Laura Joana Fevereiro Oliveira

Regulação da actividade dos receptores muscarínicos neuronais pela adenosina na placa motora de rato: Papel das cinases A e C e dos canais Ca_v1 (tipo L)





Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia
Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto

Porto, 2006

Laura Joana Fevereiro Oliveira

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em Ciências Biomédicas, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar- Universidade do Porto.

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá

ICBAS U P BIBLIOTECA PORTO

Porto, 2006

10807

Para os meus pais.

Para os meus irmãos.

Para todos aqueles cuja companhia e amizade me ajudou a levar a bom porto a presente dissertação.

Publicações

Os resultados apresentados nesta dissertação constam dos seguintes trabalhos publicados em revistas internacionais com arbitragem científica:

- **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2002) Modulation by adenosine of both muscarinic M_1-facilitaton and M_2-inhibition of [^{3}H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *European Journal of Neuroscience*, **15**, 1728-1736.

- **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2002) Activation of neuronal muscarinic M_1 receptors suppresses adenosine A_{2A} facilitation and muscarinic M_2 inhibition of [^{3}H]-acetylcholine release from motor nerve terminals by a mechanism involving protein kinase C. *FENS Abstracts*, **Vol.1**, A115.10.

- **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2003) Fine-tunnig modulation of neuronal muscarinic M_1 (facilitatory) and M_2 (inhibitory) receptors activation by adenosine at the rat neuromuscular junction. In *Cholinergic Mechanisms- Function and dysfunction*, eds. A. Fisher & H. Soreq. Taylor and Francis, London, **ch. 120**.

- Faria, M., **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A., Lobo, M.G.B.& Correia-de-Sá, P. (2003) Tetanic fade is revealed by blocking presynaptic nicotinic receptors containing alfa4beta2 and alfa3beta2 subunits after reducing the safety factor of neuromuscular transmission. In *Cholinergic Mechanisms - Function and dysfunction*, eds. A. Fisher & H. Soreq. Taylor and Francis, London, **ch. 94**.

- Faria, M., **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A., Lobo, M.G.B & Correia-de-Sá, P. (2003) Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing $\alpha 3\beta 2$ subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse*, **49**, 77-88.

- **Oliveira, L.**, Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A_{2A} receptor facilitation of L-type Ca^{2+} influx into rat motor nerve terminals. *Journal of Physiology (London)*, **560**, 157-168.

- **Oliveira, L.,** Timóteo, M.A, Barroso, A., & Correia-de-Sá, P. (2005) Facilitatory muscarinic M_1 and adenosine A_{2A} receptors operate a common pathway involving protein kinase A and L-type calcium channels at the rat motor endplate. *Journal of Neurochemistry*, **94 (suppl. 2)**, 128.

- **Oliveira, L.** & Correia-de-Sá, P. (2005) Protein kinase A and Ca_V1 (L-type) channels are common targets to facilitatory adenosine A_{2A} and muscarinic M_1 receptors on rat motoneurons. *NeuroSignals*, **14**, 262-272.

- **Oliveira, L.** & Correia-de-Sá, P. (2006) Dissociation between M_1-facilitation of acetylcholine release and crosstalk with A_{2A}- and M_2- receptors on rat motoneurons. *Signal Transduction (Receptors, Mediators and Genes),* **6**, 19-31.

O contributo pessoal para a realização dos trabalhos consistiu na:

- Colaboração no planeamento do protocolo experimental
- Realização da maior parte das experiências
- Interpretação e discussão de resultados
- Preparação dos manuscritos

Índice

	Página
Abreviaturas	1
Resumo	3
Abstract	5
Resume	7
Capítulo 1 – Introdução	9
1.Transmissão Neuromuscular	9
2.Adenosina como neuromodulador	14
2.1 Origem da adenosina extracelular	15
2.2 Receptores da adenosina	17
2.3 Controlo da actividade sináptica	20
2.5 Interacção com outros neuromediadores	21
3. Receptores muscarínicos	23
4. Papel do Ca^{2+} na transmissão neuromuscular	27
4.1 Papel do Ca^{2+} na libertação de ACh	27
4.2 Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem: Modulação da transmissão neuromuscular	28
5. Objectivos do presente trabalho	33
Capítulo 2 – Material e Métodos	37
Descrição metodológica	39
Preparação do hemidiafragma inervado de rato	39
Protocolo experimental	42
Libertação de [^{3}H]-ACh	42
Montagem das preparações do hemidiafragma inervado	43
Descrição do período experimental	43
Condições de estimulação	45
Contribuição pós-sináptica na libertação de [^{3}H]-ACh	45
Quantificação da[^{3}H]-ACh libertada	48
Efeito dos fármacos	50
Registo Miográfico	50
Montagem das preparações do hemidiafragma inervado	51
Descrição do protocolo experimental	51
Solução de fármacos	53
Estatística	54
Capítulo 3 – Resultados	55
3.1 Modulação da actividade dos autoreceptores muscarínicos M_1 facilitatório e M_2 inibitório pela adenosina na junção neuromuscular de rato.	55
3.1.1 Regulação bifásica da libertação de [^{3}H]-ACh através da activação de autoreceptores muscarínicos.	55

3.1.2 Os autoreceptores facilitatórios muscarínicos M_1 e nicotínicos $\alpha3\beta2$ regulam a libertação de [^{3}H]-ACh de um modo independente. 60

3.1.3 Modulação da actividade dos autoreceptores muscarínicos pelos receptores A_1 e A_{2A} da adenosina 62

3.1.4 Dinâmica da interacção dos receptores muscarínicos e da adenosina em função do padrão de estimulação. 65

3.2 Dissociação entre a facilitação da libertação de ACh mediada por receptores muscarínicos M_1 e a interacção com os receptores A_{2A} e M_2 localizados nas terminações nervosas motoras de rato. 68

3.2.1 A facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela activação dos receptores muscarínicos M_1 resulta maioritariamente do recrutamento de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares sensíveis ao IP_3 68

3.2.2 A activação dos receptores muscarínicos M_1 restringe tanto o efeito inibitório mediado por receptores M_2 como a facilitação resultante da activação de receptores A_{2A} por um mecanismo dependente da activação da PKC. 72

3.2.3 A estimulação da PKC causada pela activação dos receptores M_1 regula a formação intracelular de AMP cíclico 74

3.2.4 A interacção entre os receptores facilitatórios A_{2A} e M_1 resulta da convergência das duas vias de sinalização intracelulares para a activação da proteína cinase A (PKA) e influxo de cálcio através de canais Ca_V1 (tipo L). 77

3.3 A depressão tetânica pode ser atenuada pelo recrutamento de cálcio pelos canais Ca_V1 (tipo L) devido à activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina nas terminações nervosas motoras. 83

3.3.1 Influência das condições de estimulação na libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras: Papel diferencial dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) e Ca_V1 (tipo L) 83

3.3.2 A Activação tónica dos receptores facilitatórios A_{2A} da adenosina desvia o influxo de Ca^{2+} dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) para os canais Ca_V1 (tipo L) durante estímulos interpolados de elevada frequência (50 Hz- *"Bursts"*) 86

Capítulo 5 – Discussão 93

5.1 A libertação de ACh na junção neuromuscular de rato é regulada pela activação tónica de receptores muscarínicos M_1-facilitatórios e M_2-inibitórios 93

5.2 O balanço da activação dos autoreceptores muscarínicos M_1 *vs* M_2 é regulado pela adenosina gerada durante a actividade neuronal 97

5.3 A facilitação da libertação de ACh causada pelo receptor muscarínico M_1 pode ser dissociada da sua interacção com a actividade dos receptores M_2-inibitório e A_{2A}-facilitatório na placa motora 102

5.4 As vias de sinalização intracelular activadas pelos receptores facilitatórios M_1 e A_{2A} convergem para a activação da PKA e o influxo de Ca^{2+} por canais Ca_V1 (tipo L). 104

5.5 A activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina atenua a depressão tetânica durante a actividade neuronal através do recrutamento de Ca^{2+} pelos canais Ca_v1 (tipo L) 109

Agradecimentos 119

Referências Bibliográficas 120

Abreviaturas

- **1,9-ddFSK** 1,9-dideoxiforscolina
- **2-APB** 2-aminoetoxidifenilborano
- **4-DAMP** Metiodeto de 4-difenilacetoxi-*N*-metilpiperidina
- **8-Br-AMPc** 8-Bromo-3',5-monofosfato de adenosina cíclico
- **acetilCoA** Acetilcoenzima A
- **ACh** Acetilcolina
- **ADA** Desaminase da adenosina
- **ADO** Adenosina
- **ADP** Adenosina 5'-difosfato
- **AF-DX 116** 11-[[2-1[(Dietilamino) metil-1-piperidinil]-acetil]-5,11-dihidro-6H-piridino[2,3-b][1,4] benzodiazepina-6-ona
- **AMP** Adenosina 5'-monofosfato
- **AMPc** 3',5'-Monofosfato de adenosina cíclico
- **ATP** Adenosina 5'-trifosfato
- **Ca^{2+}** Ião cálcio
- **CCSV** Canais de cálcio sensíveis à voltagem
- **$CdCl_2$** Cloreto de cálcio
- **CGS 21680C** 2-[4-(2-*p*-Carboxietilo)-fenilamino]-5'-N-etilcarboxoamida adenosina
- **ChAT** Acetiltransferase da colina
- **CHL** Cheleritrina
- **DAG** Diacilglicerol
- **DMPP** 1,1-Dimetil-4-fenilpiperazinium
- **DMPX** 3,7-Dimetil-1-propargilxantina
- **DPCPX** 1,3-Dipropil-8-ciclopentilxantina
- **EGTA** Ácido *N,N,N',N'*-tetra-acético
- **FLC** Fosfolipase C
- **FSK** Forscolina
- **HC-3** Hemicolínio-3
- **IP_3** Trifosfato de inositol
- **K^+** Ião potássio
- **LiCl** Cloreto de lítio
- **McN-A-343** Cloreto de 4-(*N*-[3-clorofenil]-carbamoil-oxi-2-butiriltrimetilamónio
- **MT-3** Toxina muscarínica 3
- **MT-7** Toxina muscarínica 7
- **NBTI** S-(*p*-nitrobenzil)-6-tioinosina
- **NMDG** N-metil-D-glucamina
- **PKA** Proteína cinase A
- **PKC** Proteína cinase C
- **PMA** 12-Miristato-13-acetato de forbol
- **ROL** Rolipram; 4-(3'-Ciclopentiloxi-4'-metoxifenil)-2-pirrolidona (4-RS)
- **Rp-cAMPS** Rp-adenosina 3',5'-monofosfotioato cíclico de

	trietilamina
• **R-PIA**	R-N^6-Fenilisopropil adenosina
• **ZM 241385**	(4-(2-[7-Amino-2-(2-furil{1,2,4}-triazolo{2,3-a{1,3,5}triazina-5-il-aminoetil)fenol
• **ω-AgaTx IVA**	ω-agatoxina IVA
• **ω-CgTx GVIA**	ω-conotoxina GVIA
• **ω-CmTx MVIIC**	ω-conotoxina MVIIC

Resumo

Neste trabalho mostra-se que a libertação provocada de acetilcolina a partir das terminações nervosas motoras estimuladas electricamente com frequências baixas (5 Hz) e durante breves períodos de tempo pode ser amplificada pela activação de autoreceptores facilitatórios nicotínicos $\alpha 3\beta 2$ e muscarínicos do subtipo M_1. A acumulação de adenosina na fenda sináptica, proveniente dos nucleótidos de adenina libertados ou do sistema de transporte membranar de nucleósidos, favorece a activação de receptores do subtipo A_1, que são os principais responsáveis pela inibição da libertação do neurotransmissor durante estímulos de moderada intensidade. Nestas condições experimentais, a actividade dos receptores M_2 muscarínico e A_{2A} da adenosina é reprimida pela activação do receptor M_1 por intermédio de um mecanismo dependente da estimulação da PKC. Contrariamente, o ciclo dos fosfatos de inositol não parece estar envolvido no controlo da actividade dos receptores A_{2A} e M_2 e, portanto, o efeito facilitatório M_1 que depende do recrutamento de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares sensíveis ao IP_3 pode ser dissociado do seu papel nas interacções receptor-receptor observadas na junção neuromuscular de rato.

Nas terminações nervosas motoras de mamíferos adultos a libertação de ACh é mediada pelo influxo de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.1$ (tipo P) localizados junto às zonas activas. Porém, a actividade destes canais decresce rapidamente devido ao influxo de Ca^{2+}, facto que poderá contribuir para o aparecimento do fenómeno de depressão tetânica da transmissão neuromuscular. Diversos autores mostraram que a depressão tetânica poderia ser completamente ultrapassada pela interposição de períodos de repouso relativamente curtos (poucos segundos) entre estímulos tetânicos consecutivos. Apesar de existir alguma controvérsia relativamente ao mecanismo responsável por este fenómeno, neste trabalho demonstra-se que a activação tónica de receptores facilitatórios pré-sinápticos do subtipo A_{2A} pela adenosina gerada endogenamente durante a actividade nervosa parece ser um dos

responsáveis pela recuperação da depressão tetânica entre estímulos consecutivos de elevada frequência (50 Hz – *"Bursts"*, intercalados por períodos de 20 segundos de repouso) por via do recrutamento alternativo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) que estão habitualmente quiescentes. O controlo do influxo de Ca^{2+} por canais $Ca_V2.1$ (tipo P) e/ou Ca_V1 (tipo L) devido à actividade tónica dos receptores A_{2A} da adenosina configura um novo modelo de plasticidade sináptica mediada pela adenosina na junção neuromuscular que pode ser aproveitado em situações em que haja necessidade de aumentar a margem de segurança da transmissão neuromuscular (*e.g.* síndromes miasténicos, re-inervação, recuperação da intoxicação por toxina botulínica).

São, ainda, apresentadas evidências demonstrando que a activação de receptores A_{2A} da adenosina favorecem a re-adaptação do funcionamento de outros receptores intervenientes no controlo da libertação de ACh na placa motora. A adenosina (por intermédio dos receptores A_{2A}) promove a dessensibilização do receptor nicotínico $\alpha3\beta2$ e suprime a facilitação operada pelo receptor M_1. A oclusão do efeito facilitatório M_1 pela activação tónica A_{2A} resulta da estimulação do sistema de transdução adenilciclase / AMP cíclico / PKA e da competição para o recrutamento de Ca^{2+} extracelular pelos canais Ca_V1 (tipo L). A supressão do controlo inibitório exercido pelos receptores M_1 sobre os receptores M_2 causada pela activação dos receptores A_{2A} pela adenosina endógena é indirectamente responsável pela transferência do controlo inibitório da transmissão neuromuscular para os receptores muscarínicos M_2 durante estímulos de elevada frequência.

Abstract

In this work, we showed that ACh release from motor nerve terminals evoked by electrical stimulated with low frequency (5 Hz) and during brief periods of time can be amplified by activation of presynaptic facilitatory nicotinic α3β2 and muscarinic M_1 autoreceptores. The adenosine accumulation in the synaptic cleft, originated from the release of adenine nucleotides or from the nucleoside transporters system, favours the activation of adenosine A_1 receptors subtype, responsible for the inhibition of neurotransmitter release during moderate stimulation intensity. In these experimental conditions, the activity of the muscarinic M_2 and adenosine A_{2A} receptors are restrained by M_1 receptors activity by a mechanism dependent on stimulation of PKC. However, the cycle of inositol phosphates do not seem to be involved in the control of M_2 and A_{2A} receptors activity and, therefore, the M_1 facilitatory effect depends on Ca^{2+} mobilization from the IP_3-sensitive intracellular stores and can be dissociated from the interactions receptor-receptor observed at the rat neuromuscular junction. At the motor nerves terminals of adult mammals the release of ACh is mediated by the influx of Ca^{2+} through $Ca_V2.1$ channels (type P) located at the active zones. However, the activity of these channels decrease quickly due to the influx of Ca^{2+}, which probably contribute for the appearance of tetanic depression of neuromuscular transmission. Several authors demonstrated that tetanic depression could be completely reverted by relatively short periods of rest (few seconds) between consecutive tetanic stimulations. Although, some controversy relatively to the responsible mechanism for this fenomena, in this work we demonstrated that tonic activation of presynaptic facilitatory receptors of A_{2A} subtype by adenosine generated endogenously during nervous activity seems to be the responsible for the recovery of the tetanic depression between consecutive stimulations of increased frequency (50 Hz - "Bursts", intercalated by periods of 20 seconds of rest) due to the

alternative recruitment of Ca^{2+} through habitually "quiescent" Ca_V1 channels (type L). The control of Ca^{2+} influx by $Ca_V2.1$ (type P) and/or Ca_V1 (type L) channels due to tonic adenosine A_{2A} receptors activity configures a new model of synaptic plasticity mediated by adenosine at the rat neuromuscular junction that can be manipulated in situations where there is a necessity to increase the safety margin of neuromuscular transmission (e.g. miasténicos syndromes, re-inervação, recovery of the poisoning for botulínica toxin). There are still evidences demonstrating that the activation of A_{2A} adenosine receptors favours the readjustment of presynaptic receptors function in the control of the ACh release at the rat motor plate. The adenosine (by intermediary of A_{2A} adenosine receptors) promotes the desensitization of the nicotinic $\alpha3\beta2$ and suppresses the facilitation operated for the M_1 receptors. The occlusion of M_1 facilitatory effect by tonic A_{2A} adenosine receptors activation results from the stimulation of adenylate/cAMP/PKA transduction system and by the competition for recruitment of extracellular Ca^{2+} from the Ca_V1 channels (type L). The shift on the inhibitory control of neuromuscular transmission to muscarinic M_2 receptors during high frequency burst, results mainly from suppression of M_2 inhibitory control exerted by M_1 receptors due to adenosine A_{2A} receptors activation by endogenous adenosine.

Resumé

Dans ce travail on montre que la libération provoquée d'acethycoline provenaient des terminassions nerveuses motrices stimulées électriquement avec de baises fréquences (5Hz) et pendant de brefs périodes de temps peut être amplifiée par l'activation de autorécepteurs facilitateurs nicotiniques $\alpha 3\beta 2$ et muscariniques du subtype M_1. L'accumulation d'adénosine dans la fente synaptique, résultante des nucléotides d' adénine libérés ou du system de transporte de la membrane de nucléosides, favorise l'activation de récepteurs du subtype A_1, qui sont les principaux responsables de l'inhibition de la libération du neurotransmisseur pendant des stimulus d'intensité modérée. Dans ces conditions expérimentales, l' activité des récepteurs M_2 muscariniques et A_{2A} de l'adénosine est réprimée par l'activation du récepteur M_1 par l'intermède d'un mécanisme dépendant de stimulation de la PKC. Contrairement, le cycle des phosphates de l'inositol ne paraît pas être impliqué dans le contrôle de l'activité des récepteurs A_{2A} et M_2 et, donc l'effet facilitateur M_1 dépendant du recrutement de Ca^{2+} a partir des réserves intercellulaires sensibles au IP_3 peut être dissocié de son rôle dans les interactions recepteur-recepteur observées dans la jonction neuromusculaire du rat.

Dans des terminaisons nerveuses motrices de mammifères adultes la libération de Ach est médiée par l'influx de Ca^{2+} vers des canaux Ca2.1 (typeP) localisés prés des régions actives. Cependant, l'activité de ces canaux décroisse rapidement due à l' influx de Ca^{2+}, ce qui pourrait contribuer à l' apparition du phénomène de dépression tétanique de la transmission neuromusculaire. Plusieurs auteurs ont montré que la dépression tétanique pourrait être complètement dépassé par l'interposition des périodes de repos relativement de courtes (peu de seconds) entre les stimulus tétaniques consécutifs. Malgré l'existence de quelque controverse relativement au mechanisme responsable par ce phénomène , dans

ce travail on fait la demonstration que l'activation tonique des récepteurs facilitateurs pre-sinaptiques du subtype A_{2A} par l'ádenosine gérée endogenement pendant l'activité nerveuse parait être un des responsables par la récupération de la dépression tétanique entre des stimulus consécutifs de fréquence élevée (50 Hz- *"Bursts"* intercalés par des périodes de 20 seconds de repos) par voie du recrutement alternatif de Ca^{2+} parmi des canaux Ca_v1 (typeL) que sont normalement en repos. Le contrôle de l'influx de Ca^{2+} par des canaux $Ca_v2.1$ (tipe P) et/ ou Ca_v1 (typeL) dû a l'activité tonique des récepteurs A_{2A} de l'adénosine configure un nouveau modèle de plasticité synaptique medié par l'adénosine dans la jonction neuromusculaire qui peut être profité en situations dans lesquelles il a besoin d'augmenter la marge de sécurité de la transmission neuromusculaire (e.g. syndromes miasténiques, re-innervation, récupération de l'intoxication par la toxine botulínique).

De plus, on démontre par des évidences que l'activation de récepteurs A_{2A} de l'adénosine favorise la re-adaptation du fonctionnement d'autres récepteurs intervenant dans le contrôle de la libertation de Ach dans la plaque motrice. L'adénosine (par moyen des récepteurs A_{2A}) promouve la désensibilisation du récepteur nicotinique $\alpha 3ß2$ et supprime la facilitation opérée par le récepteur M_1. L'occlusion de l' effet facilitateur M_1 par l'activation tonique A_{2A} résulte de la stimulation du système de transduction adenilciclase/AMP cíclic/ PKA et la compétition par le recrutement de Ca^{2+} extracellulaire par des canaux Ca_v1 (type L). La suppression du contrôle inhibitoire exercé par des récepteurs M1 sur les récepteurs M_2 provoquée par l'activation des récepteurs A_{2A} par l'adénosine endogène est indirectement responsable du transfert du contrôle inhibitoire de la transmission neuromusculaire vers les récepteurs muscariniques M_2 pendant les stimulus de fréquence élevée.

CAPÍTULO 1 – Introdução

1. Transmissão Neuromuscular

A compreensão do funcionamento das sinapses químicas muito deve aos estudos da transmissão na junção neuromuscular esquelética em vertebrados, uma vez que, genericamente, os seus princípios de funcionamento parecem ser aplicáveis à maioria das sinapses químicas.

A junção neuromuscular esquelética tem sido extensamente usada como modelo para estudar os fenómenos envolvidos na transmissão sináptica. Isto deve-se ao facto desta estrutura ser anatomicamente mais acessível e apresentar vantagens funcionais comparativamente a outras sinapses centrais e periféricas. Das vantagens encontradas destacam-se as seguintes:

I. Facilidade na preparação dos modelos experimentais;
II. Inexistência de interferências interneuronais, já que cada fibra muscular é inervada por um único neurónio motor;
III. Facilidade relativa com que se podem fazer registos intra e extracelulares a partir da região pós-sináptica;
IV. As respostas registadas a partir de uma única fibra muscular são função da quantidade de neurotransmissor que é libertado por uma única terminação nervosa, após se excluirem modificações da actividade pós-sináptica;
V. Nos mamíferos, observa-se a libertação predominante de um único neurotransmissor, **acetilcolina (ACh)**, cuja natureza química, metabolismo,

farmacologia e processo de quantificação estão bem definidos (Whittaker & Dowdall, 1973; Wessler & Kilbinger, 1986a);

VI. Facilidade na distinção entre efeitos pré-sinápticos e pós-sinápticos devido à extensa caracterização funcional e farmacológica desta preparação.

Se funcionalmente a junção neuromuscular é um excelente modelo para o estudo da transmissão sináptica, a sua complexidade ultraestrutural acarreta algumas limitações relativamente à penetração/difusão de moléculas mais volumosas e, consequentemente, à interpretação de fenómenos localizados no seu microambiente. As células musculares esqueléticas são inervadas por fibras nervosas mielinizadas oriundas dos neurónios motores dos cornos anteriores da espinal medula. Nos mamíferos, os feixes nervosos intramusculares ramificam-se em axónios terminais mielinizados, que raramente se tornam a dividir. Junto à sinapse neuromuscular, o axónio perde a bainha de mielina e as terminações nervosas motoras inserem-se numa invaginação existente na fibra muscular. Esta estrutura em fenda, designada por **Placa Motora,** é geralmente recoberta por células peri-sinápticas da glia que são prolongamentos das células de Schwann que envolvem os axónios. A membrana pós-sináptica apresenta inúmeras invaginações designadas por **sulcos sinápticos** que lhe confere uma área de superfície significativamente superior à da membrana pré-sináptica. A profundidade, forma e comprimento destes sulcos varia com a espécie e com o tipo de músculo esquelético. Os sulcos são tendencialmente mais profundos nos mamíferos que nos seres mais primitivos. A profundidade dos sulcos sinápticos é uma característica anatómica com relevância funcional importante. A extensão da profundidade dos sulcos sinápticos está relacionada de um modo directamente proporcional à eficácia da transmissão sináptica. Os sulcos sinápticos são ricos em receptores nicotínicos para a ACh e em canais de sódio sensíveis à voltagem, o que facilitam a despolarização da membrana pós-sináptica. A profundidade dos sulcos

sinápticos também aumenta no decurso do desenvolvimento, sofrendo alterações em situações patológicas como por exemplo na *Miastenia gravis*. Esta complexidade ultraestrutural condiciona, ainda, certos estudos bioquímicos por não ser tecnicamente viável o isolamento de uma fracção enriquecida em terminais nervosos livres da contaminação por fibras musculares.

