

EDEMA PULMONAR DE RATOS VAGOTOMIZADOS:
PROVÁVEL ENVOLVIMENTO DA HISTAMINA

ELEONORA ELISIA ABRA BLANCO

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela aluna Eleonora E. Abra
Blanco e aprovada pela comissão julgadora.*

17/12/85

PJP

EDEMA PULMONAR DE RATOS VAGOTOMIZADOS: PROVÁVEL ENVOLVIMENTO
DA HISTAMINA

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas, para a obten-
ção do título de Mestre em Ciên-
cias Biológicas na área de Fisi-
ologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rui Errerias Maciel

CAMPINAS

-1985-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À memória de meu pai
Albino,

À minha mãe,

Eleonora e

Ao Audiŕaz,

DEDICO.

Ao Professor Doutor RUI ERRERIAS MACIEL
Professor Adjunto do Departamento de Fisiologia e Biofísica,
pela confiança e dedicação,
pela orientação,

Agradeço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. NELSON DURAN do Departamento de Química Orgânica, por ter cedido o equipamento para a dosagem de histamina.

Ao Prof. Dr. LOPES DE FARIA do Departamento de Patologia e Prof. NORAIR SALVIANO DOS REIS do Departamento de Histologia e Embriologia, pela avaliação histológica.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ANTONIO CORDEIRO do Departamento de Estatística, pelo tratamento estatístico.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CELSO RAMALHO do Departamento de Fisiologia e Biofísica, pelas sugestões e discussões úteis durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. VALTER MARTINS do Departamento de Química Analítica e Sr. QUINTINO DE CARVALHO, pela colaboração nos cálculos de diluições.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP.

Aos funcionários, APARECIDA DA SILVA GERALDO, DANIEL VICENTE DE FARIAS, IVETE DE JESUS ROQUE e MARIA ELIDIA DOS SANTOS.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. EDEMA PULMONAR	1
1.2. HISTAMINA: LIBERAÇÃO E AÇÃO SOBRE A MICROCIRCULAÇÃO	6
1.3. HISTAMINA E O "STRESS"	9
1.4. PROPOSIÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1. ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA E TRATAMENTO CIRÚRGICO ...	12
2.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO HISTAMÍNICO	14
2.2.1. Ensaio Fluorimétrico	14
2.2.2. Intensidade de Fluorescência Relativa e Fluorescência do Branco	16
2.2.3. Recuperação da Histamina	17
2.2.4. Determinação da Curva Padrão	18
2.2.5. Cálculo da Concentração da Histamina nas Amostras	20
2.3. LAVAGEM DA VIDRARIA	22
2.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	23
2.5. TÉCNICA HISTOLÓGICA	24
3. RESULTADOS	25
3.1. TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA	25
3.2. PESO DOS PULMÕES E FÍGADOS	25
3.3. PORCENTAGEM DE TECIDO SECO	26
3.4. TEOR DE HISTAMINA NOS PULMÕES E FÍGADOS DOS RATOS VAGOTOMIZADOS, VAGO-ADRENALECTOMIZADOS E SEUS RES PECTIVOS CONTROLES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO ...	26

3.5. EXAME MACROSCÓPICO DOS PULMÕES	36
3.6. EXAME MICROSCÓPICO DOS PULMÕES	40
4. DISCUSSÃO	44
4.1. MÉTODO	44
4.2. ETAPAS EXPERIMENTAIS	48
4.2.1. Avaliação dos Pesos Pulmonares e Relação Peso Úmido - Peso Seco	49
4.2.2. Avaliação dos Pesos dos Fígados e Relação Peso Úmido - Peso Seco	50
4.2.3. Teor Histamínico nos Pulmões de Ratos Vago- tomizados, Vago-adrenalectomizados e Con- troles	51
4.2.4. Teor de Histamina no Fígado dos Animais Va- gotomizados, Vago-adrenalectomizados e Con- troles	55
4.2.5. Exame Microscópico	55
5. RESUMO E CONCLUSÕES	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ILUSTRAÇÕES

TABELA 3.1.	28
TABELA 3.2.	29
TABELA 3.3.	30
TABELA 3.4.	31
TABELA 3.5.	32
TABELA 3.6.	33
TABELA 3.7.	34
TABELA 3.8.	35
FIGURA 3.1.	37
FIGURA 3.2.	37
FIGURA 3.3.	38
FIGURA 3.4.	38
FIGURA 3.5.	39
FIGURA 3.6.	41
FIGURA 3.7.	41
FIGURA 3.8.	42
FIGURA 3.9.	42
FIGURA 3.10.	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. EDEMA PULMONAR

O edema pulmonar foi definido por Visscher, Haddy & Stephens (1956) como um estado patológico, no qual, o conteúdo de líquido extravascular sofre aumento. Há mais de 200 anos, Vieussens (1716) constatou que a vagotomia cervical bilateral promove edema pulmonar agudo em cobaia e rato.

A constatação da presença de edema pulmonar em grande número de necropsias de indivíduos que sofriam de distúrbios do Sistema Nervoso Central (SNC) com envolvimento da base cerebral, por Farber (1937), levou o autor a estudar as consequências da vagotomia cervical bilateral em coelho. Observou que a vagotomia causava, invariavelmente, morte por asfixia dentro de 8-24 horas, precedida de dispneia e expulsão de espuma pela boca e nariz.

Nos primeiros estudos do papel do SNC no desenvolvimento do edema por vagotomia, considerou-se possíveis contribuições como a obstrução por paralisia da laringe e aspiração de secreção. Mas Farber (1937) e Schimitt & Meyers (1957) excluíram estes fatores, pela demonstração de que o edema ocorria mesmo após traqueostomia e que a secção do nervo laríngeo não produzia edema.

A associação da vagotomia com cirurgias envolvendo o SNC (Borison & Kovacs, 1959) para estudar o mecanismo central do edema pulmonar, e a observação de que o edema se desenvolvia mesmo na ausência de inervação pulmonar, mas que era dependente da integridade do SNC (Rech, Mc Carthy &

Borison , 1962) sugeriam que um fator humoral de origem cen
tral poderia estar envolvido neste mecanismo. Esta hipôte
se foi fundamentada no fato dos animais normais que foram
 submetidos à parabiose ou circulação cruzada com animais va-
 gotomizados terem sofrido discreto edema, e dos vagotomiza-
 dos terem adquirido certa proteção. Além disso, medidas
 de permeabilidade mesentérica na cobaia após vagotomia
 (Berndt & Rech, 1963) revelaram um acentuado aumento de per
meabilidade. Embora os autores tenham demonstrado que esta
 alteração de permeabilidade em relação ao epitélio pulmonar seja
 diferente, concluíram que o edema pulmonar após vagotomia também
 seria consequente do aumento da permeabilidade, resultante
 de uma substância liberada centralmente.

A secção vagal interrompe diversos tipos de fi-
 bras. À cada uma destas fibras atribuiu-se o fator desenca
deante do edema. Diante disso, Rech (1966) isolou cada fi
bra e estudou as desordens neurofisiológicas promovidas ,
 com o intuito de saber qual o componente do vago cervical
 que estaria diretamente implicado. Observou que a interrup-
 ção de impulsos eferentes do coração e vasos sanguíneos pul-
 monares e a perda da inervação motora da corda vocal e ou
tras estruturas laringeas podiam contribuir para agravar
 o edema e a morte do animal. Entratanto, atribuiu a causa
 primária desta patologia experimental à perda de impulsos
 aferentes vagais para o SNC, concluindo que, no desenvolvi-
 mento do processo edematogênico, poderia haver a liberação
 de uma substância humoral do SNC e/ou um desequilíbrio na
 inervação simpática dos capilares pulmonares.

Os efeitos da vagotomia devidos à eliminação

do ramo aferente do nervo que controla o tono vascular e bronquiolar pulmonar também foram confirmados por Schmitt & King (1970).

A hipótese de que existe o envolvimento de alterações resultantes do desequilíbrio simpático após a vagotomia foi reforçada por Maciel (1970), que obteve a prevenção do edema pela realização de adrenalectomia bilateral em ratos vagotomizados. Além disso, o autor preveniu o edema com o uso de anti-histamínicos, propondo que o mecanismo de formação do edema estaria ligado à liberação de histamina, como consequência do efeito sinérgico da interrupção de reflexos vagais e da liberação de adrenalina endógena.

Aitken & Sanford (1972) reforçaram a idéia do envolvimento da histamina no edema pulmonar, com a constatação de que no bovino vagotomizado, a histamina conduzia à morte dentro de 15 minutos. Este dado veio a confirmar a verificação anterior de Aviado (1959) de que o conteúdo histamínico no sangue de animais com edema por inalação de vapor quente permanecia elevado até a morte, propondo que a lesão pulmonar seria a responsável pela liberação local de histamina e seu aumento na circulação. Mais tarde, a histamina foi apontada por Brigham & Owen (1975) como primeira candidata dentre os fatores humorais a ser causadora do edema não cardiogênico.

Paralelamente ao estudo do edema por vagotomia, Luisada & Sarnoff (1944), trabalhando com cães, promoveram edema pulmonar por meio de rápida infusão de líquido nas carótidas, sob pressão de 280-300 mmHg. Os autores verificaram que o receptor cardiovascular tinha importante papel na gênese do edema, pelo aumento reflexo da permeabilidade

dos capilares pulmonares. Para verificar o papel da via simpática no edema por elevação da pressão arterial sistêmica (PAS), Sarnoff & Sarnoff (1952) promoveram edema, em coelho, por injeção intracisternal de fibrina. Verificaram que a vagotomia cervical bilateral, bem como a simpatectomia bilateral torácica, antes ou após a injeção de fibrina, não alteravam a elevação da pressão vascular pulmonar e o edema. Mas, que o uso de bloqueador ganglionar fazia retornar os valores da pressão pulmonar a níveis normais. Concluíram então, que o edema não tinha mediação nervosa específica, mas resultava de um efeito de estimulação autonômica generalizada.

O edema pulmonar que se manifesta em resposta ao trauma craniano, tem como fator comum o aumento da pressão intracraniana (Ducker, 1968). Quanto ao edema por compressão mecânica cerebral, Chen, Sun & Chay (1973) observaram que a adrenalectomia, descerebração ou vagotomia cervical bilateral não alteravam a hipertensão e o edema, mas que a transecção espinal (C₇ ou C₈) os abolia. Assim sendo, sugeriram que o edema seria consequente às alterações hemodinâmicas causadas pelo mecanismo vasomotor simpático a nível medular. Estes dados concordam com registros clínicos de Simmons et alii (1969) que constatarem edema pulmonar fatal dentro de minutos, após trauma craniano, o que não ocorria quando presente a transecção da coluna cervical ou hemorragia maciça. Outra explicação para o edema pulmonar com origem na elevação da pressão intracraniana estaria na hipótese de Milley, Nugent & Rogers (1979), de que este aumento de pressão poderia iniciar um processo envolvendo o hipotálamo resultando em excessiva descarga simpática com graves consequências hemodinâmi-

cas pulmonares, danificando as paredes capilares e sua permeabilidade e, finalmente, em edema.

Por outro lado, Simon (1980) propôs um mecanismo de origem central, que atuaria nos pulmões descontrolando o fluxo de fluído e proteínas na rede capilar e consequentemente desregulando a pressão microvascular e sua permeabilidade. Este mecanismo contaria com a participação de um mediador químico. (Grauer et alii, 1981).

As pesquisas de Nathan & Reis (1975) demonstraram que a lesão no hipotálamo anterior produz hipertensão arterial fulminante e edema pulmonar dentro de 4-5 horas. Através da associação desta lesão com adrenalectomia bilateral, desmedulação e desnervação adrenal, os autores concluíram que a hipertensão arterial e alguns efeitos periféricos dependeriam da liberação de catecolaminas da adrenal. À ausência da elevação da PAS em ratos lesados e com desnervação adrenal ou adrenalectomia, sugeriu-se que a lesão hipotalâmica inicia uma ativação do sistema nervoso autônomo, simpático, com uma predominante descarga do neurônio pré-ganglionar simpático para a glândula adrenal. Além disso, concluíram que a liberação de catecolaminas parecia ser resultado direto da lesão hipotalâmica e não consequência da atividade muscular, presente no animal lesado.

Quanto ao edema por vagotomia, Wiberg (1979) propôs que o desenvolvimento do edema é acelerado no estado de vigília. Ainda, que o retardo no aparecimento deste edema pela anestesia, estaria relacionado à hiperatividade simpática.

