

Impl. 8.10.92

MARIA JOSÉ COSTA SAMPAIO MOURA *net*

ALTERAÇÃO NO CONTEÚDO DE HISTAMINA DO MIOCÁRDIO DE CÃES EM
DECORRÊNCIA DA OCLUSÃO CORONARIANA.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Esta-
dual de Campinas, para a obten-
ção do título de MESTRE em Biolo-
gia na área de Fisiologia e Bio-
física.

CAMPINÁS - SÃO PAULO
1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICO

à memória de

LAURO, meu pai

JOSÉ EDUARDO, colega e amigo.

AGRADEÇO

pela orientação

Professor Doutor RUI ERRERIAS MACIEL

pelos ensinamentos

Professor Doutor CARLOS EDUARDO NEGREIROS DE
PAIVA

Professor Doutor ERNESTO JOSÉ DOTTAVIANO

Demais Professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica

Professor Doutor CARLOS EDUARDO PINHEIRO do
Departamento de Bioquímica da Faculdade de
Odontologia de Bauru

pela colaboração

MARIA IZABEL FAEZ

MARIA ELIDIA DOS SANTOS

JOSÉ RIBEIRO

e a todos que de alguma forma contribuíram para a
realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Pag.
INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO	20
1. Método	20
2. Etapas Experimentais	23
RESUMO E CONCLUSÕES	27
BIBLIOGRAFIA	28

INTRODUÇÃO

A histamina é uma amina biogênica, isolada por BARGER & DALE em 1910. Desde então ela tem sido objeto de muitos estudos com o intuito de se delinear a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos.

Assim, DALE & LAIDLAW (1910, 1911) observaram que os efeitos da administração de histamina em animais, eram muito semelhantes àqueles eventos que ocorriam no choque anafilático. Diante disso, passou-se a atribuir a este "hormônio dos tecidos" os fenômenos anafiláticos e alérgicos.

Embora LEWIS (1927) tenha reconhecido o papel da histamina no controle fisiológico da microcirculação, permaneceu a idéia de que ela não poderia desempenhar esse papel, pela deficiência de conhecimentos sobre o seu metabolismo e de métodos analíticos para avaliá-la,

juntamente com a falha dos anti-histamínicos em bloquear os seus efeitos.

Dessa forma, até a metade deste século a histamina ficou restrita à esfera da patologia desenvolvendo-se neste período uma "teoria histamínica" para explicar os fenômenos acima mencionados, afirmando-se inclusive que sua liberação ocorria somente quando as células eram lesadas (BURN, 1950).

Apesar da verificação da existência de uma síntese contínua de histamina por parte dos tecidos sob uma forma livre e farmacologicamente ativa por SCHAYER (1952), foi dada maior importância à descoberta de presença de histamina nos mastócitos (RILEY & WEST, 1953). Tornou-se assim, bem conhecida que a histamina ligada aos mastócitos na forma inativa, quando liberada, exerce potentes efeitos farmacológicos nos músculos lisos vascular e bronquiolar e em alguns outros tecidos produz efeitos danosos, causando inclusive morte celular.

Entretanto, SCHAYER (1962), continuando suas pesquisas, mostrou que a histamina livre era sintetizada, a uma taxa determinada pelas necessidades homeostáticas, por uma forma induzível de histamina descarboxilase associada anatomicamente com a microcirculação, dentro ou nas proximidades das células musculares lisas e endoteliais.

Mais tarde SCHAYER (1970-1974), mostrou uma teoria sobre o envolvimento da histamina na regulação micro -

circulatória, considerando apenas seus efeitos diretos sobre os pequenos vasos, independente dos grandes vasos e do controle nervoso, uma vez que a ativação da histamina não era prevenida pela adrenalectomia, tireoidectomia, secção espinal ou pela administração de substâncias simpático e parassimpaticolíticas. Assim, algumas das moléculas de histamina formadas, permanecem livres no citoplasma, para estimular, quando necessário, receptores intrínsecos, causando vasodilatação, enquanto outras alcançam o lúmen do vaso, sendo arrastada pela corrente sanguínea ou se acumulando no seu interior quando o fluxo estiver bloqueado.

Paralelamente, tem sido bem documentada a mediação da histamina na vasodilatação reflexa ativa por BECK (1965), RYAN & BRODY (1970). Esses últimos autores, estudando o "uptake" da histamina marcada com trítio (H^3) e a distribuição da histamina endógena nos nervos autônomos, sugeriram que a histamina era estocada e liberada de fibras histaminérgicas simpáticas durante a vasodilatação reflexa.

Posteriormente, RYAN & BRODY (1972) apresentaram evidências de que a histamina como mediadora da vasodilatação reflexa ativa, era liberada de um sítio de estocagem não neurogênico, contrariando, portanto, o conceito anterior sobre a existência de uma fibra histaminérgica pura. Dessa forma, a liberação da histamina dessa área, po-

deria ser controlada por descargas de norepinefrina dos terminais adrenérgicos, embora não tenha sido definido se este sítio era o clássico mastócito, uma subespécie de mastócito, ou mesmo uma outra célula armazenadora de histamina (HEITZ & BRODY, 1975).

O trabalho de HEITZ & BRODY (1975), confirma os resultados obtidos por RYAN & BRODY (1972), considerando uma sítio extra-neural de estocagem e liberação de histamina. Os autores sugerem que a liberação da histamina de seus sítios de estocagem é mediada por um mecanismo receptor e que esta liberação deve estar sob controle de fibras adrenérgicas distintas sem uma função vasoconstritora específica.