Dale e colaboradores colocaram pela primeira vez a hipótese de ser a ACh o mediador químico responsável pela transmissão neuromuscular. Esta hipótese foi proposta com base na identificação experimental de pequenas quantidades de ACh no fluido de perfusão das fibras musculares contraídas após um curto período de estimulação nervosa eléctrica. Os mesmos autores verificaram que a injecção intraarterial de pequenas quantidades de ACh provocava fasciculações musculares. A hipótese de que a ACh é o principal neurotransmissor libertado na junção neuromuscular de mamíferos foi também apoiada após a evidência de que os fármacos curarizantes bloqueavam as respostas musculares resultantes da aplicação de acetilcolina, e que a incubação das preparações com inibidores da acetilcolinesterase aumentava os efeitos contracturantes da ACh.

A ACh é sintetizada nos terminais axoniais dos neurónios colinérgicos pela enzima acetiltransferase da colina (ChAT), que cataliza a reacção de condensação aldoólica entre a acetilcoenzima A (acetilCoA) e a colina, obtendo-se como produtos a ACh e a coenzima A. Dependendo dos tecidos e da espécie testada, os precursores da acetilCoA, que constituem a fonte de radical acetilo, podem ser a glicose, pela via glicolítica, em associação com o complexo enzimático piruvato desidrogenase ou o acetato resultante da via da acetilCoA. Contudo, a síntese do precursor acetilCoA é realizada na matriz mitocondrial enquanto que a síntese de ACh é citosólica. Pensa-se que este precursor deverá ser transportado pela membrana interna da mitocondria sob a forma de citrato,

sendo clivado no citosol em acetilCoA e oxaloacetato, por acção da liase do citrato. A colina pode ter várias origens, nomeadamente a partir da fracção livre existente no plasma, da hidrólise da fosfatidilcolina presente nas membranas celulares, ou da recaptação de colina produzida na fenda sináptica pela acção da acetilcolinesterase sobre a ACh libertada. Após a síntese citoplasmática de ACh, esta é transportada e armazenada nas vesículas sinápticas.

Na membrana pré-sináptica existem dois tipos de transportadores de colina, os de reduzida afinidade e os de elevada afinidade para a colina. Os transportadores de reduzida afinidade (K_m de 40-80 μM) parecem operar por difusão passiva, dependendo somente da concentração de colina. Já os transportadores de elevada afinidade (K_m de 1-5 μM) operam por difusão facilitada, são saturáveis, dependem do Na^+ e são inibidos por compostos estruturalmente relacionados com a colina, como o hemicolínio-3 (HC-3) (Long & Schueler, 1954). Este último transportador encontra-se intimamente ligado à cinética da síntese de ACh. Estima-se que cerca de 50-85% da colina transportada por estes transportadores seja utilizada na síntese de ACh. Por condicionar a disponibilidade do precursor da ACh, o transporte facilitado de colina parece ser o factor limitante da síntese deste neurotransmissor, já que esta pode ser bloqueada inibindo a recaptação de colina com HC-3.

No diafragma inervado de rato, apesar da reciclagem da ACh ocorrer durante o repouso e da mesma ser acelerada pela actividade nervosa, a síntese do neurotransmissor processa-se normalmente ao mesmo ritmo da libertação e da sua destruição, de tal modo que as reservas de ACh nunca diminuem significativamente (Potter, 1970). Contrariamente, no cérebro os níveis endógenos de ACh variam mais do que nos tecidos

ICBAS

periféricos. Essa variação é inversamente proporcional à sua libertação / destruição, *i.e.* quanto mais rápida for a libertação mais lenta será a síntese.

Nos terminais nervosos motores a libertação de ACh por impulso nervoso excede geralmente a quantidade necessária para desencadear um potencial de acção na fibra muscular, facto que garante fidelidade na transmissão neuromuscular (Wood & Slater, 1997). O excesso de libertação de ACh na junção neuromuscular deu origem à noção de **Margem de Segurança** da transmissão neuromuscular. Através deste mecanismo é possível manter a transmissão neuromuscular durante estímulos moderadamente prolongados de elevada frequência, uma situação onde se verifica uma diminuição significativa dos níveis de neurotransmissor libertado à custa da redução do número de vesículas sinápticas rapidamente mobilizáveis. A margem de segurança da transmissão neuromuscular pode ser influenciada por inúmeros factores, tanto pré- como pós-sinápticos. Estes factores podem ser de natureza estrutural apresentando um carácter relativamente estável por períodos de tempo que vão de minutos a horas. Outros factores possuem uma natureza dinâmica que reflecte mudanças fisiológicas celulares numa escala temporal bastante mais rápida. Na ausência de alterações estruturais duradoiras, pequenas variações na margem de segurança podem ocorrer devido a modificações na libertação do neurotransmissor em resposta a variações da actividade neuronal. A modulação da libertação da acetilcolina parece constituir um componente importante na dinâmica da regulação da margem de segurança da transmissão neuromuscular.

Tal como hoje é interpretada, a transmissão neuromuscular pode ser dividida numa série de etapas cronologicamente distintas: (1) Síntese e armazenamento do neurotransmissor nas vesículas sinápticas; (2) elevação dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelulares, responsável pela fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática

e subsequente libertação do transmissor para o fluido extracelular; (3) difusão do neurotransmissor para as células pós-sinápticas; (4) ligação do neurotransmissor a receptores específicos (nicotínicos); (5) alterações das propriedades da membrana pós-sináptica (*e.g.* influxo de iões) e/ou activação de segundos mensageiros intracelulares que resultam na despolarização da célula pós-sináptica. Este tipo de transmissão química é considerado "flexível" possuindo a capacidade de alterar a sua actividade, adaptando-se ao microambiente local. Trata-se, pois, de um fenómeno que pode ser modulado pela actividade nervosa e por inúmeros mediadores locais (*e.g.* aminas, purinas, péptidos, etc.) (ver *e.g.* Correia-de-Sá *et al.*, 1997).

Do ponto de vista histórico, a junção neuromuscular contribuiu ainda de forma inestimável para a caracterização do papel neuromodulador das purinas (ATP e adenosina) (Ginsborg & Hirst, 1972). Ribeiro & Sebastião (1991), comparando a fisiologia e a farmacologia da adenosina, concluíram que o mecanismo inibitório da adenosina na transmissão sináptica no hipocampo de rato parece ser semelhante ao verificado na inibição da transmissão neuromuscular. Esta conclusão reforça a ideia de que, apesar das diferenças ultraestruturais e funcionais, muitos dos resultados obtidos na junção neuromuscular relativamente ao estudo da libertação de neurotransmissores são extensíveis a outras sinapses.

2 Adenosina como neuromodulador

A adenosina encontra-se presente em todas as células como componente do seu metabolismo (Arch & Newsholme, 1978), estando envolvida em vias metabólicas chave, tais como, a síntese de ácidos nucleicos, o metabolismo de aminoácidos e a regulação da actividade metabólica celular (Stone, 1985). Em situações de stresse celular, a

concentração intracelular de adenosina varia de valores de ordem nanomolar para valores de ordem micromolar (Nordström *et al.*, 1977; Bardenheuer & Schrader, 1986). O aumento da concentração intracelular de adenosina resulta no seu transporte para o meio extracelular através dos transportadores de nucleósidos (Meghji, 1991), com o intuito de reduzir o metabolismo celular (McIlwain, 1979; Zhong *et al.*, 1998) da própria célula e das células vizinhas. O papel das purinas como moléculas sinalizadoras extracelulares foi inicialmente proposto por Drury & Szent-Gyorgyi em 1929, numa publicação onde mostrou que a adenosina e o AMP extraídos do músculo cardíaco apresentavam efeitos biológicos pronunciados, salientando-se a bradicardia, a dilatação arterial, a diminuição da pressão cardíaca e a inibição da motilidade intestinal. No entanto foi necessário esperar até à década de 70 do século XX, para que se evidenciasse o papel do ATP e da adenosina como inibidores da transmissão sináptica em trabalhos realizados na junção neuromuscular esquelética (Ginsborg & Hirst, 1972; Ribeiro & Walker, 1975). Estas evidências, simultaneamente às observações de que a adenosina podia ser libertada a partir de fatias cerebrais estimuladas electricamente (Pull & McIlwain, 1972) desencadearam o interesse pelo estudo das purinas como moduladores da transmissão nervosa.

Para além do efeito inibitório classicamente descrito, a adenosina também possui receptores excitatórios no sistema nervoso. Após a descrição pioneira dos efeitos facilitatórios da adenosina na libertação de ACh a partir de terminações nervosas colinérgicas imunopurificadas do estriado (Brown *et al.*, 1990) e de neurónios motores (Correia-de-Sá *et al.*, 1991) de rato, inúmeros trabalhos têm demonstrado uma regulação positiva da libertação de neurotransmissores e neuromoduladores pela adenosina.

2.1 Origem da adenosina extracelular

Na junção neuromuscular, a adenosina trifosfato (ATP) encontra-se armazenada com a ACh nas vesículas sinápticas (Dowdall *et al.*, 1974). Durante a estimulação nervosa o ATP é libertado conjuntamente com a ACh para a fenda sináptica de forma dependente da frequência de estimulação (Smith, 1991; Silinsky & Redman, 1996). Uma vez libertado, o ATP é sequencialmente hidrolisado em AMP, podendo este ser desfosforilado em adenosina, por acção da ecto-5'-nucleotidase, ou desaminado alternativamente em IMP, através da actividade da 5'-AMP-desaminase (Magalhães-Cardoso *et al*, 2003). Na junção neuromuscular de rato, a quantidade de adenosina formada extracelularmente a partir dos nucleótidos da adenina libertados depende, assim, da acção coordenada das duas vias metabólicas alternativas, (a) a via da ecto-5'-nucleotidase (principal, produtora de adenosina), que pode ser inibida anterogradamente pelos nucleótideos ATP e ADP, e (b) a via da ecto-5'-desaminase (acessória, formadora de IMP), que é capaz de desviar o catabolismo do ATP da produção de adenosina (Magalhães-Cardoso *et al.*, 2003) (Figura 1.1).

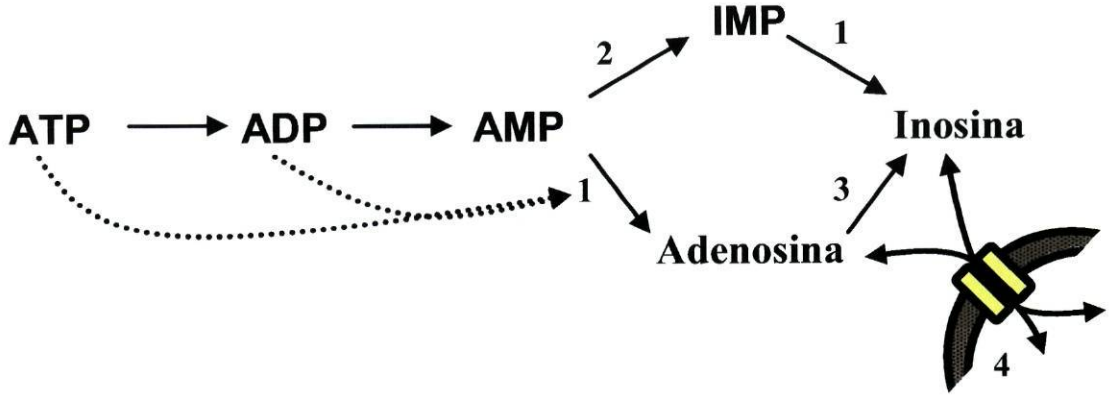


Figura 1.1 Representação esquemática da via metabólica extracelular dos nucleotideos de adenina na junção neuromuscular de rato: Mecanismos de inactivação da adenosina (adaptado de Magalhães-Cardoso *et al.*, 2003)
As linhas a tracejado representam a inibição da ecto-5'-nucleotidase, enquanto que as linhas a cheio representam a actividade enzimática mediada pelas enzimas identificadas pelos números: **1**, ecto-5'-nucleotidase; **2**, ecto-AMP desaminase; **3**, ecto-adenosina desaminase. O número **4** da figura representa os transportadores da adenosina presentes quer nos terminais nervosos quer nas fibras musculares.

A adenosina extracelular pode, ainda, ser originada a partir dos terminais nervosos, das células peri-sinápticas da glia e/ou das fibras musculares através da inversão do fluxo do transportador de nucleósidos (Cunha & Sebastião, 1993). Os níveis de adenosina na junção neuromuscular resultam do balanço entre a produção/libertação de adenosina e da actividade dos seus mecanismos de inactivação, recaptação celular e desaminação extracelular (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1996a) (Figura 1.1).

2.2 Receptores da Adenosina

A convergência de observações provenientes de estudos moleculares, bioquímicos e farmacológicos, resultaram na identificação de quatro subtipos de receptores da adenosina, dois receptores com elevada afinidade para a adenosina, A_1 e A_{2A}, e dois receptores de baixa afinidade para o nucleósido, A_{2B} e A_3 (Ralevic & Burnstock, 1998; Fredholm *et al.*, 2001).

Os receptores A_1 e A_2 foram inicialmente subdivididos com base na sua capacidade para inibir ou activar a adenilciclase, respectivamente (van Calker *et al.*, 1979). De facto, os receptores A_1 e A_2 encontram-se acoplados a proteínas G_i e G_s, respectivamente (Tabela 1.1). Apesar de algumas evidências apontarem para o acoplamento dos receptores da adenosina a outras proteínas G, a grande maioria dos resultados é proveniente de estudos de transfecção, sendo questionável se o acoplamento observado é ou não fisiologicamente relevante. Os receptores A_{2A} da adenosina parecem poder acoplar-se a outras proteínas G em diferentes tecidos (Kull *et al.*, 2000). No entanto, nos tecidos periféricos este subtipo dos receptores da adenosina encontra-se preferencialmente associado a proteínas do subtipo G_s. As respostas funcionais mediadas pela activação dos receptores da adenosina devem-se à modulação dos vários efectores moleculares envolvidos nas vias de transdução

de sinal ligadas a várias proteínas G (Tabela 1.1). Para além da inibição da adenilciclase, a activação dos receptores A_1 da adenosina pode estimular a fosfolipase C_β, aumentar o fluxo iónico dos canais de K^+ (provavelmente por via de subunidades $\beta\gamma$), e reduzir o influxo de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.2$ (tipo N) e $Ca_V2.1$ (tipo P/Q). A activação dos receptores A_{2A} estimula a actividade do sistema de transdução adenilciclase / AMPc. No entanto, estes receptores podem associar-se a outras acções como por exemplo a mobilização de cálcio intracelular e a activação da proteína cinase C. Na junção neuromuscular de rato, a facilitação da libertação de acetilcolina mediada pelos receptores A_{2A} da adenosina deve-se à activação da via de transdução adenilciclase/AMPc (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994a) e ao recrutamento de Ca^{2+} a partir dos reservatórios intracelulares e do meio extracelular (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Já os receptores A_1 da adenosina podem reduzir a libertação de ACh por inibição dos canais de Ca^{2+} $Ca_V2.2$ (tipo N), apesar destes canais não constituírem o local primário de influxo de Ca^{2+} nem contribuírem activamente para a libertação do neurotransmissor (Schwartz *et al.*, 2003). Esta acção não parece, por isso, ser a responsável pelo efeito inibitório da adenosina na junção neuromuscular. Estudos realizados por Silinsky (2004) mostraram que o efeito inibitório da adenosina na junção neuromuscular de mamíferos depende da sua acção ao nível da maquinaria exocitótica, nomeadamente por intermédio de proteínas do complexo SNARE como a proteína Rab3A (uma GTPase monomérica ancorada às vesículas sinápticas).

Os receptores da adenosina possuem uma distribuição tecidular distinta, podendo no entanto co-existir em diversos tipos celulares. A expressão de mais de um subtipo dos receptores da adenosina na mesma célula coloca questões relativamente à significância funcional da sua co-localização. Na junção neuromuscular (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b) e no canal deferente (Gonçalves & Queiroz, 1993) de rato a concentração de adenosina necessária para facilitar a libertação do neurotransmissor por intermédio da activação de

	A_1	A_{2A}	A_{2B}	A_3
Proteínas G Preferenciais				
	G_i G_o	G_i	G_s G_q	G_i G_q
Segundos Mensageiros				
	↓ AMPc ↑IP_3/DAG (FLC) ↑ Ácido Araquidónico ↓ Ca^{2+}	↑ AMPc	↑ AMPc ↑IP_3/DAG (FLC)	↓ AMPc ↑IP_3/DAG (FLC)
Respostas Funcionais				
	Bradicardia Inibição da Lipólise Redução da filtração Glomerular Anti-nocicepção Redução da actividade simpática e parassimpática Inibição pré-sináptica Hiperpolarização neuronal Pré-Condicionamento isquémico	Regulação da integração sensoriomotor no gânglio basal Inibição da agregação plaquetária e do polimorfismo leucocitário Vasodilatação Facilitação pré-sináptica Protecção contra a isquémia Estimulação da actividade sensitiva	Relaxamento do músculo liso da vasculatura e do intestino Inibição da função dos macrofagos e leucócitos Estimulação dos mastócitos	Aumento da libertação de mediadores pelos mastócitos Precondicionamento

Tabela 1.1. Respostas funcionais e acoplamento a proteínas G dos receptores da adenosina.

receptores A_{2A} é superior aquela que induz a inibição da libertação do neurotransmissor por activação dos receptores A_1. Como os níveis de adenosina na fenda sináptica estão directamente relacionados com a actividade neuronal (ver acima), esta pode ser um factor determinante na regulação da transmissão sináptica mediada pelos dois subtipos dos

receptores presentes naqueles tecidos. Esta relação está bem caracterizada na junção neuromuscular de rato, onde a intensidade e a frequência de estimulação nervosa e, consequentemente, a formação de adenosina endógena exercem um papel crucial na regulação da libertação de acetilcolina (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b).

2.3 Controlo da actividade sináptica

A adenosina faz parte integrante de um conjunto de substâncias que actuam como neuromoduladores, regulando a libertação de neurotransmissores, promovendo ou reprimindo a actividade de receptores para outros neuromediadores (neurotransmissores ou neuromoduladores), ou estabelecendo interacções ao nível dos processos mediados por segundos mensageiros intracelulares (proteínas G, AMPc, fosfatos de inositol, prostanóides e cálcio) (ver a revisão de Sebastião & Ribeiro, 2000). Genericamente, e em particular na junção neuromuscular de rato, a adenosina parece exercer um papel modulador da actividade dos outros neuromediadores, adaptando a eficácia da transmissão sináptica à actividade neuronal (Correia-de-Sá, 1994; Correia-de-Sá *et al.*, 1997).

Na junção neuromuscular, a adenosina modula a libertação de ACh através da activação de receptores pré-sinápticos inibitórios do subtipo A_1 e facilitatórios de subtipo A_{2A}, co-existentes nas terminações nervosas motoras (Correia-de-Sá *et al.*, 1991; Baxter *et al.*, 2005). O balanço da activação tónica destes receptores ligados ao sistema de transdução adenilciclase-AMP cíclico-PKA (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994a), depende da concentração de adenosina na sinapse e das condições de estimulação utilizadas. Com estímulos de baixa frequência e de duração curta (5 Hz, 40 μs), o efeito tónico inibitório mediado pelos receptores A_1 é predominante. Durante estímulos interpolados de elevada frequência ou de duração longa, observa-se uma acumulação de adenosina na fenda

sináptica, facto que favorece a activação tónica dos receptores facilitatórios do subtipo A_{2A} (Correia-de-Sá *et al.*, 1996a). A acumulação de adenosina deve-se principalmente ao aumento da sua formação a partir do ATP libertado pela via das ecto-5-nucleotidases (Cunha *et al.*, 1996), mas também à saturação dos seus mecanismos de inactivação (recaptação e desaminação) (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1996a). Funcionalmente, a adenosina parece actuar predominantemente como molécula sinalizadora inibitória durante o repouso, amplificando a eficácia da transmissão sináptica durante situações de intensa actividade neuromuscular.

2.4 Interacção com outros neuromediadores

Os rápidos avanços da investigação em neurobiologia têm revelado que o mecanismo de transmissão neuronal é mais complexo do que anteriormente se previra, podendo envolver dois ou mais neurotransmissores e/ou neuromoduladores libertados a partir do mesmo neurónio ou de terminações nervosas próximas. Esta noção, relativamente recente, tornou obsoleto o "principio de Dale" na sua definição inicial que postulava uma relação unívoca neurónio/neurotransmissor, *i.e.* cada fibra nervosa libertaria apenas um único neurotransmissor. A transmissão sináptica tal como é interpretada nos dias de hoje, depende da interacção simultânea de várias substâncias neuroactivas (ACh, péptidos, purinas, aminas, aminoácidos) com uma população heterogénea de receptores membranares específicos, cuja activação, estimula um ou mais mecanismos de sinalização intracelular mutuamente influenciáveis, desencadeando uma resposta biológica final cuja a amplitude é simultaneamente dependente do estado funcional da própria célula (ver Correia-de-Sá, 1994).

Através da sua interacção com outros neuromediadores, a adenosina parece desempenhar um papel fulcral na regulação da transmissão neuromuscular, "sincronizando" ou "dessincronizando" a activação de vários receptores para a ACh e neuropéptidos, sempre em sintonia com o balanço da sua própria actividade tónica sobre os receptores A_1 e A_{2A}. Durante estímulos de baixa frequência e de curta duração (5 Hz, 40 μs), o efeito tónico inibitório mediado pelos receptores A_1 da adenosina (Correia-de-Sá *et al.*, 1996a) coincide com a maior actividade facilitatória dos autoreceptores nicotínicos contendo subunidades α3β2 (Faria *et al.*, 2003). Aumentando a duração (> 500 μs) e a frequência (50 Hz) dos pulsos de estimulação nervosa, pode observar-se um reforço progressivo da actividade tónica mediada pelos receptores A_{2A} da adenosina. Simultaneamente a este facto, pode constatar-se uma redução da actividade nicotínica autofacilitatória (Timóteo *et al*, 2003) que é compensada pelo reforço do efeito excitatório dos neuropéptidos, CGRP e VIP (Correia-de-Sá *et al.*, 1997). Demonstrou-se experimentalmente que a activação dos receptores A_{2A} pela adenosina endógena reduzia a actividade dos autoreceptores nicotínicos porque acelerava a sua dessensibilização por um mecanismo dependente do AMP cíclico (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994b). Contrariamente, o efeito facilitador dos neuropéptidos, CGRP e VIP, sobre a libertação de acetilcolina é potenciado pela activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994c; Correia-de-Sá *et al.*, 2001). Estas observações sugerem que ligeiras modificações no balanço da activação dos receptores A_1/A_{2A}, desempenham um papel chave na adaptação do padrão de modulação (colinérgico de curta duração e peptidérgico mais duradoiro) à actividade neuronal.

Para além dos receptores pré-sinápticos peptidérgicos e nicotínicos (Wessler *et al.*, 1988; Vizi & Somogyi, 1989), a junção neuromuscular possui outro subtipo de receptores colinérgicos capazes de modular a libertação de ACh, os receptores muscarínicos. Neste

trabalho, será dado ênfase ao estudo da actividade dos receptores muscarínicos no controlo da libertação de acetilcolina na placa motora e também à avaliação da sua interacção com a adenosina.

3. Receptores Muscarínicos

Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos (M_1-M_5) expressos no tecido nervoso (Caulfield & Birsdall, 1998). As respostas funcionais mediadas pelos vários subtipos de receptores muscarínicos encontram-se esquematizadas na Tabela 1.2.

	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Proteínas G Preferenciais					
	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$
Segundos Mensageiros					
	↑ IP_3/DAG (FLC) ↑ Ca^{2+}	↓ AMPc	↑ IP_3/DAG (FLC) ↑ Ca^{2+}	↓ AMPc	↑ IP_3/DAG (FLC) ↑ Ca^{2+}
Respostas Funcionais					
	Inibição das correntes M Facilitação pré-sináptica	Activação de canais K^+ Inibição dos canais de Ca^{2+} Diminuição da força e taxa da contracção do músculo cardíaco Inibição pré-sináptica	Contracção do músculo liso Secreção glandular	Inibição das correntes de Ca^{2+}	?

Tabela 1.2. Respostas funcionais e acoplamento a proteínas G dos receptores muscarínicos.

Apesar de existirem evidências claras da capacidade dos receptores muscarínicos pré-sinápticos em modular a libertação de neurotransmissores no sistema nervoso autónomo (*e.g.* Muscholl, 1979), o papel dos autoreceptores muscarínicos nas terminações nervosas motoras tem sido algo controverso (ver Somogyi *et al.*, 1987; Wessler *et al.*,

1988). A existência de mecanismos muscarínicos antagónicos (positivos e negativos) no controlo da transmissão neuromuscular e a falta de selectividade da maioria dos agonistas e antagonistas dos receptores muscarínicos disponíveis, tem tornado bastante complexa a caracterização funcional destes receptores na regulação da libertação de ACh (ver *e.g.* Ganguly & Das, 1979; Gundersen & Jenden, 1980; Abbs & Joseph, 1981; Wessler *et al.*, 1988, Vizi & Somogyi, 1989). A co-expressão de diferentes subtipos de receptores com actividade funcional síncrona dá geralmente origem a comportamentos farmacológicos pouco claros que poderão depender de interacções ao nível das vias de sinalização intracelular. O consenso na interpretação dos resultados que visam esclarecer a actividade dos autoreceptores muscarínicos parece depender de vários factores, tais como, (1) da heterogeneidade de receptores muscarínicos (M_1-facilitatórios e M_2-inibitórios) co-localizados nas terminações nervosas (Wessler *et al.*, 1987; Alves-do-Prado & Prado, 1993), (2) das condições de estimulação nervosa (*e.g.* frequência, largura dos pulsos e duração do período de estimulação), observando-se um efeito predominantemente inibitório durante estímulos de curta duração (100 pulsos), contrastando com o fenómeno de autofacilitação observado durante estímulos mais prolongados (1500 pulsos) (Wessler *et al.*, 1988), (3) da interacção com autoreceptores nicotínicos facilitatórios, cuja activação pela ACh libertada atenua o efeito inibitório mediado pelos receptores muscarínicos (Vizi & Somogyi, 1989). De facto, o estudo da actividade dos autoreceptores muscarínicos e da sua interacção com outros receptores pré-sinápticos (*e.g.* nicotínicos e peptidérgicos) na junção neuromuscular tem sido dificultada, em parte, por falta de sintonia metodológica (Wessler *et al.*, 1988, Vizi & Somogyi, 1989; Halmiton & Smith, 1991). De entre as manipulações experimentais mais frequentes salientam-se, as variações (1) no padrão de estimulação nervosa como referido anteriormente e/ou (2) nos níveis de libertação de ACh (*e.g.* redução do conteúdo quântico nas experiências de electrofisiologia, introdução de

inibidores da colinesterase nas abordagens neuroquímicas). Adicionalmente, esta controvérsia pode também dever-se ao facto de nenhum dos autores ter equacionado previamente a possibilidade da existência de uma interacção entre os níveis de adenosina produzidos pela actividade nervosa e o nível de actividade dos receptores muscarínicos, tal como foi explorada neste trabalho.