Ao contrário das propostas feitas de que a alteração hemodinâmica consequente do desequilíbrio simpático é

que seria o fator desencadeante do edema de origem neurogênica, surgiram novos dados. Hoff et alii (1981) observaram que o edema neurogênico, por aumento da pressão intracraniana, ocorria na presença ou ausência de hipertensão sistêmica. Os autores sugeriram então que a descarga simpática evocada pelo cérebro, afetaria diretamente a rede pulmonar. Adicionalmente, Campagnole (1983) verificou que ratos com lesão no núcleo do trato solitário desenvolviam edema e chegavam à morte dentro de 4-6 horas. Quando os ratos eram tratados com reserpina e fenoxibenzamina, a hipertensão era prevenida, porém o edema permanecia. Ao contrário, quanto tratados com clorpromazina, a hipertensão permanecia e o edema não se manifestava. Uria et alii (1981) para estudar a que nível ocorria o comprometimento hemodinâmico para finalmente desenvolver o edema, realizaram medidas diretas de pressão aórtica, atrial direita e arterial pulmonar antes, durante e após a indução do edema pelo aumento da pressão intracraniana, e verificaram que a hipertensão arterial pulmonar é o fator essencial na sequência que leva ao edema neurogênico. Finalmente, ao contrário do proposto de que o edema seria resultado de alterações hemodinâmicas e hipertensão, Lagneaux, Leconte & Bodson (1982) constataram ausência de alteração na pressão arterial pulmonar imediatamente após a vagotomia cervical bilateral no rato.

1.2. HISTAMINA: LIBERAÇÃO E AÇÃO SOBRE A MICROCIRCULAÇÃO

A histamina, 2(4-imidazolil) etilamina, é categorizada na classe dos autacóides. Foi sintetizada por cu-

riosidade química em 1907 por Windaus & Vogt, antes mesmo de se conhecer sua importância biológica e só foi isolada em 1910 a partir dos extratos do ergô, por Barger & Dale e por Kutscher no mesmo ano (Douglas, 1970).

O seu papel no controle fisiológico da microcirculação foi reconhecido por Lewis (1927). Porém, pela deficiência de métodos de análise, poucos conhecimentos sobre seu metabolismo e a falha dos antihistamínicos em bloquear seu efeito circulatório, permitiu concluir que a histamina não teria esta função. De fato, acreditou-se que a sua liberação só acontecia quando as células eram lesadas. Com sua descoberta nos mastócitos por Riley & West (1953), ficou conhecida a sua existência na forma inativa, nestas células, e que, uma vez liberada exercia potentes efeitos farmacológicos.

Além de sua origem mastocitária, anteriormente Schayer (1952) reconheceu um segundo meio de mobilização da histamina por neoformação contínua, em condições livres e farmacologicamente ativa, em todos os tecidos (Schayer, 1962). E que a sua síntese seria controlada pelas necessidades homeostáticas.

Ryan & Brody (1970) em seus estudos sobre a distribuição da histamina endógena nos nervos autonômicos, do seu papel como neurotransmissor simpático liberado durante o reflexo da vasodilatação ativa e sobre a captação de histamina tritiada (H_3) no nervo autonômico, postularam que a histamina seria liberada durante o reflexo da vasodilatação ativa a partir de fibras histaminérgicas simpáticas. Porém, estes mesmos autores (1972) verificaram que a histamina não

era liberada a partir de terminais neurogênicos específicos. Mas sua liberação seria controlada pela descarga de adrenalina. Heitz & Brody (1975) concordam que a histamina seja o mediador liberado na vasodilatação ativa, mas admitem que sua liberação esteja sob controle de fibras adrenérgicas distintas, sem função vasoconstrictora.

Embora Beck (1965) e Ryan & Brody (1970) houvessem identificado a histamina na mediação da vasodilatação reflexa ativa, Schayer (1974) sugeriu uma contínua influência dilatadora da histamina sobre o músculo liso microvascular, e que um estímulo drástico que causa aumento local e sistêmico da histamina poderia levar à alteração microvascular e ao choque.

As suspeitas iniciais de que a histamina atuaria através de mais de um receptor foram confirmadas. Existem duas classes de receptores histamínicos: Os H_1 (Asch & Schild, 1966) e os H_2 (Black et alii, 1972). Os primeiros são bloqueados seletivamente pelos "anti-histamínicos" clássicos (como a pirilamina), os anti- H_1 ; os segundos, por substâncias bloqueadoras dos receptores H_2 introduzidas no início da década de 70, os anti- H_2 .

Houge (1968) observou que altas doses de histamina poderiam causar vasoconstricção pulmonar antagonizável por anti- H_1 . A introdução do novo tipo de antagonista, o anti- H_2 , explicou a falha do anti-histamínico convencional em bloquear os efeitos microcirculatórios da histamina injetável, e permitiu observar que os pequenos vasos sanguíneos estão sob uma contínua influência dilatadora da histamina

intrinsecamente formada (Schayer, 1974). Okpako (1973, 1974) em estudos para comparar os efeitos da histamina na rede vascular pulmonar de cobaia, sugeriu que os receptores H_1 , associados com a vasoconstrição pulmonar, localizam-se nos vasos de resistência e os receptores H_2 associados com a vasodilatação nos vasos menores. Tucker et alii (1976) propôs que a histamina seja liberada durante a hipóxia para modular a resposta vascular pulmonar, no cão, em oposição à vasoconstrição produzida pela hipóxia.

Posteriormente Propst, Millen & Glauser (1978) verificaram que a histamina aumenta a permeabilidade epitelial alveolar a substâncias de baixo peso molecular, no cão.

1.3. HISTAMINA E O "STRESS"

A histidina descarboxilase, enzima encontrado em todos os mamíferos (Werle, 1936) é catalizadora da única reação que transforma a L-histidina em histamina. Este enzima sofre aumento adaptativo de sua atividade em resposta a diferentes tipos de "stress" (Schayer & Ganley, 1959). Schayer (1959) confirmou que o "stress", adrenalina, noradrenalina e endotoxinas aumentam a atividade enzimática, "in vitro", no camundongo, sugerindo a existência de um balanço entre catecolaminas e histamina para manter a homeostase (Schayer, 1960) e que, uma falha neste equilíbrio, levaria ao choque.

Graham, Kahlson & Rosengreen (1964) estudando a relação entre a formação da histamina e o exercício físico, observaram que no camundongo o exercício induzia à formação intracelular de histamina, mas nos pulmões de rato diminuía

esta capacidade. Concluíram que no rato isto ocorre, em parte, devido ao fato do corticosteróide liberado durante o exercício, diminuir a síntese da histamina. Também, a exposição de um grupo de ratos à baixa pressão de O_2 , resultou numa queda da capacidade de formação da histamina (HFC) nos pulmões, em torno de 30%. Em função destes dados, investigaram até que ponto a adrenalina liberada no exercício físico poderia estar envolvida na HFC e constataram que a adrenalina produz uma considerável queda na HFC pulmonar, no rato, e um efeito contrário no camundongo e galinha.

O tecido pulmonar de rato é pobre em mastócitos (Kahlson & Rosengreen, 1968), e se localizam no espaço perivascular (Hass & Bergofsky, 1972). Entretanto, no cão estão em correlação inversa com o diâmetro interno dos brônquios (Nisan et alii, 1978).

No pulmão de rato, a HFC é relativamente alta, o conteúdo de histamina é baixo e sua vida média excepcionalmente longa (Kahlson & Rosengreen, 1968). Esta situação indica que a maior parte da histamina pré-formada é estocada de forma a deixar a célula facilmente.

1.4. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto e das hipótese nas quais as adrenais e a histamina poderiam estar mais diretamente implicadas no mecanismo de formação do edema por vagotomia, do que outros fatores relacionados a hipertensão à nível sistêmico e pulmonar, propusemo-nos a dosar o conteúdo histamínico nos pulmões que sofreram edema por vagotomia, nos que tiveram prevenção deste edema pela adrenalectomia e nos dois respec

tivos grupos controles dos vagotomizados e vagoadrenalectomizados. Investigando desta forma, se existe alguma participação da histamina no processo edematogênico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA E TRATAMENTO CIRÚRGICO

No presente trabalho foram utilizados 40 ratos , (*Rattus norvegicus*, albinos, Wistar) adultos, machos, com peso compreendido entre 245 e 410 gramas.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 10 animais, sendo 9 animais utilizados para dosagens de histamina e 1 para o exame macro e microscópico.

GRUPO CV - Controle com operação simulada de vagotomia.

Nos componentes deste grupo foi realizada uma incisão na região cervical ventral, isolados os nervos vagos, sem serem entretanto, seccionados. Após, a incisão foi fechada com pontos totais separados.

GRUPO V - Vagotomizados. Nos componentes deste grupo procedeu-se a vagotomia cervical bilateral por incisão na região cervical ventral.

GRUPO CVA - Controle com operação simulada de vago - adrenalectomia. Este grupo foi submetido à mesma operação simulada do grupo CV, e, também às incisões laterais no abdomen logo abaixo da última costela, isolando-se as supra-renais, somente, e logo após, a incisão foi fechada com pontos totais separados.

GRUPO VA - Vagotomizados e Adrenalectomizados. Nestes animais procedemos a vagotomia cervical bilateral conforme a técnica usada nos ratos do grupo V

e adrenalectomia.

Os ratos foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico e assim mantidos por meio de uma máscara de circuito aberto, até o término da cirurgia.

Após anestesia, os animais foram imobilizados em placa cirúrgica apropriada em decúbito dorsal e submetidos às cirurgias relativas à cada grupo.

Ao recuperarem-se da anestesia, os animais foram submetidos a exercício em gaiola giratória, constituída de um cilindro confeccionado com tela de arame, com dois eixos nas bases, girando em mancais. A gaiola possuía uma divisão no seu centro, o que possibilitava submeter dois ratos a exercício ao mesmo tempo. Este conjunto era acionado através de um sistema de roldanas, por um motor elétrico e controlado para uma velocidade de 12 voltas por minuto.

O tempo de exercício foi anotado. Os componentes do grupo V permaneceram em exercício até a morte, e cada animal deste grupo era acompanhado de um animal do grupo CV, sendo este sacrificado imediatamente após, por inalação de éter sulfúrico. Os animais do grupo CVA e VA permaneceram em exercício durante 90 minutos, e também foram sacrificados ao término deste período. Após a morte, os anⁱmais eram fixados novamente à placa cirúrgica para remoção dos pulmões e fígado, através de incisão ventral abrangendo o tórax e o abdômen.

Os pulmões (livres dos tecidos mediastinais e traquéia) e os fígados foram secados com papel de filtro e pesados em balança analítica.

Após a pesagem dos pulmões e fígado, retiramos

amostras com peso variando entre um a dois gramas para processarmos a extração e dosagem de histamina. O restante foi pesado novamente e submetidos à desidratação em estufa à 105°C durante 48 horas para determinação da porcentagem de tecido seco.

2.2. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO HISTAMÍNICO

2.2.1. Ensaio Fluorimétrico

A determinação do teor de histamina em cada uma das amostras, foi feita por meio de análise fluorimétrica. Empregou-se o método de Shore, Burkhalter & Cohn (1959), com algumas modificações sugeridas por Noah & Brand (1961), Redlick & Glick (1965), Anton & Sayre (1968) e Håkanson, Ronnberg & Sjölund (1972), todas visando obter um aumento de sensibilidade e especificidade.

O ensaio fluorimétrico consistiu de duas etapas fundamentais: a extração da histamina dos tecidos e a análise fluorimétrica com o o-ftaldialdeído (OPT)*.

1a. Etapa - Extração da Histamina

Depois de pesadas, cada amostra passou pelos processos:

1. Homogeneização em 12 ml de ácido perclórico 0.4N, mediante trituração com areia lavada.
2. Transferência do volume total da suspensão obtida para um tubo de centrífuga e centrifugação.

* o-Phthalic-dicarboxaldehyde. ALDRICH

3. Adição de 3 ml do sobrenadante em um balão (b_1) de vidro arrolhado, com conteúdo prévio de: 0,5 ml de solução de hidróxido de sódio 5N, 1 grama de cloreto de sódio e 10 ml de n-butanol. Acréscimo, ainda de 1 ml de ácido clorídrico 0,1N, para corresponder à adição feita no "balão de recuperação" conforme será descrito no item nº 2.2.3.

4. Agitação da mistura por 10 minutos, transferência do conteúdo total para um tubo de centrífuga, arrolhado e centrifugação.

5. Aspiração da fase aquosa inferior, que era desprezada e subsequente lavagem do butanol por agitação com 5 ml de solução de hidróxido de sódio 0,1N, saturada em cloreto de sódio, durante 3 minutos. Esta operação consistia em remover a histidina residual, ficando retida na solução de hidróxido de sódio.

6. Nova centrifugação e transferência de 8 ml de sobrenadante para um balão (b_2) de vidro, arrolhado, contendo 3 ml de ácido clorídrico 0,1N e 15 ml de n-heptano.

7. Agitação durante 5 minutos e centrifugação do conteúdo total em tubo de centrífuga, de vidro, arrolhado.

8. Transferência de 2 ml da fase aquosa para um tubo de ensaio.

2a. Etapa - Análise Fluorimétrica com o o-ftaldialdeído (OPT).

1. Acréscimo de 0,4 ml de solução 1N de hidróxido de sódio ao extrato ácido no tubo de ensaio.

2. Adição de 0,1 ml de solução de OPT a 0,2% em metanol, o qual reage prontamente com a histamina, formando um produto que emite fluorescência específica a 450 mμ, quando excitado a 350 mμ.

3. Após 4 minutos, acréscimo de 0,2 ml de solução 2 M de ácido cítrico, a fim de bloquear a reação OPT-histamina, por queda do pH. A fluorescência emitida pelo produto final praticamente se mantém por 30 a 40 minutos.

