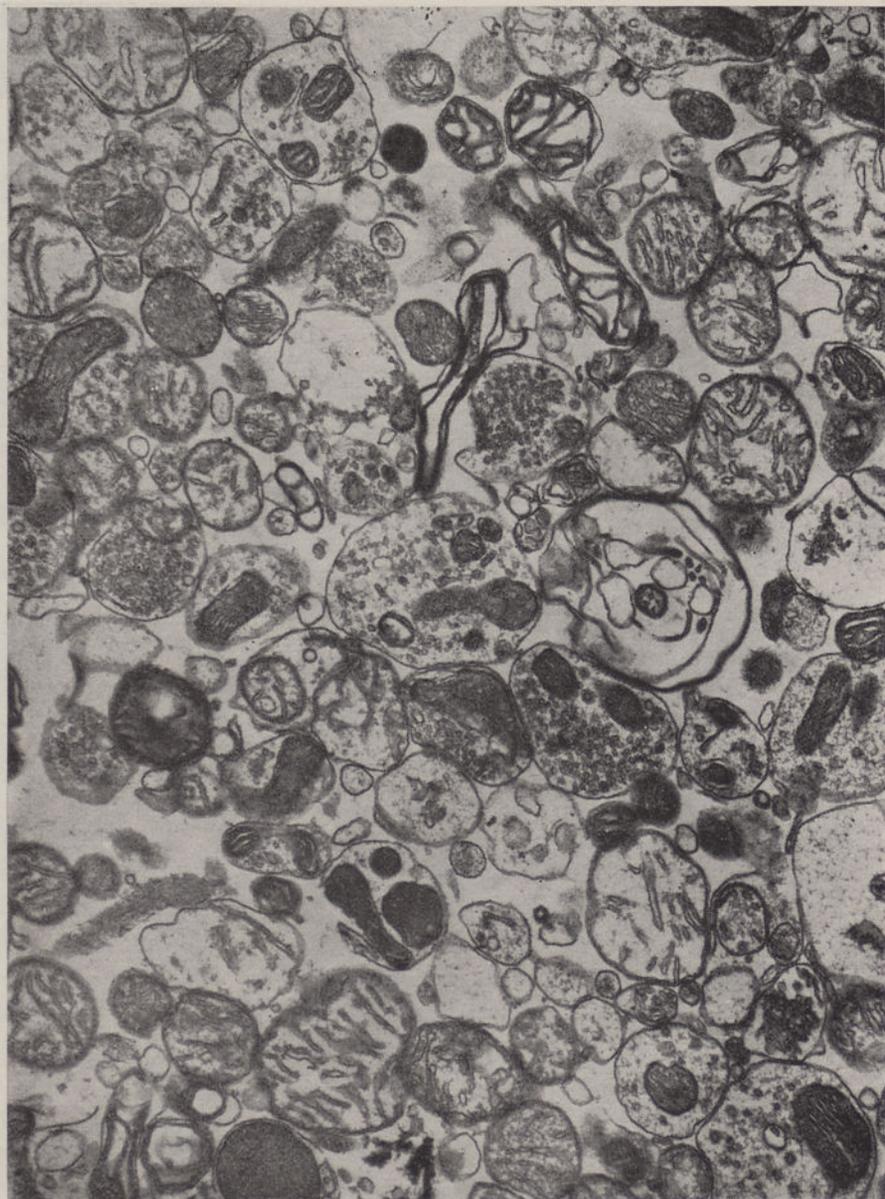
T F P

S_1
 \overline{AER}
 $\overline{DIF} = -0,136$
 $SD = 0,129$
 $P < 0,0125$

T F P

$M_3 A$
 \overline{AER}
 $\overline{DIF} = 0,946$
 $SD = 1,255$
 $P < 0,025$

Nas duas microfotografias seguintes mostra-se a diferença entre a fracção R₃, antes do choque osmótico descrito na técnica, contendo sináptomas intactos, e a fracção M₂ A contendo vesículas e membranas.



(Fig. 6)

Sedimento, mostrando sinaptosomas, mitocôndrias, alguma mielina. $\times 30.000$



(Fig. 7)

Aspecto do sedimento M₂ A, verificando-se, pela simples inspeção a presença de vesículas sinápticas, e a importante contaminação por fragmentos de membranas. × 48.000. Fixação em ácido ósmico. Os sedimentos foram emulsionados com o fixador.

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Em resumo, podemos dizer que o tratamento dos animais de experiência com qualquer das drogas estudadas se associa a uma tendência para um aumento de radioactividade no homogeneizado inicial «H» e nos produtos das centrifugações iniciais «S₁» e uma diminuição nos componentes sinápticos finais (M₂A e M₂B).

Essa tendência, imprecisa no caso da clorpromazina, atinge valores estatisticamente significativos no caso do Trifluoperidol e Majeptil.

O efeito é mais nítido no caso da tioproperazina (Majeptil) e da fracção subcelular M₂A.

Aceitamos como limite de significação $P < 0,05$.

INTERPRETAÇÃO

A radioactividade presente no cérebro 40 a 60 minutos após a injeção subcutânea no rato de D-L DOPA C 14 é constituída na sua maior parte por Dopamina e Noradrenalina (Pletscher 181), e (Udenfriend 196).

A identificação destes compostos nas fracções subcelulares das nossas experiências não foi tecnicamente possível na altura, e não nos pareceu de interesse primordial nesta fase dos nossos trabalhos.

Admitindo como correcta a dedução de estarmos em presença de Dopamina e Noradrenalina, os nossos resultados são interpretáveis como significando que, pela acção dos neurolépticos, se assiste a uma redistribuição dos intermediários químicos cuja concentração aumenta no conjunto dos elementos da célula nervosa (S₁) e diminue nos componentes sinápticos, especialmente nas vesículas sinápticas (M₂A).

A interpretação corrente da acção dos neurolépticos, consiste em supor que provocam o bloqueio de um receptor pós-sináptico, o que desencadeia, por um mecanismo de retroacção, um incremento no funcionamento do neurónio pré-sináptico, traduzido por um aumento na intensidade da fluorescência no perikáron desse neurónio (177), um

aumento no efluxo de catecolaminas e seus metabolitos em experiências de perfusão (185), e por uma aceleração da síntese amínica (175).

Os nossos resultados permitem supor que existe um componente pré-sináptico neste mecanismo, consistindo em uma diminuição do conteúdo das vesículas sinápticas em catecolamina, o que levaria a uma menor disponibilidade de intermediário químico para a transmissão sináptica do influxo nervoso.

Outra possibilidade seria a de que o tratamento prévio com neurolépticos diminuisse o número de vesículas sinápticas por terminação nervosa.

Um dado favorável a esta interpretação seria a diminuição em conteúdo proteico que se nota na fração M_2 (Majepetil). Apesar de estatisticamente significativa, essa diferença não se mantém após as centrifugações seguintes.

Não se observa essa diferença em M_2A ou M_2B , nem no caso dos animais tratados pelo Trifluperidol, pelo que não lhe atribuímos significado biológico.

A nossa interpretação permite colocar dentro da mesma célula o sinal para a aceleração da síntese amínica do perikáron, o qual consistiria na diminuição da concentração do produto final desta síntese no complexo sináptico, e em especial nas vesículas sinápticas.

A sequência das nossas experiências (tratamento prévio com neurolépticos) permite supor que o efeito destes medicamentos consiste em diminuir a afinidade das vesículas sinápticas para o intermediário químico recém-sintetizado.

Não encontramos nestas experiências diferenças significativas entre animais tratados e não tratados pelo que respeita ao conteúdo das frações subcelulares em proteínas ou em fósforo fosfolipídico.

O exame a que se procedeu das frações subcelulares pela microscopia electrónica levanta dúvidas acerca da pureza destes sedimentos, principalmente pelo que respeita à fração contendo vesículas sinápticas. As preparações de mitocôndrias são praticamente puras. A nossa fração M_2A está enriquecida em vesículas sinápticas relativamente à M_2 , e a esse enriquecimento em vesículas atribuímos o seu comportamento diferente perante os tratamentos relativamente às outras frações. No entanto, o grau de contaminação por membranas é importante e mostra a necessidade, especialmente em estudos bioquímicos, de proceder com frequência a um controle ultramicroscópico.

O efeito menos intenso e incerto da CPZ faz supor que o efeito encontrado com os outros dois neurolépticos se deve a uma interferên-

cia com a dopamina. Como vimos atrás a C P Z parece actuar principalmente nos mecanismos adrenérgicos.

Relativamente ao problema de que partimos inicialmente, ou seja da elucidação do efeito dos neurolépticos sobre o S N C, a nossa contribuição é modesta mas não destituída de interesse:

1.º Tende a focar a atenção sobre uma estrutura morfológica bem definida, a vesícula sináptica, cuja obtenção, ainda que não isenta de factores de erro, é mais fácil e menos controversa que a dos receptores centrais, pós-sinápticos. 2.º Como já foi dito, coloca dentro do mesmo compartimento biológico o mecanismo de retroacção que estimula a síntese amínica do corpo celular descrita por vários autores. 3.º Finalmente, e em conjunto com os fenómenos de alteração das membranas mitocondrias descritas por Roizin, sugere que a acção destes medicamentos se exerce por uma interferência com a estrutura das membranas celulares.

Se considerarmos importante o componente pré-sináptico na acção dos neurolépticos, a fisiopatologia do síndrome parkinsonoide produzido por estes medicamentos aproximar-se-iam mais do modelo da doença de Parkinson.

JOSÉ BERNARDO AZEREDO KEATING

SUMMARY

After a brief review of the clinical, pharmacological and biochemical effects of neuroleptics and the possible role of synaptic vesicles in synaptic transmission, evidence is produced to the effect that neuroleptics act, at least in part, by interfering with the uptake of neurotransmitter substances by the synaptic vesicles.

Three groups of white Wistar male rats were treated with daily injections of CPZ, thioproperazine, trifluoperidol, for at least 10 days, and compared with the same number of animals injected during the same time, with normal saline.

At zero time an intracerebral injection of DL-DOPA-2-C 14 was performed in all animals. After 40 minutes brains were removed, homogenized and separated in subfractions according to de Robertis. We compared the radioactivity in saline treated (N) and neuroleptic treated (T) animals, in the initial Homogenate (H) and subfractions S_1 , R_3 , M_2 , M_2A and M_2B .

No difference was noted between CPZ and saline treated animals.

Significant differences were observed between N and T for the other two neuroleptics showing an increase in radioactivity in the initial fraction S_1 in the Treated (T) animals and a decrease in the radioactivity of the synaptic subfractions M_2A and M_2B in the same group of animals, as compared with saline injected ones (N). These results are preliminary but they suggest that in neuroleptic treated animals a decrease in the availability of the neurotransmitter occurs in the pre-synaptic side of the synaptic complex.

Total protein and phospholipidic phosphorus were measured likewise in all subfractions.