Na tentativa de solucionar o problema da falta de selectividade dos agentes farmacológicos e da farmacologia pouco claro resultante da co-expressão de vários receptores muscarínicos na mesma população celular, existem diversos estudos onde se associaram várias metodologias bioquímicas e, também, com recurso à biologia molecular aplicadas ao estudo dos receptores muscarínicos. Métodos envolvendo ratinhos "knockout" e técnicas de isolamento de receptores (*e.g.* inactivação selectiva de outras populações de receptores) têm sido utilizadas na determinação da função biológica dos receptores muscarínicos neuronais. Por outro lado, estudos de imunoprecipitação usando anticorpos selectivos para os vários subtipos de receptores e a determinação da expressão do RNA mensageiro (mRNA) por reacção em cadeia da polimerase e da transcriptase reversa (RT-PCR) têm sido utilizados no estudo da localização destes receptores nos vários tecidos. No entanto, apesar da presença de mRNA específico ou a imunoreactividade para um determinado subtipo de receptor muscarínico reforçar as evidências farmacológicas para a demonstração da sua resposta funcional, a falta de evidências moleculares não é suficiente para rejeitar as observações resultantes da caracterização farmacológia. Sendo assim, a caracterização farmacológica dos subtipos de receptores muscarínicos continua a ter um papel fundamental no estudo destes receptores. O estudo de vários agonistas e a determinação do perfil de antagonistas permite discriminar os vários subtipos de receptores muscarínicos envolvidos numa determinada resposta funcional (ver tabela 1.3).

	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Antagonistas					
Atropina	9.0-9.7	9.0-9.3	8.9-9.8	9.1-9.6	8.9-9.7
Pirenzepina	7.8-8.5	6.3-6.7	6.7-7.1	7.1-8.1	6.2-7.1
4-DAMP	8.6-9.2	7.8-8.4	8.9-9.3	8.4-9.4	8.9-9.0
AF-DX 384	7.3-7.5	8.2-9.0	7.2-7.8	8.0-8.7	6.3
MT3	7.1	<6	<6	8.7	<6
MT7	9.8	<6	<6	<6	<6

Tabela 1.3. Logaritmo dos valores das constantes de afinidade (pK_B) dos antagonistas para os receptores muscarínicos (adaptado de Caulfield & Birdsall, 1998).

Os receptores muscarínicos com numeração ímpar (M_1, M_3, M_5) estão acoplados por intermédio de uma proteína $G_{q/11}$ à fosfolipase C (isoforma β), enquanto os receptores com numeração par (M_2, M_4) activam a subunidade $G_{i/0}$ inibindo a actividade da adenilciclase (ver as revisões de Caulfield & Birdsall, 1998; Lanzafame *et al.*, 2003) (ver tabela 1.2). Algumas respostas funcionais mediadas pelas vias de acoplamento atrás mencionadas resultam na interacção com alguns efectores moleculares dos quais se salientam os canais de Ca^{2+} e os canais de K^+. Na literatura, para além da controvérsia na caracterização dos receptores muscarínicos na placa motora as informações relativas ao mecanismos efectores envolvidos nas respostas funcionais nesta preparação são praticamente inexistentes.

4. Papel do Ca^{2+} na transmissão neuromuscular

4.1 Papel do Ca^{2+} na libertação de ACh

A ACh está armazenada em vesículas sinápticas que se encontram concentradas próximo das zonas de libertação – **zonas activas** (Katz, 1966). Nesta região, a densidade de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes da voltagem é significativamente superior

comparativamente com outras zonas do terminal nervoso pré-sináptico (Augustine *et al.*, 1991; Smith & Augustine, 1988). A concentração dos canais de Ca^{2+} nas zonas activas permite que a concentração de Ca^{2+} local aumente rapidamente de 100 para 1000 μM junto aos locais onde ocorre a fusão das vesículas sinápticas (Augustine *et al.*, 1991; Smith & Augustine, 1988). A fusão das vesículas sinápticas com a membrana dos terminais pré-sinápticos pode ser contrariada pelas forças electroestáticas devido à polaridade semelhante das superfícies das membranas do terminal nervoso e das vesículas sinápticas. O Ca^{2+}, por ligação às superfícies membranares, pode neutralizar as cargas negativas superficiais e, assim, favorecer a exocitose vesicular (Niles & Cohen, 1991). Outros aspectos importantes que justificam o papel crucial do cálcio na libertação do neurotransmissor são (a) a abertura de canais catiónicos activados pelo Ca^{2+} em que a entrada de catiões pode reduzir as cargas negativas superficiais nas membranas das vesículas e do terminal (Ehrenstein *et al.*, 1991), (b) a indução de alterações conformacionais em moléculas que permitem a libertação das vesículas sinápticas do citoesqueleto e a sua participação na fusão das membranas (Vincent, 2001). As moléculas envolvidas neste processo são proteínas vesiculares (sinaptobrevina, sinaptofisina, sinaptotagamina, sinapsina, Rab 3 e 5) (Perin *et al.*, 1990; Perin *et al.*, 1991) e membranares (sintaxina, SNAP-25) (Zimmerberg *et al.*, 1991).

Apesar da libertação provocada do neurotransmissor depender predominantemente do influxo de Ca^{2+} através dos canais dependentes da voltagem, a mobilização das reservas intracelulares de Ca^{2+} parece também desempenhar um papel fisiologicamente importante durante estímulos de elevada frequência ou quando as terminações nervosas motoras são submetidas a um processo de despolarização focal (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). O recrutamento de reservas intracelulares constitui uma via mobilizadora de Ca^{2+} alternativa

capaz de induzir a libertação de neurotransmissores durante estimulos prolongados na ausência extracelular de Ca^{2+} ou quando os canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem estão bloqueados (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a; Hong *et al.*, 1996; Smith & Cunnane, 1996).

4.2 Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem: Modulação da transmissão neuromuscular

Os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (**CCSVs**) foram identificados pela primeira vez por Fatt e Katz (1953). Inicialmente postulou-se a existência de apenas um tipo de canais de Ca^{2+}. No entanto, o trabalho pioneiro de Hagiwara e colaboradores (1975) mostrou a existência de mais de um tipo de correntes de cálcio na membrana celular dos óvulos da estrela-do-mar. Os diferentes canais foram entretanto caracterizados tendo por base a sua conductância para o Ca^{2+} e a sua voltagem de activação. Assim, os canais de Ca^{2+} cujo limiar de activação é ligeiramente inferior ao potencial de repouso são designados por **canais activados por voltagens baixas** (*Low voltage activated channels*, **LVA),** enquanto aqueles cujo limiar de activação é substancialmente superior ao potencial de repouso são designados por **canais activados por voltagens elevadas** (*High voltage activated channels*, **HVA)**. Para além da caracterização electrofisiológica, a investigação sobre o funcionamento dos diversos canais de cálcio existentes nos organismos vivos tem beneficiado da descoberta de fármacos e de inúmeras toxinas de origem animal (*e.g.* caracóis marinhos, aracnídios, etc.) com actividade bloqueadora altamente selectiva para os diversos subtipos de canais (Tabela 1.3) (ver Duarte-Araújo, 2004).

As dihidropiridinas bloqueiam a actividade dos canais HVA (Hess *et al.*, 1984) mas não a dos canais LVA (Bean, 1985). No entanto, existem alguns tipos de canais HVA que são insensíveis às dihidropiridinas (Carbone & Lux, 1984), levando à subdivisão dos canais

HVA em sensíveis, designados por canais do tipo L (Ca_V1), e insensíveis às dihidropiridinas, designados por canais do tipo N ($Ca_V2.2$), P/Q ($Ca_V2.1$) e R ($Ca_V2.3$). A procura de um inibidor para os canais do tipo N ($Ca_V2.2$) levou à descoberta de uma toxina do caracol marinho *Conus geographus*, a ω-conotoxina GVIA (McCormack *et al.*, 1990). Um outro canal do tipo HVA, encontrado originalmente nas células Purkinje (Cherkesy *et al.*, 1991) e, por isso designado por canal do tipo P ($Ca_V2.1$), pode ser inibido pela toxina da aranha com a teia em forma de funil, ω-agatoxina IVA ou pelo péptido FTX (Mintz, 1992). A diferença de sensibilidade dos canais para a agatoxina, mostrou a existência de outro tipo de canais HVA, o canal do tipo Q ($Ca_V2.1$) (Sather *et al*, 1993; Zhang *et al.*, 1993). No entanto a distinção entre os canais do tipo P e Q nem sempre é evidente, como tal eles são frequentemente agrupados e referidos como os canais do tipo P/Q ($Ca_V2.1$). A aplicação de uma mistura de todos os inibidores referidos anteriormente, mostrou uma actividade residual dos canais de cálcio, levando à hipótese da existência de canais do tipo R. A voltagem de activação destes canais encontra-se entre o limiar de activação dos canais HVA e dos LVA; os canais R podem ser bloqueados não selectivamente pelo níquel (Zhang *et al.*, 1993). Em 2000, uma nova nomenclatura para os canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem foi adoptada. Os canais de Ca^{2+} foram designados usando o símbolo químico do principal ião para o qual o canal é selectivo (**Ca**) e o principal regulador fisiológico da sua actividade em índice (**Voltagem**) ($\mathbf{Ca_V}$). Seguidamente, o identificador numérico corresponde ao gene que codifica a subfamilia da subunidade α_1 (1 a 3 até ao presente) e a ordem de descoberta da subunidade α_1 dentro da sua subfamilia (1 a n). A correspondência entre a antiga e a nova nomenclatura dos canais de Ca^{2+}, a sua localização e as respostas funcionais a eles associadas encontram-se representadas na Tabela 1.3.

Canais	Correntes	Bloqueadores Selectivos	Localização	Funções Celulares
$Ca_V1.1$	L	Dihidropiridinas (e.g. nifedipina) Verapamil	Músculo-esquelético	Acoplamento excitação-contracção
$Ca_V1.2$	L	Dihidropiridinas (e.g. nifedipina) Verapamil	Miócitos Cardíacos Células Endócrinas Corpo Celular Neuronal Dendrites Próximais	Acoplamento excitação-contracção Libertação de hormonas Regulação da transcrição Integração Sináptica
$Ca_V1.3$	L	Verapamil Menos sensível às dihidropiridinas	Células endócrinas Corpo celular das dendrites	Libertação de Hormonas Regulação da transcrição Integração Sináptica
$Ca_V1.4$	L	Menos sensível às dihidropiridinas	Retina	Libertação de neurotransmissores
$Ca_V2.1$	P/Q	ω-Agatoxina IVA ω-Agatoxina IVB ω-Conotoxina MVIIC	Terminais Nervosos Dendrites	Libertação de neurotransmissores Libertação de Hormonas
$Ca_V2.2$	N	ω-Conotoxina GVIA ω-Conotoxina MVIIC	Corpo Celular Neuronal Dendrites	Libertação de neurotransmissores
$Ca_V2.3$	R	SNX-482* Níquel (conc. elevadas)	Corpo Celular Neuronal Dendrites Miócitos Cardiacos	Estimulação repetitiva
$Ca_V3.1$	T	Mibefradil Níquel (baixa sensibilidade) SB-209712	Corpo Celular Neuronal Dendrites Miócitos Cardiacos	Estimulação repetitiva
$Ca_V3.2$	T	Mibefradil Níquel (elevada sensibilidade) SB-209712	Corpo Celular Neuronal Dendrites Miócitos Cardiacos	Estimulação repetitiva
$Ca_V3.3$	T	Mibefradil Níquel (baixa sensibilidade) SB-209712	Corpo Celular Neuronal Dendrites Miócitos Cardiacos	Estimulação repetitiva

Tabela 1.3. Localização e respostas funcionais dos canais de cálcio sensíveis à voltagem.
(adaptado de Catterall *et al.*, 2005) *SNX482 poderá não ser completamente específico (Alexander *et al.*, 2005

Nas terminações nervosas motoras de rato, demonstrou-se a co-localização de vários subtipos de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem capazes de actuarem sinergicamente para causarem a libertação do neurotransmissor (Takahashi & Momiyama, 1993; Wheeler *et al.*, 1994). A predominância dos efeitos de cada subtipo de canal depende de diferenças de localização, propriedades biofísicas, mecanismos de inactivação, cooperatividade e sensibilidade às substâncias moduladoras (Tsien *et al.*, 1988; Tareilus & Breer, 1995). Na placa motora de mamíferos adultos, a exocitose das vesículas sinápticas é principalmente regulada pelos canais de cálcio $Ca_V2.1$ (tipo P) (*e.g.* Atchison, 1989; Protti & Uchitel, 1993; Wessler *et al.*, 1990; Correia-de-Sá *et al.*, 2000a) localizados na zona activa dos terminais nervosos pré-sinápticos (Stanley, 1997) enquanto que nos anfíbios parece ser regulada pelos canais $Ca_V2.2$ (tipo N) (Searl & Silinsky, 2000). Este facto pode dever-se à variação existente entre as duas espécies no que diz respeito ao acoplamento entre os canais de Ca^{2+} e a maquinaria exocitica.

A contribuição do influxo de Ca^{2+} pelos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) desempenha um papel preponderante durante estímulos de baixa frequência e de curta duração (Miller, 1987; Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). No entanto, o influxo de Ca^{2+} através destes canais diminui drasticamente durante estímulos prolongados ou de elevada intensidade devido à sua inactivação operada pelo influxo deste ião (Luebke *et al.*, 1993). Contrariamente, os canais de Ca^{2+} Ca_V1 (tipo L) que apresentam elevada condutância iónica e cuja localização é mais distante dos locais activos, geralmente não participam no processo de libertação podendo eventualmente estar envolvidos na integração da actividade sináptica repetida ou duradoira (Tsien *et al.*, 1988; Robitaille *et al.*, 1990). Recentemente, foi demonstrado que a despolarização intensa ou prolongada das terminações nervosas motoras causava o influxo de Ca^{2+} por canais de cálcio Ca_V1 (tipo L) e que estes canais podem actuar sinergicamente com o recrutamento de Ca^{2+} das reservas intracelulares sensíveis à tapsigargina para

promover a libertação de acetilcolina (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Nestas circunstâncias poderá ocorrer a abertura sincronizada de ambos os canais de Ca^{2+} (Ca_V1 e 2.1) dando origem a um gradiente espaciotemporal na proximidade da sua localização capaz de induzir a exocitose do neurotransmissor. Esta situação promove a inactivação dos canais $Ca_V2.1$ dependentes do Ca^{2+} (Luebke *et al.*, 1993) favorecendo o influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) (Hong *et al.*, 1995). O favorecimento do influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) poderá dever-se à sua localização afastada das zonas activas (Tsien *et al.*, 1988; Robitaille *et al.*, 1990), a sua inactivação lenta e à sua condutância elevada que permite a saturação dos tampões intraterminais que limitam a difusibilidade do Ca^{2+} para junto da maquinaria exocitótica (ver a revisão de Tareilus & Breer, 1995). Estes atributos contribuem para a facilitação da libertação de ACh nos terminais nervosos de rato. O significado fisiopatológico das correntes de cálcio do tipo Ca_V1 (tipo L) tem sido difícil de demonstrar. Estas correntes parecem desempenhar um papel fisiologicamente importante no restabelecimento da transmissão neuromuscular (1) durante o desenvolvimento e a re-inervação da placa motora após desnervação, quando os canais de cálcio $Ca_V2.1$ (tipo P) estão funcionalmente imaturos (Katz *et al.*, 1995; Sugiura & Ko, 1997), (2) durante a recuperação funcional após envenenamento pela toxina botulínica do tipo A (Santafé *et al.*, 2000) e (3) na miastenia de Lambert-Eaton, onde os canais do tipo Ca_V1 disponíveis podem ser activados devido à estimulação repetida do nervo motor para compensar a perda das correntes de cálcio do tipo $Ca_V2.1$ (Garcia & Beam, 1996).

A compreensão do mecanismo regulador do influxo de cálcio pelos canais neuronais do tipo Ca_V1 e $Ca_V2.1$ em diversas condições de estimulação, bem como da sensibilidade de diferentes CCSVs aos moduladores endógenos, pode ser clinicamente relevante para aumentar a margem de segurança da junção neuromuscular.

5. Objectivos do presente trabalho

O presente trabalho foi delineado para averiguar como é que a actividade tónica dos receptores inibitórios A_1 e facilitatórios A_{2A} da adenosina poderia influenciar alguns dos mecanismos celulares envolvidos na regulação da transmissão neuromuscular, nomeadamente o influxo adicional de Ca^{2+} extracelular por intermédio do recrutamento de CCSVs que não estejam directamente envolvidos no fenómeno exocitótico e a interacção com autoreceptores muscarínicos co-existentes nas terminações nervosas motoras.

Na literatura existe alguma controvérsia sobre o papel predominante dos auto-receptores muscarinicos M_1-facilitatórios e M_2-inibitórios co-expressos nas terminações nervosas motoras, derivada das diferenças no seu perfil farmacológico e do seu modo de activação em função do padrão de estimulação utilizado (Somogyi *et al.*, 1987; Wessler *et al.*, 1988; revisto por Re, 1999). Esta controvérsia encontra paralelo na forma como a adenosina produzida endogenamente durante a estimulação nervosa eléctrica exerce o seu papel regulador da libertação de ACh. Foi demonstrado que o balanço da activação tónica dos receptores A_1-inibitório / A_{2A}-facilitatório depende do padrão de disparo neuronal (Correia-de-Sá *et al.*, 1996). Assim, pareceu-nos interessante reavaliar o papel dos autoreceptores muscarínicos descritos (M_1 e M_2) no controlo da libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras em circunstâncias onde predomina a acção tónica inibitória (A_1) da adenosina (*e.g.* pulsos de baixa frequência) ou durante períodos de estimulação nervosa mais intensa / frequente onde se demonstrou a actividade preferencial dos receptores facilitatórios do subtipo A_{2A}. A complexidade na avaliação da modulação muscarínica pode, ainda, ser exacerbada por uma possível interacção com receptores nicotínicos pré-sinápticos (Vizi & Somogyi, 1989), razão pela qual esta interacção foi explorada.

No decorrer deste estudo, observou-se que a activação diferencial dos receptores M_1 e M_2 depende do padrão de estimulação nervosa e, consequentemente, da interacção com a adenosina através da activação dos receptores A_1 e A_{2A}. Como tal, pareceu-nos interessante averiguar se a regulação negativa da actividade muscarínica M_2 e purinérgica A_{2A} resultante da activação de receptores M_1 pela ACh libertada no início do período de estimulação nervosa poderia dever-se à interacção ao nível dos mecanismos efectores e/ou da produção de segundos mensageiros intracelulares. Para tal explorou-se o ciclo dos fosfatos de inositol e à activação da cascata de sinalização da PKC tendo em consideração que a estimulação destas vias poderia ser secundária à activação dos receptores M_1 (Somogi *et al.*, , Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Em simultâneo, avaliou-se a via adenilciclase/ AMP cíclico em virtude desta poder ser modulada positiva ou negativamente através da activação de receptores A_{2A} e M_2, respectivamente. Devido à complexidade anatómica da junção neuromuscular dos mamíferos é difícil realizar estudos bioquímicos para avaliar a produção de segundos mensageiros intracelulares no interior das terminações nervosas motoras sem que haja contaminação por parte do metabolismo muscular cuja massa é muito maior. Assim, os resultados apresentados baseiam-se em manipulações farmacológicas de cada uma das vias de sinalização intracelular usando vários compostos moderadamente selectivos para cada um dos mecanismos.

À semelhança do que acontece com a expressão de inúmeros receptores nas terminações nervosas motoras, estas estruturas exibem vários subtipos de canais de cálcio dependentes da voltagem capazes de actuarem sinergicamente para controlar a exocitose do neurotransmissor (Takahashi & Momiyama, 1993; Wheeler *et al.*, 1994). Esta constatação abre perspectivas para a regulação diferencial do fenómeno exocitótico através da manipulação dos influxos de Ca^{2+} veiculados por determinado subtipo de canais. Sabe-se que as correntes "facilitatórias" de Ca^{2+}, que estão normalmente quiescentes e só se

tornam evidentes durante períodos de estimulação intensa ou repetida, são diferentes das correntes necessárias à exocitose do neurotransmissor durante períodos de estimulação breve e de moderada intensidade (*cf.* Artalejo *et al.*, 1992). Na junção neuromuscular dos mamíferos, a exocitose da ACh depende normalmente do influxo de Ca^{2+} através dos canais $Ca_V2.1$ (*e.g.* Atchinson, 1989; Protti & Uchitel, 1993; Wessler *et al.*, 1995; Correia-de-Sá *et al.*, 2000a) localizados junto da zona activa de libertação (Stanley, 1997). Contrariamente, os canais Ca_V1 (tipo L), presumivelmente localizados fora das zonas activas de libertação, não participam habitualmente nos fenómenos exocitóticos mas têm importância na plasticidade sináptica (Tsien *et al*, 1988; Robitaille *et al.*, 1990). Recentemente, demonstrou-se que o influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 de elevada capacidade e inactivação lenta (tipo L) contribuía para a facilitação da libertação de ACh causada pela estimulação eléctrica das terminações nervosas motoras do frénico de rato (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a; ver também Urbano & Uchitel, 1999). A compreensão da regulação do transporte de Ca^{2+} através dos vários subtipos de canais (*e.g.* P e L) co-existentes nas terminações nervosas motoras durante a estimulação neuronal, bem como a sua sensibilidade a diferentes moduladores da actividade sináptica, pode ter importância clínica para aumentar a margem de segurança da transmissão neuromuscular em algumas situações patológicas (e.g. re-inervação, intoxicação por toxina botulínica, síndromes miasténicos). A adenosina formada endogenamente durante o disparo neuronal é um dos mediadores capazes de ajustar o padrão da transmissão neuromuscular às condições de estimulação nervosa (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b), sendo por isso candidata a desempenhar um papel regulador do influxo de Ca^{2+} através da membrana pré-sináptica. Neste trabalho, investigou-se a influência da adenosina endógena sobre o recrutamento de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.1$ ("prevalentes", do tipo P) e/ou Ca_V1 ("silenciosos", do tipo L) num modelo de depressão tetânica da libertação do neurotransmissor.

O bloqueio dos canais Ca_V1 (tipo L) pode atenuar a facilitação da libertação de ACh induzida pela activação dos receptores neuronais M_1 e A_{2A} (Somogyi *et al.*, 1996; Correia-de-Sá *et al*, 2000b). A actividade dos canais de Ca^{2+} pré-sinápticos pode ser modulada por uma via circunscrita à membrana envolvendo as proteínas G, como também pela activação de moléculas mensageiras citoplasmáticas. Foi demonstrado que elevados níveis intracelulares de AMP cíclico aumentam a probabilidade de abertura, diminuem a inactivação, e favorecem o recrutamento de canais Ca_V1 (tipo L) (revisto por Carbonne *et al.*, 2001). A fosforilação pela PKC pode aumentar a libertação quântica de ACh por abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L nos terminais nervosos de rã para potenciais de repouso (Arenson & Evans, 2001). Estas evidências instigaram-nos a estudar se a interacção negativa entre os receptores M_1 e A_{2A} poderia resultar da competição do influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) com o objectivo de impedir o excesso de libertação do neurotransmissor durante uma activação sincronizada dos receptores pré-sinápticos facilitatórios.

CAPÍTULO 2 – Material e Métodos

A libertação de acetilcolina endógena a partir de terminações nervosas estimuladas electricamente pode ser avaliada (1) directamente, quantificando directamente do neurotransmissor libertado para o líquido de perfusão por métodos bioquímicos e/ou (2) indirectamente, através de técnicas electrofisiológicas.

A quantificação de ACh por métodos indirectos baseia-se na resposta da célula pós-sináptica induzida pela libertação do neurotransmissor, sendo então avaliados potenciais bioeléctricos na fibra muscular a partir dos quais se pode estimar os níveis de libertação do neurotransmissor calculando o conteúdo quântico desses potenciais. As técnicas electrofisiológicas apresentam resolução temporal e espacial elevadas, *i.e*, a libertação da acetilcolina pode ser detectada em milisegundos e o efeito resultante de uma quantidade muito reduzida de neurotransmissor endógeno libertado ($\sim 10^{-20}$ mol) por apenas uma terminação nervosa pode ser avaliado. No entanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens: não pode ser determinada a natureza química do neurotransmissor, a quantificação do neurotransmissor é avaliada indirectamente pela resposta da célula pós-sináptica, e podem ser introduzidas alterações na libertação do neurotransmissor devido ao uso de fármacos que reduzem a margem de segurança da transmissão (concentrações elevadas de Mg^{2+}; *d*-tubocurarina).