4. Transferência da solução problema para uma cubeta especial de quartzo e leitura no espectrofotofluorímetro*.

2.2.2. Intensidade de Fluorescência Relativa e Fluorescência do Branco.

Para cada amostra, a intensidade de fluorescência relativa que se obtém da leitura, pode ser considerada igual a soma da intensidade do produto histamina-OPT, que é específico, e a do solvente e demais solutos utilizados, que podem fluorescer inespecificamente, e constituem o branco.

Com base nesta consideração, a intensidade de fluorescência correspondente a histamina foi determinada pela seguinte equação:

$$F_{hi} = F_t - F_b \quad (I)$$

onde

F_{hi} = intensidade de fluorescência relativa devido a histamina ligada ao OPT.

* Perkin Elmer - Modelo MPS 44B

F_t = intensidade total de fluorescência relativa, obtida da leitura e

F_b = intensidade de fluorescência relativa do branco, obtida também da leitura.

A solução do branco foi preparada mediante homogeneização de areia lavada e ácido perclórico 0,4N, e posterior centrifugação. Os passos seguintes foram os mesmos já expostos a partir do item 3, 1a. etapa do ensaio fluorimétrico.

2.2.3. Recuperação da Histamina

Para se saber o quanto de histamina seria recuperada pelo ensaio fluorimétrico, a 3 ml do mesmo sobrenadante empregado para o branco, acrescentou-se 1 ml de solução de ácido clorídrico 0,1N contendo 2 μg de histamina*. Os 4 ml de solução histamínica resultante (solução de recuperação ou padrão interno) de concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, foram adicionados a um balão (b_{1R} = balão de recuperação) e prosseguiu-se o tratamento conforme item 3, 1a. etapa do ensaio fluorimétrico.

Admitindo-se que a referida solução de recuperação, R, acrescentada na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no seu balão b_{1R} , forneça na cubeta uma solução de concentração C_{cubR} , então, uma solução problema, P, acrescentada numa concentração $C_{b_{1P}}$ no seu balão b_{1P} , fornecerá na cubeta uma solução de concentração C_{cubP} , tal que é válida a propor-

* Histamina dihydrochloride, SIGMA

ção:

$$\frac{0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}}{C_{\text{cubR}}} = \frac{C_{\text{b}_{1\text{P}}}}{C_{\text{cubP}}}$$

Desta relação deduz-se que:

$$C_{\text{b}_{1\text{P}}} = \frac{0,5 \cdot C_{\text{cubP}}}{C_{\text{cubR}}} \text{ (}\mu\text{g/ml)} \quad (\text{II})$$

Esta equação permitiu determinar a concentração $C_{\text{b}_{1\text{P}}}$, de uma solução problema adicionada no balão $\text{b}_{1\text{P}}$ (extrato de pulmão e fígado no caso), quando se conheciam as concentrações C_{cubP} , da mesma solução-problema, e C_{cubR} da solução de recuperação, ambas na cubeta. Frizemos que o valor 0,5 exprime o módulo da concentração conhecida adicionada ao balão $\text{b}_{1\text{R}}$.

As concentrações C_{cubP} e C_{cubR} , foram determinadas introduzindo-se a respectiva intensidade de fluorescência num gráfico de curva padrão.

2.2.4. Determinação da Curva Padrão

Em cada experimento foi traçada uma curva pa-drão, empregando-se soluções histamínicas de concentrações 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 $\mu\text{g/ml}$ (padrões externos). Estas concentrações, "plotadas" contra as respectivas intensidades de fluorescência relativa, determinam pontos que definem uma reta (Fig. 2.1). O branco padrão foi obtido com ácido clorídrico 0,1 N, o qual foi também utilizado como solvente da histamina.

Para o tratamento fluorescente, tomaram-se 2 ml de cada solução padrão, inclusive o branco, em tubos de ensaio, sendo a seguir submetido ao que foi exposto na 2a. etapa do ensaio fluorimétrico.

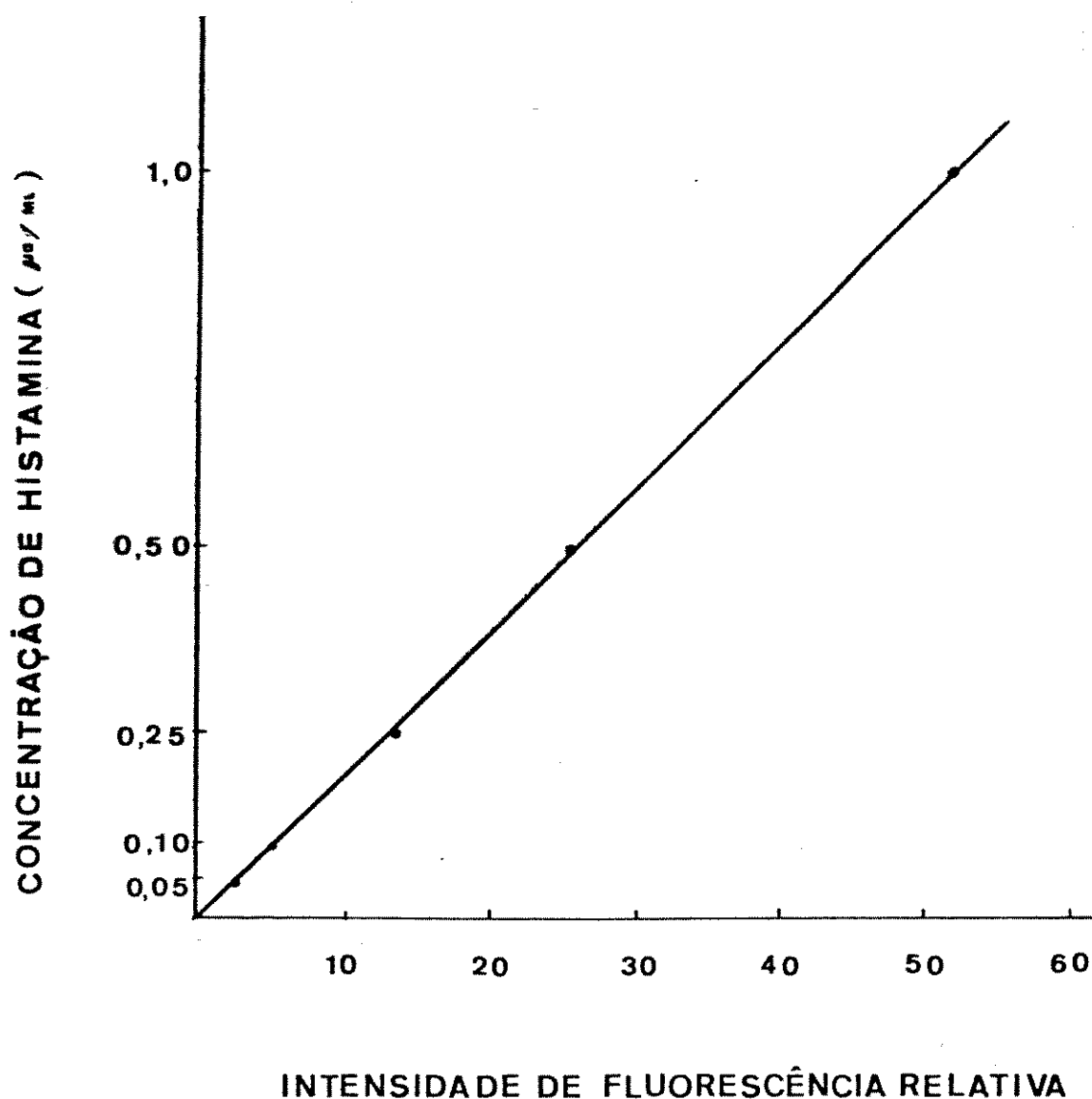


FIGURA 2.1. Curva padrão (externo). Concentração de histamina em função da intensidade de fluorescência relativa.

2.2.5. Cálculo da Concentração de Histamina nas Amostras

A aplicação da fórmula II a cada amostra, permitiu determinar a sua respectiva concentração de adição ao balão b_1 . Porém, ao passar para o balão b_1 , a histamina contida na amostra já terá sofrido dois processos de diluição.

1º Processo: ocorreu quando o tecido foi homogeneizado em 12 ml de ácido perclórico 0,4 N. Esta diluição obedeceu à equação.

$$F_{D1} = \frac{|Vap|ml + |Va'|ml}{|Ma| g} \quad \text{III}$$

onde

FD_1 = fator que indica quantas vezes a concentração histamínica se tornou menor, neste primeiro processo de diluição.

$|Vap|ml$ = módulo do volume de ácido perclórico, expresso em ml (empregaram-se, por conveniência, 12 ml em todos os experimentos).

$|Va'|ml$ = módulo do volume da amostra de tecido, dissolvida, expresso em ml.

$|Ma| g$ = módulo da massa da amostra, expresso em gramas.

2º Processo: ocorreu pelo fato de 3 ml da solução da amostra serem diluído à 4 ml, pelo acréscimo de 1 ml da solução 0,1 N de ácido clorídrico ao balão b_1 . Esta diluição foi definida pela equação:

$$F_{D2} = 4/3 \quad \text{IV}$$

Era nessa concentração, após sofrer duas diluições consecutivas, que a histamina permanecia no balão b_1 . Logo, multiplicando-se a concentração C_{b_1p} , encontrada através da fórmula II, por ambos estes fatores, determinou-se a concentração real que a histamina deveria ter nas amostras de tecido. Chamando de CHT (concentração de histamina nos tecidos) a esta concentração, tem-se pois:

$$CHT_{(\mu g/g)} = \frac{|Vap|ml + |Va'|ml}{|Ma| g} \times \frac{4}{3} \times 0,5 \cdot \frac{C_{cubP}}{C_{cubR}} \quad VI$$

Esta equação final permitiu determinar a concentração de histamina de uma amostra de tecido pulmonar ou hepático.

Para determinar o volume de cada amostra de pulmão normal e edemaciado e do fígado, utilizaram-se os seus respectivos valores de porcentagem de tecido seco e úmido.

Desta forma, o volume líquido foi determinado por:

$$VL = \% L \times |Ma|$$

onde:

VL = volume líquido

%L = porcentagem de líquido do tecido

|Ma| = massa da amostra.

O restante, ou seja, o volume da parte sólida (V_s) de cada amostra foi determinada por medida do volume ocupado por certa quantidade de tecido seco, reduzido a p.º. Assim, o tecido seco (T_s), expresso em grama, correspondeu a um volume (V_x) expresso em ml.

Esta relação foi aplicada a cada amostra após ter sido determinado a massa do seu peso seco (P_s) expresso

em grama. Desta forma:

$$V_s(ml) = \frac{P_s(g) \times V_x(ml)}{T_s(g)}$$

O volume total da amostra ($|V_a'|ml$) resultou da soma dos dois volumes determinados a partir da porcentagem de líquido e da porcentagem de peso seco. Assim:

$$|V_a'|ml = V_L + V_s$$

2.3. LAVAGEM DA VIDRARIA

Para limpeza do material de vidro empregou-se logo após o uso, o que se segue:

1. Enxaguadura em água corrente, até máxima remoção do material aderido.
2. Submersão em solução detergente e agitação deste material no interior de cada frasco, inclusive pipetas.
3. Lavagem com água de torneira até completa remoção do detergente.
4. Imersão em nova solução detergente deixando-se pernoitar.
5. Enxaguadura 6 vezes em água corrente, repetindo-se esta operação com água destilada e, depois com água bi-destilada.
6. tratamento do interior de todos os frascos com ácido nítrico 50% (as pipetas eram mergulhadas neste líquido), onde se deixava permanecer por 20 minutos. (Esta operação foi repetida a cada três experimentos).
7. Finalmente enxaguadura 4 vezes em água desti-

lada e o mesmo em água bi-destilada. Secagem em estufa a 36°C.

8. Lavagem da cubeta de quartzo no final de cada sessão experimental com água destilada e tratamento com ácido nítrico a quente. Remoção do ácido residual com água bi-destilada. Secagem espontânea, em ambiente livre de "contaminação".

2.4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Para o processamento estatístico dos dados, comparou-se cada grupo cirurgicamente tratado com seus respectivos controles.

As concentrações histamínicas foram divididas por 1.000.000, passando os valores para grama/grama e após, extraiu-se a raiz quadrada.

As porcentagens de tecido seco foram divididas por 100 e transformadas pela função normalizadora $\arcsin \sqrt{p}$.

Sobre estes valores finais da concentração histamínica porcentagem de tecido seco e os dados de peso dos órgãos aplicou-se o teste "t" de Welch (Bickel & Doksum, 1977).

Admitiu-se como não significantes os valores de p acima de 0,05.