No significant differences were noted between saline and drug treated animals.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. F. DOMINO *et. al.* — *Drugs affecting the central nervous system* — «The substituted Phenothiazines» (Buerger, A., Ed. Marcell Dekker, In, New-York, 1968).
- (2) S. COURVOISER *et. al.* — *Arch Int, Pharmacodyn*, 1953, XII n° 3-y 305-361.
- (3) COLE e DAVIS — *Psychopharmacology. A review of progress 1957-1967*. Public Health Service publication n° 1836 pg. 1097.
- (4) J. DELAY — *Neuropsychopharmacology «Presidential Adress»* — Proceedings of the 5th International Congress of the Collegium Internationale, Neuro-Psychopharmacologicum International Congress series n° 129, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- (5) R. DUVOISIN — *Psychopharmacology. A review of progress 1957-1967*. Public Health service (PHS) publication n° 1836 pág. 561.
- (6) GUTMANN-LEHMAN — *Laval Médical* 41, n° 4, Avril 1970.
- (7) PARKINSON'S DISEASE — (*N. I. N. D. B., Information Network*), pág. 12. U. S. Dept of Health, Education and Welfare, 1968.
- (8) MCGEER — *J. A. M. A.*, 177-665, 1961.
- (9) AYD — *J. A. M. A.*, 175: 1054, 1961.
- (10) HASKOWEC — *Nouvelles remarques sur l'akathisie N. Iconog. de la Salpe-trière*, 16, 289, 1903.
- (11) CORREIA DE OLIVEIRA — *Comunicação pessoal*, 1961.
- (12) SIGWALD — *Rev. Neurologique*, 100: 751, 1959.
- (13) SIGWALD — *Rev. Neurologique* 100: 553, 1959.
- (14) POURSINES — *Rev. Neurologique* 100: 745, 1959.
- (15) GRÜNTAL — *Psych. Neurol.* 140: 249, 1962.
- (16) ROIZIN — *Structural changes induced by neuroleptics. Revue Canadienne de Biologic*, vol. 20, n.º 2, Juin, 1961.
- (17) CAMERMAYER — *In «Psychotropic drugs and disfunctions of the basal ganglia»*. Public Health Service Publication n° 1938 (1968). U. S. Dept of Health, Education and Welfare.
- (18) L. ROIZIN — *Neuropsychopharmacology*, vol. 3, pág. 232, Elsevier 1962, Amsterdam. Proceedings of 3d meeting of the CINP.
- (19) CAZULLO — *Neuropsychopharmacology*, pág. 124. Proceedings of the 5th International Congress of Neuropsychopharmacology, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1966.
- (20) DELAY e P. DENNIKER — *In «Diseases of the Basal Canglia», Handbook of Clinical Neurology*, vol. 6, pág. 248. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- (21) CHRISTENSEN e WASE, A. W. — *Acta Pharmacol. et toxicol.*, 1956, 12, 81-84.

- (22) A. W. WASE J. CHRISTENSEN, E. POLLEY — *Archives of Neurology and Psychiatry*, 75(1) 54-56, 1956.
- (23) MERKULOV — *Uchen. Zap. Mosk. Med. Inst.* 6 — 190-196, 1957. *International Abstracts of Biological Sci.*, vol. 15, nº 3, pg., 457.
- (24) F. W. TADROS e ABDEL WAHAB — *Journal of Mental Science*, 1962, vol. 10, pg. 816.
- (25) CASSANO, SJÖSTRAND, HANSSON — *Arch. Int. Pharmacodyn*, 1965, 156, nº 1, pg. 340.
- (26) SJÖSTRAND, CASSANO, HANSSON — *Arch. Int. Pharmacodyn*, 1965, 156, nº 1, pg. 34.
- (27) EMMERSON e MIYA — *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1962, 137, pg. 148.
- (28) IRENE S. FORREST e L. H. PIETTE — *Neuropsychopharmacology*, vol. 3. Proceedings of the third meeting of the Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Munich 1962. P. B. Bradley, F. Flugel and Hoch. Elsevier Editors, Amsterdam, 1964.
- (29) BERNARD KATZ — *Nerve, muscle and synapse*. Mc Graw Hill. Ed. New-York, 1966.
- (30) MC. ILLWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System* (pg. 124). Little, Brown and Company. Boston, 1966.
- (31) CARVALHO GUERRA — *Tumefacção mitocondrial*, Porto 1964. (Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Farmácia do Porto).
- (32) M. SPIRITES — *Biochemical Pharmacology*, 1965, vol. 14, pg. 295-303.
- (33) ANSELL — «Phospholipids» *Physiological Pharmacology* (W. S. Root and Hoffman Edit.), vol. 3, pg. 417 — Academic Press.
- (34) R. M. FURTON *et. al.* — *Arch. Int. Pharmacodyn*, 1960 — CXXVIII, nº 3-4, pg. 260.
- (35) R. M. BURTON e SALVADOR — *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 96, Article 1, pg. 353-359, January 13, 1962.
- (36) R. M. BURTON *et. al.* — *Science*. Jan, 3, 1958, vol. 127, nº 3288, pg. 30-32.
- (37) R. SALVADOR *et. al.* — *Nature*, vol. 190, nº 4777, pg. 723-724. May 20, 1961.
- (38) ANTHONY PISCIOTTA *et. al.* — *Fed. Proceedings*, vol. 25, nº 2, March-April, 1966.
- (39) ANTHONY PISCIOTTA — *Proceedings of the Society for Exp. Biol. and Med.*, 1965, vol. 120, pg. 305-308.
- (40) ANTHONY PISCIOTTA — *J. Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 70, nº 2, pg. 229-235, August 1967.
- (41) GARDNER QUARTON — *The Neurosciences*, pg. 744. Study Program. Rockefeller University Press. New-York, 1967.
- (42) H. BLASHKO — *Biogenic Amines*, pg. 1. Progress in Brain Research, vol. 8, Elsevier — 1964.
- (43) GEORGE W. THORN, ALAN GOLDFIEN — *Diseases of the Adrenal Medulla*, in «Harrison's» — Principles of Internal Medicine Mc. Graw-Hill, 1959.
- (44) MC. LENNAN — *Synaptic Transmission*, pg. 24. W. B. Saunders, 1970.
- (45) ECCLES — *The physiology of Synapses*, pg. 61 — Springer — Verlag, 1963.
- (46) S. KETY — *The neurosciences. A study program*, pg. 444. The Rockefeller University Press, New-York, 1967.

- (47) PARKINSON'S DISEASE — *Staff of Parkinson's Disease Information Center, College of Physicians and Surgeons, Columbia University*. P. H. S. publication n° 1491 (1968), pg. 47.
- (48) O. ERÄNKÖ and MATTI HÄRKÖNEN — *Acta physiol. scand*, 1963, 58, pg. 285-286.
- (49) E. ANGELAKOS and MARY KING — *Psychopharmacology, A review of progress, 1957-1967*, Efron Ed. P. H. S. Publication n° 1836, pg. 27 e seguintes.
- (50) BENGT FALK — *Biogenic amines*, pg. 28-43. *Progress in Brain Research*, vol. 8, Elsevier, 1964.
- (51) HORNIEKIEVICZ — *Wien. Klin. Wschr* — 79: 309, 1963.
- (52) BERNHEIMER — *Klin. Wschr.*, 139: 1056, 1961.
- (53) EHRINGER — *Klin. Wschr.*, 38: 1236, 1960.
- (54) BARREAU — *Laval Médical*, 41: Sept. 1970, 903.
- (55) CANTAROW, SHEPARTZ — *Biochemistry*, pg. 594-602 Saunders, 1967.
- (56) MC. ILLWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, 4th Edition, pg. 467. Churchill Livingstone, 1971.
- (57) MORRIS LIPTON e SIDNEY UDNENFRIEND — *Psychopharmacology, a Review of Progress — 1957-1967*, pg. 7. Public. Health Service (P. H. S.) Publication n° 1836.
- (58) PARKINSON'S DISEASE — *Staff of Parkinson's Disease Information Center College of Physicians and Surgeons*. Columbia University. P. H. S. Publication n° 1491 (1968), pg. 54.
- (59) MC. ILLWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, 4th Edition, pg. 473. Churchill — Livingstone, 1971.
- (60) KOPIN — *Psychopharmacology. A Review of Progress, 1957-1967*, pg. 430.
- (61) MC. ILLWAIN — *Op. Cit.*, pg. 475.
- (62) TAYLOR and LAVERTY — *J. of Neurochem* 16, 1637 (1969).
- (63) MC. LENNAN — *Synaptic transmission*, pg. 117, 1970.
- (64) SALMOIRAGHI — *Neuropsychopharmacology*, vol. 3, 1962, pg. 228-231, 1962. Elsevier.
- (65) MC. LENNAN — *Synaptic transmission*, pg. 114, 1970. W. B. Saunders 1970.
- (66) MC. LENNAN — *O P. Cit.*, pg. 112, 1970.
- (67) SHERRINGTON — *The Integrative Action of the Nervous System* — Yale University Press, 1906 (Re-edição de 1961, pg. 17).
- (68) RAMON CAJAL — *Histologie du System Nerveux de L'Homme et des Vertébrés*, Maloine ed. 1909. Paris, pg. 135.
- (69) ECCLES — *The physiology of synapses*, pg. 3. Springer — Verlag, 1963.
- (70) RAMON CAJAL — *Histologie du Systém Nerveux de L'Homme et des Vertébrés*, Maloine ed. 1909, Paris.
- (71) DE ROBERTIS — *Histophysiologie des Synapses et Neurosécrétion*, pg. 31-37, Gauthier-Villars, Paris, 1964.
- (72) BARR, M. — *J. of Anatomy*, 74 (1939 — 1-11).
- (73) WHITTAKER — *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 60, n° 4, pg. 1081-1091, August, 1968.
- (74) DE ROBERTIS — *Histophysiologie des Synapses et Neurosécrétion*, pg. 39-58 Gauthier-Villars, Paris 1964.
- (75) MC. LENNAN — *Synaptic Transmission*, pg. 6-8, 1970, W. B. Saunders.