A quantificação directa da acetilcolina pode ser avaliada directamente por análise química; bioensaio ou radioisotopicamente após a marcação da acetilcolina com um isótopo radioactivo. Este tipo de metodologias apresenta vantagens relativamente às técnicas electrofisiológicas: A quantificação da libertação do neurotransmissor baseia-se exclusivamente na resposta da célula pré-sináptica e a natureza química do

neurotransmissor pode ser identificada. No entanto, apesar das vantagens estas metodologias possuem uma resolução temporal (ao minuto) e espacial baixas, isto é para se obterem níveis de neurotransmissor mensuráveis é necessário recorrer a estimulações de frequência igual ou superior a 5 Hz, sendo também necessário adicionar-se ao meio de incubação inibidores da acetilcolinesterase ou da recaptação de colina para que os níveis de libertação sejam mensuráveis. A aplicação de inibidores da actividade colinesterásica do tecido, favorece a acumulação do neurotransmissor ACh na fenda sináptica, podendo originar potenciais nervosos antidrómicos (ver Miyamoto, 1978) e a activação de autoreceptores pré-sinápticos nicotínicos e muscarínicos (Wessler, 1989). A activação de mecanismos facilitatórios ou inibitórios pode levar a uma sobre- ou subvalorização, respectivamente, da quantidade de acetilcolina libertada durante cada período de estímulo, podendo este artefacto experimental complicar a interpretação dos resultados quando se investiga os mecanismos pré-sinápticos envolvidos na modulação da libertação provocada de acetilcolina.

Os estudos electrofisiológicos não parecem ser os mais indicados para avaliar os níveis de libertação do neurotransmissor induzidos por estimulações de elevada frequência (5-50 Hz), porque a variabilidade verificada ao longo do tempo na amplitude dos potenciais de placa motora é significativamente exacerbada em situações de aumento da frequência de estimulação (> 1 Hz), e como tal estes estudos são geralmente realizados calculando a média das amplitudes de *n* potenciais de placa provocados por estimulações eléctricas de baixa frequência (0.2-0.5 Hz). No presente trabalho, o efeito modulador da adenosina dos mecanismos reguladores pré-sinápticos da libertação de ACh na junção neuromuscular provocada por frequências de estimulação que variaram entre 5-50 Hz foi avaliado, utilizando uma técnica radioisotópica para quantificar a libertação de ACh na ausência de inibidores da acetilcolinesterase.

Descrição Metodológica

As experiências foram realizadas simultaneamente em 4 preparações do nervo frénico hemidiafragma esquerdo retiradas de ratos (150-200g) de ambos os sexos da estirpe Wistar (Charles River, Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos a uma temperatura constante (21°C), com ciclo regular de luminosidade (06.30-19.30) / obscuridade (19.30-06.30 horas), com água e comida *ad libitum*). O maneio animal e os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS).

Preparação do hemidiafragma inervado de rato

Após o sacrifício do animal por deslocamento cervical seguido de ex-sanguinação por secção bilateral das carótidas, procedeu-se à toracotomia que permitiu a identificação e dissecção do nervo frénico esquerdo até à sua inserção no hemidiafragma homolateral (Figura 2.1, A e B). Antes de penetrar no músculo o nervo frénico divide-se, e as suas ramificações formam uma linha nacarada (rica em placas motoras) a meia distância entre a inserção costal do diafragma e o centro frénico de origem tendinosa. A pleura parietal que reveste o hemidiafragma e que reflete sobre o nervo frénico foi cuidadosamente descolada e retirada (Figura 2.1, C), para eliminar a barreira física à difusão do neurotransmissor para a solução de incubação que posteriormente irá ser quantificada. Estes procedimentos foram executados rapidamente, enquanto se verificavam as contracções cardíacas reflexas *post mortem,* sempre na presença da preparação humedecida pela solução fisiológica Tyrode (NaCl: 137 mM, KCl: 2.7 mM, $CaCl_2$: 1.8 mM, $MgCl_2$: 1 mM, NaH_2PO_4: 0.4 mM,$NaHCO_3$: 11.9 mM, glucose: 11.2 mM e colina: 0.001 mM, pH=7.4) aquecida a 37°C

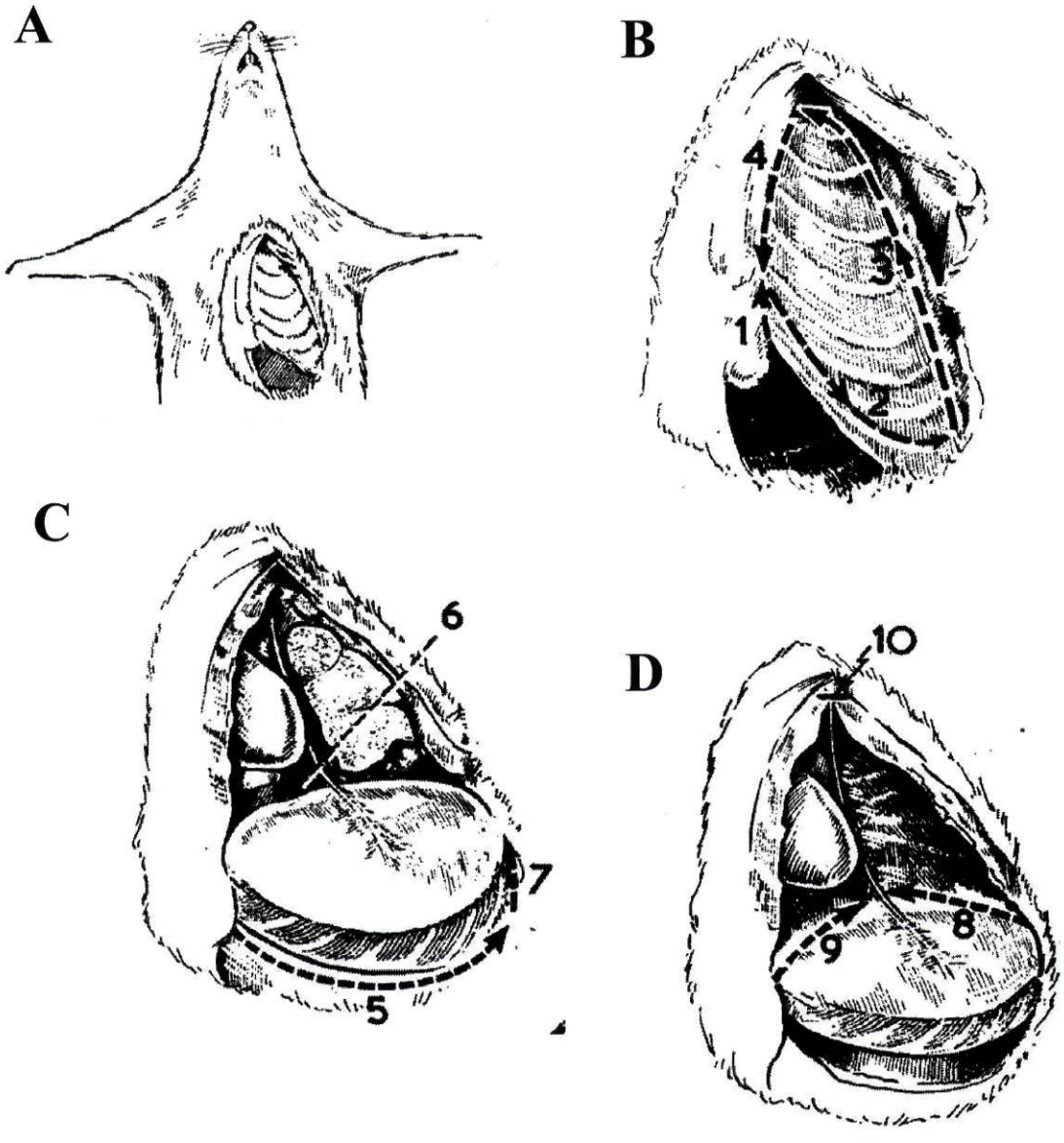


Figura 2.1: Esquema representativo do processo de dissecção do nervo frénico-hemidiafragma inervado de rato.

A) Incisão na região toráxica
B) Remoção da região costelar
C) Remoção da pleura parietal
D) Isolamento do nervo frénico e do diafragma inervado de rato.

e previamente oxigenada com uma mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2, no sentido de minimizar as lesões celulares devido à hipoxia e desidratação.

O conjunto nervo frénico-hemidiafragma foi então colocado numa câmara de dissecção contendo uma solução fisiológica Tyrode oxigenada (Fig. 2.2, A), onde se isolou por corte tangencial ao sentido das fibras musculares, a porção diafragmática mais rica em terminações nervosas (Fig. 2.2, B e C), localizada 3-4 mm para cada lado da inserção nervosa. As preparações foram colocadas nos banhos de órgãos, correspondentes à **técnica de libertação de [^{3}H]-ACh** ou de **registos miográgicos**. A temperatura de 37ºC utilizada em todo o desenrolar experimental foi mantida constante por meio de um dispositivo de circulação de água a partir de um banho termostatizado, o qual serviu igualmente para aquecer previamente as soluções de perfusão. As preparações foram perfundidas (3 mL/min) com o auxilio de uma bomba peristáltica (Gilson, modelo Miniplus II) com a solução fisiológica Tyrode com a composição descrita anteriormente.

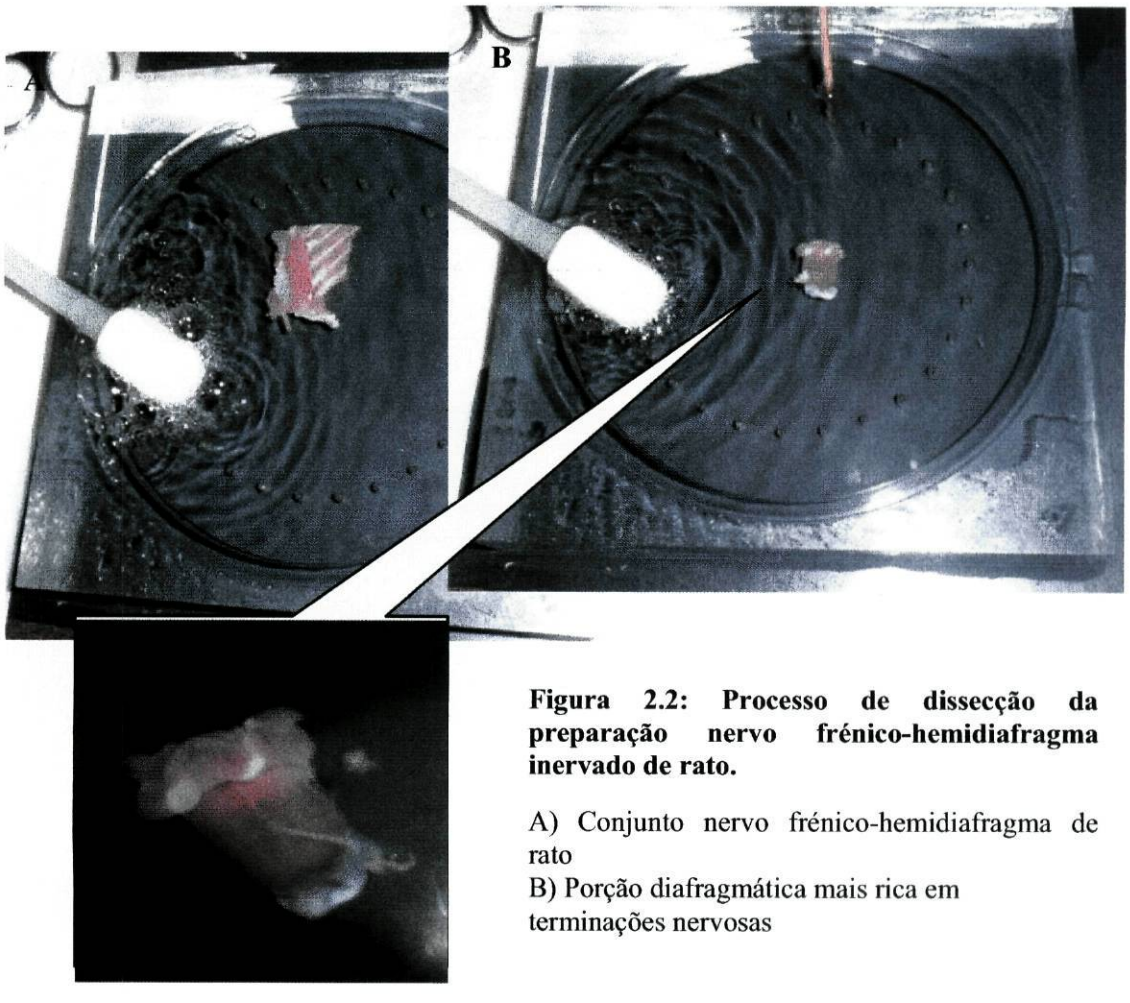


Figura 2.2: Processo de dissecção da preparação nervo frénico-hemidiafragma inervado de rato.

A) Conjunto nervo frénico-hemidiafragma de rato
B) Porção diafragmática mais rica em terminações nervosas

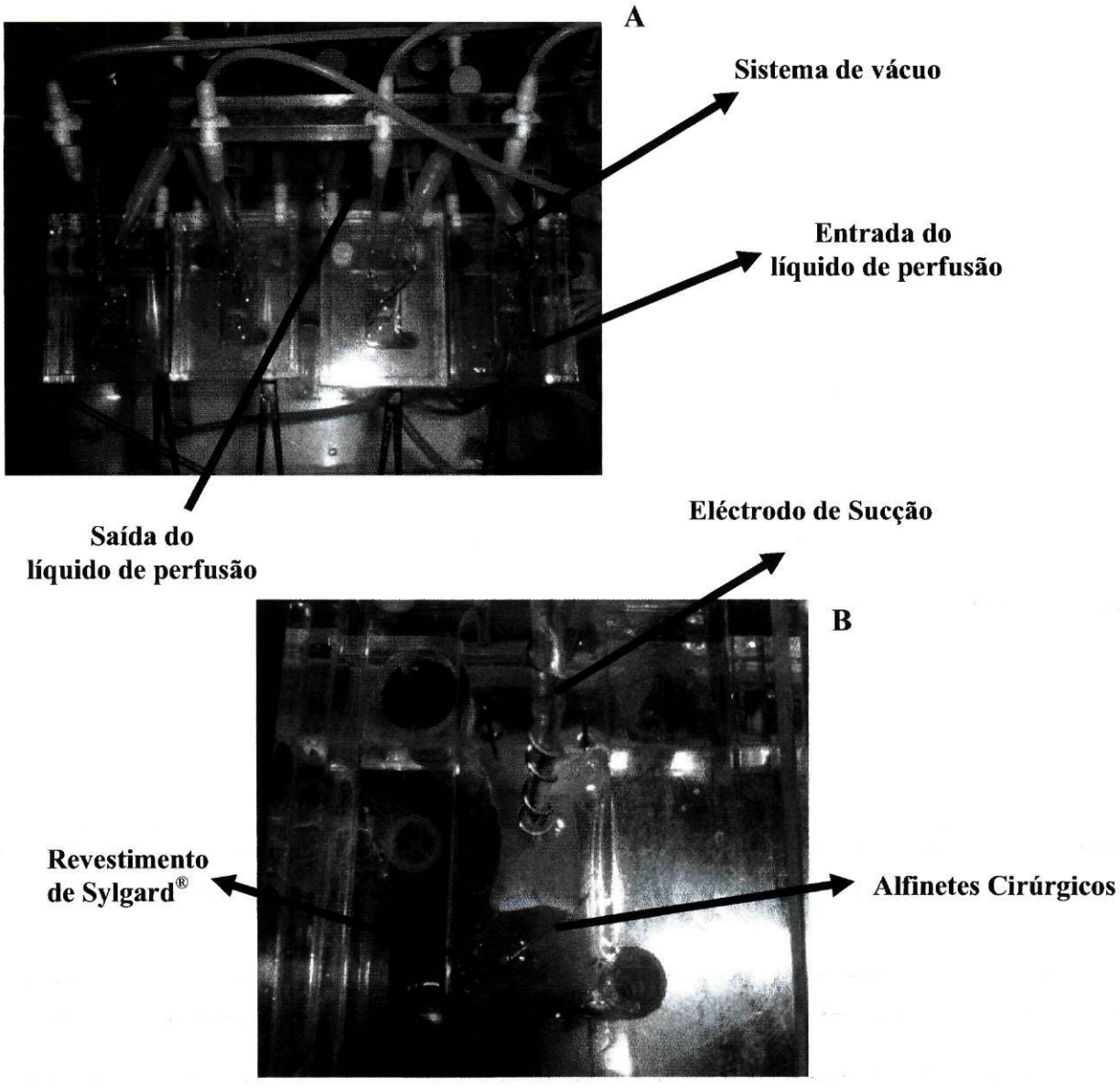


Figura 2.3: Montagem das preparações nervo-frénico hemidiafragma nas câmaras do banho de orgãos horizontal (Topo). Após a dissecção das preparação est : foram colocadas em câmaras de incubação de perspex revestida com Silgard dispostas em paralelo (A) com 3 mL de capacidade. As preparações foram fixadas horizontalmente pela porção costal e pela porção tendinosa (centro frénico) com 4 alfinetes cirúrgicos (B). Cada nervo frénico foi introduzido no interior de um eléctrodo de sucção manufacturado no Laboratório de Farmacologia (ICBAS), posicionado de modo a evitar o contacto com as fibras musculares. A preparação ficou submersa na solução de perfusão, sendo o nível do banho mantido por um sistema de sucção por vácuo.

Protocolo Experimental

Libertação de [^{3}H]-acetilcolina

A libertação do neurotransmissor foi determinada pela quantificação do efluxo evocado de trítio a partir das terminações marcadas com [^{3}H]-colina pelo método descrito por Wessler & Kilbinger (1986).

Montagem das preparações do hemidiafragma inervado

Os hemidiafragmas inervados dissecados foram distendidos aproximadamente 1,1 vezes o seu tamanho e foram fixados com 4 pequenos alfinetes cirúrgicos a uma fina camada de Sylgard®, que revestia o fundo das câmaras de banho de órgãos (Figura 2.3, B). Foram utilizados em cada experiência 4 banhos de órgãos horizontais com 3 mL de capacidade dispostos em paralelo (Figura 2.3, A), que foram desenhados e manufacturados de acordo com as características da preparação utilizada. Cada nervo frénico foi introduzido no interior de um eléctrodo de sucção manufacturado no Laboratório de Farmacologia (ICBAS), posicionado de modo a evitar o contacto com as fibras musculares (Figura 2.3, B). A integridade da preparação foi testada, *i.e.* verificou-se se a estimulação eléctrica com pulsos de intensidade gradualmente crescente com uma duração de 40 μs e com uma frequência de 1-5 Hz induzia contracções musculares. A voltagem gerada foi geralmente fixada num valor três vezes superior àquela que induziu a contracção máxima observada. Os parâmetros de estimulação foram monitorizados num osciloscópio (Meguro, modelo MO-1251A).

Descrição do período experimental

1. Período de equilíbrio

Durante o período de equilíbrio, as preparações foram perfundidas com uma solução Tyrode durante 30 minutos, com um fluxo constante de 3mL/min. Este período

permite a estabilização da preparação às novas condições experimentais (sais, glucose, colina, oxigenação e pH) e ao grau de distensão, assim como, propicia a eliminação dos subprodutos libertados pela preparação durante o procedimento cirúrgico (acetilcolina, enzimas, potássio, ácidos, ATP, etc.), capazes de interferir com os resultados experimentais.

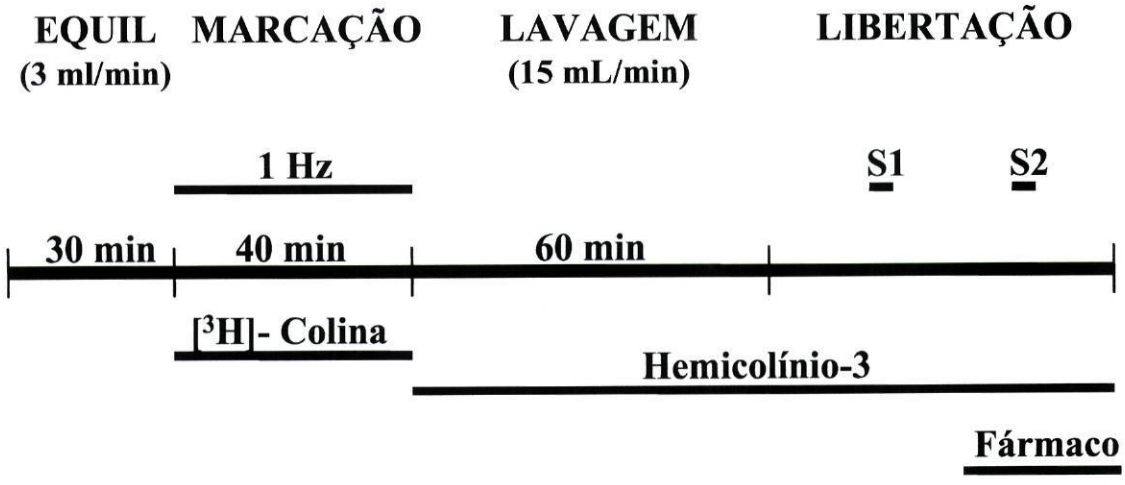


Figura 2.4: Esquema representativo do protocolo experimental seguido na quantificação da libertação da acetilcolina marcada com [^{3}H]-colina por estimulação eléctrica das terminações nervosas motoras do frénico de rato.

2. Período de marcação

Após o período de estabilização, a perfusão foi interrompida e as terminações nervosas foram marcadas por incubação com cloreto de metil-^{3}H-colina (2,5 μCi/nmol) durante 40 minutos. Durante o período de marcação o nervo frénico foi estimulado com pulsos rectangulares de intensidade supramáxima com 40 μs de duração aplicados com frequência de 1Hz. Estas condições favorecem o esgotamento das reservas de acetilcolina endógena e a sua substituição por [^{3}H]-ACh vesicular recentemente sintetizada (Wessler & Kilbinger, 1986).

3. Período de lavagem

Após o término do período de marcação as preparações foram de novo perfundidas com solução Tyrode (15 mL/ min) e a estimulação nervosa foi interrompida. A partir do final do período de marcação, o inibidor da recaptação da colina pelos transportadores de alta afinidade (K_M 1 a 5 μM), hemicolinio-3 (10 μM), foi adicionado a todas as soluções. Este período de lavagem de 60 minutos serviu para remover o excesso de colina tritiada não incorporada pela preparação.

4. Período de libertação

A perfusão foi novamente interrompida (tempo "zero" do período de libertação), procedendo-se à recolha de amostras de 1,5 mL incubadas com a preparação durante 3 minutos. O esvaziamento completo e repreenchimento dos banhos de órgãos com a solução em uso, foi realizada automaticamente através da utilização de uma bomba peristáltica (Miniplus II; Gilson) acoplada a um colector de fracções programável (FC 203B; Gilson). Os tempos indicados nas figuras das curvas de efluxo correspondem aos tempos de colheita de cada amostra. Extraíram-se alíquotas de 400 μL de volume do meio de incubação recolhido, que após serem adicionados a 3.5 mL de solução de cintilação (Packard Insta Gel II), foram utilizados para a quantificação da radioactividade em cada amostra.

Condições de estimulação

A libertação de [^{3}H]-ACh foi evocada por estimulação das terminações nervosas motoras do frénico de rato com pulsos rectangulares de 40 μs de duração e uma intensidade de 8 mA. O uso de pulsos rectangulares de intensidade supramáxima permite a

Parâmetros de estimulação	S_2 (10^3.dpm/g)	Controlo S_2/S_1
5 Hz (750 pulsos)	83±4 (*n*=11)	0.81±0.03 (*n*=8)
50 Hz (750 pulsos)		
Tétanos (15 seg)	30±3 (*n*=10)*	0.78±0.05 (*n*=5)
Bursts (5×3 seg)	88±6 (*n*=11)	0.84±0.04 (*n*=8)

Tabela 2.1: Influência do padrão de estimulação na libertação provocada de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas do frénico de rato. O nervo frénico foi estimulado aos 12 e 39 minutos após o fim do período de lavagem, aplicando 750 pulsos de intensidade supramáxima com frequências de 5 a 50 Hz. S_1 representa a média (± SEM) da libertação provocada de [^{3}H]-ACh durante o primeiro período de estimulação. O número de experiências está indicado entre parêntesis. S_2/S_1 representa a razão da libertação provocada de [^{3}H]-ACh durante o segundo e o primeiro período de estimulação. A significância das diferenças foi analisada pelo teste unidireccional de variância ANOVA seguido pelo teste *t* modificado de Dunnett's. *P<0.05 foi considerado representar diferenças significativas quando comparado com a libertação média de [^{3}H]-ACh induzida pela frequência de estimulação de 5 Hz.

sincronização do disparo dos neurónios motores do nervo frénico (à semelhança do observado durante a inspiração contra resistência - Road *et al.*1995), reduzindo, desta forma, o número de unidades motoras silenciosas, factor prejudicial na interpretação dos resultados na libertação. A frequência de estimulação variou dentro de limites fisiológicos, entre 5 (Fásica) e 50 (Tétanos) Hz, e foram aplicados 750 pulsos por período de estimulação. Nos estímulos interpolados de alta frequência (50 Hz), foram aplicados uma série de 5 tétanos cada um com 150 pulsos, separados por um intervalo de 20 segundos sem estimulação. Este padrão de estimulação permitiu ultrapassar a depressão tetânica verificada quando se utilizam estímulos de alta frequência, e produziu um valor de libertação semelhante à estimulação fásica (5 Hz, 40 μs) (Tabela 2.1). Foram aplicados dois períodos de estimulação eléctrica, o primeiro aos 12 minutos (S_1) e o segundo aos 39

minutos (S_2), contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). Os estímulos foram produzidos por dois estimuladores Grass S48 acoplados a uma unidade de isolamento de estímulo (Grass SIU5), operando em corrente constante. Os parâmetros de estimulação, monitorizados continuamente num osciloscópio (Meguro, MO-125IA), foram escolhidos porque se revelaram suficientemente eficazes para provocar a libertação de [^{3}H]-ACh para níveis facilmente detectáveis pelo método de quantificação descrito, e por se encontrarem dentro dos parâmetros descritos por outros autores para a mesma preparação (Wessler & Kilbinger, 1986; Correia-de-Sá *et al.*; 1996b).