2.5. TÉCNICA HISTOLÓGICA

Para a avaliação histológica dos pulmões, escolhemos um animal de cada grupo. Após a morte dos animais, retiramos os pulmões, com traquéia e tecido mediastinal, que foram preparados para fotografia macroscópica. Sendo em seguida colhido um fragmento do pulmão e fixado durante 24 horas em líquido de Bouin (solução aquosa saturada de ácido pícrico, formol a 40% e ácido acético glacial, na proporção de 75: 25: 5). Após a fixação, o material foi lavado em água corrente para retirar o excesso de ácido pícrico. Posteriormente a peça foi desidratada em álcool com graduação crescente de 70° até o absoluto, clarificada em xilol e incluída em parafina. Os cortes com 6 μ m foram montados para posterior coloração por Hematoxilina Eosina, Aldeido Fucsina e Azul de Toluidina a 0,1% em tampão fosfato, pH 4,0. Estas duas últimas colorações destinaram-se à identificação de mastócitos.

3. RESULTADOS

3.1. TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA

O tempo de sobrevivência dos animais vagotomizados que compreende desde o momento que o animal se recupera da anestesia e inicia o exercício até a morte por edema pulmonar, estão representados na tabela 3.2. Os seus respectivos controles tiveram o mesmo tempo de sobrevivência.

Os animais vago-adrenalectomizados e seus controles permaneceram em exercício por tempo fixo de 90 minutos, (conforme tabela 3.2).

Observa-se que os animais vagotomizados tiveram um período de sobrevivência muito curto ($\bar{x} = 31,5$ min) sendo que os vago-adrenalectomizados exercitaram-se normalmente durante 90 minutos.

3.2. PESO DOS PULMÕES E FÍGADOS

Nos animais vagotomizados e submetidos a exercício físico, observa-se que o peso pulmonar é quase duas vezes maior que o dos seus controles - Tabela 3.3. - apresentando peso pulmonar ($2,65 \pm 0,70$) significativamente maior que os controles ($1,38 \pm 0,15$), ($p < 0,0001$).

Por outro lado, a vago-adrenalectomia e exercício físico não alteram significativamente o peso pulmonar ($1,74 \pm 0,19$) em relação ao controle ($1,56 \pm 0,23$) ($p > 0,090$) - Tabela 3.3.

O peso dos fígados dos animais vagotomizados não exibiu alteração significativa quando comparado ao grupo

controle ($p > 0,20$), embora os seus pesos pulmonares tenham se elevado bastante. Também, os vago-adrenalectomizados não exibiram alteração no peso do fígado ($p > 0,70$) - Tabela 3.4.

3.3. PORCENTAGEM DE TECIDO SECO

A vagotomia seguida de exercício físico diminuem a porcentagem de tecido seco pulmonar em relação ao controle (CV) ($p < 0,05$) - Tabela 3.5. Atuando simultaneamente a vagotomia e adrenalectomia nos animais, não há alteração da porcentagem de tecido seco pulmonar comparando-se ao controle (CVA) ($p > 0,85$).

No fígado, a porcentagem de tecido seco entre os vagotomizados e controles, exibiu uma diferença significativa ($p < 0,05$) - Tabela 3.6. Entretanto, nos vago-adrenalectomizados o peso seco hepático não se alterou em relação ao seu controle ($p > 0,50$) - Tabela 3.6.

3.4. TEOR DE HISTAMINA NOS PULMÕES E FÍGADOS DOS RATOS VAGOTOMIZADOS, VAGO-ADRENALECTOMIZADOS E SEUS RESPECTIVOS CONTROLES SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO.

As concentrações de histamina obtidas das amostras de pulmões e fígado dos ratos vagotomizados, vago - adrenalectomizados e seus controles estão representados nas tabelas 3.7 e 3.8.

Observa-se nos vagotomizados, que a concentração de histamina pulmonar é bem menor que a dos pulmões dos controle (CV) ($p < 0,001$). Entretanto, nos ratos vago-adrena-

lectomizados a concentração histamínica pulmonar, em relação ao normal controle não sofreu alteração significativa ($p > 0,19$).

Quanto à concentração de histamina hepática, observa-se que tanto a vagotomia quanto a vago-adrenalectomia não alteram seu conteúdo. Conforme a tabela 3.8, a concentração nos ratos vagotomizados em relação ao normal, não se alterou ($p > 0,75$) e o mesmo ocorreu com os vago-adrenalectomizados ($p > 0,25$).

TABELA 3.1. - Peso dos animais (g) vagotomizados, vago-adrenalectomizados e seus respectivos controles.

Rato nº	Peso Animais (g)			
	CV	V	CVA	VA
1	255	285	380	355
2	285	305	360	325
3	385	300	305	410
4	300	331	340	335
5	290	315	350	342
6	325	345	345	335
7	380	390	354	355
8	340	378	360	338
9	280	245	355	374
$\bar{X}$	315,56	321,56	349	352,11
SD	45,3	45,4	20,3	26,1

$p > 0,75$

$p > 0,80$

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomizados

CVA - Controle com operação simulada de vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.2. Tempo de sobrevivência (exercício) dos ratos vagotomizados e de exercício dos vago-adrenalectomizados e seus controles.

Rato nº	Tempo de Exercício (min)			
	CV	V	CVA	VA
1	12	12	90	90
2	12	12	90	90
3	100	100	90	90
4	17	17	90	90
5	44	44	90	90
6	40	40	90	90
7	9	9	90	90
8	40	40	90	90
9	10	10	90	90
$\bar{X}$	31,5	31,5	90	90

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomizados

CVA - Controle com operação simulada de vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.3. Peso pulmonar dos ratos vagotomizados, vago-adrenalectomizados e controles.

Rato nº	Peso Pulmonar (g)			
	CV	V	CVA	VA
1	1,19	2,67	1,29	1,77
2	1,35	3,45	1,38	1,63
3	1,41	1,99	1,34	1,49
4	1,28	2,49	1,49	1,75
5	1,57	2,23	1,60	1,87
6	1,31	1,45	1,64	1,97
7	1,54	3,62	1,85	1,76
8	1,56	2,84	1,54	1,48
9	1,24	3,15	1,99	2,02
— X	1,38	2,65	1,56	1,74
SD	0,14	0,70	0,23	0,19

$P < 0,0001$

$P > 0,090$

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomizados

CVA - Controle com operação simulada de vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.4. Peso do fígado dos ratos vagotomizados, vago a-drenalectomizados e controles.

Rato nº	Peso Fígado (g)			
	CV	V	CVA	VA
1	10,33	11,60	10,91	10,62
2	10,66	11,31	11,66	11,09
3	10,86	10,23	8,89	9,33
4	11,03	12,07	11,10	10,72
5	9,45	10,37	10,48	10,26
6	9,17	11,29	9,51	11,23
7	13,41	11,20	11,26	12,02
8	10,69	15,06	10,81	10,00
9	9,99	9,60	11,89	12,94
$\bar{X}$	10,62	11,41	10,72	10,91
SD	1,22	1,57	0,97	1,08

$p > 0,20$

$p > 0,70$

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomizados

CVA - Controle com operação simulada de vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.5. Porcentagem de tecido seco pulmonar dos ratos vagotomizados, vago-adrenalectomizados e controles.

Rato nº	Porcentagem de Tecido Seco Pulmonar			
	CV	V	CVA	VA
1	25,80	22,31	18,99	24,74
2	36,16	16,27	19,88	25,83
3	19,87	20,18	17,78	19,47
4	17,97	16,01	27,78	20,60
5	19,48	15,01	19,50	20,89
6	14,02	19,91	20,20	18,79
7	18,75	12,61	26,13	21,54
8	19,95	16,17	17,94	18,54
9	25,91	12,83	19,89	19,64
$\bar{X}$	21,99	16,81	20,89	21,11
SD	6,47	3,34	3,55	2,56
$\bar{X}_*$	0,4848	0,4209	0,4736	0,4768
SD _*	0,0758	0,0445	0,0426	0,0310

$p < 0,05$

$p > 0,85$

OBS.: Os valores de p referem-se a $\bar{X}_*$ e SD_{*} dos dados da tabela divididos por 100 e transformados pela função normalizadora $\arcsin \sqrt{P}$.

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomizados

CVA - Controle com operação simulada de vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.6. Porcentagem de tecido seco do fígado dos ratos vagotomizados, vago-adrenalectomizados e controles.

Rato nº	Porcentagem de Tecido Seco do Fígado			
	CV	V	CVA	VA
1	28,79	26,98	28,97	30,02
2	27,59	27,73	26,94	28,76
3	24,57	24,85	28,95	28,61
4	28,27	20,91	27,99	27,63
5	28,66	26,57	28,11	28,41
6	27,45	25,05	27,91	28,46
7	27,89	28,33	28,96	28,34
8	29,51	25,76	24,76	27,43
9	28,83	22,61	28,23	26,43
$\bar{X}$	27,95	25,42	27,86	28,23
SD	1,42	2,40	1,33	0,99
$\bar{X}_*$	0,5569	0,5280	0,5560	0,5601
SD _*	0,0161	0,0280	0,0151	0,0111

$p < 0,05$

$p > 0,50$

OBS.: Os valores de p referem-se a $\bar{X}_*$ e SD_* dos dados da tabela divididos por 100 e transformados pela função normalizadora $\arcsen \sqrt{P}$.

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomia

CVA - Controle com operação simulada de vagotomia e vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.7. Concentração de histamina pulmonar dos ratos vagotomizados, vago-adrenalectomizados e controles.

Rato nº	Concentração de Histamina ($\mu\text{g/g}$) pulmonar			
	CV	V	CVA	VA
1	6,72	2,51	14,64	14,03
2	7,97	6,26	15,44	16,89
3	12,32	5,62	18,63	15,53
4	8,89	5,15	9,52	15,23
5	16,61	6,66	12,42	20,82
6	13,20	8,44	17,11	7,41
7	11,64	7,42	21,05	7,60
8	15,53	9,22	27,40	12,51
9	13,85	5,29	11,93	9,79
$\bar{X}$	11,85	6,28	16,46	13,31
SD	3,39	1,98	5,42	4,45
$\bar{X}_*$	0,0034100	0,0024747	0,0040105	0,0036007
SD _*	0,000510	0,000426	0,000650	0,000625
$p < 0,001$		$p > 0,19$		

OBS.: Os valores de p estão relacionados a $\bar{X}_*$ e SD_{*} dos dados da tabela acima, divididos por 1.000.000 e extraída a sua raiz.

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomia

CVA - Controle com operação simulada de vagotomia e vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

TABELA 3.8. Concentração de histamina no fígado dos ratos vagotomizados, vago-adrenalectomizados e controles.

Rato nº	Concentração de Histamina ($\mu\text{g/g}$) Hepática			
	CV	V	CVA	VA
1	1,21	1,14	1,46	1,41
2	1,60	1,42	1,84	2,73
3	1,27	2,06	2,68	2,25
4	1,32	1,37	1,67	2,18
5	1,71	1,66	1,34	2,11
6	1,79	1,94	3,19	0,87
7	0,97	2,17	2,64	2,86
8	2,56	1,27	3,22	1,64
9	1,17	1,03	3,08	1,40
$\bar{X}$	1,51	1,56	2,34	1,93
SD	0,47	0,41	0,76	0,65
$\bar{X}_*$	0,0012170	0,0012401	0,0015124	0,0013729
SD*	0,000184	0,000165	0,000258	0,000246

$p > 0,75$

$p > 0,25$

OBS.: Os valores de p estão relacionados a $\bar{X}_*$ e SD_* dos dados da tabela, divididos por 1.000.000 e extraída a sua raiz.

CV - Controle com operação simulada de vagotomia

V - Vagotomia

CVA - Controle com operação simulada de vagotomia e vago-adrenalectomia

VA - Vagotomizados e adrenalectomizados.

3.5. EXAME MACROSCÓPICO DOS PULMÕES

Os pulmões dos animais controle com operação simulada de vagotomia e vago-adrenalectomia, mostraram aspecto normal, de coloração róseo, brilhante, esponjoso e elástico. Ao contrário, os pulmões dos animais vagotomizados tinham características anormais, com coloração róseo escuro apresentando manchas vermelhas lembrando hemorragia, densos e com pouca elasticidade. Em relação ao pulmão dos controles apresentava volume bem maior. Uma característica importante era o fato de haver grande saída de espuma pela traquéia (como é visível na fotografia). Nos animais vago - a drenalectomizados os pulmões apresentavam aumento de volume, mas não tanto quanto os vagotomizados, tinham aspecto róseo escuro, menor elasticidade e aspecto esponjoso.