- (76) E. G. GRAY — *Symposium of International Society for Cell Biology*, vol. 8, pg. 211-227, Academic Press, 1969.
- (77) E. G. GRAY and R. A. WILLIS — *Brain Research*, 24 (1970), 149-168.
- (78) J. TAXI — *Progress in Brain Research*, vol. 31, pg. 6, Elsevier, 1969.
- (79) E. G. GRAY — *Progress in Brain Research*, vol. 31, pg. 141-152.
- (80) DE ROBERTIS — *Histophysiologie des Synapses et Neurosécrétion*, pg. 159, Gauthier-Villars, Paris 1964.
- (81) DE ROBERTIS — *Pharmacological Reviews*, vol. 18, pg. 413 a 424.
- (82) WHITTAKER — *Pharmacological Reviews*, vol. 18, Part I, pg. 401-411.
- (83) STJÄRNE — *Pharmacological Reviews*, vol. 18, Part I, pg. 425-432.
- (84) A. PELLEGRINO DE IRALDI and ANGELA MARIA SUBURO — *Experientia*, 27/3, pg. 289-290.
- (85) DAVID S. SMITH, JÄRLFORS and R. BERANEK — *The Journal of Cell Biology*, vol. 46, 1970, pg. 199-219.
- (86) G. K. AGHAJANIAN e F. E. BLOOM — *Brain Research*, 6 (1967), 716-727.
- (87) MARY BARTLETT BUNGE, RICHARD P. BUNG and EDITH R. PETERSON — *Brain Research* 6 (1967), 728-749.
- (88) STANLEY MCRAIN and EDITH R. PETERSON — *Brain Research*, 6 (1967) 750-762.
- (89) DE ROBERTIS — *Histophysiologie des synapses et neurosécrétion*, pg. 85, Ganthier-Villars, Paris 1964.
- (90) VICK WILLIAMS and ROBERT GROSSMAN — *The anatomical record*, vol. 166, nº 2, February, 1970.
- (91) KATZ — *Muscle Nerve and Synapse*, pg. 112-127, Mc. Graw-Hill, New-York, 1966
- (92) CSILLIK — *Functional Structure of the Post-synaptic Membrane of the Myoneural Junction*, pg. 18, Akadémiai Kiadó Budapest, 1965.
- (93) EDUARDO DE ROBERTIS — *Science*, 12 March, 1971, 171, nº 3975, pg. 963-971.
- (94) KATZ — *Nerve, Muscle and Synapse*, pg. 130-137, Mc. Gram-Hill N. Y., 1966.
- (95) MORONEY — *Facts From Figures*, pg. 96-107, Penguin Books, 1958.
- (96) FATT — *Handbook of Physiology*, vol. I, pg. 208, Williams and Wilkin Co, Batimore 2, Maryland.
- (97) DE ROBERTIS — *Histophysiologie des Sinapses et Neurosécrétion*, pg. 94, Gauthiers-Villars, Paris, 1964.
- (98) ECCLES — *The Physiology of Synapses*, pg. 35, Springer Verlag, 1964.
- (99) CREUTZFELDT, M. A. E. KAWA, HÖSLI — *Progress in Brain Reserach*, vol. 31, pg. 265-273, Elsevier, 1969, Amsterdam.
- (100) NILS-ÅKE HILLARP — *Handbook of Physiology*, section I, vol. II, pg. 997.
- (101) U. S. VON EULER — *Handbook of Physiology*, sector I, vol. I, pg. 216-235.
- (102) J. P. TRANZER, H. THOENEN, R. L. SNIPES J. G. RICHARDS — *Progress in Brain Research*, vol. 31, pg. 36. Elsevier 1969, Amsterdam.
- (103) PARKINSON'S DISEASE — *NINDB Information network*, pg. 52, U. S. Department of Health, Education and Welfare, 1968.
- (104) ANDREOLI *et. al.* — *Exp. Brain Research*, 11, 17-28, 1970.
- (105) GLOWINSKI and AXELROD — *Pharmacological Reviews*, vol. 18, part I, pg. 775-785.
- (106) J. R. SMYTHIES, *et al.* — *Nature*, 231, May 21, 1971, pg. 185.

- (107) J. R. SMYTHIES *et al.* — *Nature*, 231, May 21, 1971, pg. 188.
- (108) H. CORRODI — *Life Sciences*, vol. 6, pg. 767-774, 1967, Pergamon Press.
- (109) SARA FISZER e DE ROBERTIS — *Journal of Neurochemistry*, 1969, vol. 16, pg. 1201-1209.
- (110) AXELROD — *Progress in Brain Research*, vol. 31, pg. 21, 1969, Elsevier.
- (111) WHITTAKER — *The Biochem. Journal*, 1959, vol. 72, pg. 694.
- (112) E. DE ROBERTIS, A. PELLEGRINI DE IRALDI, G. RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ and L. SALGANICOFF — *J. of Neurochemistry*, 1962, vol. 9, pg. 23-35.
- (113) E. G. GRAY and V. P. WHITTAKER — *J. Anat. of London*, 96, 74-88, 1962.
- (114) E. G. GRAY and V. P. WHITTAKER — *The Journal of Physiology*, pg. 35, vol. 153, n° 2, 1960.
- (115) E. DE ROBERTIS, GEORGINA RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, L. SALGANICOFF, AMANDA PELLEGRINO DE IRALDI and L. M. ZIEHER — *J. of Neurochemistry* (1963), vol. 10, pg. 225-235.
- (116) E. G. LAPETINA, E. F. SOTO and E. DE ROBERTIS — *Biochimica et Biophysica Acta*, 135 (1967), 33-43.
- (117) MC. CAMMAN, DE ROBERTIS — *J. Neurochem*, 12, 927 (1965).
- (118) J. L. TROTTER and R. M. BURTON — *J. Neurochem* (1969), 16, pg. 809-811.
- (119) LAATSCH *et al.* — *The Journal of Experimental Medicine*, April, 1 1962, vol. 115, n° 4, pg. 777-788.
- (120) AUTILIO, NORTON, TERRY — *J. Neurochem*, II, 17 (1964).
- (121) TAKAHITO KATO and MASANORI KUROKAWA — *J. of Cell Biology* (1967), vol. 32, n° 3, pg. 649-662.
- (122) N. LEMSKY, JOHNSTON and H. DEKIRMENJIAN — *Exp. Brain Research*, 11, 392-410, 1970.
- (123) KORNGUTH *et al.* — *The Journal of Biological Chemistry* (1971) February, 25, pp. 1177-1181.
- (124) WHITTAKER — *Progress in Brain Research*, vol. 31, pg. 221 e seguintes, 1969, Elsevier.
- (125) GEORGINA RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, MARTHA ALBÉRICI and DE ROBERTIS — *J. of Neurochem* (1967), vol. 14, pg. 213-224.
- (126) COTMAN, MAHLER, ANDERSON — *Biochim Biophys. Acta*, 163 (1968), 272-275.
- (127) FONUM — *J. Neurochem*, vol. 17, n° 7, pg. 1029 (1970).
- (128) FONUM — *J. Neurochem*, vol. 17, n° 7, pg. 1095 (1970).
- (129) T. HAGA — *J. Neurochem*, vol. 18, n° 6, pg. 781 (1971).
- (130) H. HAUSER, M. C. PHILLIPS MARCHBANKS — *Biochem. J.* (1970), 120-329-335.
- (131) LESLIE IVERSEN and SOLOMON H. SNYDER — *Nature*, vol. 220 ,n° 5169, pg. 796-798 (1968).
- (132) J. SCHUBERTH, B. SPAFF and A. SUNDWALL — *J. of Neurochem*, 1970, vol. 17, n° 4, pg. 461.
- (133) M. J. KUHAAR E. G. SHASKAN, S. H. SNYDER — *J. of Neurochem*, 1971, vol. 18, pg. 333.
- (134) J. B. MACON, L. SOKOLOFF and J. GLOWINSKI — *J. of Neurochem*, 1971, vol. 18, pg. 323.
- (135) S. FAHN, J. RODMAN and L. J. CÔTÉ — *J. of Neurochem*, 1969, vol. 16, pg. 1293.

- (136) D. G. GRAHAME, SMITH and A. G. PARFITT — *J. of Neurochem*, vol. 17, 1970, pg. 1339.
- (137) MC. ILWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, pg. 468, 4th Edition, 1971.
- (138) D. B. REIS and P. B. MOLINOFF — *J. of Neurochem*, vol. 19, pg. 195, 1972.
- (139) J. AXELROD — *Progress in Brain Research*, vol. 8, pg. 82, 1964, Elsevier.
- (140) A. PLETSCHER — *In Neuro-Psychopharmacology a Review of Progress 1957-67*, pg. 650 — P. H. S. Publication, n° 1836, 1968.
- (141) MC. ILWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, pg. 474, 1971, Churchill Livingstone.
- (142) A. TAGLIAMONTE, P. TAGLIAMONTE and G. L. GESSA — *J. of Neurochem*, 1970, vol. 17, pg. 773-778.
- (143) DONALD F. BOGDANSKI, ANJA TISSARI, B. B. BRODIE — *Neuro-Psychopharmacology a Review of progress, 1957-1967*. P. H. S. Publication, n° 1836, pg. 17, 1968.
- (144) D. BOGDANSKI, ANJA H. TISSARI and BERNARD BRODIE — *Biochim. Biophys. Acta*, 219, 1970, 189-199.
- (145) A. KAITA PITCHIE and ALAN M. GOLDBERG — *Science*, vol. 169, pg. 489, 1970.
- (146) K. Y. NG, ROBERT W. COLBURN, IRWIN J. KOPIN — *Nature*, vol. 230, April 2, 1971.
- (147) R. M. BURTON and GIBBONS — *Biochim. Biophys. Acta* (1964), 220-223.
- (148) R. M. BURTON — *Drugs and Poisons in relation to developing nervous system*. Public Health Service publication n° 1791, pg. 60.
- (149) N. LAKSHMINARAYANAIH — *Transport phenomena in membranes*. Academic Press, 1969, N. Y., pg. 410.
- (150) MC. ILWAIN — *Biochemistry and the Central Nervous System*, pg. 398, Churchill, Livingstone, Edinburg.
- (151) MC ILWAIN — *Op. Cit.*, pg. 397.
- (152) S. H. APPEL and B. L. PARROT — *J. of Neurochem*, 1970, vol. 17, pg. 1619-1626.
- (153) L. G. ABOOD *et. al.* — *Biochim Biophys. Acta*, 153, 1958, 531-544.
- (154) L. G. ABOOD and MATSUBARA — *Biochim. Biophys. Acta*, 163, 1968, 534-549.
- (155) DE ROBERTIS *et. al.* — *J. Biol. Chem*, 242: 3487-3493, 1967.
- (156) MC. ILWAIN — *Op. Cit.*, pg. 232.
- (157) E. COSTA and B. WEISS — *Neuro-Psychopharmacology, a Review of Progress, 1957-1967*, pg. 47-51 — P. H. S. Publication n° 1836, 1968.
- (158) MAC AFEE, SCHARRER, GREENGARD — *Science* 171 pg. 156.
- (159) MC. ILWAIN — *Op. cit.*, pg. 359, 1971.
- (160) PER HEDQVIST — *Acta Physiologica Scandinavica*. Supplementum 345, Stockholm, 1970.
- (161) G. B. ANSELL — *Advances in Lipid Research*, pg. 141-149, Academic Press, 1965.
- (162) ROBERT W. COLBURN and JAMES W. MAAS — *Nature*, 208, pg. 37, 1965.
- (163) JAMES W. MAAS and ROBERT W. COLBURN — *Nature*, 208, pg. 41, 1965.
- (164) K. S. RAJAN, J. M. DAVIS R. W. COLBURN — *J. of Neurochem*, vol. 18, n° 3, 1971, pg. 345.