Contribuição pós-sináptica na libertação de [^{3}H]-ACh

D. O. Hebb (1945), postulou que a sincronização da actividade eléctrica nas células pré- e pós-sinápticas potencia a transmissão sináptica- Postulado de Hebb. Extensões deste postulado, sugerem que a eficácia sináptica pode ser potenciada ou estabilizada por actividades pré- e pós-sinápticas sincronizadas e enfraquecida por actividades dessincronizadas. Mu-ming Poo, estudou o mecanismo de modulação Hebbiana em culturas neuromusculares isoladas, tendo verificado que a aplicação de pulsos isolados de acetilcolina ou na presença de actividade pré-sináptica dessincronizada resultava numa imediata e persistente depressão sináptica, enquanto que com uma coactivação sincronizada pré- e pós-sináptica não houve qualquer alteração na eficácia sináptica (Dan & Poo, 1992). Estes resultados mostram que a modulação Hebbiana opera em sinapses neuromusculares in vitro, podendo resultar duma activação transsináptica retrógrada.

A modulação da libertação de [^{3}H]-ACh pela actividade pós-sináptica condicionaria a interpretação dos resultados caso este fenómeno estivesse operante nas nossas condições experimentais. No entanto, tal não parece ocorrer uma vez que a α-bungarotoxina

(antagonista nicotínico muscular contendo α1 subunidades) não alterou a libertação de ACh (Faria *et al*, 2003).

Quantificação da [^{3}H]-ACh libertada

A libertação de [^{3}H]-ACh resulta da exocitose das vesículas sinápticas das terminações nervosas motoras despolarizadas pela estimulação eléctrica do nervo frénico. Foi demonstrado (consultar Wessler & Kilbinger, 1986) que a estimulação eléctrica do nervo frénico induz a libertação de [^{3}H]-ACh, que é abolida na ausência de iões de cálcio extracelulares ou na presença de tetrodotoxina (TTX, bloqueador dos canais de sódio), enquanto o efluxo de [^{3}H]-colina se mantém inalterado (*cf.* Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Assim, a libertação provocada de [^{3}H]-ACh foi calculada subtraindo o efluxo basal de trítio ao efluxo total durante o período de estimulação. O conteúdo em trítio por amostra foi analisado por cintilometria líquida num contador de cintilação líquida (Beckman, modelo LS 3801) (% Eficiência para trítio: 40±2%), após subtracção do valor basal. A radioactividade foi expressa em desintegrações por minuto por grama de tecido seco (dpm/g) (*cf.* Correia-de-Sá *et al.*, 1991). O efluxo de [^{3}H]-ACh foi calculado em percentagem da quantidade de trítio existente no tecido no início do tempo de colheita respectivo (libertação fraccionada de trítio, %). Após os períodos de marcação e de lavagem, as preparações continham 5542±248 x10^3 dpm/g e o valor do efluxo basal de trítio foi de 132±12 x10^3 dpm/g (n=8). A libertação fraccionada de trítio foi de 2.38±0.14% da radioactividade presente no tecido no início do período de libertação (primeira colheita, ver *e.g.* Figura 4.1). Para tal cada preparação foi incubada (durante a noite, à temperatura ambiente) com 1 ml de ácido tricloroacético a 10% e determinado o conteúdo em trítio existente em 0,1 ml de sobrenadante.

O efluxo basal de trítio diminuiu ligeiramente ao longo do período de libertação (*cf.* Wessler & Kilbinger, 1986) devido à presença do hemicolínio-3, que inibindo a recaptação de colina e, consequentemente, a síntese "de novo" de acetilcolina (Takagi *et al.*, 1970), favorece o esgotamento gradual das reservas de [^{3}H]-ACh à medida que a sua libertação provocada por estimulação nervosa se processa. As diluições sucessivas a que o meio de incubação está sujeito, provocadas pelo esvaziamento e repreenchimento do banho durante as colheitas, também contribuem para o declínio do efluxo basal verificado. Por estes motivos, o efluxo basal durante o período de estimulação foi determinado pelo cálculo do ponto correspondente numa recta de regressão linear que incluía os valores de libertação das três amostras antes e das tês amostras obtidas após a estimulação que atingiram níveis semelhantes aos obtidos antes do estímulo. Dada a sensibilidade da técnica, o declínio da libertação do neurotransmissor ao longo do tempo não constitui um factor limitante, porque (1) a quantidade de [^{3}H]-ACh detectada no líquido de incubação, após cada período de estimulação separado de 24 minutos relativamente ao anterior, não foi significativamente diferente, e (2) a libertação de [^{3}H]-ACh pode, ainda, ser aumentada pela aplicação de compostos neurofacilitatórios (consultar Correia-de-Sá *et al.*; 1991; 1996a).

Efeito dos Fármacos

Os fármacos a testar foram adicionados às soluções de incubação 15 minutos antes de S_2 e mantiveram-se nas soluções até ao fim de cada experiência. Todos eles foram adicionados ao banho por esvaziamento e repreenchimento deste com a solução do fármaco na concentração a testar. Os seus efeitos foram avaliados pela comparação das razões S_2/S_1, *i.e.*, as razões entre a libertação provocada de [^{3}H]-ACh durante o segundo e

o primeiro período de estímulo (na presença do fármaco), com a média das razões S_2/S_1 obtidas em experiências controlo (na ausência do fármaco).

As interacções entre duas ou mais substâncias foram estudadas sistematicamente avaliando o efeito de cada uma delas na presença e na ausência da(s) outra(s). Assim, a substância moduladora foi aplicada antes de cada período de estimulação (S_1 e S_2), com a excepção do fármaco LiCl (10 mM) que foi aplicado 15 minutos antes do fim do período de lavagem (tempo 0) e sujeito a um estímulo de precondicionamento (S0). Enquanto que o composto a testar foi aplicado apenas antes do segundo período de estimulação (S_2). Nas situações em que o primeiro fármaco alterava significativamente os níveis de libertação provocada de [^{3}H]-ACh, procedeu-se a uma lavagem do fármaco entre S_1 e S_2, voltando a adiciona-lo 15 minutos antes do segundo período de estimulação. Com este procedimento não se verificaram variações significativas nas razões S_2/S_1 obtidas na presença ou na ausência do fármaco modulador. A influência osmótica de alguns fármacos, sobretudo quando aplicados em concentrações elevadas ($\geq$ 1 mM), foi testado investigando o efeito da sacarose (1-10 mM), aplicada 15 minutos antes de S_2, em experiências paralelas. A solução isotónica de sacarose, aplicada na maior concentração testada (10 mM) não alterou significativamente a libertação provocada de trítio (0.83±0.04, n=3).

As percentagens indicadas nas figuras, indicam as variações percentuais das razões S_2/S_1 observadas na ausência e na presença dos fármacos a testar, obtidas nas mesmas condições experimentais. Valores positivos e negativos representam facilitação ou inibição da libertação provocada de [^{3}H]-ACh, respectivamente. Nenhum dos fármacos testados alterou significativamente (P>0.05) o efluxo basal de trítio.

Registos miográgicos

A metodologia usada no registo das respostas contrácteis na junção neuromuscular de rato foi previamente descrita por Bülbring (1946). A aplicação de estímulos com elevada frequência (50 Hz) durante um curto período de tempo (5 seg) facilita transitoriamente a transmissão neuromuscular – **Facilitação Tetânica** (ver Figura 2.4). Este fenómeno é dependente da activação endógena de receptores nicotínicos pré-sinápticos (Bowman, 1980; Faria *et al.*, 2003). Como tal, utilizamos esta abordagem experimental no sentido de elucidar qual seria a interacção entre os receptores pré-sinápticos facilitatórios muscarínico M_1 e nicotínicos do subtipo $\alpha 3\beta 2$.

Montagem das preparações do hemidiafragma inervado

A montagem do conjunto nervo frénico-hemidiafragma consistiu numa fixação vertical. Para tal, as preparações foram fixadas pela porção costal a um suporte de Perspex. O suporte conjuntamente com a preparação foi submerso num banho de órgãos vertical com 10 ml de capacidade. O centro frénico de origem tendinosa do diafragma foi suspenso por meio de um fio de sutura ao transdutor de força de deslocamento vertical. De seguida procedeu-se à aspiração do nervo frénico para o interior do eléctrodo de sucção (semelhante ao utilizado na técnica de libertação).

Descrição do período experimental

As contracções musculares foram induzidas por estimulação do nervo frénico com pulsos rectangulares de intensidade supramáxima com uma duração de 40 μs e uma frequência de 50 Hz durante curtos períodos de tempo (5 seg.). Este padrão de estimulação foi repetido com uma periodicidade de 15 minutos.

As respostas contrácteis foram registadas isometricamente com uma tensão de repouso de 50 mN através de um transdutor mecânico, que se encontrava ligado a um amplificador de sinal eléctrico e a um registador de papel termo-sensível da Hugo-Sachs (Alemanha). Estas condições de estimulação permitem obter contracções tetânicas cujo padrão e amplitude se mantêm praticamente inalterados ao longo de várias horas (6-8 horas). Uma vez alcançada uniformidade na amplitude das contracções tetânicas, iniciou-se a incubação da preparação com os fármacos em estudo. A alternância das várias soluções a testar fez-se por transferência do tubo de entrada da bomba peristáltica de um frasco para outro. O fluxo inicial de aplicação de cada nova solução foi 20 ml min^{-1} durante o primeiro minuto, sendo reduzido para 5 ml min^{-1} até à próxima mudança de solução. Os fármacos em estudo contactaram com a preparação por um período nunca inferior a 12 minutos antes da aplicação de cada tétano.

A tensão muscular produzida pelo primeiro estímulo de cada série tetânica (a) foi comparada com a desenvolvida pelo último pulso da mesma série (b) (ver Figura 2.4). A razão R (R=b/a) obtida após a adição do fármaco em estudo foi comparada com a observada em situação controlo. Com o objectivo de reduzir a margem de segurança da transmissão neuromuscular (Paton & Waud, 1967; Wood & Slater, 2001), a concentração de $MgCl_2$ na solução de Tyrode foi aumentada de 1 mM para 6-7 mM em algumas das experiências.

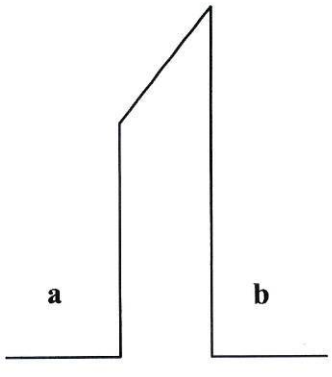


Figura 2.4 Traçado representativo das contracções tetânicas induzidas por estimulação do nervo frénico na presença de solução Tyrode normal (1 mM de $MgCl_2$ com conteúdo quântico normal). O nervo frénico foi estimulado com pulsos rectangulares de intensidade supramáxima com uma duração de 40 μs e uma frequência de 50 Hz durante um curto período de tempo (5 seg., linha horizontal). A amplitude do traçado corresponde a uma calibração vertical de 50 mN.

Soluções dos Fármacos

Todas as soluções foram armazenadas em alíquotas congeladas a -20ºC e nunca foram sujeitas a mais de um ciclo de congelação/descongelação antes de serem usadas. Foram utilizadas diluições aquosas das soluções e executadas experiências para controlar o efeito dos solventes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0.05$) entre as experiências controlo realizadas na ausência e na presença dos solventes na percentagem máxima utilizada de 0.5% v/v. O pH não foi significativamente alterado pela aplicação dos fármacos na máxima concentração testada.

Os fármacos utilizados foram: adenosina, desaminase da adenosina (ADA, tipo VI, 1803 U/mL, EC 3.5.4.4), adenosina 5'-monofosfato (AMP), cloreto de cálcio ($CdCl_2$), cloreto de colina, ω-conotoxina GVIA (ω-CgTx GVIA), ω-conotoxina MVIIC(ω-CmTx MVIIC), etilenoglicol-*bis*(β-aminoetil éter) ácido *N,N,N',N'*-tetraacetico (EGTA), hemicolinio-3, nifedipina, R-N^6-fenilisopropil adenosina (R-PIA); S-(*p*-nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI); 2-aminoetoxidifenilborano (2-APB), (4-hidroxi-2-butinil)-1-trimetilamonio-*m*-clorocarbonilato de cloreto (McN-A-343), 1,1-dimetil-4-fenilpiperazina (DMPP), forscolina (FSK), cloreto de lítio (LiCl), N-metil-D-glucamina (NMDG), sesquifumarato de oxotremorina, diciclomina, dihidrocloreto de pirenzepina; 8-bromo-AMP cíclico (8-Br-cAMP), 1,9-dideoxifoscolina (dd-FSK), 4-difenilacetoxo-*N*-metilpiperazínio metioiodina (4-DAMP) (Sigma, St. Louis, MO); 11-[[2-1[(dietilamino) metil - piperidil] – acetil] - 5,11 – dihidro - 6H – piridino [2,3 -b][1,4] benzodiazepina (AF-DX 116), Cheleritrina (CHL), forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), (4-(2-[7-amino-2-(2-furil{1,2,4}-triazolo{2,3-a{1,3,5}triazina-5-il-aminoetil) fenol (ZM 241385), 4-(3'-ciclopentiloxi-4'-metoxifenil)-2-pirrolidona (4-RS) (Rolipram), Dihidrocloreto de flunarizina (Tocris Cookson Inc., UK); Rp-adenosina 3',5'-monofosfatiato de trietilamina

cíclico (Rp-cAMPS), 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX), 2-[4-(2-*p*-Carboxietilo)-fenilamino]-5'-N-etilcarboxoamida adenosina (CGS 21680C), 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX) (Res. Biochem. Inc., USA). Toxina muscarínica 3 (MT-3) (Alomone Laboratories, Israel). Toxina muscarínica 7 (MT-7), ω-agatoxina IVA (ω-AgaTx IVA) (Peptide Institute Inc., Japan); Cloreto de [Metil-^{3}H]-colina (solução de etanol, 80 Ci/mmol, Amersham (UK).

Os seguintes fármacos: R-PIA, NBTI, dd-FSK, AF-DX 116, Rolipram, 2-APB, FSK foram dissolvidos e armazenados em soluções mãe de 2-50 mM em dimetilsulfóxido (DMSO), a DPCPX foi dissolvida e armazenada numa solução mãe de 5 mM em 99% de DMSO e 1% NaOH (1M) (v/v) e a nifedipina foi dissolvido e armazenado numa solução de 10 mM de etanol. A solução de nifedipina foi protegida da luz para prevenir a fotodecomposição. Os outros fármacos foram preparados em água destilada.

Estatística

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (SEM), correspondendo a um número *n* de experiências. A significância das diferenças foi avaliada pelo teste unidireccional de variância ANOVA seguido pelo teste *t* modificado de Dunnett's. $*P<0.05$ foi considerado representar diferenças significativas.

ICBAS

CAPÍTULO 3 – Resultados

3.1 Modulação da actividade dos autoreceptores muscarínicos M_1 facilitatório e M_2 inibitório pela adenosina na junção neuromuscular de rato.

3.1.1 Regulação bifásica da libertação de [^{3}H]-ACh através da activação de autoreceptores muscarínicos.

A Figura 3.1 mostra curvas de efluxo de trítio em experiências representativas realizadas na ausência (controlo) e na presença de dois antagonistas dos receptores muscarínicos, pirenzepina (10 nM) e AF-DX 116 (10 μM), aplicados 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2). A pirenzepina é um antagonista muscarínico com uma afinidade 10-100 vezes superior para receptores dos subtipos M_1 e M_4, enquanto o AF-DX 116 possui maior selectividade para receptores dos subtipos M_2 e M_4 (*cf.* Caulfield & Birdsall, 1998). Pela análise dos gráficos pode verificar-se que a libertação [^{3}H]-ACh induzida por estimulação eléctrica (5 Hz, 750 pulsos de 40 μs de duração) do nervo frénico foi atenuada na presença de pirenzepina (10 nM), enquanto a aplicação de AF-DX 116 (10 μM) aumentou significativamente a libertação do neurotransmissor.

De forma análoga à pirenzepina (1-30 nM), a toxina muscarínica isolada do veneno da serpente mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), MT-7 (0.1-1 nM), reduziu a libertação de [^{3}H]-ACh de um modo dependente da concentração (Figura 3.2). Os efeitos inibitórios máximos da MT-7 (1 nM, -44±7%, n=4) e da pirenzepina (10 nM, -32±6%, n=5) foram observados em concentrações próximas dos valores de pK_B (respectivamente

9.8 e 7.8-8.5) determinados para o bloqueio selectivo dos receptores muscarínicos de subtipo M_1 (*cf.* Caulfield & Birdsall, 1998) (Figura 3.2).

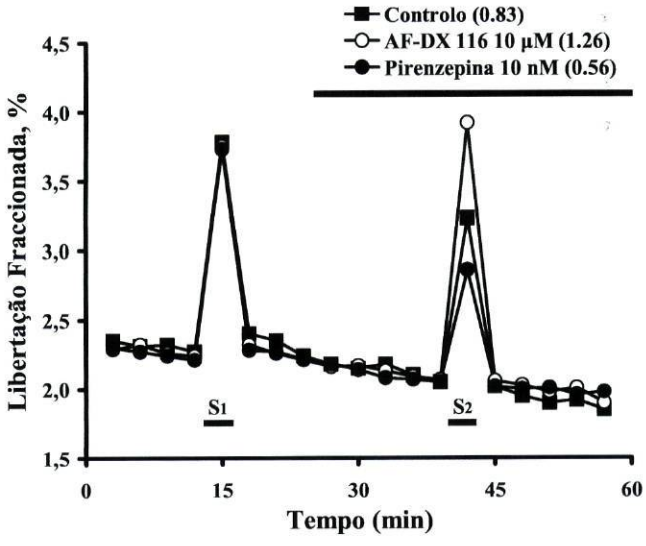


Figura 3.1 Efeito dos antagonistas muscarínicos, AF-DX 116 (10 µM) e pirenzepina (10 nM) na libertação de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores de rato. Após a marcação e o período de lavagem (tempo 0), a libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação eléctrica do nervo frénico com pulsos de intensidade supramáxima e com uma frequência 5 Hz nos tempos indicados (S_1 e S_2). O efluxo de trítio foi avaliado em amostras colhidas de 3 em 3 minutos. Os antagonistas muscarínicos, AF-DX 116 (10 µM) e pirenzepina (10 nM), foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2) (barra horizontal). Os valores de S_2/S_1 obtidos nestas experiências típicas estão representados entre parêntesis, e são fornecidos para comparação do efeito dos fármacos relativamente à situação controlo.

Apesar do antagonista muscarínico, 4-DAMP, se ligar indistintamente a todos os subtipos de receptores muscarínicos com uma afinidade de ordem nanomolar, este fármaco tem sido utilizado experimentalmente na caracterização de receptores M_3 (valores de pK_B entre 8.9 e 9.3) (Michel *et al.*, 1989). Quando aplicado em concentrações de 1 e 10 nM, o 4-DAMP reduziu a libertação de [^{3}H]-ACh em -4±9% (n=4) e -47±4%, (n=5, P<0.05), respectivamente (dados não representados). Contrariamente, a toxina muscarínica MT-3, que se liga reversivelmente e com elevada afinidade aos receptores M_4 (pK_B~8.7) (Adem & Karlsson, 1997), não modificou significativamente (P>0.05) a libertação de [^{3}H]-ACh quando foi testada em concentrações que variaram entre 1 e 10 nM. Nas mesmas condições experimentais, a aplicação do antagonista preferencial dos receptores M_2 e M_4, AF-DX 116 (0.01-10 µM), aumentou a libertação do neurotransmissor de forma dependente da

concentração (Figura 3.2), tendo produzido um efeito facilitatório de +55±12% (n=4) na concentração mais elevada (10 μM) (ver Figura 3.1). Estes resultados sugerem que os terminais nervosos do frénico de rato possuem dois subtipos de receptores muscarínicos, facilitatórios do subtipo M_1 e inibitórios do subtipo M_2, capazes de controlar a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação eléctrica.

O antagonista muscarínico não selectivo, diciclomina (0.003-10 μM), que possui oito vezes maior afinidade para os receptores muscarínicos que a atropina, teve uma acção bifásica dependente da concentração sobre a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos aplicados com uma frequência de 5 Hz (Figura 3.2). Em concentrações nanomolares, a diciclomina (3-100 nM) inibiu a libertação de [^{3}H]-ACh, mas quando foi aplicada em concentrações superiores a 1 μM observou-se um efeito facilitatório consistente sobre o efluxo de trítio. Estes resultados suportam a hipótese de que a ACh exerce um efeito facilitatório predominante sobre a sua própria libertação através da activação de autoreceptores muscarínicos do subtipo M_1 durante estímulos nervosos aplicados com uma frequência próxima do ritmo de disparo dos neurónios motores do frénico durante a ventilação de ratos não anestesiados em repouso (Monteiro & Ribeiro, 1987).

Conforme ilustrado na Figura 3.3, o agonista muscarínico, McN-A-343 (1-30 μM), aumentou de um modo dependente da concentração a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação do nervo frénico com uma frequência de 5 Hz. Apesar da selectividade do McN-A-343 para os receptores M_1 ter sido questionada (ver *e.g.* Caulfield & Birdsall, 1998), a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pelo McN-A-343 (3 μM, +51±8%, n=7) nestas condições experimentais parece ser mediada por autoreceptores muscarínicos

do subtipo M_1 já que este efeito foi antagonizado na presença de MT-7 (0.1 nM) e de pirenzepina (1 nM), mas não após a aplicação de AF-DX 116 (10 nM) (Figura 3.3).

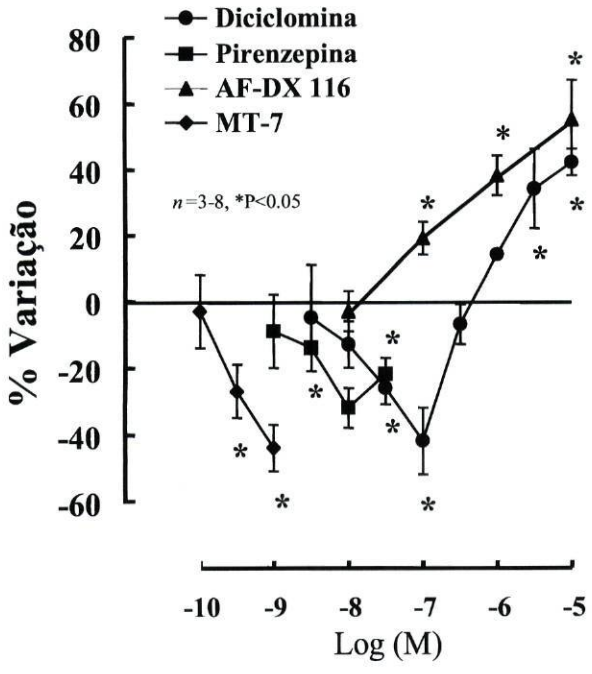


Figura 3.2 Curvas de concentração-resposta para o efeito da diciclomina (0.003-10 μM), pirenzepina (1-30 nM), AF-DX 116 (0.01-10 μM) e MT-7 (0.1-1 nM) sobre a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos eléctricos (5Hz, 750 pulsos de 40 μs de duração) a partir de preparações de nervo frénico hemidiafragma de rato marcadas com [^{3}H]-colina. As abcissas, representam o logaritmo da concentração (M) dos antagonistas muscarínicos diciclomina (0.003-10 μM), pirenzepina (1-30 nM), AF-DX 116 (0.01-10 μM) e MT-7 (0.1-1 nM) aplicados 15 minutos antes de S_2. As ordenadas, representam a percentagem de variação na libertação de [^{3}H]-ACh, obtida por comparação das razões S_2/S_1 na presença e na ausência dos fármacos testados. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os valores controlo.