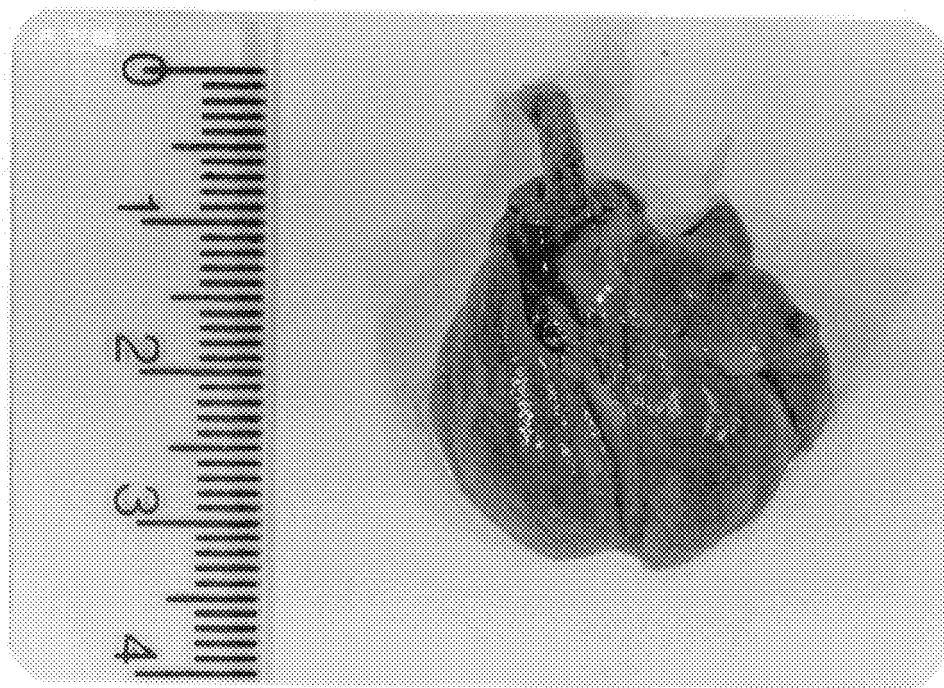


FIGURA 3.1. Pulmão de rato controle com operação simulada de vagotomia.

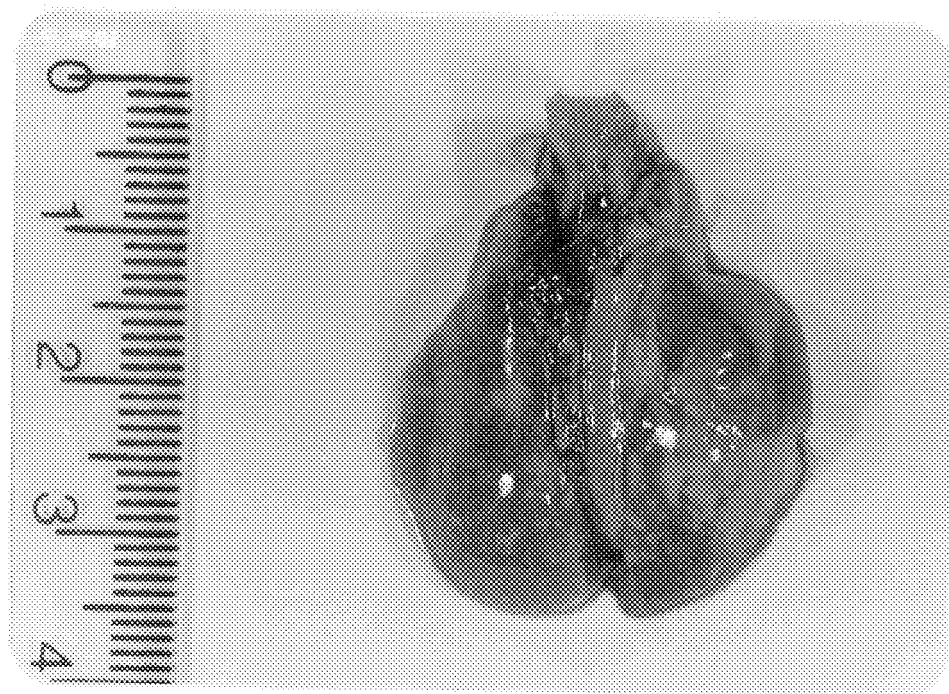


FIGURA 3.2. Pulmão de rato vagotomizado (ventral).



FIGURA 3.3. Pulmão de rato vagotomizado (posterior).



FIGURA 3.4. Pulmão de rato controle com operação simulada de vagotomia e adrenalectomia.

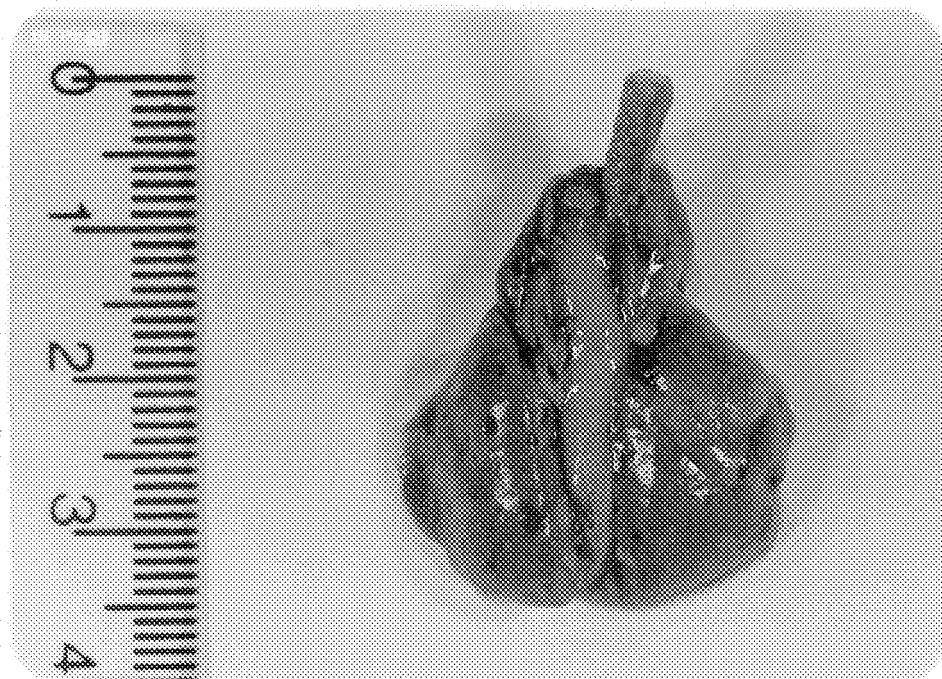


FIGURA 3.5. Pulmão de rato vago-adrenalectomizado.

3.6. EXAME MICROSCÓPICO DOS PULMÕES

	Colapso parcial	Enfisema alveolar	Edema alveolar	Mastócitos
CV	0	0	0	++
V	+	+	+	+
CVA	0	0	0	++
VA	+	+	+	++

Critério: 0 (zero) a +++ (três cruces)

Observação: A pesquisa de mastócitos foi feita na pleura visceral e no tecido conjuntivo que envolve os brônquios e as pequenas artérias pulmonares. A avaliação da quantidade de mastócito foi feita através de cuidadosa observação de cada campo e, finalmente, uma análise subjetiva permitiu concluir que nos pulmões de ratos vagotomizados, os mastócitos eram menos presentes que nos animais dos outros grupos.

CV e CVA: Aspectos de normalidade do órgão. (Fig. 3.6 e 3.9).

VA: Presença de determinadas áreas de atelectasia principalmente de localização sub-pleural, hemorragia intra-alveolar, congestão e espessamento septal e edema discreto. (Fig. 3.10)

V: Desarranjo morfológico da configuração alveolar com evidente redução da luz alveolar, presença de edema e material fibrinar na luz de alguns alvéolos. (Fig. 3.7

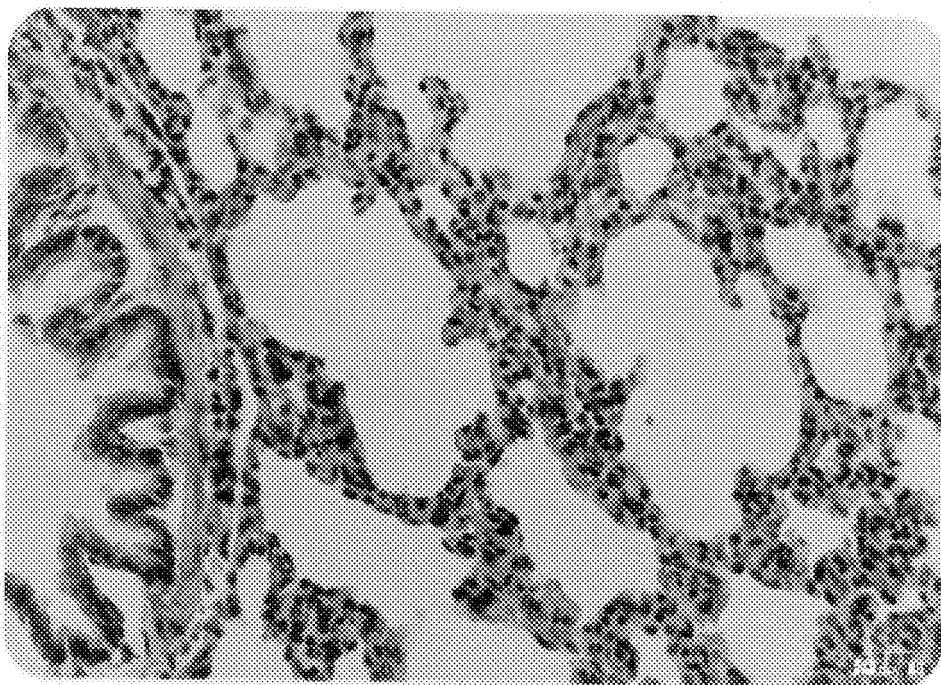


FIGURA 3.6. Pulmão de rato controle com operação simulada de vagotomia (aumento 400 x)

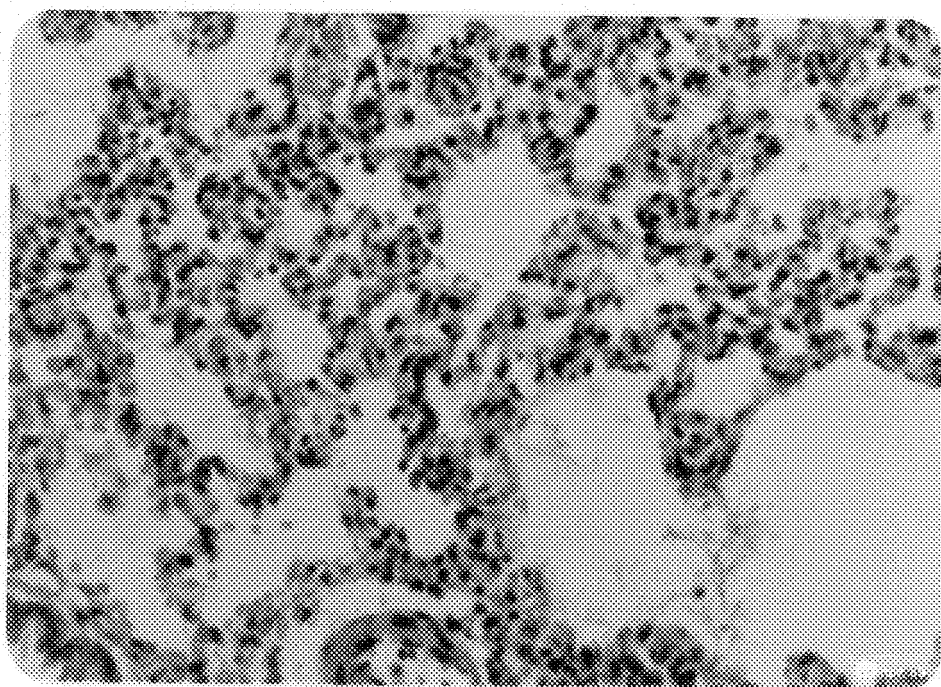


FIGURA 3.7 Pulmão de rato vagotomizado (aumento 400 x)

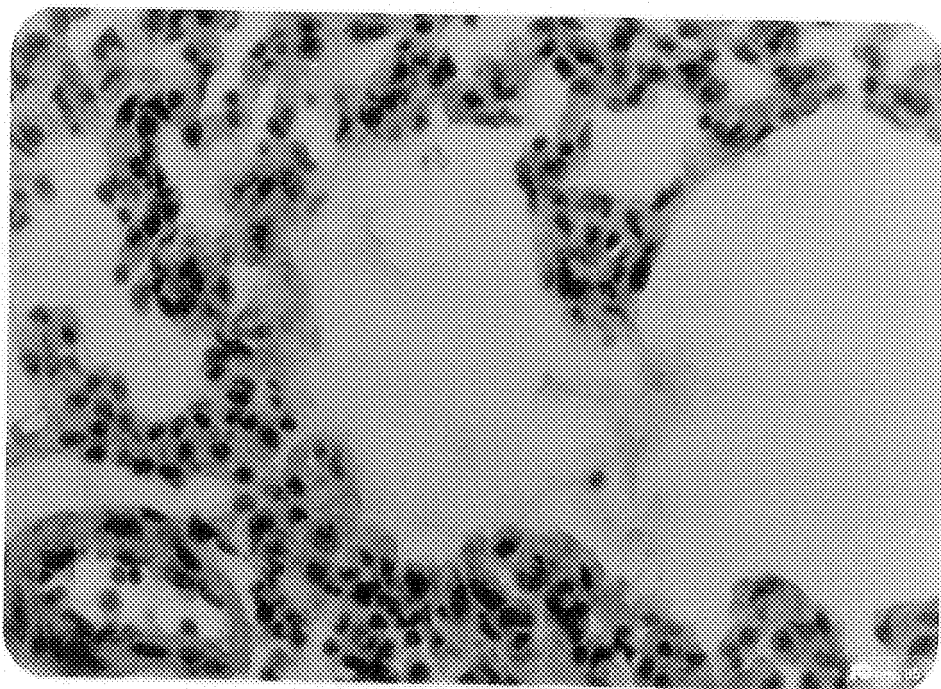


FIGURA 3.8. Pulmão de rato vagotomizado (aumento 640 x)