- (165) K. S. RAJAN, J. M. DAVIS, R. W. COLBURN and F. H. JARKE — *J. of Neurochem*, vol. 19, n° 4, 1971, pg. 1099.
- (166) S. GABALLAH and C. POPOFF — *J. of Neurochem*, vol. 18, n° 9, 1971, pg. 1795.
- (167) Mc. ILWAIN — *Op. Cit.*, 1971, pg. 380-91.
- (168) (1).
- (169) H. GRUNDFEST — *Neuropsychopharmacology*, vol. 3, pg. 254-255, 1964, Elsevier.
- (170) R. SPEHLMANN — *Neuropsychopharmacology*, vol. 3, pg. 256-259, 1964, Elsevier.
- (171) LAVERTY, R. and SHARMANN, D. F., 1965 — *Brit. J. Pharmacology*, 24, 759.
- (172) A. PLETSCHER and M. DA PRADA — *Neuropsychopharmacology*, pg. 304-311, Excerpta Médica Foundation, 1967.
- (173) B. E. ROOS — *Neuropsychopharmacology*, pg. 312-313, Excerpta Médica Foundation, 1967.
- (174) J. VAN ROSSUM — *Neuropsychopharmacology*, Excerpta Médica Foundation, pg. 321-334, 1967.
- (175) K. F. GREY and A. PLETSCHER — *J. Pharmacology and Exp. Therapeutic*, vol. 133, pg. 18, 1961.
- (176) ARVID CARLSSON and MARGIT LINDQVIST — *Acta Pharmacol. et toxicol.*, 1963, 20, 140-144.
- (177) HANS CORRODI, KJELL FUXE and THOMAS HÖKFELT — *Life Sciences*, vol. 6, pg. 767-774, 1967.
- (178) H. CORRODI — *Bayer Symposium III*, 252-255, 1970, Springer-Verlag.
- (179) ANDEN HÖKFELT — *European Journal of Pharmacology*, 2, 59-64, 1967.
- (180) ANDEN, CORRODI *et. al.* — *Life Sci.*, 5, 561-568, 1966.
- (181) K. F. GEY and A. PLETSCHER — *Experientia*, 1968, 24, pg. 335-336.
- (182) HENRIK NYBÄCK and GÖRAN SEDVALL — *European Journal of Pharmacology*, 10, 1970, 193-205.
- (183) A. CHERAMY, B. J. BESSON and J. GLOWINSKI — *European Journal of Pharmacology*, 10, 1970, 206-214.
- (184) F. JAVOY, M. HAMON and J. GLOWINSKI — *European Journal of Pharmacology*, 10, 1970, 178-188.
- (185) J. GLOWINSKI — *Bayer Symposium III*, pg. 237-248, 1970.
- (186) B. SCATTON, A. CHERAMY, M. J. BESSON and J. GLOWINSKI — *European Journal of Pharmacology*, 13, 1970, 131-133.
- (187) JULIUS AXELROD, GEORG HERTTING and LINCOLN POTTER — *Nature*, pg. 297, April 21, 1962.
- (188) H. T. HOENEN, HÜRLIMANN, HAEFELY — *Int. J. Neuropharmac.*, 1965, 79-89.
- (189) JACQUES GLOWINSKI and JULIUS AXELROD — *Nature*, 204, pg. 318-319, December, 1964.
- (190) J. L. MEEK, A. R. KRALL, M. A. LIPTON — *J. Neurochemistry*, 1970, vol. 17, pg. 1627-1635.

(1) Referência 168 foi suprimida após a revisão final do texto.

- (191) JOSEPH T. COYLE and SOLOMON H. SNYDER — *Science*, vol. 166, November, 1969, pg. 899-901.
- (192) S. SYMCHOWICZ, C. A. KORDUBA and J. VEALS — *Life Sciences*, vol. 10, Part I, pg. 35-42, 1971.
- (193) C. C. HUG, J. R. and T. OKA — *Life Sciences*, vol. 10, Part I, pg. 201-213, 1971.
- (194) R. M. BURTON — *Reserpine distribution in rat brain subcellular particles Proceedings. 7th International Congress, Collegium Neuropsychopharmacologicum, Prague, 1970.*
- (195) R. M. BURTON — *Reserpine distribution. Effect on lipid and protein turnover. Proceedings. 7th International Congress, Collegium Neuropsychopharmacologicum, Prague, 1970.*
- (196) S. UDENFRIEND, P. ZALTZMAN-NIRENBERG — *Science*, vol. 42, pg. 394-396, 1963.
- (197) K. Y. NG, ROBERT W. COLBURN, IRWIN J. KOPIN — *Nature*, vol. 230, pg. 331, 1971.
- (198) NATHAN S. KLINE — *Psychopharmacology. A Review of Progress, 1946-1967*, pg. 2.

DOIS MUSEUS INDUSTRIAIS E COMERCIAIS CRIADOS NO SÉCULO XIX

Se os museus científicos criados em Portugal no século XVIII se propunham, como objectivos primordiais, ou a distração de príncipes, como foi o caso do museu do Palácio da Ajuda, criado no tempo de D. José, ou o ensino universitário, como se verificou com os museus e gabinetes criados por Pombal na Universidade de Coimbra, os museus industriais e comerciais criados no século XIX tinham como objectivo, fundamentalmente, contribuir para o fomento da indústria e do comércio. Criados em 1883 por António Augusto de Aguiar, que visitara o museu industrial de *South Kensington* ⁽¹⁾ e estava a par do que, no domínio do ensino profissional e no do fomento industrial e comercial, se estava a fazer nos países mais evoluídos da Europa, os Museus Industriais e Comerciais situam-se, de certo modo, na linha dos *Conservatórios de Artes e Ofícios* criados por Passos Manuel, por Decretos de 18 de Novembro de 1836 e de 5 de Janeiro de 1837, respectivamente em Lisboa e no Porto.

Ao criar os Museus Industriais e Comerciais pelo Decreto de 24 de Dezembro de 1883 ⁽²⁾, António Augusto de Aguiar, Ministro das Obras Públicas, Comércio e Indústria, considerou-os «o complemento indispensável» das escolas industriais e de desenho industrial que viria a criar dez dias mais tarde, pelo Decreto de 3 de Janeiro de 1884 ⁽³⁾.

Para que a articulação entre os Museus e as Escolas fosse mais íntima e funcional, o Decreto de 3 de Janeiro de 1884 criou uma escola de desenho industrial junto de cada um dos museus.

O Decreto de 24 de Dezembro de 1883 mandava, pois, que fossem criados dois museus industriais e comerciais, um em Lisboa e outro

(1) ANTÓNIO JOSÉ ARROIO, *Relatório sobre o ensino elementar industrial e comercial*, Lisboa, Imprensa Nacional, 1911, p. 15.

(2) *Diário do Governo*, n.º 297, de 31 de Dezembro de 1883. Parte da legislação sobre os museus industriais e comerciais foi compilada por GASPAR CÂNDIDO DA GRAÇA CORREIA FINO, *Colecção de legislação industrial*, Lisboa, Imprensa Nacional, 1893, pp. 400-452.

(3) *Diário do Governo*, n.º 5, de 7 de Janeiro de 1884.

no Porto (*art. 1.º*), devendo o primeiro ser estabelecido no edifício da Real Casa Pia e o segundo «em qualquer edifício do Estado que, para este fim, possa ser aproveitado» (*art. 1.º, § 1.º*).

Cada um dos museus comportaria duas secções: industrial e comercial. Cada uma destas secções comportaria, por sua vez, duas subsecções: nacional e estrangeira (*art. 1.º, § 2.º*).

O objectivo principal dos museus seria adquirir e expor ao público colecções de produtos e matérias-primas, acompanhadas de esclarecimentos suficientes por onde se conhecesse a sua origem, o nome do fabricante ou comerciante, o preço no local da produção, as despesas de transporte, os mercados de consumo e todas as mais informações que pudessem dar uma ideia prática suficientemente nítida do seu valor e da sua aplicação (*art. 1.º, § 3.º*).

O Museu Industrial e Comercial de Lisboa seria administrado por uma direcção composta de cinco membros: o presidente da Associação Comercial de Lisboa, o provedor da Real Casa Pia, o chefe da Repartição do Comércio e Indústria do Ministério das Obras Públicas, um delegado do Instituto Industrial e Comercial de Lisboa e um indivíduo que reunisse os dotes necessários para o desempenho dessas funções (*art. 2.º*). Por sua vez, o Museu Industrial e Comercial do Porto seria administrado por uma comissão composta por três membros: o presidente da Associação Comercial do Porto, um delegado do Instituto Industrial do Porto e um indivíduo que reunisse os dotes necessários para o desempenho dessas funções (*art. 3.º*) ⁽⁴⁾.

Por Portaria de 6 de Maio de 1884 ⁽⁵⁾, António Augusto de Aguiar

Cfr. JOAQUIM FERREIRA GOMES, *Escolas industriais e comerciais criadas no século XIX*, in «Revista Portuguesa de Pedagogia», Ano XII, Coimbra, 1978, pp. 79-151.

⁽⁴⁾ Por duas Portarias da mesma data do Decreto acabado de referir e publicadas no mesmo *Diário do Governo*, foram nomeados membros da direcção dos Museus de Lisboa e do Porto, respectivamente, Manuel Raimundo Valadas e Joaquim Pedro de Oliveira Martins.

O Museu de Lisboa foi inaugurado, na Casa Pia, no dia 14 de Janeiro de 1884. Após uma breve alocução de António Augusto de Aguiar, os cargos da direcção foram assim distribuídos: presidente — Carlos Ferreira dos Santos e Silva, presidente da Associação Comercial de Lisboa; vice-presidente — Carlos Maria Eugénio de Almeida, par do reino e provedor da Casa Pia; secretário — Manuel Raimundo Valadas, tenente-coronel do estado maior de engenharia e director da Casa Pia (*Auto de inauguração do Museu Industrial e Comercial de Lisboa*, in «Diário do Governo», n.º 21, de 26 de Janeiro de 1884).

⁽⁵⁾ *Diário do Governo*, n.º 103, de 7 de Maio de 1884.

promulgou o *Regulamento dos museus industriais e comerciais*. Segundo esse Regulamento, os museus teriam por fim, não só proporcionar instrução prática através da exposição dos variados produtos da indústria e do comércio, mas ainda prestar um serviço mais directo aos fabricantes e consumidores, mostrando-lhes onde e como poderiam obter vantajosamente os objectos necessários ao seu abastecimento (*art. 1.º*).

Os museus teriam, além disso, a natureza de *exposições permanentes*, pelo que conteriam, dentro dos limites do possível, o conjunto dos produtos industriais e comerciais, e organizariam as colecções desses produtos com amostras fornecidas, na máxima parte, pelos próprios fabricantes e negociantes.

Essas amostras seriam acompanhadas por uma factura simulada que indicasse: o preço do objecto, referido a uma unidade métrica; o nome do expositor e o lugar da fabricação e da venda; indicações geográficas necessárias, com relação ao lugar; meios e preços de transporte até Lisboa ou Porto; importância dos direitos de exportação e importação, nas alfândegas, nacionais ou estrangeiras, conforme se referissem a produtos de importação ou exportação, e mais despesas diversas (*art. 1.º, § 1.º*).

Os produtos expostos seriam acompanhados de uma factura simulada e dos rótulos de classificação dos museus (*art. 1.º, § 2.º*).

Além das informações indicadas, os expositores poderiam fornecer quaisquer esclarecimentos, catálogos, memórias, etc., que seriam patentes ao público pelos empregados dos museus, podendo a sua distribuição pelo público, dentro dos museus, ser autorizada pelas respectivas direcções quando os expositores o solicitassem, e sempre que as referidas direcções o julgassem conveniente (*art. 1.º, § 3.º*).

Os produtos da indústria seriam acompanhados, tanto quanto possível, de séries de amostras que elucidassem os processos de fabricação, mostrando o objecto nos seus successivos momentos, aparecendo tais séries de amostras por ordem ao lado do produto acabado (*art. 4.º, § único*).