Em condições experimentais semelhantes, a aplicação de oxotremorina (0.3-100 μM) inibiu consistentemente a libertação de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores do frénico de rato (Figura 3.3). O efeito inibitório da oxotremorina (10 μM, -34±8%, n=5), foi abolido após o pré-tratamento com o antagonista M_2, AF-DX 116 (10 nM). Contrariamente, a inibição da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela oxotremorina (10 μM) foi significativamente ($P<0.05$) potenciada na presença de antagonistas com maior afinidade para os autoreceptores muscarínicos do subtipo M_1 (Caulfield & Birdsall, 1998), MT-7 (0.1 nM, -63±12%, n=4) e pirenzepina (1 nM, -56±2%, n=4, ver Oliveira *et al.*, 2002) (ver Figura 3.3). Note-se que os antagonistas muscarinicos, MT-7 (0.1 nM), pirenzepina (1 nM) e AF-DX 116 (10 nM), foram adicionados ao meio de incubação

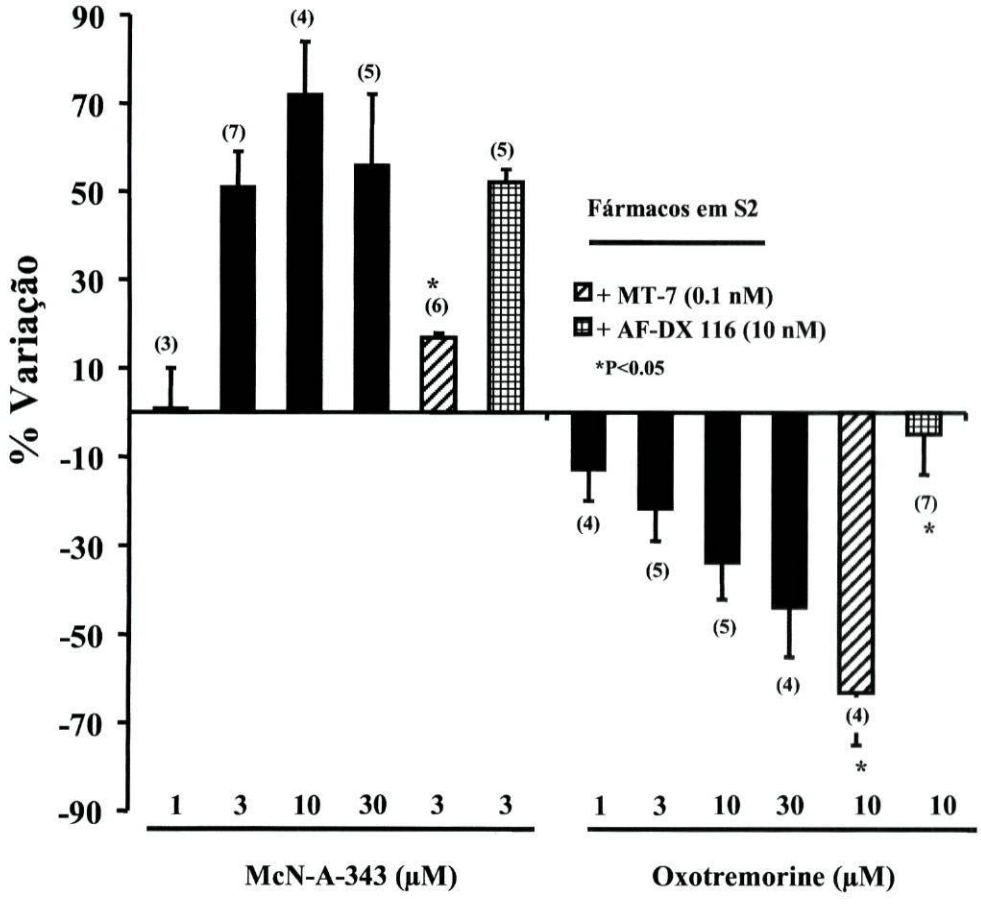


Figura 3.3 Efeitos do McN-A-343 e da oxotremorina na libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação eléctrica do nervo frénico na ausência e na presença de MT-7 (0.1 nM, antagonista selectivo M_1) e de AF-DX 116 (10 μM, antagonista M_2.). A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contando a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). Os agonistas muscarínicos, McN-A-343 (1-3 μM) e oxotremorina (1-30 μM), foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. Os antagonistas muscarínicos, MT-7 (0.1 nM) e AF-DX (10 nM), estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 quando comparadas com as razões S_2/S_1 em experiências controlo. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos do McN-A-343 (3 μM) e da oxotremorina (10 μM) isoladamente.

durante todo o ensaio, incluindo S_1 e S_2, em concentrações virtualmente desprovidas de efeito na libertação de [^{3}H]-ACh (*cf.* Figura 3.2). Estes resultados sugerem que a inibição da libertação de ACh mediada pelos receptores M_2 é parcialmente atenuada quando os receptores muscarínicos M_1 se encontram activos, o que está de acordo com a hipótese de que os receptores muscarínicos facilitatórios de subtipo M_1 desempenham um papel

predominante no controlo da libertação de [^{3}H]-ACh durante curtos períodos de estimulação com uma frequência de 5 Hz. Esta hipótese foi reforçada após a constatação de que o efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) foi mantido (52±12%, n=3) praticamente inalterado, enquanto a inibição produzida pela oxotremorina (10 μM) foi atenuada para 17±6% (n=6), após a redução do número de pulsos de 750 para 250.

3.1.2 Os autoreceptores facilitatórios muscarínicos M_1 e nicotínicos α3β2 regulam a a libertação de [^{3}H]-ACh de um modo independente.

Considerando as interacções putativas entre receptores nicotínicos (contendo subunidades α3β2) (Faria *et al.*, 2003) e muscarínicos (subtipos M_1 e M_2) (Wessler, 1989; Oliveira *et al.*, 2002) nas terminações nervosas motoras de rato, e sabendo que o McN-A-343 pode exercer efeitos (nicotínicos) não relacionados com a activação de receptores muscarínicos na junção neuromuscular de rã (Alkadhi *et al.*, 1980), investigou-se a contribuição dos receptores nicotínicos no efeito produzido pelo McN-A-343 (3 μM). Para tal, testou-se o efeito deste fármaco na presença do antagonista nicotínico, *d*-tubocurarina, aplicado numa concentração (0.1 μM) suficiente para prevenir o efeito facilitatório do agonista nicotínico, 1,1-dimetil-4-fenilpiperazínio (DMPP), na junção neuromuscular de rato (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994b). Nestas circunstâncias, o efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) não foi significativamente (P>0.05) modificado pela *d*-tubocurarina (0.1 μM, +45±5%, n=5). De forma análoga, a aplicação de McN-A-343 (3 μM) durante todo o período experimental (incluindo S_1 e S_2) não alterou o efeito facilitatório do DMPP (1 μM, 40±2%, n=4), quando este fármaco foi adicionado 3 minutos antes de S_2 para evitar a dessensibilização dos receptores nicotínicos (ver Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994b).

Em estudos miográficos realizados na junção neuromuscular de rato observou-se um aumento transitório da força contráctil do diafragma durante a estimulação tetânica do nervo frénico (50 Hz durante 5 seg) - **Facilitação Tetânica**. De acordo com vários autores, este fenómeno deve-se à activação tónica de receptores nicotínicos pré-sinápticos pela ACh libertada durante o estímulo (Bowman, 1980; Faria *et al.*, 2003). No sentido de esclarecer e existência de uma possível interacção entre os receptores pré-sinápticos facilitatórios muscarínicos do subtipo M_1 e nicotínicos contendo subunidades $\alpha 3\beta 2$, estudou-se o efeito da pirenzepina na facilitação tetânica. Contrariamente ao observado na presença de *d*-tubocurarina (0,1-0,7 μM) (Faria *et al.*, 2003) a aplicação cumulativa de pirenzepina (1-30 nM) ao meio de incubação por períodos nunca inferiores a 12 minutos reduziu a tensão tetânica máxima de forma dependente da concentração, sem contudo alterar o fenómeno de facilitação tetânica (Figura 3.4A). A depressão da tensão tetânica máxima causada pela pirenzepina não ultrapassou 20% do valor inicial nas situações em que se preservou o conteúdo quântico das preparações mantendo a composição iónica da solução de Tyrode ($MgCl_2$ 1 mM). Contudo, como a margem de segurança da transmissão neuromuscular é geralmente elevada (ver Introdução) a depressão da actividade contráctil causada por estimulação nervosa nem sempre reflecte o grau de inibição da libertação de neurotransmissor (Wood & Slater, 2001). Para que se estabeleça uma razão de proporcionalidade mais directa entre os níveis de libertação do neurotransmissor e a actividade contráctil é por vezes necessário utilizar agentes bloqueadores neuromusculares ou proceder à elevação da concentração de Mg^{2+} na solução de incubação de forma a reduzir a margem de segurança da transmissão neuromuscular (del Castillo & Katz, 1954; Paton & Waud, 1967). Quando se reavaliou o efeito da pirenzepina (1-30 nM) na contractilidade muscular em presença de uma elevada concentração de Mg^{2+} no meio (6 mM), observou-se que o efeito depressor do antagonista muscarínico foi significativamente

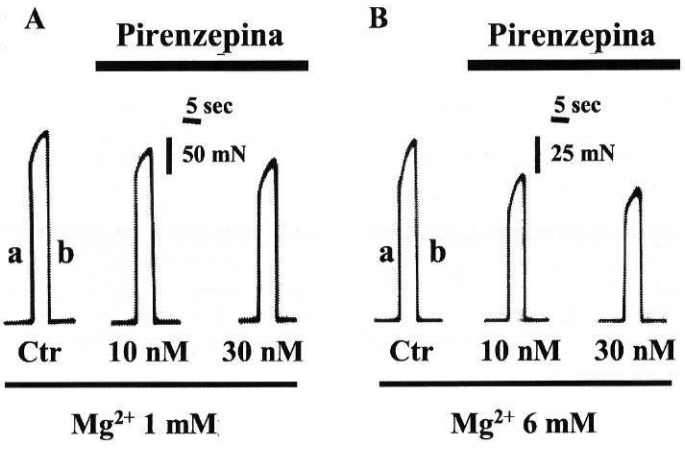


Figura 3.4 Efeito do antagonista dos receptores muscarínicos M_1, pirenzepina, na contractilidade do hemidiafragma induzida por estimulação nervosa. (A) e (B) Traçados representativos das contracções induzidas por estimulação do nervo frénico com uma frequência de 50 Hz durante um período de 5 segundos na ausência (Controlo) e na presença de pirenzepina (1-30 nM), registados num meio contendo uma solução de Tyrode controlo (A, 1 mM de $MgCl_2$, conteúdo quântico normal) e após a elevação da concentração de Mg^{2+} (B, 6 mM de $MgCl_2$) no meio de incubação. A pirenzepina (1-30 nM) foi aplicada de um modo cumulativo por períodos nunca inferiores a 12 minutos que antecederam cada período de estimulação tetânica. A amplitude dos traçados obtidos durante a perfusão das duas concentrações testadas, 1 mM (A, calibração vertical 50 mN) e 6 mM (B, calibração vertical 25 mN), foi normalizada para facilitar a comparação.

potenciado (P<0.05) para 46±7% (n=3) (Figura 3.4B), sem contudo se verificar qualquer modificação no padrão de facilitação tetânica. Nestas condições, a percentagem de variação da razão R (b/a) não foi superior a 3-7% comparativamente com os valores controlo obtidos com uma solução de Tyrode de composição normal (1.23±0.07%, n=3) ou após o aumento dos níveis de Mg^{2+} no meio (1.35±0.06%, n=3). Estes resultados contribuem para excluir uma possível interacção entre os receptores muscarínicos do subtipo M_1 e os receptores nicotínicos contendo subunidades α3β2 (Faria *et al.*, 2003).

3.1.3 Modulação da actividade dos autoreceptores muscarínicos pelos receptores A_1 e A_{2A} da adenosina

A Tabela 3.1 mostra que o pré-tratamento com o agonista dos receptores A_{2A} da adenosina, CGS21680C (2 nM), potenciou significativamente o efeito inibitório da oxotremorina (10 μM, -67±13%, n=5), e reverteu a facilitação induzida pelo McN-A-343 (3 μM). Contrariamente, a activação selectiva dos receptores A_1 da adenosina com R-PIA

(100 nM), atenuou a acção inibitória da oxotremorina (10 M, -7±4%, *n*=4), mas não alterou o efeito facilitatório produzido pelo agonista M_1, McN-A-343 (3 μM, 48±8%, *n*=6).

Fármacos em S_1 and S_2	**McN-A-343 (3 μM)**	**Oxotremorina (10 μM)**
Controlo	+51±8%(7)	-34±8%(5)
CGS 21680C (2 nM)	-19 ±7%(6) [b]	-67±13%(5)[a]
R-PIA (100 nM)	+48±8%(6)	-7±4%(4)[a]

Tabela 3.1 Influência da activação dos receptores da adenosina sobre o papel modulador do McN-A-343 (3 μM) e da oxotremorina (10 μM) na libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação electrica do frénico de rato. Os agonistas muscarínicos, McN-A-343 (1-30 μM) e oxotremorina (0.3-100 μM), foram aplicados 15 minutos antes de S_2. Os agonistas dos receptores da adenosina, CGS 21680C (2 nM) e R-PIA (100 nM), foram aplicados ao meio de incubação desde o inicio do período de libertação (tempo 0), *i.e.* estiveram presentes durante todo o ensaio, incluindo S_1 e S_2. O nervo frénico foi estimulado aos 12 e 39 minutos após o período de lavagem com 750 pulsos de intensidade supramáxima com uma duração de 40 μs e uma frequência de 5 Hz. Os valores representam a percentagem de variação na libertação de [^{3}H]-ACh, obtida por comparação das razões S_2/S_1 na presença e na ausência dos agentes moduladores. O número de experiências encontra-se representado entre parêntesis. Valores de $^aP<0.01$ e $^bP<0.001$ foram considerados significativos quando comparados com as razões S_2/S_1 nas experiências controlo.

Sabendo que a activação dos receptores muscarínicos M_1 controla negativamente a actividade dos receptores inibitórios M_2 (ver acima), foram delineadas experiências no sentido de investigar se o papel modulador da adenosina sobre a actividade inibitória da oxotremorina (10 μM) seria devido (1) a uma interacção directa, entre os receptores da adenosina (A_1 e A_{2A}) e os receptores inibitórios M_2, ou (2) a um mecanismo indirecto, mediado pela interacção com os autoreceptores M_1. A Figura. 3.5 mostra que a potenciação do efeito inibitório da oxotremorina (10 μM, -67±13%, *n*=5) pelo CGS 21680C (2 nM) foi prevenido pela pirenzepina (1 nM, -38±7%, *n*=5), sugerindo que a potenciação do efeito inibitório M_2 se deve à redução da actividade muscarínica M_1 desencadeada pela activação de receptores pré-sinápticos A_{2A} da adenosina. Contrariamente, a supressão da actividade

inibitória M_2 pela R-PIA (100 nM) parece ser independente de uma interacção putativa entre receptores A_1 e M_1. Tal foi sugerido uma vez que a atenuação do efeito inibitório da oxotremorina (10 μM, -34±8%, *n*=5) pela R-PIA (100 nM) se manteve praticamente inalterada na presença do antagonista dos receptores muscarinicos M_1, pirenzepina (1 nM, -10±8%, *n*=4) (Figura 3.5).

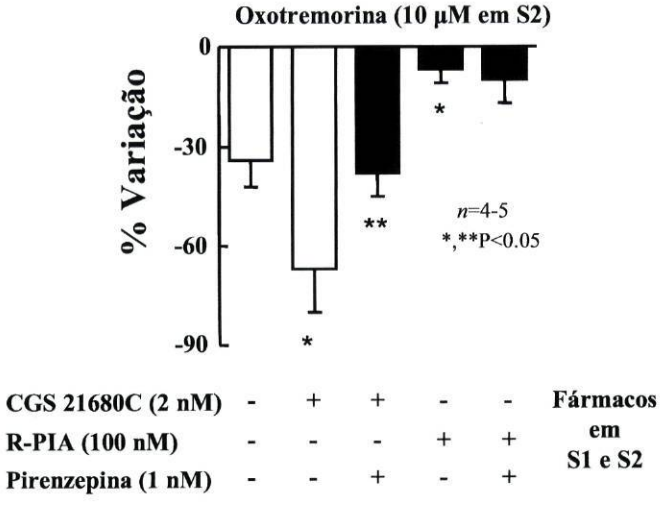


Figura 3.5 Influência da activação dos receptores da adenosina, com CGS 21680C (2 nM, agonista A_{2A}) e R-PIA (100 nM, agonista A_1), sobre a inibição da libertação de [^{3}H]-ACh pela oxotremorina (10 μM) a partir das terminações nervosos motoras de rato – Interacção com os autoreceptores muscarínicos M_1. A oxotremorina (10 μM) foi aplicada 15 minutos antes de S_2. Os agonistas dos receptores da adenosina, CGS 21680C (2 nM) e R-PIA (100 nM), foram aplicados ao meio de incubação desde o inicio do período de libertação (tempo 0), quer na presença quer na ausência do antagonista dos receptores M_1, pirenzepina (1 nM). As ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 na presença da oxotremorina (10 μM) quando comparadas com as razões S_2/S_1 em experiências controlo. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos da oxotremorina (10 μM) na ausência (*) e na presença (**) dos agonistas dos receptores da adenosina.

Uma vez que a activação dos autoreceptores M_1 pode regular a transmissão neuromuscular através da activação de dois mecanismos distintos, um directo e outro indirecto (por via do controlo do funcionamento do receptor M_2-inibitório mediado pela adenosina, ver acima), investigou-se a influência exercida pelo McN-A-343 (um agonista preferencial dos receptores M_1, 3 μM) sobre os efeitos resultantes da activação de receptores inibitórios A_1 e facilitatórios A_{2A} da adenosina na libertação de [^{3}H]-ACh. Conforme se mostra na Figura 3.6, a aplicação de McN-A-343 (3 μM) em ambos os

períodos de estimulação S_1 e S_2 não alterou significativamente ($P>0.05$) o efeito inibitório da R-PIA (30 nM) mas preveniu a facilitação causada pelo CGS 21680C (2 nM) na libertação de [^{3}H]-ACh. Estes resultados sugerem que durante estímulos aplicados com uma frequência de 5 Hz a facilitação da libertação do neurotransmissor resulta da interacção entre receptores pré-sinápticos facilitatórios muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina. No que ao controlo inibitório da libertação de ACh diz respeito, este parece ser predominantemente mediado pela adenosina através da activação de receptores inibitórios do subtipo A_1 nas mesmas condições experimentais.

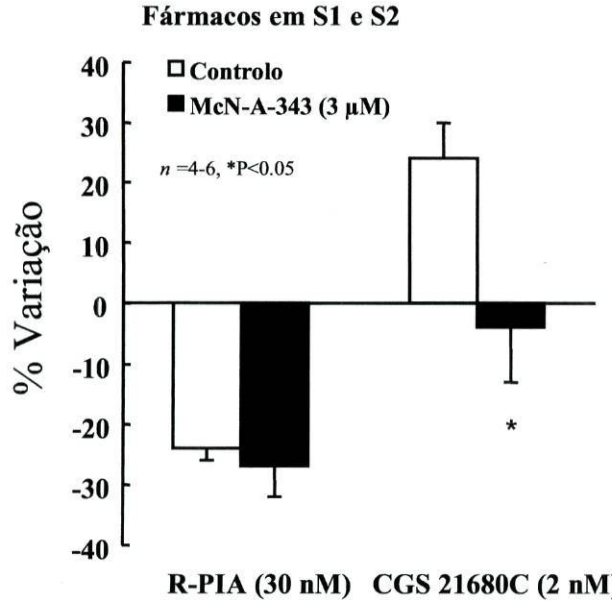


Figura 3.6 Influência da activação dos receptores muscarínicos M_1 pelo McN-A-343 (3 µM) no controlo da libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras do frénico de rato devido à activação dos receprores da adenosina A_1-inibitório e A_{2A}-facilitatório. Os agonistas dos receptores da adenosina, CGS 21680C (2 nM) e R-PIA (30 nM), foram aplicada 15 minutos antes de S_2. O agonista M_1, McN-A-343 (3 µM), foi adicionado ao meio de incubação desde o início do período de libertação (tempo 0). As ordenadas representam a percentagem de variação das razões S_2/S_1 na presença da R-PIA (30 nM) ou CGS 21680C (2 nM) comparativamente com as razões S_2/S_1 em experiências controlo determinadas na presença e na ausência do McN-A-343 (3 µM). Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos da R-PIA (30 nM) e do CGS 21680C (2 nM) isoladamente.

3.1.4 Dinâmica da interacção dos receptores muscarínicos e da adenosina em função do padrão de estimulação.

Em trabalhos anteriores, Correia-de-Sá e colaboradores (1996b) mostraram que o balanço entre a activação tónica dos receptores A_1 e A_{2A} dependia da concentração de

adenosina na junção neuromuscular de rato e que esta era estritamente regulada pelo padrão de estimulação nervosa utilizado para desencadear a libertação do neurotransmissor. Foi ainda demonstrado que a adenosina activa preferencialmente receptores inibitórios de subtipo A_1 durante a actividade nervosa moderada (*e.g.* estímulos com uma frequência de 5 Hz), mas quando se aumenta a frequência de estimulação (50 Hz) observa-se um aumento proporcional no teor de adenosina na fenda sináptica podendo atingir níveis capazes de activar receptores facilitatórios do subtipo A_{2A} (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Esta hipótese é apoiada por resultados obtidos testando os efeitos da desaminase da adenosina (ADA, 0.5 U/mL), a enzima que metaboliza a adenosina endógena no seu metabolito inactivo inosina (Arch & Newsholme, 1978). A adição de ADA (0.5 U/ml) ao meio de incubação removeu o tónus inibitório mediado pela adenosina endógena, *i.e.* causou um efeito facilitatório de +19±3% (n=4) na libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação nervosa aplicada com uma frequência de 5 Hz (750 pulsos com 40 μs de duração). Contrariamente, a ADA (0.5 U/ml) reduziu (-54±8%, n=5) significativamente a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por 5 estímulos tetânicos (50 Hz, 150 pulsos com 40 μs de duração) intervalados por períodos de 20 segundos em repouso (*Tetanic bursts*), sugerindo uma predominância do tónus facilitatório mediado por receptores A_{2A} nestas condições experimentais (Figura 3.7).

Considerando as interacções potenciais de vários receptores com a adenosina endógena, testou-se o papel neuromodulador dos agonistas dos dois subtipos dos receptores muscarínicos, McN-A-343 (M_1) e oxotremorina (M_2), na libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos de elevada frequência (50 Hz). A Figura. 3.7 mostra que a facilitação (+51±8%, n=7) da libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos com a frequência de 5 Hz na presença de McN-A-343 (3 μM) foi transformada num efeito inibitório quando o nervo frénico foi estimulado com uma frequência de 50 Hz-*"Bursts"*.

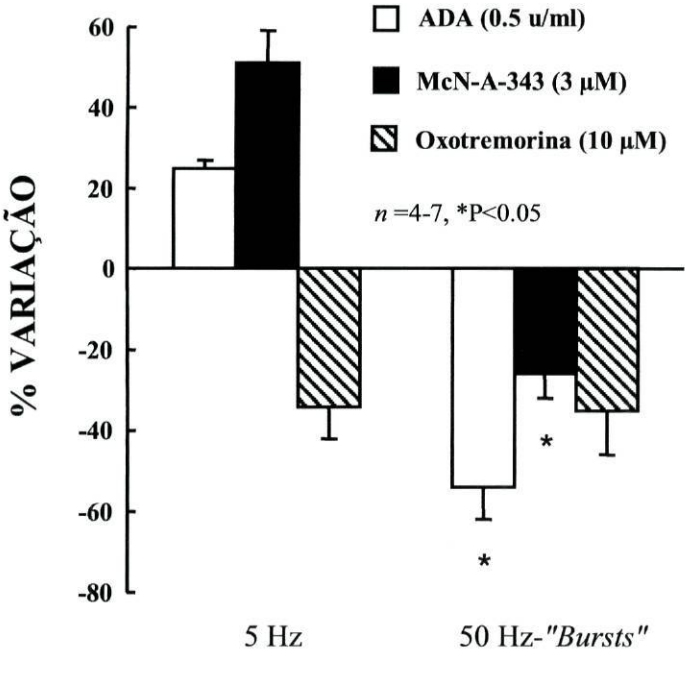


Figura 3.7 Influência da frequência de estimulação no efeito da desaminase da adenosina (ADA, 0.5 U/mL), do McN-A-343 (3 μM) e da oxotremorina (10 μM) na libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras de rato. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação eléctrica do nervo frénico com 750 pulsos de intensidade máxima com frequências de 5 Hz e 50 Hz durante os períodos S_1 e S_2; quando se utilizou a frequência de 50 Hz, foram aplicados 5 tétanos de 150 pulsos cada um intervalados por períodos de 20 segundos em repouso (*"Bursts"*). A ADA (0.5 U/mL), o McN-A-343 (3 μM) e a oxotremorina (10 μM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. As ordenadas representam a variação nas razões S_2/S_1 na presença dos fármacos a testar comparados com as razões S_2/S_1 em experiências controlo usando protocolos de estimulação semelhantes. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com o efeito dos mesmos fármacos observado para estímulos aplicados com uma frequência de 5 Hz.

Deve, ainda, realçar-se o facto do efeito inibitório do McN-A-343 (3 μM) ter sido da mesma magnitude do obtido com estímulos de 5 Hz (1) na presença do agonista dos receptores A_{2A}, CGS 21680C (2 nM, -19±7%, n=6) (Tabela 3.1), ou (2) após a aplicação do antagonista dos receptores A_1, DPCPX (2.5 nM, -23±5%, n=5) (resultado não apresentado), que causa um desvio do efeito tónico da adenosina no sentido da activação dos receptores A_{2A} (Correia-de-Sá *et al.*, 1991). Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a interacção negativa entre os receptores facilitatórios A_{2A} e M_1 pode ser funcionalmente relevante em situações que favorecem a acumulação de adenosina e a atenuação do tónus inibitório mediado pelos receptores A_1, tal como acontece durante períodos de actividade neuronal de elevada frequência (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Contrariamente, o efeito inibitório da oxotremorina (10 μM, ~35%) não foi

significativamente alterado quando se aumentou a frequência de estimulação de 5 para 50 Hz (Figura 3.7), apesar de ter sido atenuado na presença do antagonista selectivo dos receptores A_{2A} da adenosina, ZM 241385 (10 nM, -6±7%, n=5). Estes resultados parecem indicar que a inibição mediada pelos receptores M_2 é favorecida pela activação tónica dos receptores A_{2A} durante estímulos de elevada frequência (50 Hz).