Além dos estudos sobre o envolvimento da histamina na microcirculação, muitas pesquisas tem sido feitas sobre o papel fisiológico da histamina em outras áreas como sistema nervoso (GREEN, 1964; WHITE, 1964; WOODRUFF, ONIWINDE & KERKUT, 1969), secreção gástrica (SHORE, 1965; KAHLSON et alii 1963, 1964; HAVERBACK, STUBRIN & DYCE, 1965; CODE, 1965; LEVINE, 1965; FISHER & SNYDER, 1965) e regulação da função e crescimento tecidual (UNGAR, 1965; KAHLSON & ROSENGREN, 1968).

BURN & RAND (1958), trabalhando com á-

trios isolados de coelhos, pré-tratados com reserpina, observaram que não havia alteração nas respostas dessas estruturas quanto aos efeitos da histamina, o mesmo ocorrendo com MANNAIONI (1960) que associou reserpina e ganglioplégicos, observando que os átrios isolados de cobaia também não sofriam qualquer interferência.

Nessa mesma época TRENDELEMBURG (1960) chegou a resultados semelhantes, trabalhando com átrios isolados de gato, coelho e cobaia, pois verificou que a resposta muscular à histamina não era afetada por drogas ganglioplégicas, simpaticolíticas e neurodepressoras.

BARTLET (1963), mostrou que a noradrenalina e a histamina aumentavam a contratilidade cardíaca em cobaia, e que o uso de agente bloqueador β -adrenérgico como o pronetalol antagonizava o efeito inotrópico positivo da noradrenalina, mas não o da histamina. Observou ainda que em rato e galinha, os efeitos cardíacos dessas duas aminas, eram opostos, ou seja: a primeira aumentava a contratilidade enquanto que a segunda diminuía.

FLACKE et alii (1967), observaram que os efeitos da histamina sobre o coração de cão não eram afetados pela depleção de catecolaminas por reserpina e nem por propranolol. Esses autores observaram ainda que a histamina causava um grande aumento no fluxo coronário e que esse era bem maior do que o esperado pelo aumento da frequência e força de contração do miocárdio.

O fato destes trabalhos levarem à conclusão de que o efeito da histamina no coração era devido a sua ação sobre receptores específicos do músculo cardíaco, não envolvendo mediação por parte de catecolaminas e seus respectivos receptores, induziu à realização de muitas pesquisas com o intuito de definir estes receptores. Assim, os efeitos cronotrópico e inotrópico positivos, em preparação de coração isolado de cobaia, não foram inibidos pelos anti-histamínicos clássicos tripelinamina e pirilamina (TRENDELEMBURG, 1960) e mepiramina, piratiazina e difenidramina como mostrou BARTLET (1963).

FLACKE et alii (1967), mostraram que os efeitos da histamina na frequência e contratilidade cardíaca, em preparação coração-pulmão de cão, não foram inibidos pelos anti-histamínicos típicos prometazina e difenidramina, mas estas drogas bloquearam completamente o efeito dromotrópico negativo.

ASH & SHILD (1966), definiram um tipo de receptor envolvido nas ações da histamina, que era bloqueado por baixas concentrações de anti-histamínicos clássicos, e o chamaram de receptor- H_1 . Esse receptor ocorreria em íleo de cobaia e brônquios. (ARUNLAKSHANA & SHILD, 1959).

Adiciona-se a estes trabalhos, o de MANNAIONI et alii (1968) que mostrou serem os efeitos da histamina e norepinefrina sobre a atividade automática do átrio direito e fibras de Purkinje da cobaia, consequências da interação destas aminas com receptores específicos.

Os receptores não sensíveis aos anti-histamínicos típicos foram definidos como receptores - H_2 por BLACK et alii (1972) com a síntese das drogas tais como a burimamida (BLACK et alii, 1972) e a metiamida (BLACK et alii, 1973), que mostraram ser antagonistas desses receptores.

PÖCH, KUKOVETZ & SCHOLZ (1973), trabalhando com coração isolado de cobaia, obtiveram resultados com a hipótese de que a histamina exercia seus efeitos cardíacos por estimulação de um receptor (H_2) que poderia ser claramente distinguido do receptor adrenérgico (β_1). Observaram ainda que o estreito paralelismo entre as variações na amplitude contrátil e no AMP cíclico, produzidas pela histamina na ausência e na presença de burimamida estaria de acordo com o conceito de que o AMP cíclico é o mediador da resposta mecânica do coração à histamina.

ERCAN et alii (1974), observaram em cobaia, que a metiamida inibiu competitivamente os efeitos induzidos pela histamina, tais como aumento na força contrátil e frequência cardíaca e uma diminuição na pressão coronária

de perfusão, concluindo que estes efeitos da histamina eram mediados por receptores- H_2 .

LEDDA et alii (1974) também mostraram que a histamina agia em receptores - H_2 e ainda que a histamina - era mais efetiva que a noradrenalina na produção de uma ação inotrópica positiva, fato também observado por MORONI et alii (1974). Estes últimos, mostraram além disso que a burimamida e a metiamida antagonizavam competitivamente a ação inotrópica positiva da histamina, não modificando contudo, o efeito da noradrenalina.

LEVI & KUYE (1974) mostraram, em cobaia, que os anti-histamínicos difenidramina, tripelenamina, clorfeniramina, ciclizina e prometazina, não inibiam os efeitos da histamina sobre o cronotropismo e inotropismo cardíaco, mas inibiam o efeito dromotrópico. Além disso, mostraram que a clorfeniramina e a difenidramina antagonizaram o efeito dilatador coronário da histamina. Pelos resultados obtidos, os autores afirmaram que os receptores- H_1 ocorriam no nodo átrio-ventricular e vasos coronários enquanto que os receptores- H_2 estavam localizados no nodo sino-atrial e nas fibras ventriculares.