Os museus dividir-se-iam em duas grandes zonas: nacional e estrangeira. A zona nacional subdividir-se-ia em: metropolitana e colonial (*art. 5.º*).

Na zona nacional metropolitana, cada um dos museus abriria uma secção especial regional, que seria constituída: para o museu de Lisboa, pelos distritos de Faro, Beja, Évora, Portalegre, Santarém, Leiria,

Lisboa, Castelo Branco, Funchal, Angra, Horta e Ponta Delgada; para o museu do Porto, pelos distritos de Viana, Vila Real, Braga, Porto, Bragança, Aveiro, Coimbra, Viseu e Guarda.

Nessa secção especial regional, os directores dos museus procurariam expor colecções, tão completas quanto possível, das matérias-primas e produtos das regiões respectivas, de modo a dar ao público uma imagem aproximadamente exacta da aptidão e capacidade real de cada distrito. Além disso, os conservadores dos museus deveriam ir coligindo, pelos meios ao seu alcance, os elementos de uma estatística industrial nacional referida às regiões respectivas (*art. 6.º*).

As direcções dos museus deveriam coligir, por meio de originais ou reproduções, os objectos necessários para se constituir gradualmente a colecção retrospectiva ou histórica das ferramentas e utensílios, bem como dos objectos notáveis das indústrias e da arte industrial nacional (*art. 7.º*).

A classificação especificada dos objectos expostos seria feita num catálogo impresso, comum aos dois museus. Na elaboração desse catálogo, deveria seguir-se a nomenclatura adoptada pelos principais museus estrangeiros similares, e nomeadamente pelo museu belga, indicando-se, sempre que possível, a correspondência com a pauta geral das alfândegas do reino (*art. 8.º*).

Entre o museu de Lisboa e do Porto far-se-ia a permuta de todos os objectos duplicados (*art. 9.º*).

Os museus estariam patentes ao público, gratuitamente, todos os dias, incluindo os santificados, podendo também estar abertos de noite, quando as condições de instalação o permitissem (*art. 10.º*).

Com o objectivo de coligir os produtos que haveriam de constituir os museus, as respectivas direcções deveriam distribuir, com a profusão necessária, circulares, expondo a natureza e fins da instituição e os benefícios que dela poderiam tirar os expositores e os consumidores. Essas circulares, que seriam redigidas umas em português e outras em francês, seriam enviadas às associações comerciais e câmaras de comércio, às corporações fabris e operárias, aos fabricantes e negociantes de Portugal e do estrangeiro, aos ministros e cônsules de Portugal no estrangeiro e aos museus estrangeiros (*art. 11.º*).

Em ordem a reunir colecções de produtos da pequena indústria e das indústrias caseiras, o Governo ordenaria às autoridades da sua dependência que atendessem os pedidos e as instruções das direcções dos museus, sendo esse serviço considerado como oficial (*art. 12.º*).

O legislador promete que seriam fornecidos aos dois museus quais-

quer objectos aproveitáveis, restos de antigas colecções, duplicados do museu colonial, etc., (*art. 14.º*) e ainda cópias de todos os projectos e memórias descritivas dos aparelhos a que já tenham sido ou venham a ser concedidas patentes de invenção (*art. 15.º*).

As escolas de desenho industrial criadas, por Decreto de 3 de Janeiro de 1884, junto aos museus de Lisboa e Porto seriam estabelecidas no recinto desses museus e ficariam subordinadas à sua direcção (*art. 17.º*) ⁽⁶⁾.

Os cursos de desenho deveriam ter, tanto quanto possível, um carácter de nacionalidade, inspirando-se nos modelos e formas artísticas dos objectos da indústria tradicional popular (*art. 18.º*). Além do ensino do desenho, as direcções dos museus deveriam promover prelecções ou cursos industriais, convidando pessoas de aptidão reconhecida, permitindo que os expositores viessem expor verbalmente o que julgassem a bem do seu interesse e, finalmente, se os recursos lho consentissem, subsidiando cursos de matérias directamente ligadas com o ensino industrial ou comercial-geográfico (*art. 19.º*).

Junto aos museus, formar-se-iam bibliotecas industriais e comerciais, compostas especialmente de obras de tecnologia, almanaques do comércio e listas de moradas, publicadas nos diferentes países, jornais e revistas especiais, catálogos, colecções de modelos e desenhos, mapas, etc. As bibliotecas estariam patentes ao público sempre que os museus o estivessem (*art. 20.º*).

As direcções dos museus deveriam publicar um *Boletim* que contivesse, além do índice das colecções catalogadas, os preços correntes dos mercados, cotações, notícia das adjudicações de obras, estatísti-

⁽⁶⁾ A escola de desenho industrial criada, em Belém, na Casa Pia, junto do Museu Industrial e Comercial de Lisboa, recebeu, por Decreto de 9 de Outubro de 1884 (*Diário do Governo*, n.º 234, de 14 de Outubro), o nome de Escola *Gil Vicente*. Começou a funcionar no ano lectivo de 1884-85, no dia 10 de Dezembro de 1884, com 48 alunos (FRANCISCO DA FONSECA BENEVIDES, *Relatório sobre as escolas industriais e de desenho industrial da circunscrição do sul (1884-1885)*, Lisboa, Imprensa Nacional, 1885, pp. 11-12). Foi extinta pelo Decreto de 8 de Outubro de 1891 (*Diário do Governo*, n.º 227, de 9 de Outubro).

A escola criada, em Vilar, no Palácio de Cristal, junto do Museu do Porto, recebeu, por Decreto de 5 de Dezembro de 1884 (*Diário do Governo*, n.º 282, de 11 de Dezembro), o nome de *Escola Infante D. Henrique*. Começou a funcionar no ano lectivo de 1885-86, no dia 14 de Janeiro de 1886, estando matriculados 555 alunos, dos quais apenas foram admitidos 160 (JOSÉ GUILHERME DE PARADA e SILVA LEITÃO, *Relatórios sobre as escolas industriais e de desenho industrial da circunscrição do norte (1884-1885 a 1886-1887)*, Lisboa, Imprensa Nacional, 1888, pp. 48-49).

cas dos movimentos dos portos e quaisquer outras informações práticas de reconhecida utilidade para o comércio e indústria (*art. 21.º*).

Junto da direcção de cada museu (cuja constituição foi atrás referida), seria instituído um conselho de dez membros, escolhidos entre os industriais e comerciantes, ou ainda entre pessoas que o merecessem por motivos especiais, sendo seus membros natos os presidentes das respectivas câmaras municipais e os inspectores das escolas industriais e de desenho industrial da circunscrição do sul e da circunscrição do norte (*art. 25.º*).

Por Portaria de 19 de Janeiro de 1885 (7), António Augusto de Aguiar aprova a *Classificação sistemática dos Museus Industriais e Comerciais de Lisboa e do Porto*. Os Museus deveriam ser classificados em quatro *Divisões*: Matérias minerais e suas manufacturas; Matérias vegetais e suas manufacturas; Matérias animais e suas manufacturas; Manufacturas complexas. Cada *Divisão* seria subdividida em *Secções* que, por sua vez, se subdividiriam em *Grupos* (num total de 48), subdividindo-se estes em *Classes* (num total de 394) (8).

Os Museus Industriais e Comerciais nasceram e desenvolveram-se em paralelo com as escolas industriais e comerciais. Por isso, tendo Emídio Navarro decretado um novo plano de organização do ensino industrial e comercial em 30 de Dezembro de 1886 (9), era natural que sentisse necessidade de modificar em alguns pontos a organização dos Museus. Foi o que efectivamente fez por Decreto de 19 de Dezembro de 1888 (10), em que aprova o novo *Regulamento dos museus industriais e comerciais*.

Segundo esse *Regulamento*, os Museus Industriais e Comerciais teriam carácter de exposições permanentes e seriam destinados a expor ao público colecções de matérias-primas, de produtos ou de modelos, fornecidas por particulares ou organizadas pelo Estado, com o intuito de:

a) Mostrar aos fabricantes nacionais onde e como poderiam obter vantajosamente as matérias-primas de que carecessem e dar-lhes a

(7) *Diário do Governo*, n.º 28, de 6 de Fevereiro de 1885.

(8) Em 23 de Novembro de 1885, a direcção do Museu do Porto aprovou o regulamento do serviço interno daquele museu. A referida direcção era constituída por Augusto Pinto Moreira da Costa, Manuel Rodrigues Miranda Júnior e Joaquim Pedro de Oliveira Martins. Era conservador do museu Joaquim de Vasconcelos (cfr. GASPAREL CÂNDIDO DA GRAÇA CORREIA FINO, *ob. cit.*, pp. 426-438).

(9) *Diário do Governo*, n.º 34, de 14 de Fevereiro de 1887.

(10) *Diário do Governo*, n.º 15, de 18 de Janeiro de 1889.

conhecer os produtos da sua indústria que pudessem ter mais fácil venda nos mercados estrangeiros;

b) Prestar aos fabricantes e negociantes nacionais as informações necessárias sobre o andamento dos negócios nos países estrangeiros e proporcionar-lhes todos os esclarecimentos que pudessem facilitar as transacções comerciais com os produtores ou consumidores desses países;

c) Mostrar aos fabricantes e negociantes estrangeiros e aos consumidores nacionais onde e como poderiam obter vantajosamente os produtos de que necessitassem;

d) Proporcionar instrução prática pela exposição permanente de bons padrões e modelos das artes industriais de todos os países e de todos os estilos, educando o gosto do produtor e do consumidor, e fazendo apreciar o que há de valioso, de original e de característico nas tradições artísticas da indústria nacional;

e) Patentear a história das indústrias e artes industriais e sobretudo a história das indústrias nacionais, as suas origens, os seus progressos e os seus processos de trabalho, por meio de colecções retrospectivas de ferramentas, utensílios, maquinismos e produtos (originais ou reproduções);

f) Mostrar o estado da instrução industrial no país (*art. 1.º*).

Nos Museus, deveria, quanto possível, procurar-se facilitar, aos produtores e comerciantes nacionais, o estudo prático dos negócios e habilitá-los para a concorrência nos mercados estrangeiros ou coloniais, não só patenteando-lhes os produtos preferidos nos mesmos mercados, mas também dando-lhes a conhecer o melhor modo de acondicionamento e as condições em que esses produtos podem ser mais fácil e vantajosamente vendidos (*art. 3.º*). Para isso, procurariam os directores dos museus obter, com o auxílio dos ministros e dos cônsules portugueses nos países estrangeiros, colecções de:

a) Produtos desses países cuja exportação para Portugal fosse importante;

b) Amostras de matérias-primas produzidas nesses países que pudessem ser empregadas com vantagem pela indústria portuguesa ou que pudessem dar lugar à introdução de novas indústrias em Portugal;

c) Amostras de produtos estrangeiros, importados nos grandes mercados desses países, similares dos que a indústria portuguesa pudessem produzir e exportar (*art. 3.º, § 1.º*).

Os museus seriam divididos em três secções: *comercial, industrial* e de *arte industrial*. Cada secção comportaria duas sub-secções: *nacional* e *estrangeira* (*art. 9.º*).