3.2 Dissociação entre a facilitação da libertação de ACh mediada por receptores muscarínicos M_1 e a interacção com os receptores A_{2A} e M_2 localizados nas terminações nervosas motoras de rato.

3.2.1 A facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela activação dos receptores muscarínicos M_1 resulta maioritariamente do recrutamento de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares sensíveis ao IP_3

Para investigar o papel da cascata da fosfolipase C na capacidade dos receptores M_1 facilitarem a libertação de [^{3}H]-ACh, testou-se o efeito de fármacos capazes de bloquearem a via dos fosfatos de inositol, como o LiCl (10 mM) e o 2-aminoetoxidifenilborano (2-APB, 30 μM), e o de um potente inibidor do domínio catalítico da proteína cinase C (PKC), a cheleritrina (CHL, 5 μM) (Herbert *et al.*, 1990). Conforme está ilustrado na Figura 3.8 (A), o efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM, +51±8%, n=7) foi prevenido pelo bloqueador do receptor do IP_3, 2-APB (30 μM, IC_{50} de 10 a 42 μM) (Maruyama *et al.*, 1997), não tendo sido alterado pelo inibidor selectivo da PKC, CHL (5 μM, IC_{50} de 0.66 μM) (Herbert *et al.*, 1990) (ver também a Figura 3.9). A flunarizina (3 μM), um bloqueador alternativo do receptor do IP_3, também reduziu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pelo McN-A-343 (3 μM) para +2±6%, (n=4). Note-se que todos os agentes modificadores da cascata da fosfolipase C estiveram presentes durante todo o

período de libertação, incluindo durante S_1 e S_2, em concentrações virtualmente desprovidas de efeito na libertação de [^{3}H]-ACh (Tabela 3.2).

Os efeitos da CHL (5 μM) e do 2-APB (30 μM) parecem ser específicos uma vez que, estes fármacos preveniram os efeitos facilitatórios causados respectivamente pelo activador da PKC, o éster de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA, 10 μM, +27±7%, n=4), e pelo LiCl (10 mM, +22±3%, n=4), um inibidor não-competitivo da monofosfatase do inositol (K_i de 0.5-1 mM) capaz de elevar os níveis intracelulares de IP_3 (Nahorski *et al.*, 1991) (Figura 3.8 (B) e 3.8 (C), ver Tabela 3.2 para obter os valores-controlo). Tal como esperado não foram observados efeitos cruzados entre a CHL (5 μM) e o LiCl (10 mM), assim como entre o 2-APB (30 μM) e o PMA (1-30 μM) (dados não representados).

Os resultados mostrando que o LiCl (3-30 mM) facilita a libertação de [^{3}H]-ACh de forma dependente da concentração confirmam os dados obtidos através de técnicas electrofisiológicas e sugerem que a potenciação da libertação do neurotansmissor pelo LiCl se deve ao recrutamento de Ca^{2+} a partir dos reservatórios intracelulares sensíveis ao IP_3 (Branisteanu & Volle, 1975; Crawford, 1975; Maeno *et al.*, 1995). Esta possibilidade é bastante provável, já que os dois bloqueadores do receptor do IP_3 testados no presente trabalho, 2-APB (30 μM) e flunarizina (3 μM), antagonizaram o efeito facilitatório do LiCl (10 mM) (ver *e.g.* Figura 3.8 (C)). Apesar dos resultados obtidos, neste trabalho não foi possível excluir acções alternativas do Li^+ sobre outras vias de sinalização celular (*e.g.* interacções ao nível das proteínas G e outros mecanismos efectores) (ver a revisão de Phiel & Klein, 2001). Está bem estabelecido que a sensibilidade celular ao Li^+ depende da homeostasia dos polifosfatos de inositol, variando por isso com o tipo de célula e com o seu estado de actividade; este facto pode explicar porque razão alguns tecidos requerem concentrações mais elevadas (30-60 mM) de LiCl até que se obtenha a inibição máxima da

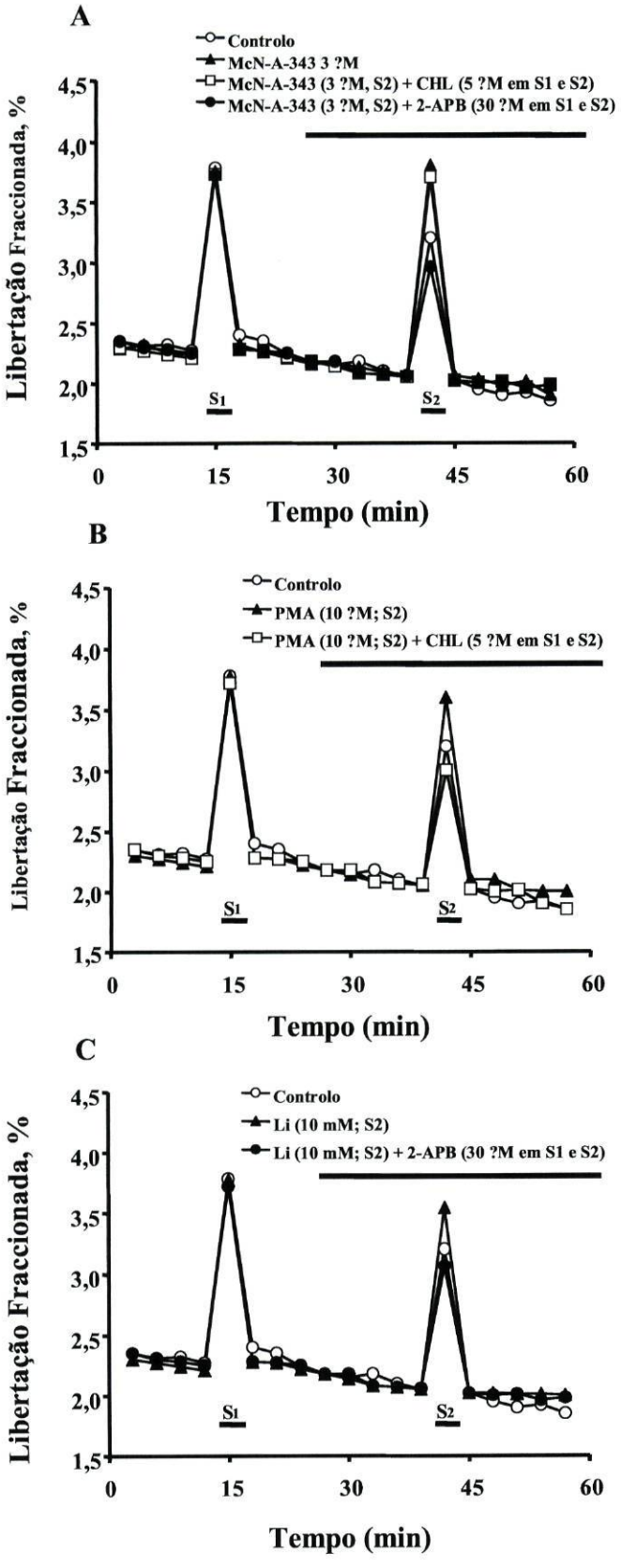


Figura 3.8 Facilitação muscarínica M_1 da libertação provocada de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores de rato: Comparação com os efeitos excitatórios da estimulação da via do IP_3 intracelular e a via de sinalização da PKC. Os paneis (A), (B), e (C) mostram curvas de efluxo de trítio obtidas em experiências típicas realizadas na ausência (Controlo, ○) e na presença (▲) de um agonista dos receptores M_1 (McN-A-343 3 μM), do activador da PKC (PMA 10 μM) e do inibidor do metabolismo dos fosfatos de inositol (LiCl 10 mM), respectivamente. O efeito do McN-A-343 (3 μM) foi testado na presença de CHL (5 μM, A) e 2-APB (30 μM, A), enquanto que o efeito do PMA (10 μM) foi testado na presença de CHL (5 μM, B) e do LiCl (10 mM) foi testado na presença de 2-APB (30 μM, C). O efluxo de trítio encontra-se expresso em função da percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita – Libertação fraccionada. As abcissas indicam o tempo no qual as amostras foram recolhidas. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). O McN-A-343 (3 μM), o PMA (10 μM) e o LiCl (10 mM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. Nas experiências em que se usaram CHL (5 μM) e 2-APB (30 μM) estes fármacos estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. Os fármacos não alteraram a libertação espontânea de trítio.

monofosfatase do inositol (Fisher, 1995). Também é bem aceite a ideia de que a inibição prolongada do ciclo dos fosfatos de inositol pelo LiCl causa depleção dos níveis intracelulares de inositol e reduz a actividade dos receptores acoplados à via do IP_3 (Berridge & Irvine, 1989). Este efeito que tem sido invocado para explicar a disfunção miasténica observada em alguns doentes medicados cronicamente com Li^+ para o tratamento da doença bipolar (Ronziere *et al.*, 2000). Neste trabalho, mostrou-se que o efeito facilitatório do LiCl (10 mM) pode ser abolido prolongando a sua presença no meio de incubação após a aplicação de um estímulo de pré-condicionamento (S_0) 15 minutos antes do fim do período de lavagem (tempo 0) (ver *e.g.* Worley *et al.*, 1988). Nestas condições experimentais, a razão S_2/S_1 não foi significativamente ($P>0.05$) diferente do valor controlo (ver Tabela 3.2), mas o pré-tratamento com LiCl (10 mM) reduziu a capacidade do McN-A-343 (3 μM, aplicado 15 minutos antes de S_2) facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh (Figura 3.9). Isto foi verificado mesmo quando o agonista muscarínico M_1 foi aplicado numa concentração superior (10 μM, resultado não apresentado). Para avaliar se o efeito do LiCl (10 mM) poderia ser devido à inibição do trocador Na^+/Ca^{2+} e/ou ao bloqueio do transporte neuronal de Na^+ e geração do potencial de acção devido à substituição equimolar (10 mM) do NaCl no meio de incubação, realizaram-se experiências paralelas usando um substituinte do Na^+ extracelular, NMDG (10 mM). Por si só, a aplicação de NMDG (10 mM) não alterou significativamente ($P>0.05$) o efluxo de trítio (Tabela 3.2). Na presença do NMDG (10 mM), a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pelo McN-A-343 (3 μM) foi da mesma ordem de grandeza (+46±12%, n=4) da observada nas esperiências controlo (Figura 3.9). Os resultados sugerem que a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela activação de receptores M_1 resulta predominantemente do aumento da produção de fosfatos de inositol e da estimulação dos receptores intracelulares do IP_3.

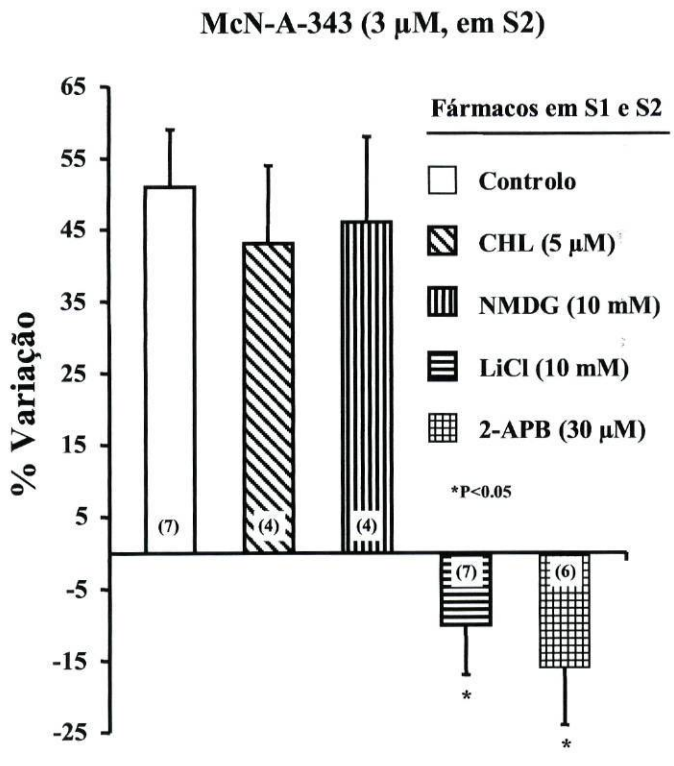


Figura 3.9 Efeito facilitatório do agonista M_1, McN-A-343 na presença de CHL (5 μM), 2-APB (30 μM), LiCl (10 mM) e NMDG (10 mM) na libertação provocada de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras de rato. A libertação de [^{3}H]-ACh foi provocada por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contando a partir do término do período de lavagem (tempo zero). O McN-A-343 (3 μM) foi adicionado ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. A CHL (5 μM), o 2-APB (30 μM), o LiCl (10 mM) e o NMDG (10 mM), estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 quando comparadas com as razões S_2/S_1 em experiências controlo. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos do McN-A-343 usado isoladamente.

3.2.2 A activação dos receptores muscarínicos M_1 restringe tanto o efeito inibitório mediado por receptores M_2 como a faclitação resultante da activação de receptores A_{2A} por um mecanismo dependente da activação da PKC.

Na Figura 3.10 mostra-se que o McN-A-343 (3 μM) preveniu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh induzida pelo CGS 21680C (2 nM, um agonista selectivo dos receptores A_{2A}) assim como a inibição causada pela oxotremorina (10 μM). Estes resultados demonstram que a activação dos receptores muscarínicos M_1 restringe tanto o efeito inibitório mediado por receptores M_2 como a facilitação resultante da activação de receptores A_{2A} da adenosina.

	A_1 (LF, %)	S_1 (LF, %)	S2/S1	*n*
Controlo	2.29±0.01	3.78±0.02	0.81±0.03	8
Fármacos em S_1 e S_2				
PMA (10 μM)	2.27±0.03	4.24±0.01*	0.81±0.06	4
CHL (5 μM)	2.26±0.03	3.81±0.04	0.85±0.08	5
2-APB (30 μM)	2.24±0.04	3.80±0.03	0.76±0.03	5
Flunarizina (3 μM)	2.27±0.04	3.82±0.03	0.83±0.03	4
LiCl (10 mM)	2.27±0.04	3.82±0.03	0.83±0.03	4
NMDG (10 mM)	2.28±0.03	3.84±0.04	0.87±0.06	6
Nifedipina (1μM)	2.23±0.01	3.83±0.02	0.78±0.07	4

Tabela 3.2 Efeito dos moduladores das vias de sinalização na libertação basal e provocada de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores de rato. Os dados mostram a radioactividade das amostras colhidas imediatamente antes (A_1) e depois (S_1) do primeiro período de estimulação expressa em percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita (Libertação Fraccionada, FR, %). A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). O PMA (10 μM), a CHL (5 μM), o 2-APB (30 μM), o LiCl (10 mM), o NMDG (10 mM), a flunarizina (3 μM) e a nifedipina (1 μM) estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. *P<0.05 foram considerados significativos quando comparados com o efluxo de trítio médio em S_1 obtido nas experiências controlo.

O mecanismo pelo qual os receptores M_1 regulam negativamente a função dos receptores facilitatórios A_{2A} e dos inibitórios M_2 parece envolver a activação da PKC

Esta hipótese foi considerada já que o bloqueio dos efeitos do CGS21680C (2 nM, +24±6%, n=4) e da oxotremorina (10 μM, -34±8%, n=5) observado na presença de McN-A-343 (3 μM) foi reproduzido pela forma activa do éster de forbol, PMA (10 μM) (Figura 3.10). À semelhança do que tinha sido observado na presença de McN-A-343 (3 μM), o

pré-tratamento com PMA (10 μM) transformou o efeito facilitatório do CGS21680C (2 nM) num pequeno efeito inibitório, tendo o oposto sido observado relativamente à inibição causada pela oxotremorina (10 μM). Este efeito poderá resultar de uma mudança no padrão de modulação conduzindo à acentuação da actividade dos receptores inibitórios A_1 da adenosina e facilitatórios M_1 respectivamente pelo CGS21680C (2 nM) e pela oxotremorina (10 μM), tal como foi observado anteriormente (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b; Oliveira *et al.*, 2002). Para avaliar se esta alteração do padrão de modulação poderia ser motivada pelo enfraquecimento da actividade dos receptores A_{2A} e M_2 causada pela estimulação da PKC, realizaram-se experiências adicionando o inibidor da PKC, CHL (5 μM), às soluções contendo o agonista M_1, McN-A-343 (3 μM). Nestas condições, observou-se um restabelecimento completo dos efeitos facilitatório do CGS21680C (2 nM) e inibitório da oxotremorina (10 μM). O mesmo não se verificou quando o McN-A-343 (3 μM) foi aplicado ao meio de incubação contento LiCl (10 mM) (Figura 3.10). Note-se que não foi detectada qualquer alteração do efeito do CGS21680C (2 nM) e da oxotremorina (10 μM) na presença de LiCl (10 mM), aplicado isoladamente.

3.2.3 A estimulação da PKC causada pela activação dos receptores M_1 regula a formação intracelular de AMP cíclico

Para avaliar se a restrição da actividade dos receptores A_{2A} e M_2 motivada pela interacção cruzada com receptores muscarínicos do subtipo M_1 seria mediada pela interligação entre vias de sinalização paralelas, testaram-se os efeitos do activador da adenilciclase, forscolina (FSK) (Seamon *et al.*, 1981) e do inibidor não-xantínico das fosfodiesterases do tipo IV, rolipram (ROL) (Beavo & Reifnyder, 1990) na presença de McN-A-343 (3 μM). Os efeitos facilitatórios da FSK (1-10 μM) e do ROL (0.01-1 mM) na libertação de [^{3}H]-ACh na junção neuromuscular de rato foram descritos previamente

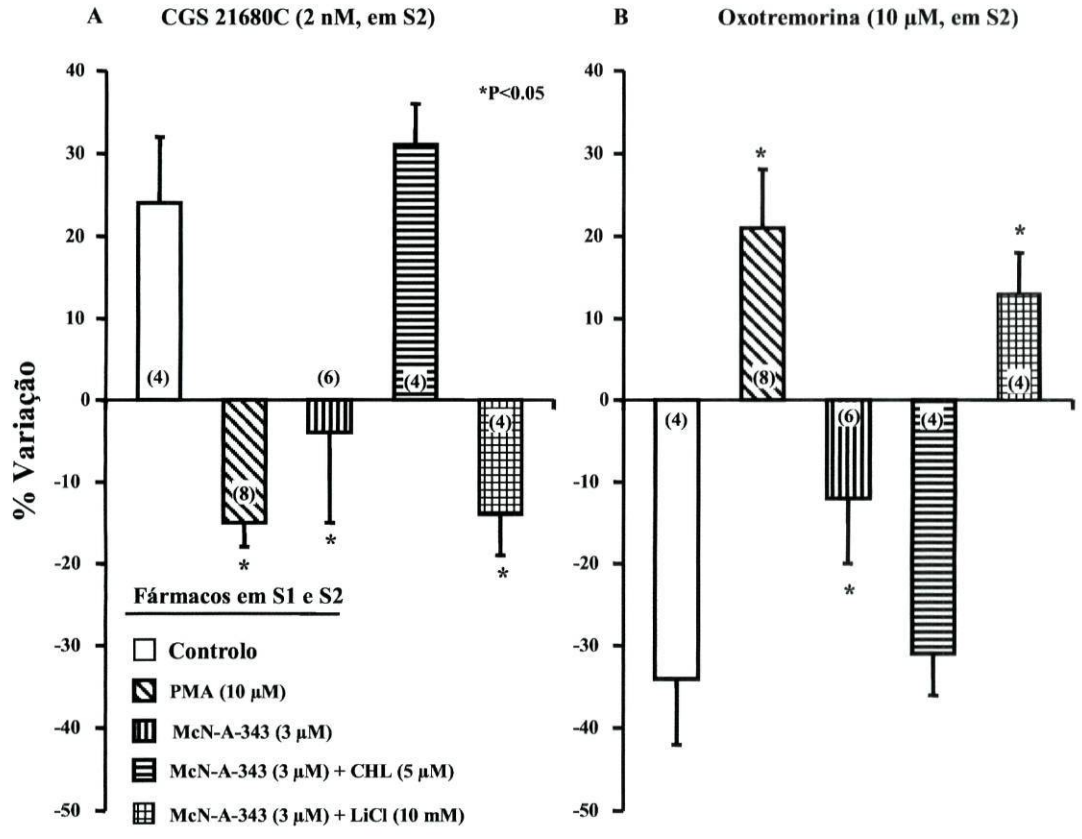


Figura 3.10 A activação dos receptores muscarínicos M_1 restringe a actividade (A) facilitatória do CGS21680C (2 nM) e a (B) inibição causada pela oxotremorina (10 μM) na libertação de [^{3}H]-ACh por um mecanismo dependente da activação da PKC na placa motora de rato. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). O CGS21680C (2 nM) e a oxotremorina (10 μM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. O PMA (10 μM) e o McN-A-343 [3 μM, na presença ou na ausência de CHL (5 μM) ou de LiCL (10 mM)], estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 quando comparadas com as razões S_2/S_1 em experiências controlo. Valores de $*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos do CGS21680C (2 nM) e da oxotremorina (10 μM) aplicados isoladamente

(Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994a). Na presença de LiCL (10 mM), que por si só não foi capaz de alterar as respostas da FSK (3 μM) e do ROL (300 μM), o agonista M_1 McN-A-343 (3 μM) preveniu as respostas facilitatórias dos dois compostos promotores da acumulação de AMP cíclico intracelular (Figura 3.11). O efeito supressivo do McN-A-343 (3 μM) na presença de LiCl (10 mM) foi reproduzido pelo PMA (10 μM). Estes resultados eliminam a possibilidade do LiCl (10 mM) modificar os níveis intracelulares de AMP

cíclico (Mork & Geisler, 1995) e, também, a hipótese dos receptores muscarínicos M_1 estimularem a acumulação do AMP cíclico através do acoplamento com a proteína G_s em lugar da habitual proteína $G_{q/11}$ (Burford & Nahorski, 1996; Lanzafame *et al.*, 2003).

Para estudar a evetualidade da activação da PKA poder ser modulada pela cascata de sinalização iniciada pela PKC em resposta à activação dos receptores muscarínicos M_1, testou-se o efeito de um antagonista do AMP cíclico que penetra bem as membranas celulares, o Rp-adenosina 3',5'-monofosfotioto cíclico de trietilamina (Rp-cAMPS) (Rothermel *et al.*, 1983). Este composto reduziu a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação eléctrica das terminações nervosas motoras de forma dependente da concentração utilizada (1-10 μM); quando usado numa concentração superior (50 μM) o Rp-cAMPS também inibiu a libertação de [^{3}H]-ACh ($P<0.05$), mas a taxa de inibição foi semelhante à observada com 10 μM (-38±7%, $n=4$). Por este motivo, usou-se nas experiências de interacção farmacológica a concentração de Rp-cAMPS (10 μM), que foi suficiente para prevenir a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh causada pelo agonista A_{2A}, CGS21680C (2 nM) (ver figura 3.13). Contrariamente ao que tinha sido observado com a FSK (3 μM) e o ROL (300 μM), o efeito inibitório do Rp-cAMPS (10 μM) não foi significativamente alterado pelo McN-A-343 (3 μM) aplicado na presença de LiCl (10 mM) (Figura 3.11). Estes resultados sugerem que a estimulação da PKC causada pela activação de receptores muscarínicos M_1 é capaz de regular a acumulação intracelular de AMP cíclico, provavelmente interferindo com a actividade da adenilciclase que é a enzima limitante do sistema de transdução mediado pelo AMP cíclico (*cf.* Premont *et al.*, 1992).