Posteriormente, LEVI, ALLAN & ZAVECZ (1976), corroboraram o trabalho anterior afirmando que os receptores - H_1 mediavam o efeito dromotrópico negativo e possivelmente o efeito inotrópico positivo, no átrio, enquanto que

os receptores - H_2 , mediavam o efeito cronotrópico e inotrópico positivos, no ventrículo. Segundo eles a intensificação da automaticidade, provavelmente envolvia receptores - H_2 no átrio e no ventrículo. Acrescentaram ainda que os receptores mediadores da dilatação coronariana não foram definidos e, hipotetizaram, à semelhança de BLACK et alii (1972), que neste evento provavelmente estivessem envolvidos ambos os receptores.

No desenvolvimento desse trabalho, é nossa intenção estudar parâmetros relacionados com a mobilização de histamina no miocárdio, visando quantificar possíveis alterações no seu conteúdo, frente a uma falência circulatória regional, devido a uma isquemia produzida por oclusão coronariana.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização desse trabalho foram utilizados 14 cães, sem raça definida, com pesos compreendidos entre 6 e 23 quilogramas, que foram distribuídos em 2 grupos de acordo com o sexo.

Esses animais foram anestesiados por via endovenosa com pentobarbital sódico*, na dose de 30 mg/Kg de peso corporal, traqueotomizados e mantidos sob respiração artificial com pressão positiva intermitente, por meio de um respirador TAKAOKA, durante todo o experimento.

A seguir fez-se a toracotomia mediana e a exposição do coração para se efetuar a ligadura do ramo

* Nembutal, ABBOTT

desdendente da artéria coronária esquerda. Após 50 minutos do bloqueio circulatório, foram retiradas duas amostras de 1 grama de miocárdio, sendo uma da área cianótica e outra da região irrigada pela artéria obstruída, com a finalidade de verificar seus conteúdos de histamina, por meio de análise fluorimétrica.

Empregou-se o método de SHORE, BURKHALTER & COHN (1959), para o ensaio fluorimétrico, com algumas modificações sugeridas por NOAH & BRAND (1961), REDLICK & GLICK (1965), ANTON & SAYRE (1968) e HAKANSON, RÖNNBERG & SJÖLUND (1972) com o intuito de se obter um aumento da sensibilidade e especificidade.

O método consiste em dois passos fundamentais: a extração da histamina dos tecidos e análise fluorimétrica com oftalaldeído (OPT)**.

Para se extrair a histamina do tecido, este é homogeneizado em 9 volumes de ácido perclórico 0,4N e centrifugado. A 4 ml de fluido sobrenadante é adicionado 0,5 ml de hidróxido de sódio 5N, 1 g de cloreto de sódio e 10 ml de n-butanol. A mistura é agitada por 10 minutos e a histamina é extraída pelo butanol, que passa a seguir por uma lavagem com 5 ml de solução de hidróxido de

** o-Phtalic - dicarboxaldeyde, ALDRICH

sódio 0,1 N, saturada de cloreto de sódio, a fim de remover quantidades residuais de histidina. Adiciona-se a 8 ml do butanol, 15 ml de n-heptano e 3 ml de ácido clorídrico 0,1 N e institui-se outro período de 3 minutos de agitação para que a histamina passe da fase orgânica para a fase ácida.

A seguir procede-se ao ensaio fluorimétrico, onde amostras de extrato ácido são tornadas fortemente alcalinas pelo acréscimo de 0,4 ml de hidróxido de sódio 1 N, uma vez que a reação da histamina com o OPT ocorre somente nestas condições. Uma vez alcalinizado o extrato, adiciona-se 0,1 ml de OPT que reage prontamente com a histamina formando um produto que emite fluorescência a 450m μ quando ativado a 360m μ . A reação do OPT com a histamina é bloqueada exatamente após 4 min. com a adição de 0,2 ml de ácido cítrico 2 M. Conforme sugerido por NOAH & BRAND (1961) e REDLICK & CLICK (1965), o OPT foi diluído a 0,1% em metanol absoluto, a fim de se diminuir a leitura do branco.

Uma curva padrão foi preparada com concentrações conhecidas de histamina* que chamamos de padrões externos.

A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração de histamina e o gráfico obtido se apresenta como na Fig. 1:

* Histamine dehydrochloride, SIGMA.