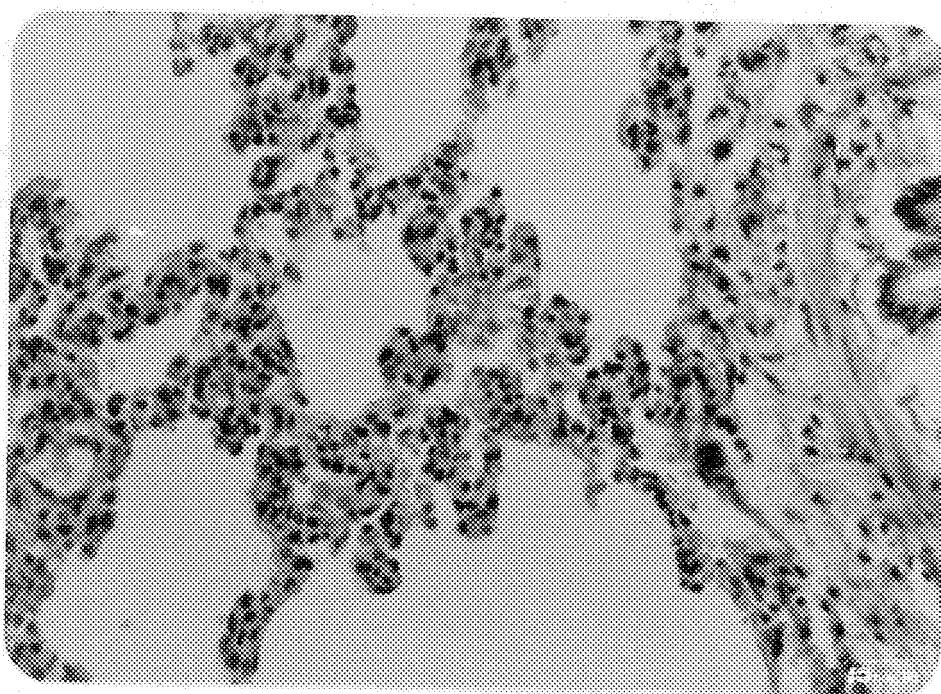


FIGURA 3.9. Pulmão de rato controle com operação simulada de vagotomia e adrenalectomia (aumento 400 x).

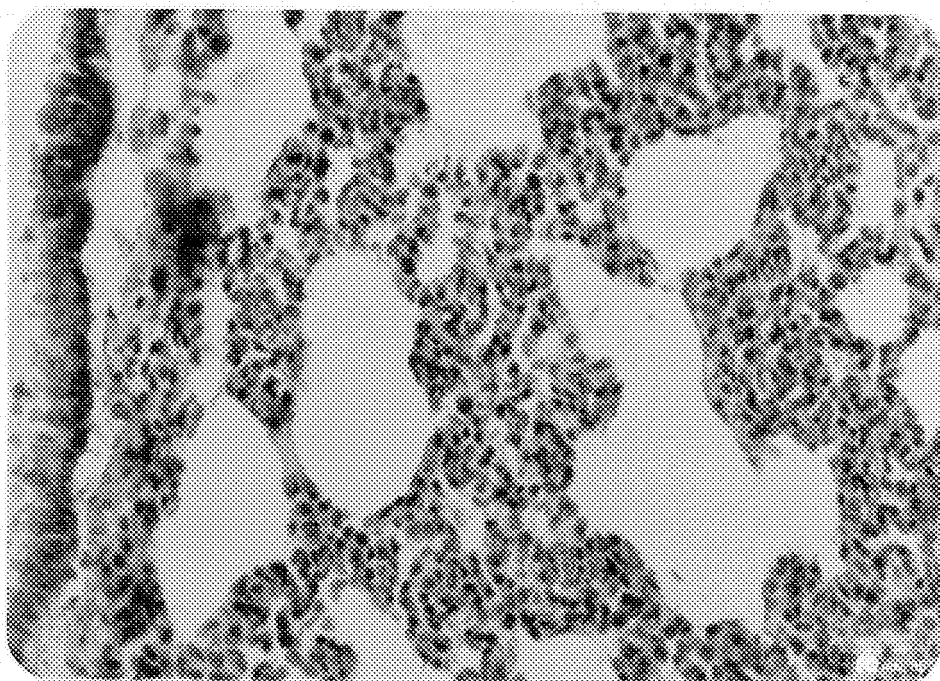


FIGURA 3.10. Pulmão de rato vago-adrenalectomizado (aumento 400 x).

4. DISCUSSÃO

4.1. MÉTODO

Muitas técnicas têm sido empregadas para se estimar o teor histamínico dos tecidos, além do ensaio fluorimétrico (Shore, Burkalter & Cohn, 1959). As primeiras se baseavam na atividade biológica da histamina em órgãos isolados tais como íleo de cobaia (Barsoum & Gaddum, 1935; Mc Intire, 1966; Vugman & Rocha e Silva, 1966). Também foi usado o ensaio colorimétrico, que se seguia ao tratamento da histamina com sal diazônico (Rosenthal & Tabor, 1948; Sawicki et alii, 1970) ou dinitrofluorobenzeno (Mc Intire, White & Sproul, 1950; Lowry et alii, 1954).

O que nos levou a optar pelo método fluorimétrico de Shore et alii (1959), foi o fato de ser uma técnica simples e precisa, a qual tem sido continuamente aperfeiçoada no sentido de se tornar mais sensível e específica.

Ao invés de se trabalhar com amostras de um grama homogeneizada em 9 ml de ácido perclórico 0,4N, conforme preconiza o método original, utilizamos amostras de peso entre 1 a 2 gramas homogeneizada em 12 ml de ácido perclórico (Pereira, 1981), empregando areia lavada na homogeneização. O aumento do volume do solvente permitiu tanto o acrescimo da areia lavada, como de amostra de massas maiores, sem alteração sensível na concentração do homogeneizado, a qual era devidamente corrigida.

Em desacordo, mais uma vez, com o preconizado por Shore, empregou-se para cada análise, uma alíquota de 3 e não de 4 ml do homogeneizado tecidual (Pereira, 1981). Po-

rēm este volume (4 ml) era restabelecido quando se acrescentava 1 ml de ácido clorídrico 0,1N no primeiro balão de ensaio (b_1), contendo a solução problema ou 1 ml de ácido clorídrico 0,1N levando 2 μ g de histamina dissolvidos, em cada "balão de recuperação".

Outra variação metodológica foi a homogeneização do tecido mediante trituração com areia lavada (Moura, 1979), usando-se almofariz e pistilo manual de porcelana, ao invés de homogeneizador elétrico de vidro, empregado rotineiramente por outros investigadores (Shore et alii, 1959; Anton & Sayre, 1968; Hakanson et alii, 1972). Esta homogeneização com areia, facultaria encontrar um teor histamínico maior que o encontrado utilizando o homogeneizador elétrico (Pereira, 1981).

Embora Noah & Brand (1961) houvessem introduzido a utilização do OPT a 0,1% em metanol, ao invés de 1% como no método original, optamos pela concentração de 0,2%, a qual foi considerada ótima por Hakanson et alii (1972). Estes autores testando a solução a 0,1% e comparando os resultados obtidos com os da solução a 0,2%, observaram que, com aquela, a intensidade de fluorescência da histamina se reduzia acerca de 10%, enquanto que, com esta, ela se mantinha inalterada; e, além disso, com a solução a 0,2% a intensidade de fluorescência do branco decaía para menos da metade, sem prejuízo nos ganhos de reprodutibilidade e estabilidade do método, os quais haviam sido apontados por Redlick e Glick (1965) quando estudaram o ensaio com solução a 0,1%.

De muita importância é a alcalinidade do meio em que deve ocorrer a condensação da histamina com o OPT. Trabalhamos com o pH em torno de 12,6, o qual se encontra den-

tro da faixa observada como ótima (12,4 a 12,7) por Håkanson et alii (1972), no que diz respeito à intensidade de fluorescência.

Outra preocupação dos pesquisadores era conseguir a estabilidade do fluoróforo com alta sensibilidade, ou seja, com intensa fluorescência. Shore et alii (1959) haviam conseguido boa estabilidade acidificando o meio a um pH de aproximadamente 0,8, porém, Kremzner & Wilson (1961) conseguiram aumentar a sensibilidade em relação ao método original, elevando o pH a valores entre 2 e 4. Posteriormente Håkanson et alii (1972) verificaram que a faixa de variação do pH para a estabilização da fluorescência dependia do ácido usado, uma vez que, com a utilização do ácido cítrico, uma intensidade ótima de fluorescência era conseguida com o pH entre 2 e 3,5 e, com ácido sulfúrico, com pH entre 2 e 7.

Optamos pela utilização do ácido cítrico 2M, acatando as sugestões de Anton & Sayre (1968), que verificaram ser estável a intensidade de fluorescência quando este ácido é empregado na reação de condensação, mesmo com alguma variação de volume. Desse modo, refutamos as opiniões de Kremzner & Wilson (1961), para o uso do ácido fosfórico, por sua grande capacidade tamponante, e acatamos, em parte, as observações de Håkanson et alii (1972), que sugeriram o emprego do ácido cítrico ou sulfúrico.

A preparação do branco é também importante, pois do processo como foi obtido, muito dependerão os níveis histamínicos encontrados. O "branco reverso" usado no ensaio original, era conseguido tratando-se com OPT uma das soluções oriundas do tecido examinado, porém, após a acidifica-

ção final. Seus preconizadores acreditavam que nestas condições apenas a histamina deixaria de fluorescer. Entretanto, foram constatados materiais que reagem com o OPT em meio alcalino, provocando fluorescência não específica, mas que não o fazem em solução ácida. Deste modo, o "branco reverso" daria uma leitura baixa de fluorescência não específica, conduzindo para valores falsos para a quantificação da histamina (Atak, 1977). Diante deste fato, preparamos um reagente branco em que o extrato tecidual era substituído por ácido perclórico 0,4N, homogeneizado com areia lavada e centrifugado (Pereira, 1981). Análogo ao que se fazia com o extrato das amostras, 3 ml do sobrenadante eram tomados e seguia-se com o procedimento normal, preconizado por Shore et alii (1959).

A escolha do método fluorimétrico, acrescido do que melhor descobriram os pesquisadores no sentido de aperfeiçoá-lo, parece ter-nos proporcionado excelentes condições para a quantificação da histamina pulmonar e hepática.

No cálculo da concentração da histamina nas amostras, aplicamos sobre a fórmula II duas multiplicações referentes às diluições sofridas pela amostra antes de passar pelo balão b_1 (1ª. etapa do método fluorimétrico) onde se iniciava a extração da histamina. A primeira diluição obedeceu a equação (III):

$$F_{D1} = \frac{|Vap|ml + |Va'|}{|Ma|g}$$

O Va' referia-se ao volume de amostra de pulmão ou fígado utilizada para a extração e dosagem da histamina.

Como o pulmão é constituído de um tecido que contém espaços preenchidos por ar, e, este espaço, com o desenvolvimento do edema passaria a ser ocupado por líquido em proporções diferentes variando de animal para animal, foi-nos impossível estabelecer uma densidade para o tecido pulmonar que pudesse ser aplicada a todas as amostras. Assim sendo, optamos por calcular o volume total das amostras partindo das porcentagens de tecido seco e úmido de cada amostra, conforme exposto no ítem 2.2.5.

Acreditamos que a metodologia aplicada para o cálculo do volume da amostra possa ter apresentado alguma margem de erro, constante para todas as amostras, a qual consideramos desprezível em relação ao erro que existiria estabelecendo uma densidade fixa para todas as amostras pulmonares. Para uniformidade dos cálculos, aplicamos a mesma metodologia para as amostras de fígado.

4.2. ETAPAS EXPERIMENTAIS

A prevenção do edema pulmonar agudo em ratos submetidos à vagotomia e exercício físico pela adrenalectomia e anti-histamínicos, aliada à hipótese de que o mecanismo do edema pulmonar poderia estar ligado à liberação de histamina, a nível pulmonar (Maciel, 1970) constituíram o fundamento deste trabalho.

A presença de grande quantidade de "cininas" ativas nos pulmões e fígado dos animais vitimados por edema pulmonar agudo, relatado por Di Mattei (1962), nos levou a realizar dosagens de histamina nestes dois ôrgãos.

Foi demonstrado que o exercício desencadeia e

acelera marcadamente o edema pulmonar agudo em ratos previamente vagotomizados, sendo que esta alteração se caracteriza pelo aumento de peso dos pulmões e pela eliminação de plasma em forma de espuma dos brônquios dos animais (Mello, 1965). Maciel (1970) confirmou estes resultados. Desta forma, optamos por submeter todos os animais a exercício após o tratamento cirúrgico, para acelerar o processo agudo.