Em cada museu haveria uma biblioteca comercial, industrial e de arte industrial e um gabinete de estudo para os visitantes poderem fazer cópias, esboços, etc. (*art. 9.º, § 1.º*).

Quando as circunstâncias o aconselhassem, poderiam ser destacadas de cada museu parte das respectivas coleções, a fim de serem sucessivamente expostas em diversas localidades do Continente e das Ilhas Adjacentes.

Essas coleções destacadas constituiriam o *museu ambulante*, que seria exposto sucessivamente nos grandes e pequenos centros industriais, principiando-se pelas localidades em que estivessem estabelecidas escolas industriais ou de desenho industrial (*art. 22.º*).

Em ordem a facilitar a instrução prática pela divulgação de bons padrões e modelos de arte industrial e a fazer apreciar o que há de valioso, original e característico nas tradições artísticas da indústria portuguesa, poderia ser organizado em cada um dos museus um serviço de reprodução económica desses modelos e padrões — pela fotografia, pela moldagem ou por outros processos. Essas reproduções destinar-se-iam a completar as coleções dos museus de Lisboa e do Porto e a estabelecer permuta com museus estrangeiros congêneres; a facilitar a organização dos museus ambulantes; a enriquecer as coleções dos pequenos museus estabelecidos nas províncias pelas corporações locais e a ampliar as coleções de ensino das escolas industriais e de desenho industrial (*art. 36.º*).

O *Regulamento das escolas industriais e de desenho industrial*, aprovado por Decreto de 23 de Fevereiro de 1888⁽¹¹⁾, na sequência do disposto no artigo 34.º do *Regulamento* de 6 de Maio de 1884, determinava que seriam expostos anualmente nos museus os desenhos e modelos executados pelos alunos das escolas industriais e de desenho industrial que fossem considerados necessários para demonstrar o estado do ensino (*arts. 28.º e 62.º*)⁽¹²⁾.

Ao reorganizar o ensino industrial e comercial, pelo Decreto de 8 de Outubro de 1891⁽¹³⁾, João Franco ocupa-se também dos Museus Industriais e Comerciais. Repete o essencial do Decreto de 19 de Dezem-

(11) *Diário do Governo*, n.º 44, de 24 de Fevereiro de 1888.

(12) Um diploma de 30 de Junho de 1890 estabelece quais as informações que deveriam acompanhar os desenhos expostos (cfr. GASPAR CÂNDIDO DA GRAÇA CORREIA FÍNO, *ob. cit.*, pp. 213-218).

(13) *Diário do Governo*, n.º 227, de 9 de Outubro de 1891.

bro de 1888. Nota-se, porém, um interesse mais acentuado pela ligação com as colónias (*arts. 71.º, 72.º e 73.º*). Além disso, a interligação entre os Museus e as Escolas é reforçada. Efectivamente, além da exposição anual das provas e trabalhos dos alunos das escolas industriais da respectiva circunscrição (*art. 68.º*), deveria efectuar-se, alternadamente, nos Museus de Lisboa e do Porto, uma exposição anual colectiva dos trabalhos de todas as escolas industriais do reino, para poder apreciar-se o resultado comparado do ensino na circunscrição do Norte e na circunscrição do Sul (*art. 69.º*). Mais importante ainda é o facto de os Museus deverem passar a dispor de uma *secção pedagógica* ou de material de ensino. Com efeito, cada um dos Museus seria dividido em cinco secções gerais: *comercial, industrial, tecnológica, de arte industrial e pedagógica* ou do material do ensino, subdividindo-se cada uma delas em duas subsecções: nacional e estrangeira (*art. 75.º*).

Além da biblioteca e do gabinete de estudo para os visitantes, que deveriam existir em ambos os Museus, criar-se-ia, no Museu do Porto, uma oficina modelo para abastecer de material didáctico as escolas e os institutos industriais e comerciais (*art. 75.º*) ⁽¹⁴⁾.

Por Decreto de 23 de Dezembro de 1899 ⁽¹⁵⁾, o ministro Elvino José de Sousa e Brito extinguiu os Museus Industriais e Comerciais de Lisboa e Porto, criando, em sua substituição, uma comissão permanente denominada *Comissão Superior de Exposições*. No Preâmbulo do Decreto, reconhecia-se que os Museus estavam «longe de satisfazer aos

(14) «Junto ao museu do Porto, criar-se-á uma oficina destinada à reprodução de modelos de arte e arte industrial em gesso, fotografia e processos gráficos correlativos, galvanoplastia, etc. Esta oficina fornecerá os elementos necessários, quer para o ensino, quer para o estudo das artes industriais, devendo, quanto possível, reproduzir os exemplares típicos da arte portuguesa.

§ 1.º A oficina anexa ao museu do Porto será considerada como estabelecimento-modelo para o abastecimento das escolas e institutos industriais, a fim de se poder coordenar, classificar e distribuir metodicamente o material necessário às ditas escolas e institutos e nacionalizar, quanto possível, os elementos do ensino.

§ 2.º Além dos elementos necessários para o ensino, a oficina do museu do Porto produzirá objectos de arte industrial e os tipos arquitectónicos da arte nacional, em ordem histórica, para serem expostos no Museu, oferecidos ao público por módico preço, ou permutados com os museus estrangeiros. O respectivo director taxará os preços em catálogo impresso bilingue (português e francês) ilustrado e acompanhado das necessárias indicações históricas» (*art. 78.º*).

(15) *Diário do Governo*, n.º 294, de 28 de Dezembro de 1899.

intuitos que visavam, quer como exposições permanentes de artigos industriais e correspondentes matérias-primas, quer como subsídio prestado ao ensino das escolas industriais».

Assim se gorou uma tentativa que, se efectivamente concretizada, poderia ter sido de grande utilidade, não só para o fomento da indústria e do comércio, mas também para o incremento do ensino industrial e comercial.

JOAQUIM FERREIRA GOMES

Professor da Universidade de Coimbra

PRIMEIRA LIÇÃO DE FÍSICO-QUÍMICA DADA NA UNIVERSIDADE DE COIMBRA⁽¹⁾

Mml.^{mo} F.^{mo} Serv.^o

As.:) Domenico Vandelli

Coimbra 17 de Maggio 1774

Anexo: Ex.^{mo} Snr., Sapientissimos Professores e Doutores,
Studiosos, e Respeitaveis Ovintes.

Nunca me vejo ao pensamento, que eu devese ser o primeiro, que em esta Illustre Universidade houvesse de insinar a Sciencia Chymica, a qual eu tão soamente me tenho applicado p.^a investigar os segre-

⁽¹⁾ Quase se pode dizer que até aos meados do século XVIII o estudo official das Ciências Físico-Químicas era inexistente em Portugal. Nem possuíamos escolas de ensino superior especializado em que estas ciências pudessem ser ensinadas, e nem possuíamos Laboratórios.

O seu interesse começou com a reforma Pombalina da Universidade em 1772, pela qual foi criado o Laboratório de Química, cuja direcção e regência do primeiro curso foram confiados ao Professor Doménico Vandelli, excelente investigador, professor, químico e ceramista, formado em Filosofia Natural pela Universidade de Pádua e expressamente contratado, para na nossa Universidade, vir exercer o magistério de Físico-Química. Da sua actividade e alta competência cientista dão testemunho as suas memórias: «Sobre o sal virgem das ilhas de Cabo Verde»; «sobre as águas de Lisboa»; «sobre os produtos naturais do reino», «Fábrica de Cerâmica» denominada Vandelli, que fundou em Coimbra, etc.

Lente jubilado da Universidade de Coimbra e membro da Academia Real das Ciências de Lisboa, foi o primeiro Director do Jardim Botânico de Ajuda. Por fim perseguido e desterrado, como Jacobino, foi substituído pelo vice-reitor Alexandre Rodrigues Ferreira e, em 1811, por Avelar Brotero. Vandelli enriqueceu o País com o seu saber.

Ensinou e fez escola. Dentre os seus numerosos discípulos salientaram-se:

Dr. Tomé Rodrigues Sobral, patriarca dos químicos portugueses, na opinião autorizada do Dr. Ferreira da Silva; José Bonifácio de Andrade e Silva, brasileiro de nascimento, mas tendo feito os seus estudos em Portugal, onde foi professor de metalurgia na Universidade e um dos mais notáveis mineralogistas do século XVIII; Manuel José Barjona, mineralogista de renome e autor de livros notáveis sobre esta especialidade, como «Metalurgiae Elementae» e «Tábuas mineralógicas para a diagnose do minério»; João António Monteiro, químico notável e mineralo-

dos da Natureza corporea, quanto pela experiencia se pode alcançar; e juntamente p.^a descobrir os usos, que as differentes produções da Natureza podem subministrar as Artes, a Economia, e ao Comercio. Nem eu emprenderia arogiadamente o explicar huma Sciencia tão difficoltosa, se hum Supremo, e impreterível preceito me não tivesse constringido, e determinado.

Preceito, que tanto mais me obriga, quanto he mais excessiva a confiança, que de mim raz p.^a este fim hum Re Sabio, o qual p.^a securar mais a Providencia, com que pretende fazer feliz os seus Vasallos na grande enchente de conhecimentos com que os illustra, tem comittido a execução dos seus disinhos a hum Ministro seu Lugar Tenente, o qual pela sua prudencia, e fidelidade tem feito a prezente epoca memoravel aos vindoiros. Razões estas que conheço pedem mais que nunca a minha exactidão, diligencia, e fadiga: Se se pode chamar fadiga a hum emprego, que continuamente se acha suavizado pelo benigno e affavel governo de hum Prelado, que podemos chamar com razão o Mecenas das Sciencias Naturaes, e dos que as professão; cuidando no aumento dellas não por huma chega execução, mas porque os seus vastos, e universaes conhecimentos o convençem, que dellas, como de huma origem athe agora ignorada hamde proceder as felicidades do Estado, e da Religião.

Não me dilatarei pois em demonstrar, e espender se a Chimica he huma arte, ou huma Sciencia, como no outro tempo inutil me pareço o explicar tambem se a Historia Natural he huma semplice Nomenclatura, ou huma Sciencia. Vos mesmos depois de vos achardes em ambas-

gista insigne, cujos trabalhos publicados nos Anais do Museu de Paris e noutras revistas estrangeiras foram apreciadíssimas pelos maiores sábios do seu tempo; Vicente Coelho da Silva Seabra Teles, brasileiro de nascimento, formado pela nossa Universidade, autor de vários livros e memórias sobre química e de um tratado que deve ser considerado o «primeiro tratado completo de química escrito em português».

Também o estudo da física absorveu toda a vida e actividade do grande Mestre e insigne Professor Catedrático, Doutor Mário Silva. Com todo o interesse e máximo aproveitamento se pode consultar a sua vastíssima e valiosíssima obra científica. É pena andar tão dispersa.

Ora numa das suas pastas de Documentos Avulsos encontrava-se precisamente uma fotocópia da 1.^a lição de Doménico Vandelli, que temos a honra de publicar. Foi-lhe enviada pelo distinto Professor Catedrático e actual Vice-Reitor da nossa Universidade, Doutor Luís de Albuquerque.

bem instruídos, sabreis julgar este ponto, e instruir os outros, é fazer lhes conhecer, que ninguem pode direitamente ser Juiz de huma couza sem a saber.