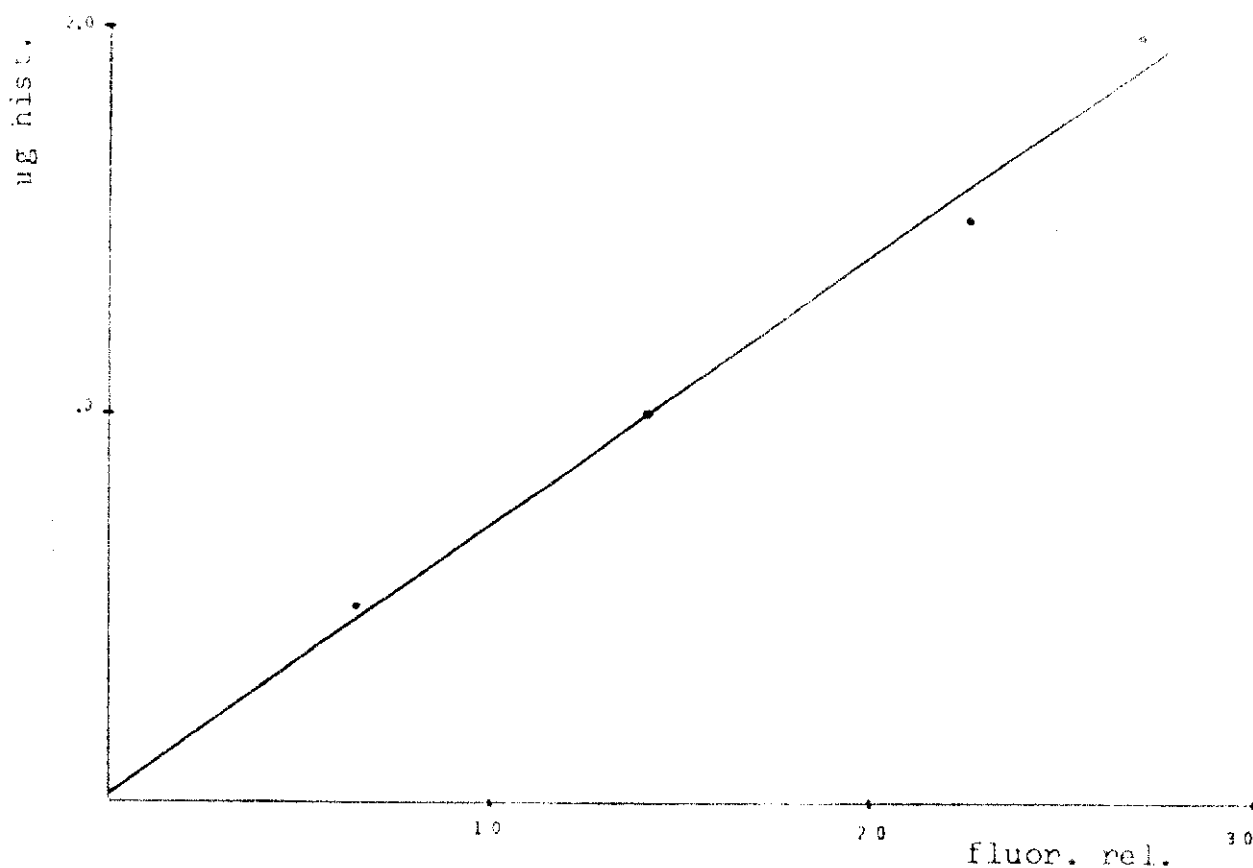


Fig. 1 - Curva padrão. Intensidade de fluorescência relativa x concentração de histamina em μg .

Para se obter uma leitura corrigida de fluorescência deve-se subtrair a fluorescência do branco. Assim:

$$\underline{f \text{ corr.} = f_{\text{obs.}} - f_b}, \text{ onde:}$$

$f \text{ corr.}$ = intensidade de fluorescência corrigida

$f \text{ obs.}$ = intensidade de fluorescência observada

f_b = intensidade de fluorescência do branco

Para se determinar a recuperação da histamina pelo método de extração, preparou-se padrões adicionando-se a quantidades conhecidas de histamina, ácido perclórico 0,4N e procedendo-se da mesma forma que para o extrato tecidual. Estas amostras foram chamadas de padrões de extração, que eram comparados com os padrões externos.

Os valores de fluorescência obtidos pela leitura das amostras de extratos teciduais, num espectrofotofluorômetro*, eram lidos diretamente na curva de calibração. Tendo-se a porcentagem de recuperação pelo método, podia-se calcular o conteúdo corrigido do tecido analisado.

Aos valores obtidos através das amostras de tecido normal e de tecido isquêmico foi aplicado o teste estatístico "t" de "Student" estabelecendo-se os níveis de significância $p < 0,05$ e calculou-se o intervalo de confiança para as médias reais.

* 4-8202 Spectrophotofluorometer AMINCO-BOWMAN

RESULTADOS

As concentrações de histamina das amostras normais e enfartadas estão representadas na Tabela I.

Nota-se que nas amostras enfartadas de todos os animais houve uma diminuição do conteúdo histamínico e o valor médio obtido para a concentração histamínica no miocârdio normal foi de $3,92 \pm 0,77$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, enquanto que o valor médio do tecido enfartado foi de $3,24 \pm 0,65$ $\mu\text{g/g}$ de tecido.

A Tabela II mostra as concentrações para os cães machos, enquanto que a Tabela III o faz para os cães fêmeas. Nota-se que as variações são maiores nos cães fêmeas.

Na Fig. 2 estão representadas as médias das concentrações histamínicas medidas em cães normais e enfartados de ambos os sexos.

TABELA I - Conteúdo histamínico expresso em $\mu\text{g/g}$ de tecido, de cães machos e fêmeas.

Cão	Sexo	P	N	I
1	masc.	9,0	2,64	2,43
2	fem.	8,0	4,30	2,96
3	fem.	9,5	4,04	3,34
4	fem.	14,0	3,14	2,90
5	masc.	8,0	5,08	4,49
6	fem.	23,0	2,82	2,48
7	fem.	10,0	4,40	2,75
8	masc.	15,0	4,50	4,30
9	masc.	8,5	3,90	3,08
10	masc.	18,0	3,84	3,50
11	masc.	13,0	3,95	3,78
12	fem.	6,0	4,88	3,80
13	fem.	7,5	4,42	2,80
14	masc.	6,0	2,90	2,78
$\bar{X}$			3,92	3,24
σ			0,74	
t			2,44	
p			$0,05 > p > 0,01$	

P - peso corporal em Kg

N - amostra de miocárdio normal

I - amostra de miocárdio isquêmico

$\bar{X}$ - médias

σ - desvio padrão

t - intervalo de confiança

p - probabilidade

TABELA II - Conteúdo histamínico expresso em $\mu\text{g/g}$ de tecido, de cães machos.