4.2.1. Avaliação dos Pesos Pulmonares e Relação Peso Úmido-Peso Seco.

A avaliação do edema pulmonar tem sido realizada por vários métodos e o considerado mais preciso para esta avaliação é o das porcentagens (Borison & Kovacs, 1959 ; Rech & Borison, 1962). Maciel (1970) aplicou este método de determinação das porcentagens relativas ao peso dos pulmões e ao peso corporal para avaliação do edema pulmonar de ratos vagotomizados ou vago-adrenalectomizados e submetidos a exercício físico. Desta forma, já é conhecido o grau de edema para cada grupo do presente experimento. A vagotomia e exercício promovem edema pulmonar e a adrenalectomia o previne. Para esta avaliação é necessário que os pulmões sejam pesados com mediastino e traquéia. Como o objetivo deste trabalho não incluía a avaliação do edema, realizamos somente pesagem dos pulmões livres dos tecidos mediastinais e traquéia.

Quanto ao peso pulmonar, observamos que nos animais vagotomizados o pulmão é quase duas vezes mais pesado que o dos animais do grupo controle (CV), o que concorda com os dados de que a vagotomia promove edema pulmonar agu-

do. Nos animais submetidos à vago-adrenalectomia, o peso pulmonar sofreu um ligeiro aumento, mas não considerado significante em relação ao seu grupo controle (CVA), confirmando também as observações de que a adrenalectomia previne o desenvolvimento do edema pela vagotomia.

Como os animais vagotomizados apresentaram peso pulmonar próximo ao dobro dos pesos normais, era de se supor que este acréscimo de peso se devesse somente à entrada de líquido nos pulmões e que, portanto, a porcentagem de tecido seco pulmonar dos animais deste grupo fosse próximo à metade da porcentagem do tecido seco pulmonar observado nos controles (CV). Mas isto não ocorreu, embora exista uma diferença significativa. A explicação para este fato poderia estar nos resultados obtidos por Staub (1974) que verificou, em pulmões humanos, que a quantidade de tecido seco pulmonar no edema aumenta devido às proteínas no fluído do edema.

A porcentagem de tecido seco pulmonar dos ratos vago-adrenalectomizados e seus controles (VA) foi praticamente a mesma, indicando que não houve ocupação de fluído nos espaços aéreo pulmonar nos animais vago-adrenalectomizados.

4.2.2. Avaliação dos Pesos dos Fígados e Relação Peso Úmido -Peso Seco

O peso dos fígados não apresentou variação significante entre os grupos. Desta forma, a vagotomia, bem como a vago-adrenalectomia não afetaram o fígado no sentido de aumentar seu peso.

Em relação à porcentagem de tecido seco do fígado entre os animais vagotomizados e seus controles (CV), houve uma diferença estatisticamente significativa, onde o vagotomizado apresentou uma porcentagem menor. Esta diferença poderia ser devido a um aumento de líquido no fígado do rato vagotomizado, mas nada podemos afirmar uma vez que o peso a fresco não exibiu aumento significativo.

Quanto à porcentagem de tecido seco do fígado entre os ratos vago-adrenalectomizados e seus controles (CVA) não houve alteração, portanto a quantidade de líquido no fígado permaneceu constante assim como o peso fresco.

4.2.3. Teor Histamínico nos Pulmões de Ratos Vagotomizados, Vago-adrenalectomizados e Controles.

O mecanismo de formação do edema de várias etiologias é muito discutido. O fato do edema neurogênico não ser alterado pela vagotomia e simpatectomia torácica bilateral e ser prevenido pelo bloqueador ganglioplégico deu origem à hipótese de que o edema resultaria de uma estimulação autônoma generalizada (Sarnoff & Sarnoff, 1952). Além disso, a via simpática tem sido apresentada como responsável pelo edema pulmonar neurogênico (Luisada, 1967; Simmons et alii, 1969; Chen, Sun & Chay, 1973; Harry, Gambil & Eggers, 1977; Milley, Nugent & Rogers, 1979), os autores ressaltaram uma grande influência de fatores hemodinâmicos envolvidos no processo. Ainda, o fato da adrenalectomia prevenir o edema causado por lesão hipotalâmica (Nathan & Reis, 1975) e vagotomia (Maciel, 1970) levou a proposição de que as adrenais e adrenalina têm grande participação.

Segundo Rech (1966) o fator determinante para o edema pulmonar causado pela vagotomia cervical bilateral, seria a perda de impulsos aferentes vagais para o SNC, ocorrendo neste processo um desequilíbrio da inervação simpática dos capilares pulmonares e/ou liberação de uma substância humoral de origem central.

Então, dentre as várias hipóteses do processo de formação do edema pulmonar foi proposto que ele seria causado por: a) uma substância humoral; b) por ação do sistema nervoso autônomo simpático através das adrenais ou da estimulação autônoma generalizada; c) fatores hemodinâmicos. Devido ao fato da rede capilar pulmonar apresentar baixa resistência periférica, torna aceitável a idéia de que sofra grandes influências hemodinâmicas. Mas, isto se torna questionável uma vez que: Campagnole (1983) observou que os ratos que morriam com edema por lesão no núcleo do trato solitário, quando tratados com anti-hipertensivos do tipo reserpina e fenoxibenzamina o edema ocorria em ausência de hipertensão e, com clorpromazina a hipertensão permanecia e o edema era abolido, atribuindo o autor à morte do animal por edema pulmonar, a fatores não hemodinâmicos.

E Hoff et alii (1981) e Uria et alii (1981) verificaram que no edema pulmonar neurogênico a pressão arterial sistêmica permanece inalterada e a pressão arterial pulmonar é o único dado a se alterar. Isto fez com que propusessem que a descarga simpática evocada pelo cérebro afetaria diretamente a rede pulmonar. E em relação ao edema por vagotomia cervical bilateral no rato, Lagneaux, Leconte & Bodson (1982) verificaram que logo após a vagotomia, a pressão arterial pulmonar não se altera.

Estes dados sugerem que o desequilíbrio da inervação simpática, como propôs Rech (1966), pode estar envolvido, mas atuando de outra forma que não hemodinamicamente.

Nossos resultados concordam com a hipótese de que as adrenais estejam envolvidas na formação do edema pela vagotomia, uma vez que os animais vago-adrenalectomizados apresentaram peso e porcentagem de tecido seco pulmonar semelhante aos controles (CVA), tiveram um tempo de exercício, em média, maior que os vagotomizados suportando bem ao exercício a que foram submetidos, demonstrando prevenção do edema e da morte dos animais. Ao contrário, os vagotomizados exercitaram-se com maior dificuldade e morreram durante o exercício, com edema pulmonar agudo dentro de um espaço de tempo, em média, menor que os vago-adrenalectomizados.

A concentração de histamina nos pulmões dos ratos vagotomizados resultou menor do que nos pulmões dos seus respectivos controles (CV). Assim sendo, a histamina poderia ser o fator humoral participante no edema por vagotomia, como propuseram Borison & Kovacs, (1959); Rech, McCarthy & Borison, (1962); Rech, (1966).

A depleção histamínica nos pulmões edemaciados corrobora a hipótese da participação da histamina na formação do edema, suportada na obtenção da potenciação do edema após vagotomia pela histamina (Aitken & Sanford, 1972), e na prevenção do edema pulmonar por inalação de vapor quente (Aviado, 1959) e vagotomia (Maciel, 1970) com o uso de anti-histamínicos.

A alteração do conteúdo histamínico pelo edema

pulmonar, também está de acordo com os dados da diminuição da concentração da histamina pulmonar pelo edema induzido por cloridrato de amônio (Jaques, 1954), epinefrina (Rotschild & Oliveira Antonio, 1977) e neurogênico (Voelkel et alii, 1981).

Schayer (1959) verificou que a adrenalina e a no radrenalina aumentam a atividade da histidina descarboxila se "in vitro", no camundongo, e mais tarde sugeriu que exis te um balanço entre catecolaminas e histamina para manter a homeostase (Schayer, 1960). Graham, Kahlson & Rosengreen (1964) constataram, de fato, que o exercício aumenta a sĩn tese de histamina no camundongo. Mas, nos pulmões de rato diminui esta capacidade. Ainda constataram que a adrena lina causa uma inibição na sĩntese histamínica pulmonar, no rato.

A depleção no nível histamínico pulmonar dos ratos vagotomizados poderia ser atribuída à inibição da forma ção da histamina pelo exercício. Mas, esta hipótese pode ser rejeitada, uma vez que nos animais vago-adrenalectomizados e nos dois grupos controles (CV e CVA), que também foram submetidos a exercício, não se verificou uma baixa no teor histamínico a nível dos animais vagotomizados. Além disso, o que se refere à sĩntese histamínica, não poderia ser aplicado a concentração de histamina neste processo agu do a que os animais foram submetidos, no presente trabalho.

A suposição de que o edema não se deva unicamente a fatores hemodinâmicos; a prevenção do edema em ratos vagotomizados pela adrenalectomia e anti-histamínicos; e a proposta de que exista um equilíbrio entre histamina e adre nalina para manter a homeostase, leva-nos a pensar que no

edema por vagotomia existe a participação de um fator humoral, no caso a histamina, como consequência da interrupção dos reflexos vagais e do desequilíbrio simpático.

4.2.4. Teor de Histamina no Fígado dos Animais Vagotomizados, Vago-adrenalectomizados e Controles.

A concentração de histamina nos fígados dos animais vagotomizados, vago-adrenalectomizados em relação a seus respectivos controles não sofreu alteração. Portanto, ao contrário das cininas ativas que foram encontradas em grande quantidade no fígado dos animais vitimados por edema (Di Mattei, 1962), a histamina não exibiu o mesmo comportamento. Desta forma, a alteração na concentração de histamina se restringiu aos pulmões edemaciados.

4.2.5. Exame Microscópico

Apesar do exame histológico realizado para avaliação de mastócito não ter sido uma análise por quantificação mas uma análise subjetiva, a presença destas células foi menor nos cortes de pulmões edemaciados (V). Coincidentemente, nestes mesmos órgãos a quantidade de histamina era menor, demonstrando, ainda mais, que o processo edematogênico por vagotomia poderia sofrer influência da histamina.

O edema alveolar verificado nos cortes é discreto, ao contrário do que foi visto no exame macroscópico dos pulmões. Este fato poderia ser explicado pela constituição líquida do edema, ser eliminada durante a preparação dos cortes histológicos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

- A vagotomia cervical bilateral seguida de exercício físico promove edema pulmonar agudo no rato dentro de minutos. A porcentagem de tecido seco pulmonar nos animais vagotomizados é menor que nos animais controles (CV) e nos vago-adrenalectomizados e seus controles (CVA).
- Adrenalectomia bilateral imediatamente após a vagotomia previne este tipo de edema.
- Nos pulmões dos ratos vagotomizados, o nível histamínico sofreu uma significativa queda em relação ao seu controle (CV), enquanto que não se constatou o mesmo nos vago-adrenalectomizados em relação ao seu controle (CVA).
- A concentração de histamina nos fígados dos vagotomizados e vago-adrenalectomizados não sofreu alteração significante em relação aos seus grupos controles, indicando que a alteração histamínica ocorreu a nível pulmonar, somente.
- A depleção histamínica pulmonar nos ratos vagotomizados não se deveu à adrenalina liberada durante o exercício físico e "stress", uma vez que todos os animais dos outros grupos que também foram submetidos ao exercício, tiveram nível histamínico maior.
- O exame histológico demonstrou nos pulmões dos ratos vagotomizados um desarranjo na configuração alveolar, e que os mastócitos se tornaram menos freqüentes nestes órgãos.
- Concluimos, finalmente, que a alteração histamínica observada é um fator indicativo da sua participação no processo edematogênico pulmonar, conseqüente à vagotomia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M.M. & SANFORD, J. Effects of histamine, 5-hydroxy thryptamine and bradykinin on cattle and their modification by antagonists and by vagotomy. *J. Comp. Pathol.* , 82: 257, 1972.

ANTON, A.H. & SAYRE, D.F. A modified fluorimetric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 166(2): 285, 1968.

ASCH, A.S.F. & SCHILD, H.O. Receptors mediating some actions of histamine. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 27:427 , 1966.

ATAK, C. Measurement of biogenic amines using cation exchange chromatography and fluorimetric assay. *Acta physiol. scand.* (Suppl. 451): 28, 1977.

AVIADO, D.M. Therapy of experimental edema in the dog. (With special reference to burns of the respiratory tract). *Circulation Res.*, 7: 1019, 1959.

BARSOUM, A.L. & GADDUM, J.H. The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. *J. Physiol., Lond.*, 85: 1, 1935. "Apud" Shore; Burkhalter & Cohn. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 127: 182, 1959.