A Chimica he p.^a os corpos tais quaes a natureza os rapresenta relativamente, como hé a Algebra p.^a a quantidade toda geralmente considerada. A Algebra insigna a descompor e disinvolver as quantidades p.^a descobrir os seus principios, e as verdades, que da estes nassee; a Chimica insigna a descompor os corpos, que a Natureza oferece p. chegar aos seus principios, e deduzir todas as quellas verdades, que delles dependem de sorte, que a Chimica he a Algebra, dos corpos, da mesma sorte, que a Algebra he a Chimica das quantidades.

Fallando geralmente a Chimica se pode devidir em Chimica fisica, Tecnica, Comerciante, e Economia.

A Chimica Fisica he a pratica da Chimica feita em pequeno, e com este metodo se podem descobrir algunas das causas dos effectos fisicos, como são os Vulcanos, os Terremotos, as Vegetações, e deste modo fazer na Natureza novos descobrimentos.

A Chimica Tecnica tem p.^a objecto a applicação da Chimica fisica a utilidade immediata de huma Arte em particular, propondo o modo de inventar, o perfemçoar a mesma Arte. De esta parte da Chimica dependem as Manufacturas dos Metaes, como são o ouro, a Prata, o Cobre, o Lattao, o Ferro, o Aço, a Pedra hume, os Saes, os Vitriolos, o Enxoufar, o Cinnabro artificial, a Porcelana, a Loiça ordinaria, os Vidros, os Esmaltes, a Tintureira, a Preparação dos Coiros, a Manufatura do Sabão, as Destillações das agoas ardentes, a preparação de muitas cores p.^a a Pintura, as differentes Collas, a arte de conservar as madeiras illesas da corução da agoa, e do ar, á arte de extrahira, as resinas, o pez, a factura do carvão, a arte dos vinhos, e vinagres, o modo de refinar o açúcar, fabbricar o papel, as Tintas, a polvara de spingarda; e emfim a arte farmaceutica.

A Chimica Comerciante he a applicação da Chimica Fisica, e Tecnica ao estabelecimento, e adiantamento de algumas partes do Comercio em particular, empregandose na esecução em grande de todas as Artes Chemicas, das quaes se pode tirar comercio. Ensinha tambem os differentes metodos de preparar, condensar, conservar, e fazer mais faceis p.^a se transportarem as sustancias naturaes, e artificiaes, ajuntando a isso o methodo com que se devem deffender das injurias do tempo, do mar, e de muitos outros accidentes.

A Chimica economica não he outra cousa mais, do que a applicação das sobreditas a utilidade, e necessidades ordinarias da vida. Tem

esta p.^a objecto a composição dos vinhos, vinagres, a purificação dos óleos, a extracção de todos os succos vegetaes, como tambem o extrahir as agoas simples e compostas, o fazer differentes sortes de agoas ardentes, agoas cordiaes etc. E emfim estendese athe a perfeçoar a arte da cucinha.

De quanto, e grande uso seja a chimica na Medicina, apenas se pode exprimir com palavras, extendendose o seu uso a todas as partes da mesma, e em primeiro lugar na Fisiologia, Patologia, e Therapeutica; Examina a natureza de todas as partes do corpo humano, e tambem faz conhecer as depravações, origẽes, effeitos dos humores. Nem os remedios mais efficaes se podem obter senão por via da Chimica, Nem tãoobem'as forças, virtudes, e elementos dos venenos e dos remedios, se podem conhecer se não pelo mejo da Chimica.

Não foi certamente a simpliz, e mera curiosidade, com que se pretendeo conhecer as misturas dos corpos, que deo principio a esta Sciencia, e convido os homeẽs a coltivala; foi sim a sua verdadeira origẽe, o quererem os homẽes proverem a sua, necessidade, e utilidade.

Não se sabe o tempo, em que esta Sciencia començou, ne tambem qual foi o primeiro, que a coltivou. He porem bem certo, que ella he muito antiga: Pois que lemos na Sacrada Escrittura, que depois de Adam, o seu oitavo descendente, quero dizer, Tubalcain, trabalhava em cobre, e em ferro, e isto p.^a differentes fins, e usos, o que certamente não poderia fazer sem extrahir os sobreditos metaes das suas respectivas veas, sem os fundir, e se aplicar a outros mais particulares trabalhos, que são proprios da arte Chimica; donde sem duvida podemos concluir a grande antiguidade desta sciencia, ao menos, por que pertence a metallurgia; a qual se coltivou na Asia, donde passou p.^a os Egizios, e destes p.^a os Gregos, daqui p.^a os Arabes, e destes emfim p.^a as outras Nações, soffrendo sempre varias mudanças, e applicandose sempre differentemente aos diversos usos das artes, athe que pouco a pouco se chegou a formar huma Sciencia, e em esta figura he que foi trattada no tempo de Becher, Boyle, Hombergo, Geoffroi, Lemery, Staal, Hoffamnn, e Boeraave, continuando a aperfeçoar-se muito com as experiencias de Henkel, Rott, Margraff, Newman, Grossi, Hellot, Lewiz Maquer, e Bomé, tendose emfim na Affinidade descobertas algumas Leis geraes.

A Affinidade, ou Atracção Chimica não he outra cousa, se não huma tendencia das particulas da materia p.^a se unirem e ajuntarẽe, quer ellas sejam omogeneas, ou aterrogeneas.

Eu poderia aqui executar muitas experiencias p.: o fim de mostrar huma semelhante affinidade; por ora vereis tão somente algumas, cuja execução pede pouco tempo.

A esta classe pertence.

1 — Se lançarmos o olio vitriolico na agoa comã, verremos, que p.^a a affinidade ou attração, que com ella tem, se unem estes dois liquidos com tanto impeto e força, que produzem huma effervescencia, e calor como da agoa que ferve.

2 — Nesta dissolução de prata feita com o acido nitroso, e diluida com agoa, em vou a deitar alguns grãos de sal comun, logo a dissolução se faz branca, e precipitase a prata com o leite qualhado, e chamase Luna cornea.

O Acido marino deixa a base (?), o alkali, com que fazia hum sal neutro p.^a juntar-se à prata com que tem major affinidade; e com ella produz a Luna cornea. O Alkali marino, e o acido nitroso estando livres se juntão e formão hum nitro quadrangular.

3 — Na solução do sublimado corrosivo feito com agoa se infonda olio de tartaro por diliquio, esta se faz no mesmo instante de color latteo, e se precipita a cal do mercurio que estava unida com o acido marino, o qual acido se juntou com o alcali, o deixou o mercurio.

4 — Se juntar o acido nitroso, este se combina com o alcali deitando fora o acido marino, que torna outra vez a solver o mercurio, e fica a solução trasparente como antes.

5 — Tambem as differentes affinidades produzem muitas e diversas cores.

Porque com a unica infusão de po branco se muda este liquor em preto.

Este liquor he huma infusão de galha, que se consorve quente em este carafa (*sic*) nella ponho hum ou dois grãos de vitriolo de ferro calcinado em branco; eis aqui vedes como a agoa pouco a pouco se faz toda negra, e isto provem da attração que a galha, como tambem algumas plantas astringentes, tem com o acido que se acha unido ao ferro, de modo, que o ferro se precipita com huma cor negra, a qual se deve attribuir a huma certa quantidade de materia oleosa das sostancias vegetaes, as quaes com o ferro tem huma grande affinidade.

6 — Este liquor negro butado em outro vaso, se muda em trasparente; e isto succede quando este liquor se muda p.^a hum vidro lavado por dentro com olio de vitriolo, o qual attrae, e dissolve novamente o ferro.

7 — Infundindo e misturando olio de tartaro por deliquio, athe

que o acido se ache bem imbebido, e saturado, este deixa o ferro, e de novo revive a cor negra, succedendo neste tempo differentes cores.

8 — Se eu agora ajuntar hum novo acido, que ecceda a quantidade do alcali, o liquor torna a parecer preto. De todas estas experiencias alem da affinidade, se collige quam pouca materia se requer p.^a fazer as cores.

9 — Vamos agora a mudar hum liquor de cor verde muito claro em cor azul. Ajuntemos a huma solução de ocre de cobre feita com vinagre e agoa, ajuntemos, digo, espirito de sal ammoniaco, o qual, absorvendo o pouco acido, com outra porção dissolve o cobre, e o faz aparecer de cor azur.

10 — Torna o mesmo liquor a ser pellucido misturandogli hum acido, que predomini. E estes differentes cores não são outra cousa mais, que a reflexão dos rajos da Luz, que reflette das particulas dissolvidas e variadamente mudadas segundo as differenças, que producêe os dissolventes nas particulas dos corpos.

O ferro tem huma grande affinidade com o enxoufre, e este reciprocamente com elle, não so p.^a a via humida; mas tambem p.^a a secca.

O enxoufre unendose ao ferro aumenta consideravelmente a dissolução deste metal.

11 — Apliquesi a extremidade desta vara de ferro tanto em braza, que cheguei ao ultimo grao, que he a candescencia, apliquesi, digo, hum pedaço de enxoufre, observeremos não sem admiração, que hum derete o outro desfazendo em pingas. Nesta operação huma parte do enxoufre se combina com o ferro, o faz dereter em pingas ardentes, reduzindo ao estado mineral; isto he aquelle, em que se acha ordinariamente nas minas. Este ferro se desfaz em grãos redondos, e he que: bradiço como o vidro.

Fazse esta operação sobre hum vaso de agoa p.^a que a porção do enxoufre, que não se unio ao ferro se extingua logo, e não fiquem os circummstantes incomodados com os seus vapores.

Ha huma especie de affinidade intermedia, a qual succede, quando dois corpos não se podem unir entre si, se não p.^a mejo de hum terceiro, o qual tem affinidade com os dois primeiros, e no mesmo tempo.

12 — Pelo que se eu poser neste *Matras* de col comprido agoa com limalha de ferro, esta certamente se não dissolverá; porem se lhe juntarmos olio de vitriolo, e aqueçermos hum pouco a mistura, verreis o impeto com que estes liquores se unem ao ferro, formando huma effervescencia, a qual lança de si vapores brancos, aos quaes applicandose huma luz na sahida do vaso se accendem com strondo, e lançando nova lima-

lha, continua o mesmo effeito, circulando as vezes a chama no interior do matrass.

13 — Se lançarmos o espirito de nitro fumante sobre o espirito de vinho bem rettificado, se une com tanta força ao dito espirito, que produz huma grande effervescencia, na qual arabatando consigo, o dissipa na major parte p.^a o ar, de tal sorte, que pouco delle fica na vaso.

(*Tem à margem:* olio de vitriolo se junta com o flogisto do ferro e forma hum enxoufre).

14 — Se lançarmos o esp.^o de nitro fumante sobre o olio de cravo, observaremos unirem-se com huma tão grande attração, ou afinidade, a qual aquelle acido tem com o flogistico do olio, com o qual no tempo da effervescencia se une, e forma hum enxoufre nitroso, que queimandose produz fumo, e chama.