Cão	P	N	I
14	6,0	2,90	2,78
5	8,0	5,08	4,49
9	8,5	3,90	3,08
1	9,0	2,64	2,43
11	13,0	3,95	3,78
8	16,0	4,50	4,30
10	18,0	3,84	3,50
$\bar{X}$		3,83	3,48
σ		0,87	
t		0,75	
p		$0,25 > p > 0,05$	

P - peso corporal em Kg

N - amostra de miocárdio normal

I - amostra de miocárdio isquêmico

$\bar{X}$ - média

σ - desvio padrão

t - intervalo de confiança

p - probabilidade

TABELA III - Conteúdo histamínico expresso em $\mu\text{g/g}$ de tecido de cães fêmeas.

Cão	P	N	I
12	6,0	4,88	3,80
13	7,5	4,42	2,80
2	8,0	4,30	2,96
3	9,5	4,04	3,34
7	10,0	4,40	2,75
4	14,0	3,14	2,90
6	23,0	2,82	2,48
$\bar{X}$		4,00	3,00
σ		0,66	
t		2,82	
p		$0,005 < p < 0,05$	

P - peso corporal em Kg

N - amostra de tecido normal

I - amostra de tecido isquêmico

$\bar{X}$ - médias

σ - desvio padrão

t - intervalo de confiança

p - probabilidade



Fig. 2 - Representação das médias das concentrações histamínicas medidas em cães normais e enfartados de ambos os sexos.

DISCUSSÃO

1. MÉTODO

Diversas técnicas tem sido empregadas para a estimação da histamina tecidual. Elas se baseavam na atividade biológica da histamina em órgãos isolados tais como íleo de cobaia (BARSOUM & GADDUM, 1935; McINTIRE, 1966 ; VUGMAN & ROCHA e SILVA, 1966), ou ensaio colorimétrico seguindo tratamento da histamina com sal diazônio (ROSENTHAL & TABOR, 1948; SAWICKI et alii, 1970) ou dinitrofluorobenzeno (McINTIRE, WHITE & SPROULL, 1950; LOWRY et alii, 1954) e finalmente, o método fluorimétrico (SHORE, BURKALTER & COHN, 1959).

Em virtude do método fluorimétrico, originalmente descrito por SHORE, BURKALTER & COHN (1959), ter sido objeto de muitos estudos por parte dos pesquisadores, aperfeiçoando-o com a finalidade de aumentar a sensibilidade.

de e especificidade, somado ao fato de ser uma técnica química simples precisa e sensível para a determinação da histamina tecidual, levou-nos a optar pela sua utilização neste trabalho.

Assim, NOAH & BRAND (1961), introduziram a utilização de OPT a 0,1% em metanol em vez de 1% como no método original, e os efeitos dessa mudança foram estudados por REDLICK & GLICK(1965), que afirmaram ser esta modificação responsável por um ganho na reprodutibilidade e estabilidade da fluorescência no ensaio.

Por outro lado, KREMZNER & WILSON (1961), conseguiram aumentar a sensibilidade do método, pois constataram que a intensidade de fluorescência aumentava rapidamente com um pH em torno de 2 e então permanecia constante até um pH 4 modificando, portanto, o método original que preconizava estabilizar o fluoroforo por meio de uma acidificação da solução a um pH de aproximadamente 0,8.

Posteriormente, HAKANSON, RÖNNBERG & SJÖLUND (1972) verificaram que o pH alcalino ótimo, no qual a condensação da histamina com OPT ocorre, é em torno de 12,7 e que a faixa de variação do pH para a estabilização da fluorescência dependia do ácido usado, uma vez que a utilização do ácido cítrico, a uma intensidade de fluorescência ótima era conseguida com pH entre 2 e 3,5 e com ácido sulfúrico, num pH entre 2 e 7.

Frente as sugestões de ANTON & SAYRE (1968). sobre o uso do ácido cítrico 2M, uma vez que verificaram que a intensidade de fluorescência era estável mesmo com uma variação no volume do ácido utilizado na reação de condensação; de KREMZNER & WILSON (1961), para o uso de ácido fosfórico, por sua grande capacidade tamponante, e de HAKANSON, RÖNNBERG & SJÖLUND (1972) sugerindo o uso de ácido cítrico ou sulfúrico, optamos pela utilização do ácido cítrico.

A preparação do branco também é muito importante. No procedimento original usou-se o branco reverso, no qual o OPT somente era adicionado após a acidificação final. Entretanto, hoje sabe-se da existência de materiais - que reagem com o OPT em solução alcalina, formando fluorescência não específica, mas que não o fazem em solução ácida. Então o branco reverso daria uma leitura baixa de fluorescência não específica, levando à estimação de valores - falsos para a quantificação da histamina (ATAACK, 1977). Este fato levou-nos a usar um reagente branco no qual o extrato tecidual era substituído por ácido perclórico 0,4N (livre de histamina), seguindo-se o procedimento normal, preconizado por SHORE, BURKHALTER & COHN (1959).

A introdução destas modificações no método original parece ter proporcionado as condições ótimas para a execução do ensaio fluorimétrico no desenvolvimento deste trabalho, pois o conteúdo histamínico do tecido normal está

em estreita concordância com o valor obtido por outros pesquisadores (ANTON & SAYRE, 1968 e RYAN & BRODY, 1970).