- BECK, L. Histamine as the potential mediator of active reflex dilatation. *Fed. Proc.* 24: 1298, 1965.
- BERNDT, W.O. & RECH, R.H. Altered mesothelial permeability in the guinea pig following bilateral vagotomy. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 112: 950, 1963.
- BICKEL, P.J. & DOKSUM, K.A. Mathematical statistics, basic ideas and selected topics. San Francisco, Holden-Day, 1977, 218p.
- BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, C.J.; GANELLINI, C. R. & PARSON, E.M. Definition and antagonism of histamine H_2 -receptors. *Nature*, 236: 385, 1972.
- BORISON, H.L. & KOVACS, B.A. Central mechanisms in pulmonary oedema of nervous origin in guinea pigs. *J. Physiol., Lond.*, 145: 374, 1959.
- BRIGHAM, K.L. & OWEN, P. Increased sheep lung vascular permeability caused by histamine. *Circulation Res.*, 37:647, 1975. "Apud" Propst, K.; Millen, J.E. & Glauser, F.L. The effects of endogenous and exogenous histamine on pulmonary alveolar membrane permeability. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 117: 1063, 1978.
- CAMPAGNOLE, M.J. Alterações da pressão arterial provocadas por lesões restritas do núcleo do trato solitário no rato. Ribeirão Preto, 1983, 130p. Tese (Mestre em Fisiologia) Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina.

- CHEN, H.I.; SUN, S.C. & CHAY, C.Y. Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am. J. Physiol.*, 224: 223, 1973.
- DI MATTEI, P. Occurrence of kinines in epinephrine induced pulmonary edema in rabbits. *Archs. int. Pharmacodyn. Ther.*, 140: 368, 1962.
- DOUGLAS, W.W. Histamina e anti-histamínicos; 5-hidroxi-triptamina e antagonistas. In: Goodman, L.S. & Gilman, A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 4a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. Cap. 29, p. 577.
- DUCKER, T.B. Increased intracranial pressure and pulmonary edema. I: Clinical study of eleven patients. *J. Neurosurg.*, 28: 112, 1968.
- FABER, S. Studies on pulmonary edema. I. The consequences of bilateral cervical vagotomy in the rabbits. *J. exp. Med.*, 66: 397, 1937.
- GRAHAM, P.; KAHLSON, G. & ROSENGREEN, E. Histamine formation in physical exercise, anoxia and under the influence of adrenaline and related substances. *J. Physiol., Lond.* 172: 174, 1964.
- GRAUER, S.E.; PETERSON, B.T.; KUENZING, M.; HYDE, R.W. & SCHWARTZ, S.I. Effects of lung denervation on development of pulmonary edema. *Surgery*, 89(5): 617, 1981.

HÅKANSON, R.; RONNBERG, A.L. & SJOLUND, K. Fluorometric determination of histamine with OPT: Optimum reaction conditions and tests of identify. *Analyt. Biochem.*, 47: 356, 1972.

HARRY, B.C.; GAMBILL, A.F. & EGGERS, G.W.N. Acute pulmonary edema following head injury: two case reports. *Anesth. Analg.*, 56:136, 1977.

HASS, F. & BERGOFISKY, E.H. Role of the mast cell in the pulmonary pressor response to hypoxia. *J. clin. Invest.*, 51: 3154, 1972.

HEITZ, D.C. & BRODY, M.J. Possible mechanism of histamine release during active vasodilatation. *Am. J. Physiol.*, 228: 1351, 1975.

HOFF, J.T.; NISHIMURA, M.; URIA, J.G. & MIRANDA, S. Experimental neurogenic pulmonary edema. *J. Neurosurg.*, 54: 627, 1981.

HOUGE, A. Role of histamine in hypoxic pulmonary hypertension in the rat. I. Blockade or potentiation of endogenous amines, Kinines and ATP. *Circulation Res.*, 22: 371, 1968. "Apud" Owen, D.A.A. Histamine receptor in the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.*, 8: 141, 1977.

JAKUES, R. Lung histamine and susceptibility to pulmonary edema in the rats. *Br. J. exp. Path.*, 35: 209, 1954.

- KAHLSON, G. & ROSENGREEN, E. New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.*, 48(1): 155, 1968.
- KREMZNER, L.T. & WILSON, I.B. A procedure for the determination of histamine. *Biochim. Biophys. Acta*, 50: 364, 1961.
- LAGNEAUX, D.; LECONTE, J. & BODSON, L. The absence of immediate effects of vagotomy on the pulmonary arterial pressure of the anesthetized rat. *Arch. int. Physiol. Biochim.*, 90(4): 265, 1982.
- LEWIS, T. The blood vessels of the human skin and their responses. London, Shaw, 1927. "Apud" Kahlson & Rosengreen. New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.*, 48(1): 155, 1968.
- LOWRI, O.H.; GRAHAM, H.T.; HARRIS, F.B.; PRIEBOT, M. K.; MARKS, A.R. & BREGMAN, R.V. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 112: 116, 1954. "Apud" Shore, P.A.; Burkhalter, A. & Cohn, V.H. A method for the fluorometric assay of histamine in tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127: 182, 1959.
- LUISADA, A.A. Mechanism of neurogenic pulmonary edema. *Am. J. Cardiol.*, 20: 66, 1967.
- LUISADA, A.A. & SARNOFF, S.J. Paroxysmal pulmonary edema: A new experimental method. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 57: 279, 1944.

- MACIEL, R.E. Efeito de drogas, adrenalectomia e canulação da traquéia, no edema pulmonar de ratos vagotomizados e submetidos à exercício. Araçatuba, 1970. Tese (Doutoramento) Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araçatuba.
- Mc INTIRE, F.C. Determination of histamine by chemical means. In: Eichler, O. & Farah, A. eds. *Handbook of Experimental Pharmacology* - New York, Springer-Verlag, 1966, V. 18, pt. 1, p. 57.
- Mc INTIRE, F.C.; WHITE, F.B. & SPROUL, M. The determination histamine with 2,4-dinitrofluorobenzene. *Archs. Biochem.*, 29: 376, 1950.
- MELLO, A. Mecanismo de formação do edema pulmonar em ratos vagotomizados: papel do exercício. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 18 (Suppl), 261, 1965.
- MILLEY, J.R.; NUGENT, S.K. & ROGERS, M.C. Neurogenic pulmonary edema in childhood. *J. Pediat.* 94: 706, 1979.
- MOURA, M.J.C.S. Alteração no conteúdo de histamina do miocárdio de cães em decorrência da oclusão coronariana. Campinas, 1979. 38p. Tese (mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- NATHAN, M.A. & REIS, D.J. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in the rat. *Circulation Res.*, 37: 226, 1975.

- NISAM, M.R.; ZBINDEN, A.; CHESROW, S.; BARNETT, D. & GOLD, W.M. Distribution and pharmacological release of histamine in canine lung in vivo. *J. appl. Physiol.*, 44(3):455, 1978.
- NOAH, J. W. & BRAND, A. Afluorimetric method to determine levels of histamine in human plasma. *J. Allergy*, 32: 1961.
- OKPAKO, D.T. Histamine receptors in guinea-pig lung vessels. *Archs. Pharmacol.*, 279, R35, 1973. "Apud" Owen, D.A.A. Histamine receptors in the Cardiovascular system. *Gen. Pharmac.*, 9: 141, 1977.
- OKPAKO, D.T. A vasopressor action of histamine mediated by H_2 -receptor activation. *Eur. J. Pharmac.*, 29:10, 1974.
- PEREIRA, G.R. Influência de esteróides sexuais sobre o conteúdo histamínico no miocárdio de cães. Campinas, 1981. 77p. Tese (mestrado) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- PROBST, K.; MILLEN, J.E. & GLAUSER, F.L. The effects of endogenous and exogenous histamine on pulmonary alveolar membrane permeability. *A. Rev. resp. Dis.*, 117: 1063, 1978.
- RECH, R. H. The fiber component of the midcervical vagus nerve implicated in vagotomy-induced lung edema. *Exptl. Neurol.*, 14: 475, 1966.

- RECH, R.H. & BORISON, H.L. Vagotomy-induced pulmonary edema in the guinea pig. *Am J. Physiol.*, 202: 499, 1962.
- RECH, R.H.; Mc CARTHY, L.E. & BORISON, H.L. Evidence for a humoral factor in vagotomy induced pulmonary edema. *Am. J. Physiol.*, 203: 151, 1962.
- REDLICK, D. & GLICK, D. Studies in histochemistry LXXVI. Fluorimetric determination of histamine in microgram samples of tissue or microliter volumes of body fluids. *Analyt. Biochem.* 10: 459, 1965.
- RILEY, J.F. & WEST. The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol., Lond.*, 120: 528, 1953.
- ROSENTHAL, S.M. & TABOR, H. An improved colorimetric method for the estimation of histamine. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 92: 425, 1948.
- ROTSCHILD, A.M. & OLIVEIRA ANTONIO, M.P. Adrenaline-stimulated, aspirin-sensitive synthesis of histamine in the rat. *Agent Actions*, 7: 203, 1977.
- RYAN, M.J. & BRODY, M.J. Distribution of histamine in the canine autonomic nervous system. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 174: 123, 1970.

- RYAN, M.J. & BRODY, M.J. Neurogenic and vascular stores of histamine in the dog. *J. Pharma. exp. Ther.*, 181: 83: 1972.
- SARNOFF, S. & SARNOFF, L.C. Neurohemodynamics of pulmonary edema. II. The role of sympathetic pathways in the elevation on pulmonary and systemic vascular pressures following intracisternal injection of fibrin. *Circulation*, 6: 51, 1952.
- SAWICKI, E.; SAWICKI, C.R.; GOLDEN, C.C. & KOBER, . Fluorometric and colorimetric methods of analysis for histamine. *Microchem. J.*, 15: 25, 1970.
- SCHAYER, R.W. Biogenesis of histamine. *J. Biol. Chem.*, 199: 245, 1952. *Life Science*, 15: 391, 1974.
- SCHAYER, R.W. Relationship of stress-induced histidine decarboxylase to circulatory homeostasis and shock. *Science*, 131: 226, 1959.
- SCHAYER, R.W. & GANLEY, O.H. Adaptive increase in mammalian histidine decarboxylase activity in response to nonspecific stress. *Am. J. Physiol.*, 197: 721, 1959.
- SCHAYER, R.W. Relationship of induced histidine decarboxylase activity and histamine synthesis to shock from stress and from endotoxin. *Am. J. Physiol.*, 168 (6) : 1187, 1960.

- SCHAYER, R.W. Evidence that induced histamine is an intrinsic regulation of the microcirculatory system. *Am. J. Physiol.*, 202: 66, 1962. "Apud" Schayer, R.W. Histamine and microcirculation. *Life Science*, 15: 391, 1974.
- SCHAYER, R.W. Histamine and microcirculation. *Life Sci.*, 15: 391, 1974.
- SCHIMITT, G.H. & KING, O.Y. Effects of bilateral cervical vagotomy in primates. *Archs. Surg.*, 100: 706, 1970.
- SCHIMITT, G.H. & MEYERS, F.H. Characterization of the acute pulmonary edema that follows vagal section on the guinea pig. *Am. J. Physiol.*, 190: 89, 1957.
- SHORE, P.A.; BURKHALTER, A. & COHN, V.H. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 127: 182, 1959.
- SIMMONS, R.L.; MARTIN, A.M.; HEISTERKAMP, C.A. & DUCKER, T. B. Respiratory insufficiency in combat casualties: II. Pulmonary edema following head injury. *Ann. Surg.*, 170 (1): 39, 1969.
- SIMON, R.P. The mechanisms of neurogenic pulmonary edema : pathophysiologic events at the pulmonary capillary. *Neurology*, 30 (4): 440, 1980.

- STAUB, N.C. "State of the art" Review. Pathogenesis of pulmonary edema. *Am. Rev. resp. Dis.*, 109: 358, 1974.
- TUCKER, A.; WIER, E.K.; RUVES, J.T. & GROVER, R.F. Failure of histamine antagonists to prevent hypoxic pulmonary vasoconstriction in dog. *J. Appl. Physiol.*, 40: 496, 1976.
- URIA, G.J.; HOFF, J.T.; MIRANDA, S. & NISHIMURA, M. Experimental neurogenic pulmonary edema. Part 2: The role of cardiopulmonary pressure change. *J. Neurosurg.*, 54: 632, 1981.
- VIEUSSENS, R. *Neurographia Universalis, Liber III: De nervis*, p. 185ff, 1716. "Apud" Visscher, M.B.; Haddy, F.J. & Stephens, G. The physiology and pharmacology of lung edema. *Pharmacol. Rev.*, 8: 389, 1956.
- VISSCHER, M.B.; HADDY, F.J. & STEPHENS, G. The physiology and pharmacology of lung edema. *Pharmacol. Rev.*, 8: 389, 1956.
- VOELKEL, N.F.; NEWMAN, J.H.; AROYAVE, C.M. & REEVES, J.T. Factors influencing lung histamine content. *Agent Actions*, 11: 204, 1981.
- VUGMAN, I. & ROCHA e SILVA, M. Biological determination of histamine in living tissue and body fluids. In: EICHLE, O. & FARAH, A., eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York, Springer-Verlag, 1966. v. 18, pt 1, p. 81.

"
WERLE, E. Über die Bildung von Histamin aus Histidin durch
tierisches gewebe. *Biochem. Z.*, 288: 292, 1936. "Apud"
Kahlson, G. & Rosengreen, E. New approaches to the phy-
siology of histamine. *Physiol. Rev.*, 48(1): 155, 1968.

WIBERG, T. Development of pulmonary edema after cervical
vagotomy in guinea pig and rat. *Microvas. Res.*, 17: 214,
1979.