15 — No tempo, que se derrete a polvora fulminante, a qual he composta de nitro, de alkali; e de enxoufre, se fazem duas decomposições, e duas novas combinações: effeito das affinidades, que em este estado de liquido podem obrar; como a major parte he do flogisto do enxoufre, este se combina com o acido nitroso, e produz hum enxoufre nitroso. O acido vitriolico do enxoufre por ter major afinidade se une com o alkali fixo, e o alkali do nitro, e forma hum tartaro vitriolado. O effeito desta detonação he da inflamação do enxoufre nitroso, que produz bastante calor p.^a reduzir a agoa principio das substantias salinas, e os mesmos saes em vapores muito dilatados.

Tudo, o que athe agora temos feito he sufficiente p.^a a presente occasião, e pelo que pertence as mais affinidades, vos as ireis observando nos processos chimicos, que neste Curso vos hei da explicar.

As Instituições Chimicas de Spielmann são as que se achão determinadas p.^a as explicações: nellas não segue o Autor as ordões dos tres Reinos; porem si as differentes Classes das operações chimicas, quaes são a Dissolução, a Destillação, Sublimação, Calcinação, Vetrificação, e fermentação.

Ellas são muito sufficientes p.^a dar huma boa idea da Chimica, qurendo porem adiantarvos em esta sciencia, deveis ler principalmente hum Lemery, hum Hoffmann, hum Boeraave, Geoffroy, Pott, Maquer, Bome, e ouros; e alem disso deveis p.^a vos mesmos fazer muitos ensaios de experiencias; d'outra sorte ficareis com huma simplez tintura desta Sciencia, e o mesmo vos succederá na Historia Natural, se vos não exercitardes a examinar as produções da Natureza, e isto com o metodo sistematico.

Pelo que me pertence eu me não poperei a trabalho algum, ou fadiga, em quanto as minhas forças o permittirem, p.^a vos instruirem em estas duas Sciencias.

Eu farei as minhas leções logo immediatamente depois das que costume fazer da Historia Natural, passando do Museo onde estas se costumão fazer p.^a o Laboratorio Chimico provisional, onde continuarei as que pertencem ao Curso Chimoco.

(Arquivo Histórico Colonial — Reino. Papeis avulsos (17 de Maio de 1774).

DOMÉNICO VANDELLI

UM INVENTOR DESCONHECIDO

(MANUEL BAPTISTA DOS SANTOS)

O povo anónimo, trabalhador e humilde, que nunca frequentou outra universidade que a Escola da Vida, também tem os seus artistas. Modestos trabalhadores dotados de extraordinário poder de criação e invenção, de cujas mãos surgem, por vezes, coisas aparentemente insignificantes, mas profundamente revolucionárias pelas suas consequências. Quantos valores perdidos por esse mundo fora...

E quantas pequenas coisas desaparecidas de inestimável valor...

É o caso de Manuel Baptista dos Santos, nascido a 26 de Novembro de 1895 de um pobre casal de rendeiros agrícolas, no monte alentejano denominado Tocheiro, nas imediações de Beja.

Criança ainda, deslocou-se com os seus pais para outra propriedade — Rio Seco —, onde decorreu a sua infância, arrastando sempre uma vida de trabalho, num triste peregrinar por terras alentejanas, tão cheias de desigualdades e injustiças.

Dotado de reconhecida vocação para as artes manuais, mas sem possibilidades de frequentar escolas, foi aos 14 anos para casa de um seu parente (José Páscoa), em Ferreira do Alentejo, com quem aprendeu o ofício de carpinteiro de alfaias agrícolas.

Aprendeu as primeiras letras no monte, «com Mestre Aniceto» — refugiado republicano — e talvez com ele, tenha recolhido também algumas noções de electricidade e dinâmica.

Entretanto a situação económica dos pais evoluiu favoravelmente graças a bons anos agrícolas que se sucederam, e Manuel Baptista dos Santos pôde adquirir em Ferreira do Alentejo uma modesta fábrica de moagem de farinha em rama e serração de madeira, que remodelou completamente por suas mãos. Era já então um patrão-operário de bem conhecidos méritos e sobejamente cotado no seu meio.

Como as madeiras utilizadas eram o azinho e o sobro regional, madeiras muito duras, cuja serração implicava um constante afiar de folhas de serra, um volumoso *stock* de fitas e portanto maior carestia no produto, Baptista dos Santos, dotado de excepcional espírito de observação e de intuição, começou a estudar e ensaiar um processo de execução mais rápido e económico.

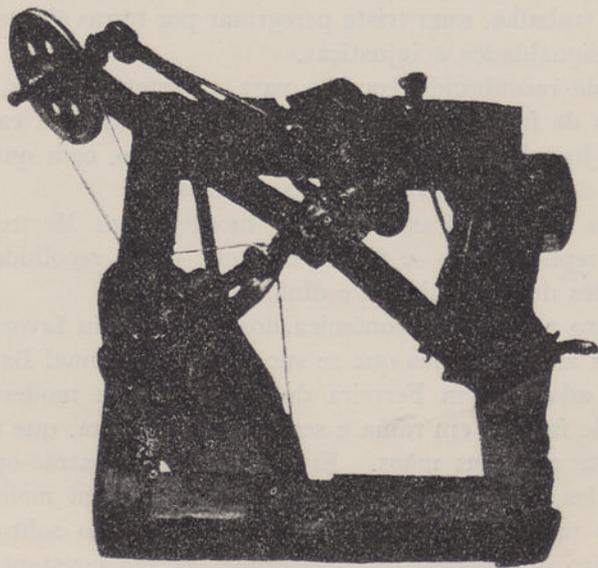
E foi com base numa pedra de esmeril especial, que observou num rudimentar estaleiro naval em S. Martinho do Porto, que concebeu e

executou por si próprio, entre 1932 e 1935 a *máquina de afiar serras de fita* que aqui apresentamos ⁽¹⁾.

É um engenho de técnica muito arcaica, mas que lhe proporcionou um trabalho ininterrupto de mais de 20 anos consecutivos e serviu de modelo, nunca regateado, a vários artistas do mesmo ofício, numa época que precedeu o aparecimento no mercado de outras máquinas de patentes registadas, com a mesma finalidade, mas de esquemas já muito diferentes e mais complicadas.

Ainda de Baptista dos Santos é a invenção de um sistema automático de lavagem do trigo para moenda; a de um misturador igualmente automático para milho, no fabrico de farinha e a transformação de um velho carro de marca DIAMBUTON, que pelo seu zumbido característico, devido a uma modificação no motor, mereceu ao público o nome de «Gafanhota».

CRUZ DINIS



(1) Este invento, encontra-se no Museu Nacional da Ciência e da Técnica, por generosa oferta de Helder Baptista Caeiro dos Santos, filho do inventor, a quem ficamos devendo também todos os demais elementos informativos.



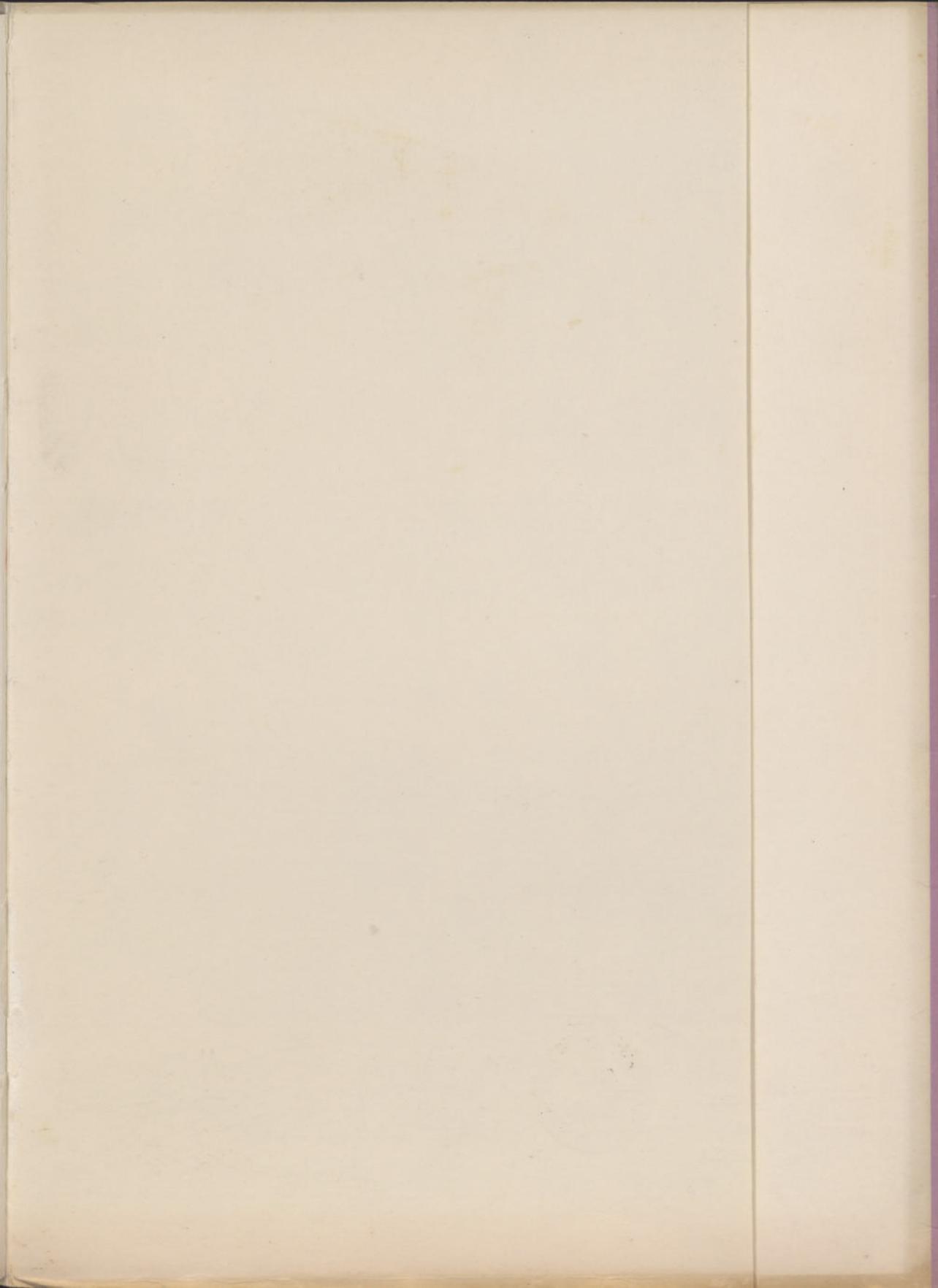
ÍNDICE

	Págs.
Contribuição para o estudo neuroquímico do efeito dos reurolépticos no sistema nervoso central	1
Dois museus industriais e comerciais no século XIX	163
Primeira lição de físico-química dada na universidade de Coimbra	173
Um inventor desconhecido (Manuel Baptista dos Santos)	181

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



ESTE LIVRO ACABOU
DE IMPRIMIR-SE NAS OFI-
CINAS GRÁFICAS DA «COIM-
BRA EDITORA, LIMITADA»,
EM AGOSTO DE 1979



MUSEU
NACIONAL
DA
CIÊNCIA
E DA
TÉCNICA