2. ETAPAS EXPERIMENTAIS

A razão de termos escolhido o tecido miocárdico ventricular para verificação do conteúdo histamínico, deve-se à importância de uma isquemia no coração. Através de manobras experimentais, produzimos isquemia em porções limitadas do referido tecido e pudemos assim, obter amostras de tecido isquêmico e tecido normal de um mesmo animal. Procedendo simultaneamente os ensaios com ambas as amostras de tecidos, eliminamos ou pelo menos diminuimos a probabilidade de desvios relacionados com agentes como temperatura, umidade, etc. Também fizemos várias curvas de calibração durante o transcorrer do experimento, o que permitiu controlar variações no espectrofotofluorômetro.

Os resultados obtidos e expressos na Tabela I mostram que há uma diferença significativa ($0,05 > p > 0,01$) nos conteúdos histamínicos de tecido normal e isquêmico.

Contudo, quando fizemos o agrupamento dos animais por sexo, como está representado nas Tabelas II e III, notamos o seguinte:

1º) a variação no conteúdo histamínico do miocárdio de cães machos, apesar de ser maior que 1 para relação histamina normal/histamina isquêmico, não é estatisticamente significativa ($0,25 > p > 0,05$).

2º) a variação do conteúdo histamínico no miocárdio das fêmeas é altamente significativa ($0,01 < P < 0,005$).

A observação de que o conteúdo histamínico en contra-se diminuído na amostra de tecido isquêmico, nos per mite inferir que talvez esse autacóide estivesse sendo utilizado numa tentativa de restauração da normalidade tecidu al , através de seus conhecidos efeitos, como aumento do fluxo coronário (FLACK et alii, 1967; LEVI & KUYE, 1974).

Para apoiar tal hipótese, vamos nos referir aos trabalhos de ANREP, BARSOUM & TALAAT, (1936) que relataram um aumento na capacidade de formação da histamina imposto pela anóxia, e ao trabalho de GRAHAM, KALSON & ROSENGREN, que propuseram em 1964, um mecanismo de "feed-back" para a rela ção histamina estocada/capacidade de formação de histamina. Ora, então um aumento na capacidade de formação, é uma indi cação de que o estoque histamínico está sendo diminuído e subsequentemente, usado.

No nosso caso, a histamina estaria sendo consumida a uma taxa tão elevada que o resultado líquido final seria uma medida baixa de sua concentração.

Por outro lado, o fato de que a variação do conteúdo histamínico em condições de isquemia é estatística mente significativa para as fêmeas, mas não o é para os machos, induz à suposição de que talvez exista algum relacionamento entre os propostos mecanismos de utilização da his

tamina e o nível de hormônios sexuais circulantes.

De fato, PHILLIPS (1977), observou que as concentrações séricas médias de estradiol e estrona estavam aumentadas em homens jovens com enfarte miocárdico, enquanto que os níveis de testosterona e diidrotestosterona, estavam normais. Este resultado somado ao de que a administração de estrogênio a homens e mulheres, aumentava a incidência de enfartes no miocárdio, como mostraram MANN et alii em 1976, induziu a suposição de que uma concentração estrogênica alta predispõe a um enfarte miocárdico. Outros hormônios como a progesterona, tem sua concentração sérica diminuída em homens e em mulheres menopausadas com relação aos seus níveis em mulheres antes da menopausa (ABRAHAM, HOPPER & TULCHINSKY, 1971; ABRAHAM & MAROULIS, 1975) e pode se apontada como possível fator na proteção destas últimas em contraposição aos citados efeitos de altas concentrações estrogênicas na produção de enfarte miocárdico (PHILLIPS, 1978). Além disso, HSUEH, PECK & CLARK em 1976, mostraram que a progesterona tem efeitos anti-estrogênicos, consequentemente, quando os níveis plasmáticos de progesterona caírem, o organismo estará mais susceptível à ação dos estrógenos. Logo os homens e mulheres menopausadas devem ser mais vulneráveis à ação estrogênica do que as mulheres antes da menopausa.

Por outro lado, SZEKO em 1965, trabalhando

com ratas, observou que a concentração histamínica uterina está sob controle estrogênico.

Baseados nos dados acima, poderíamos sugerir alguma forma de correlação entre a histamina existente no miocárdio, os níveis séricos de hormônios sexuais circulantes e a eventual proteção aos enfartes miocárdicos. Porém, os resultados obtidos nesse trabalho são insuficientes para tais conclusões, ficando, portanto, em aberto para futuras investigações.

RESUMO E CONCLUSÕES

Utilizando-se cães sem raça definida, de ambos os sexos, estudou-se a variação nos níveis histamínicos do miocárdio, após o estabelecimento de isquemia, produzida por oclusão do ramo descendente da artéria coronária esquerda. Após a produção de isquemia, retiraram-se amostras de tecido normal e isquêmico, das quais se extraiu a histamina para posterior análise fluorimétrica através do método de SHORE, BURKHALTER & COHN (1959), modificado.

Chegou-se às seguintes conclusões:

- nas fêmeas o conteúdo histamínico do tecido isquêmico estava diminuído em relação ao tecido normal;
- nos machos não houve variação significativa no conteúdo histamínico dos tecidos isquêmico e normal.

BIBLIOGRAFIA

01. ABRAHAM, G.E.; K. HOPPER, D. TULCHINSKY. Simultaneous measurement of plasma progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β radioimmunoassay. Anal. Letters, 4: 325, 1971.
02. ABRAHAM, G.E. & G.B. MAROULIS. Effect of exogenous estrogen on serum pregnenolone, cortisol, and androgens in post menopausal women. Obstet. Gynecol. , 45: 271, 1975.
03. ANREP, G.V., G.S. BARSOUM & M. TALAAT. Liberation of histamine by the heart muscle. J. Physiol., (London), 86: 431, 1936.
04. ANTON, A.H. & D.F. SAYRE. A modified fluorimetric pro

cedure for tissue histamine and its distribution in various animals. J. Pharmacol. Exp. Ther., 166(2): 285, 1968.

05. ARUNLAKSHANA, O. & H.O. SCHILD. Some quantitative uses of drug antagonists. Brit. J. Pharmacol. Chemoter., 14: 48, 1959.
06. ASH, A.S.F. & O. SCHILD. Receptors mediating some actions of histamine. Brit. J. Pharmacol. Chemoter., 27: 427, 1966.
07. ATTACK, C. Measurement of biogenic amines using cation exchange chromatography and fluorimetric assay. Acta Physiol. Scand., Suppl. 451, sec. C: 28, 1977.
08. BARGER, G. & H.H. DALE. Trans. Chem. Soc. 97: 2592 , 1910. "Apud" Rocha e Silva, 1969.
09. BARSOU, G.S. & J.H. GADDUM. The pharmacological estimation of adenosine and histamine in blood. J. Physiol. (London), 85: 1, 1935. "Apud" Shore, 1959.
10. BARTLET, A.L. The action of histamine on the isolated heart. Brit. J. Pharmacol., 21: 450, 1963.
11. BECK, L. Histamine as the potential mediator of active

reflex dilatation. Fed. Proc., 24: 1298, 1965.

12. BLACK, J.W., W.A.M. DUNCAN, C.J. DURANT, C.R. GANELLIN & E.M. PARSONS. Definition and antagonism of histamine H_2 -receptors. Nature (London), 236: 385 , 1972.
13. BLACK, J.W., W.A.M. DUNCAN, J.L. EMMETT, C.R. GANELLIN T. HESSELBO, M.E. PARSONS & J.H. WYLLIE. Metiamide: an orally active histamine H_2 -receptor antagonist . Agents and Actions., 3: 133, 1973.
14. BURN, J.H. A discussion on the action of local hormones. Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 137: 281 , 1950, "Apud" Kahlson, 1968.
15. BURN, J.H. & M.J. RAND. Action of nicotine on the heart. Brit. Med. J., 1: 137, 1958.
16. CODE, F.C. Histamine and gastric secretion: a later look, 1955-1965. Fed. Proc., 24: 1311, 1965.
17. DALE, H.H. & P.P. LAIDLAW. The physiological action of β -iminazolyethylamine. J. Physiol. (London) , 41: 318, 1910-1911, "Apud" Rocha e Silva, 1969.
18. ERCAN, Z.S., T.A. BÖKESÖY & R.K. TÜRKER. A study of the histamine H_2 -receptors in heart muscle and coro

- nary vessels. Eur. J. Pharmacol., 27: 259, 1974.
19. FISCHER, J.E. & S.H. SNYDER. Increased gastric synthesis of histamine: a possible mechanism for the gastric and hypersecretion following portacaval shunt. Fed. Proc., 24: 1334, 1965.
20. FLACKE, W., D. ATANACKOVIC, R.A. GILLIS & M. H. ALPER. The actions of histamine on the mammalian heart. J. Pharmacol. Exp. Ther., 155: 217, 1967.
21. GRAHAM, P., G. KAHLSON & E. ROSENGREEN. Histamine formation in physical exercise, anoxia and under the influence of adrenaline and related substances. J. Physiol. (London), 172: 174, 1964.
22. GREEN, J.P. Histamine and the nervous system. Fed. Proc., 23: 1095, 1964.
23. HAKANSON, R., A.L. RÖNNBERG & K. SJÖLUND. Fluorimetric determination of histamine with OPT: optimum reaction conditions and tests of identity. Anal. Biochem., 47: 356, 1972.
24. HAVERBACK, B.J., M.I. STUBRIN & B.J. DYCE. Relationship of histamine to gastrin and other secretago --

- gues. Fed. Proc., 24: 1326 1965.
25. HEITZ, D.C. & M.J. BRODY. Possible mechanis, of histamine release during active vasodilatation. Am. J. Physiol., 228(5): 1351, 1975.
26. HSUEH, A.J.W., E.J. Jr. PECK & J.H. CLARK. Control of estrogen receptor levels by progesterone. Endocrinology, 98: 438, 1976.
27. KAHLSON, G., E. ROSENGREEN, D. SVAHN & R. THUNBERG. Increased formation of histamine in the gastric mucosa elicited by gastric and food intake. J. Phisiol., (London), 167: 45, 1963.
28. KAHLSON, G., E. ROSENGREEN. D. SVAHN & R. THUNBERG. Mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa as related to acid secretion. J. Phisiol. , 174: 400, 1964.
29. KAHLSON, G. & E. ROSENGREN. New aproaches to the physiology of histamine. Physiol. Rev., 48:155,1968.
30. KREMZNER, L.T. & I.B. WILSON. A procedure for the determination of histamine. Biochim. Biophys. Acta., 50: 364.1961.

31. LEDDA, F.. R. FANTOZZI, A MUGELI, F. MORONI & P. F. MANNAIONI. The antagonism of the positive inotropic effect of histamine and noradrenalina by H_1 and H_2 -receptor blocking agents. Agents and Actions, 4: 193,1974.

32. LEWIS, T. The Blood vessels of the skin and their responses. London: Shaw, 1927 "Apud" Kahlson, 1968.

33. LEVI, R. & J.O. KUYE. Pharmacological Characterization of cardiac histamine receptors: sensitivity to H_1 - receptor antagonist. European J. Pharmacol. 27: 330, 1974.

34. LEVI.R., G.ALLAN & J.H. ZAVECZ. Cardiac histamine receptors. Fed. Proc., 35(8): 1942,1976.

35. LEVINE, R.J. Effect of histidine decarboxylase inhibition on gastric acid secretion in the rat. Fed. Proc. 24: 1331, 1965.

36. LOWRY, O. H. H.T. GRAHAM, F.B. HARRIS, M.K. PRIEBOT , A.R. MARKS & R.V. BREGMAN. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 112: 116. 1954. "Apud" Shore, 1959.

37. MANN J.I., M.P. VESSEY, M. THOROGOOD & R. DOOL. Myocardial infarction in young women with special reference to oral contraceptive practice. Br. Med. J., 2: 241, 1976.
38. MANNAIONI, P.F. Interaction between histamine and dichloroisoproterenol, hexamethonium, pempidine and diphenhydramine, in normal and reserpine-treated heart preparations. Brit. J. Pharmacol., 15: 500, 1960.
39. MANNAIONI, P.F., R. LEVI, F. LEDDA & A. GIOTTI. Interaction among histamine, norepinephrine, propanolol, diphenhydramine and quinidine on isolated heart preparations. Life Sci., 7: 771, 1968.
40. McINTIRE, F.C., F.B. WHITE & M. SPROULL. The determination of histamine with 2,4-dinitrofluorobenzene. Arch. Biochem., 29: 376, 1950.
41. McINTIRE, F.C. Determination of histamine by chemical means. In: Handbook of Experimental Pharmacology (Ed. O. Eichler and A. Farah), vol.18, part.1: 57 80, Springer-Verlag, New York, 1966.

42. MORONI, F., LEDDA, R. FANTOZZI, A. MUGELLI and P.F. MANNAIONI. Effects of histamine and noradrenaline on contractile force of guinea-pig ventricular strips: antagonism by burimamide and metiamide. *Agents and Actions*, 4(5): 314, 1974.
43. NOAH, J.W. & A. BRAND. A fluorimetric method to determine levels of histamine in human plasma. *J. Allergy*, 32: 236, 1961.
44. PHILLIPS, G.B. Relationship between serum sex hormones and glucose, insulin and lipid abnormalities in men with myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 1729, 1977.
45. PHILLIPS, G.B. Sex hormones, risk factors and cardiovascular disease. *Am. J. Med.*, 65: 7, 1978.
46. PÖCH, G., W.R. KUKOVETZ & N. SCHOLZ. Specific inhibition by burimamide of histamine effects on myocardial contraction and cyclic AMP. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 280: 223, 1973.
47. REDLICH, D. & D. GLICK. Studies in histochemistry LXXVI. Fluorimetric determination of histamine in

microgram samples of tissue or microliter volumes of body fluids. Anal. Biochem., 10: 459, 1965.

48. RILEY, J.F. & WEST. The presence of histamine in tissue mast cells. J. Physiol., 120: 528, 1953
49. ROCHA e SILVA, M. Fundamentos de farmacologia e suas aplicações à terapêutica. Vol.II, 2a. Ed. Edart , São Paulo, 1969.
50. ROSENTHAL; S.M. & H. TABOR. An improved colorimetric method for the estimation of histamine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 92: 425, 1948.
51. RYAN, M. J. & M.J. BRODY. Distribution of histamine in the canine autonomic nervous system. J. Pharmacol. Exp. Ther., 174(1) 123, 1970.
52. RYAN, M.J. & M.J. BRODY. Neurogenic and vascular stores of histamine in the dog. J. Pharmacol. Exp. Ther., 181: 83, 1972.
53. SAWICKI, E., C.R. SAWICKI, C.C. GOLDEN and KOBER. Fluorimetric and colorimetric methods of analysis

- for histamine. Microchemical Journal, 15: 25, 1970
54. SCHAYER, R. W. Biogenesis of Histamine. J. Biol. Chem., 199: 245, 1952.
55. SCHAYER, R.W. Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system. Am. J. Physiol. 202: 66, 1962.
56. SCHAYER, R.W. Biogenic amines and microcirculatory homeostasis. Biogenic amines as physiological regulators. (Ed. J.J. Blum), Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs (New Jersey), 1970.
57. SCHAYER, R.W. Histamine and microcirculation. Life-Sci. 15(3): 391, 1974.
58. SHORE, P.A., A. BURKHALTER & V. H. COHN. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissue J. Pharmacol. Exp. Ther., 127: 182, 1959.
59. SHORE, P.A. Release of histamine from stomach by vagus-stimulating drugs: association with gastric and secretion. Fed. Proc., 24: 1322, 1965.

60. SZECO, C.M. Role of histamine in mediation of hormone action. Fed. Proc., 24: 1343, 1965.
61. TRENDELEMBURG, U. The action of histamine and 5-hydroxytryptamine on isolated mammalian atria. J. Pharmac. Exp. Ther., 130: 450, 1960
62. UNGAR, G. Physiological functions of histamine (Introduction). Fed. Proc., 24: 1293, 1965.
63. VUGMAN, I. & M. ROCHA e SILVA. Biological determination of histamine in living tissue and body fluids. In Handbook of Experimental Pharmacology (Ed. O. Eichler and A. Farah), vol. 18 part 1: 81-115, Springer Verlag, New York, 1966.
64. WHITE, T. Biosynthesis, metabolism, and function of histamine in the nervous system. Fed. Proc., 23: 1103, 1964.
65. WOODRUFF, G.N., A.B. ONIWINDE & G.A. KERKUT. Histamine in tissue of the snail, crab, goldfish, frog and mouse. Comp. Biochem. Physiol., 31: 599, 1969.