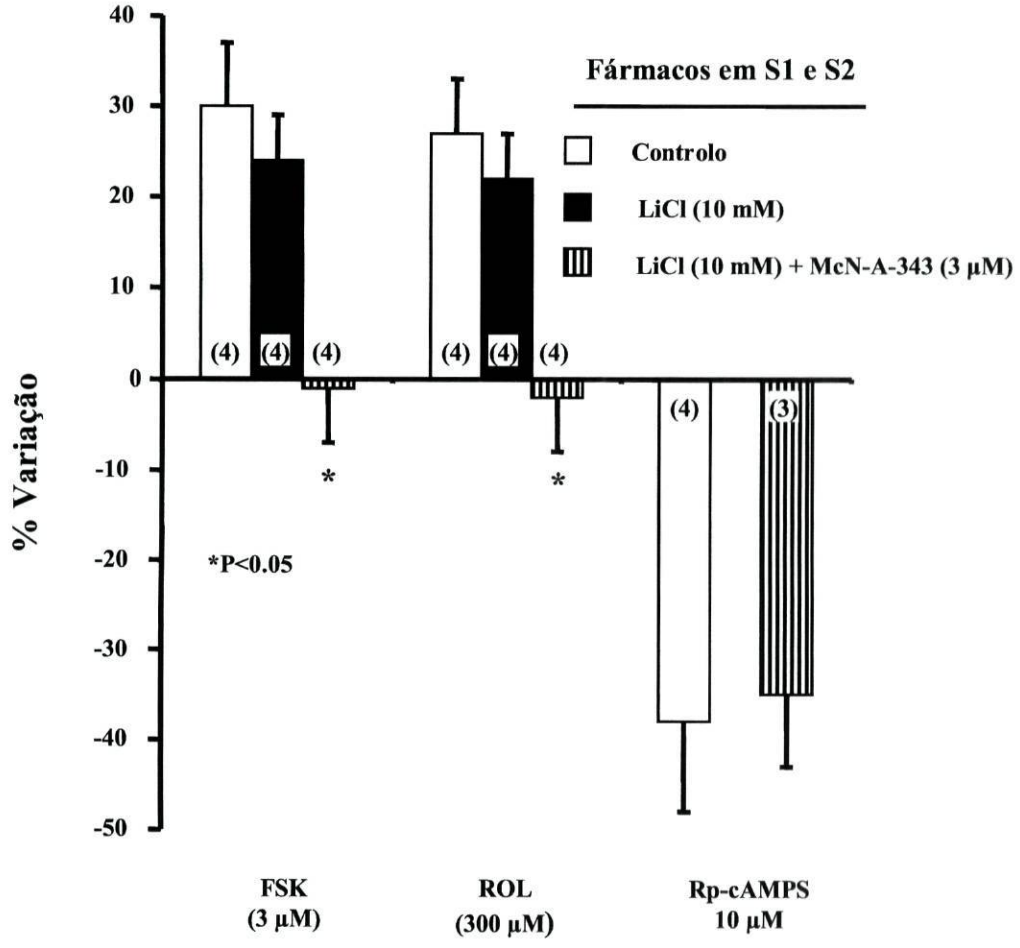


Figura 3.11 Na presença de LiCl (10 mM), a activação dos receptores muscarínicos M_1 atenua o efeito facilitatório da FSK (3 μM) e do ROL (300 μM), mas não o efeito depressor do antagonista do AMP cíclico, Rp-cAMPS (10 μM), na libertação provocada de [^{3}H]-ACh nas terminações nervosas motoras de rato. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos aplicados com uma frequência de 5 Hz (S_1 e S_2). A FSK (3 μM), o ROL (300 μM) e o Rp-cAMPS (10 μM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2. O McN-A-343 (3 μM) foi aplicado durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2, em preparações pré-incubadas com LiCl (10 mM) e sujeitas a um estímulo pré-condicionante (S_0) 15 min antes do fim do período de lavagem. As ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 quando comparadas com as razões S_2/S_1 em experiências controlo. Valores de $*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com os efeitos dos fármacos na ausência do LiCl (10 mM) e de McN-A-343 (3 μM).

3.2.4 A interacção entre os receptores facilitatórios A_{2A} e M_1 resulta da convergência das duas vias de sinalização intracelulares para a activação da proteína cinase A (PKA) e influxo de cálcio através de canais Ca_V1 (tipo L).

Conforme foi referido anteriormente (Tabela 3.1), a capacidade do McN-A-343 (3 μM) facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh foi prevenida na presença de CGS 21680C (2 nM) (Figura 3.12 (B)). O efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) foi restabelecido quando o CGS 21680C (2 nM) foi adicionado na presença do antagonista selectivo para os receptores A_{2A}, ZM 241385 (10 nM). A supressão do efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) pelo CGS 21680C (2 nM) foi, também, parcialmente restabelecido após a adição do antagonista do AMP cíclico, Rp-cAMPS (10 μM) (Figura 3.12 (B)). A estimulação do sistema de transdução intracelular adenilcilase / AMP cíclico com FSK (3 μM), ROL (300 μM) e 8-bromo AMP cíclico (8-Br-cAMP, 1 mM, um análogo permeável do AMP cíclico) causou a supressão do efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) de forma análoga à observada na presença do CGS 21680C (2 nM) (Figura 3.12 (A)). O efeito da FSK parece ser específico já que o seu análogo inactivo sobre a adenilciclase, 1,9-dideoxiforscolina (1,9-ddFSK, 3 μM) (Laurenza *et al.*, 1989), não alterou o efeito do McN-A-343 (3 μM) na libertação de [^{3}H]-ACh (Figura. 3.12 (A)). Estes resultados sugerem que a supressão da actividade dos receptores muscarínicos M_1 pela adenosina requer a activação de receptores A_{2A} acoplados ao sistema de transdução adenilciclase / AMP cíclico. Em suma, os dados demonstram a existência de uma acção oclusiva recíproca entre os receptores facilitatórios M_1 e A_{2A} nas terminações nervosas motoras (ver também as Secções 3.2.2 e 3.2.3) resultante da interacção ao nível dos mecanismos de transdução de sinal, particularmente da proteína cinase C e A, respectivamente.

Curiosamente, durante o estudo das interacções recíprocas entre os receptores M_1 e A_{2A}, observou-se que a inibição da actividade da proteína cinase A (PKA) pelo Rp-cAMPS (10 μM) suprimia o efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) de forma idêntica à verificada na presença de CGS21680C (2 nM) (Figura. 3.13 (A)). Verificou-se, ainda, que

o bloqueio dos canais de Ca^{2+} do subtipo Ca_V1 (tipo L) após a aplicação de nifedipina (1 μM) suprimia os efeitos facilitatórios tanto do McN-A-343 (3 μM) como do CGS21680C (2 nM). Sabendo que ambos os receptores, M_1 e A_{2A}, podem recrutar Ca^{2+} através deste tipo de canais sensíveis à voltagem (Somogyi *et al.* 1997; Correia-de-Sá *et al.*, 2000a), investigou-se a possibilidade de ambos os receptores fazerem convergir as suas acções através de diferentes vias de sinalização intracelular para um alvo comum, como por exemplo os canais Ca_V1 (tipo L). A convergência de sinais intracelulares operada pelos receptores M_1 e A_{2A} poderia explicar a sua actividade mutuamente exclusiva, sendo o efeito dominante ditado pela probabilidade de activação de cada um dos receptores.

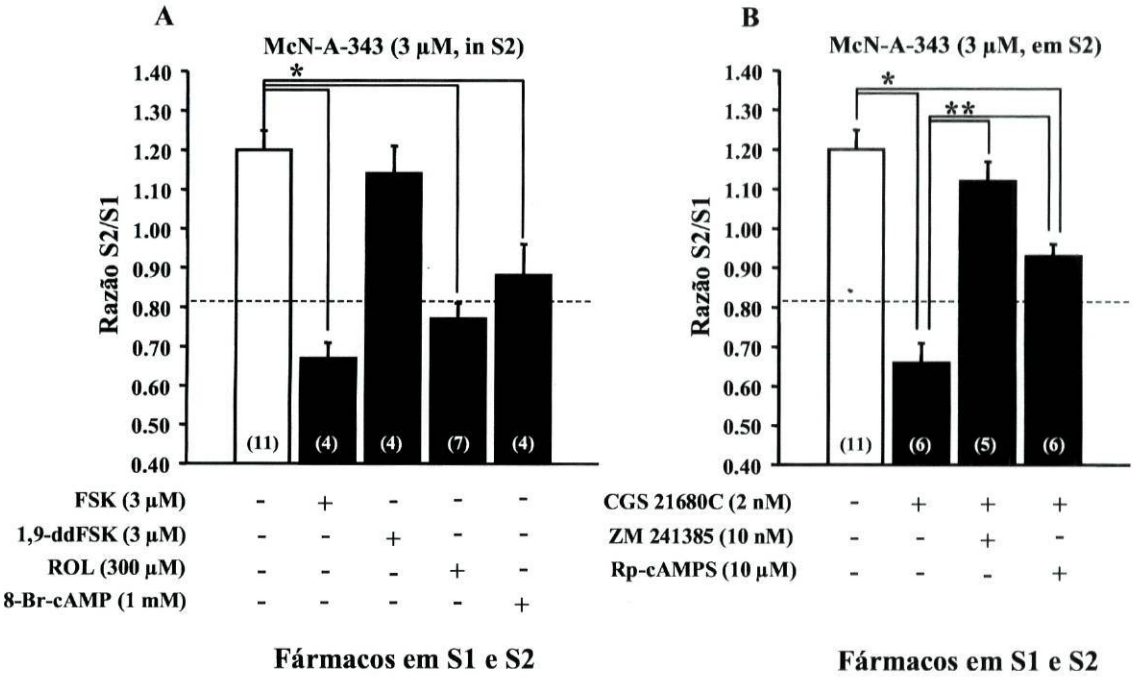


Figura 3.12 A activação dos receptores A_{2A} da adenosina suprime o efeito facilitatório do McN-A-343 (3 μM) na libertação de [^{3}H]-ACh por um mecanismo acoplado positivamente à via da adenilciclase / AMP cíclico. O McN-A-343 (3 μM) foi aplicado 15 minutos antes de S_2.O CGS21680C (2 nM) na presença ou na ausência de ZM241385 (10 nM) ou de Rp-cAMPS (10 μM) (A) e a FSK (3 μM), 1,9-ddFSK (3 μM), ROL (300 μM) e 8-Br-AMPc (1 mM) (B), estiveram presentes durante todo o período experimental S_1 e S_2. As razões S_2/S_1 obtidas nestas condições não foram significativamente diferentes das razões obtidas para as experiências controlo (na ausência de qualquer fármaco em S_1 e S_2) (linha horizontal a tracejado). As ordenadas representam o efluxo de trítio expresso sob a forma das razões entre S_2/S_1. Valores de *,**$P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com o efeito do McN-A-343 (3 μM) na ausência ou na presença de CGS21680C (2 nM), respectivamente.

A Figura 3.13 (C) mostra que o efeito facilitatório resultante da aplicação simultânea de McN-A-343 (3μM) e de CGS21680C (2 nM), 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2), não foi superior ($P>0.05$) ao observado pela aplicação isolada do fármaco mais activo, McN-A-343 (3 μM) (Figura 3.13, B e C) em concentrações não saturantes. Caso ambos os fármacos estivessem a actuar em vias de sinalização sincrónicas separadas, a combinação dos dois agonistas deveria ter aumentado a libertação de [^{3}H]-ACh para além do nível observado para o agonista mais potente. Foram excluídas possíveis interacções de antagonismo entre os dois receptores, já que o efeito facilitatório máximo obtido por ambos os agonistas foi equivalente ao observado com o agonista mais eficiente. Curiosamente, a aplicação de nifedipina (1 μM) aboliu o efeito facilitatório observado pela aplicação simultânea de McN-A-343 (3 μM) e de CGS21680C (2 nM) (Figura 3.13 (C)).

Como os canais Ca_V1 (tipo L) não participam geralmente no processo de libertação (Tsien, 1988; Robitaille *et al.*, 1990; Correia-de-Sá *et al.*, 2000b), investigou-se a possibilidade do influxo de Ca^{2+} poder ser revelado pela activação dos receptores facilitatórios muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina (*e.g.* Somogyi *et al.*, 1997; Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). A nifedipina, usada numa concentração (1 μM) capaz de bloquear especificamente os canais Ca_V1 (Dunlap *et al.*, 1995), inibiu a libertação de [^{3}H]-ACh apenas na presença de McN-A-343 (3 μM) e/ou de CGS21680C (2 nM), não se tendo observado qualquer efeito em situação controlo (Figura. 3.14). O efeito inibitório da nifedipina (1 μM) resultante da co-aplicação de McN-A-343 (3 μM) e de CGS21680C (2 nM) teve uma magnitude semelhante à observada quando estes agonistas foram aplicados individualmente (Figura 3.14). Assim, o efeito mutuamente oclusivo dos receptores M_1 e A_{2A} está de acordo com a hipótese de que ambos os receptores compartilham uma via de sinalização comum responsável pela facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh que pode

desencadear o influxo de Ca^{2+} através dos canais Ca_V1 que estão fisiologicamente "silenciosos".

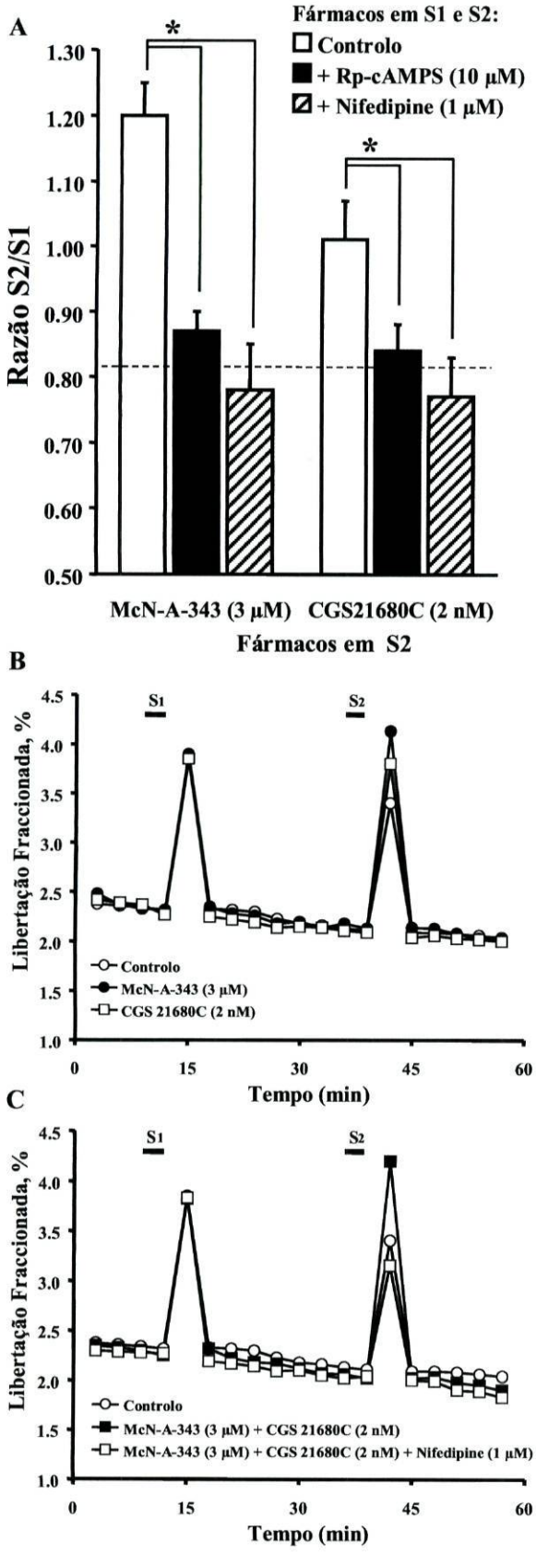


Figura 3.13 Activação dos receptores facilitatórios muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina é prevenida pelo bloqueio da actividade da PKA e do influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 com Rp-cAMPS (10 μM) e nifedipina (1 μM), respectivamente. Em (A), o CGS21680C (2 nM) e o McN-A-343 (3 μM) foram aplicados 15 minutos antes de S_2, nas experiências com Rp-cAMPS (10 μM) e nifedipina (1 μM) estes fármacos estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As razões S_2/S_1 obtidas nestas condições não foram significativamente diferentes da razão obtida nas experiências controlo (na ausência de qualquer fármaco em S_1 e S_2) (linha horizontal a tracejado). As ordenadas representam o efluxo de trítio expresso sobe a forma das razões S_2/S_1. Valores de $*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com o efeito facilitatório do CGS21680C e McN-A-343 isoladamente. Em (B) e (C) estão representadas curvas de efluxo de trítio em experiências típicas realizadas em hemdiafragma enervado de rato na ausência (Controlo, ○) e na presença de McN-A-343 (3 μM, ●) ou de CGS21680C (2 nM, □) isoladamente ou em simultâneo (■), 15 minutos antes de S_2. Nas experiências onde se usou nifedipina (1 μM, □) este fármaco esteve presente durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. O efluxo de trítio encontra-se expresso em percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita. As abcissas indicam o tempo no qual as amostras foram recolhidas. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz. Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) aos 12 minutos e 39 minutos contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero).

A inibição da PKA ou da PKC respectivamente com Rp-cAMPS (10 μM) ou com CHL (5 μM), preveniu a capacidade da nifedipina (1 μM) inibir a libertação de [^{3}H]-ACh na presença de McN-A-343 (3 μM) (Figura 3.14). Estes resultados demonstram que o influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 induzido pela activação M_1 requer a activação paralela da PKA e da PKC. Como o Rp-cAMPS (10 μM) atenuou o efeito facilitatório do PMA (10 μM, 27±9%, n=4), mas a CHL (5 μM) não foi capaz de alterar a facilitação causada pelo 8-Br-AMPc (1 mM, 30±3%, n=4) (Figura 3.15), os resultados sugerem que o envolvimento da PKA poderá ser secundário à activação da PKC.

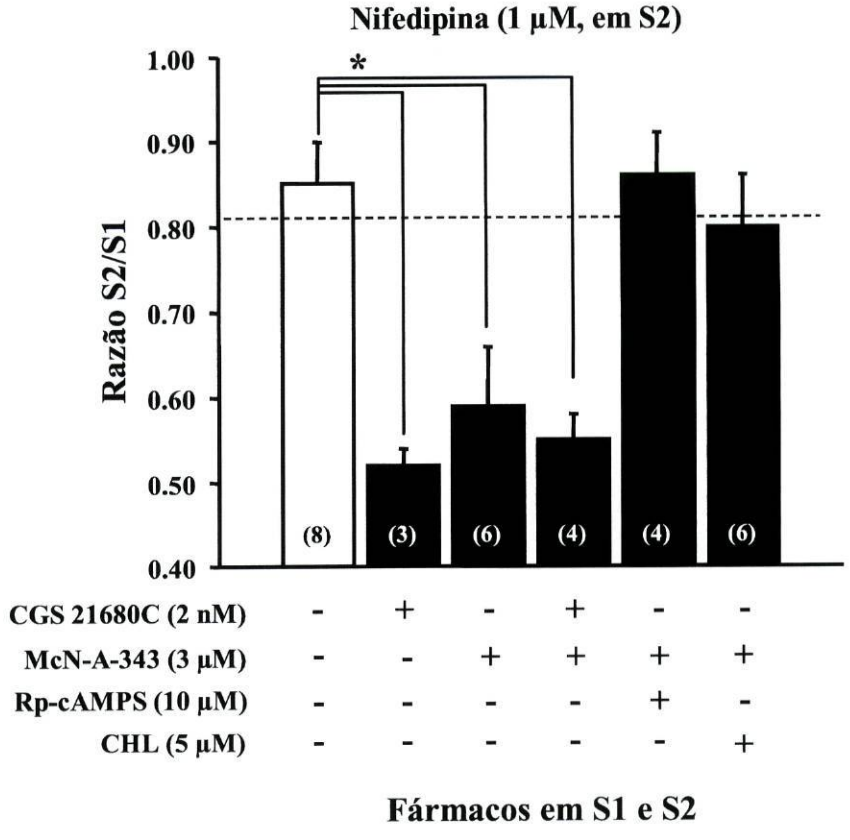


Figura 3.14 A activação dos receptores facilitatórios muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina favorecem o influxo de Ca^{2+} por canais sensíveis à nifedipina: Papel da PKA e da PKC. A nifedipina (1 μM) foi aplicada 15 minutos antes de S_2. O McN-A-343 (3 μM), o CGS21680C (2 nM), o Rp-cAMPS (10 μM) e a CHL (5 μM) estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As razões S_2/S_1 obtidas nestas condições não foram significativamente diferentes da razão obtida nas experiências controlo (na ausência de qualquer fármaco em S_1 e S_2) (linha horizontal a tracejado). As ordenadas representam o efluxo de trítio expresso sob a forma das razões entre S_2/S_1. Valores de $^*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com o efeito da nifedipina aplicada isoladamente.

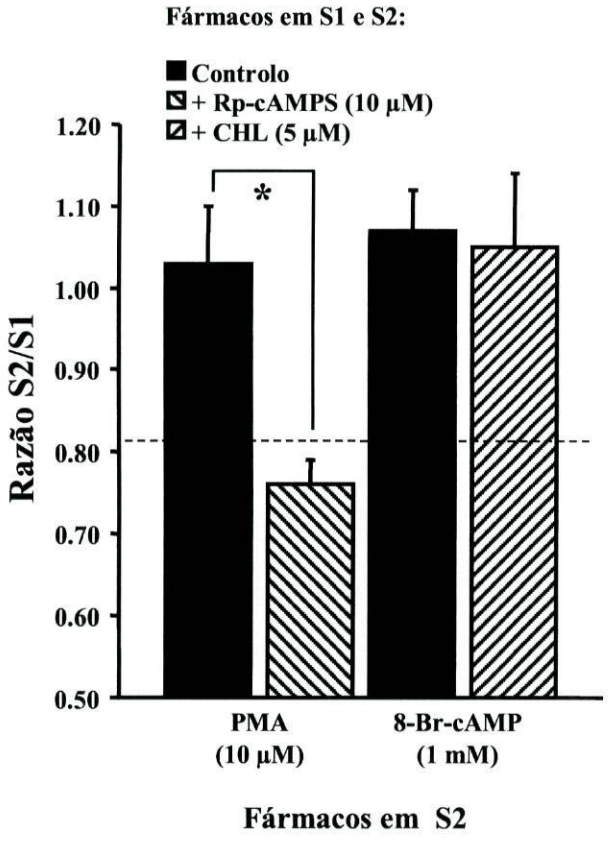


Figura 3.15 A facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores mediada pela PKC requer a activação secundária da PKA. O PMA (10 μM) e o 8-Br-AMPc (1 mM) foram aplicados 15 minutos antes de S_2. O Rp-cAMPS (10 μM) e a CHL (5 μM) estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As razões S_2/S_1 obtidas nestas condições não foram significativamente diferentes das razões obtidas nas experiências controlo (na ausência de qualquer fármaco em S_1 e S_2) (linha horizontal a tracejado). As ordenadas representam o efluxo de trítio expresso sob a forma das razões entre S_2/S_1. Cada coluna representa dados provenientes de 4-5 experiências. Valores de $*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com o efeito do PMA e do 8-Br-cAMP aplicados isoladamente.

3.3 A depressão tetânica pode ser atenuada pelo recrutamento de cálcio pelos canais Ca_V1 (tipo L) devido à activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina nas terminações nervosas motoras.

3.3.1 Influência das condições de estimulação na libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras: Papel diferencial dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) e Ca_V1 (tipo L)

A Figura 3.16 mostra curvas de efluxo de trítio a partir de preparações de hemidiafragma inervado de rato estimuladas indirectamente com diferentes padrões de estimulação eléctrica. A estimulação do nervo frénico com 750 pulsos aplicados com uma frequência 5 Hz aumentou o efluxo de trítio para um valor médio de $83\pm4\times10^3$ d.p.m/g (n=11) acima dos níveis basais. O efluxo médio de [^{3}H]-ACh decresceu para $30\pm3\times10^3$

d.p.m/g (n=10) após o aumento da frequência de estimulação para 50 Hz, mantendo constante e número de pulsos aplicados ao nervo frénico (Figura 3.16 (A), *Depressão Tetânica*). No entanto, quando o nervo frénico foi estimulado de forma descontinuada, aplicando 5 estímulos tetânicos com uma frequência 50 Hz (150 pulsos) intercalados por períodos de repouso de 20 segundos (50 Hz-*Bursts*), a libertação de [^{3}H]-ACh recuperou para valores ($88\pm6\times10^3$ d.p.m/g, n=11) idênticos aos obtidos com o estímulo de 5 Hz (ver Tabela 2.1). Em todas as condições experimentais, a libertação de [^{3}H]-ACh foi significativamente (P<0.05) atenuada pela adição de $CdCl_2$ (500 μM) ao meio de incubação, demonstando que a libertação de [^{3}H]-ACh é dependente do influxo de Ca^{2+} por canais sensíveis à voltagem (Figura 3.16 (B)).

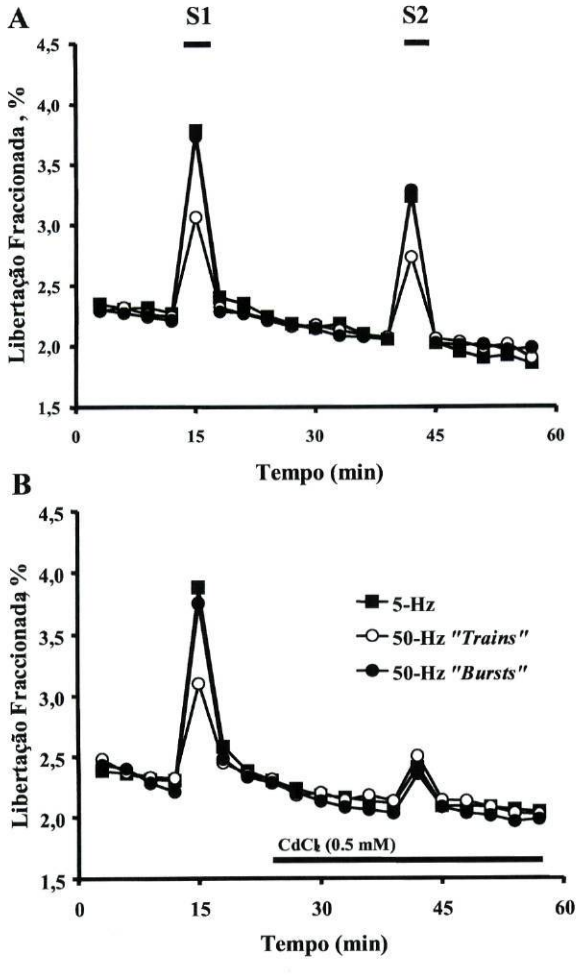


Figura 3.16 Curvas de efluxo de trítio induzido por estimulação eléctrica a partir dos terminais nervosos motores de rato. Representação do efluxo de trítio em situação controlo (A) e na presença de 0.5 mM de $CdCl_2$ (B). O efluxo de trítio (ordenadas) é expresso em percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita. As abcissas indicam os tempos de colheita das amostras. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com frequências de 5 Hz (■) e 50 Hz; quando se usou a frequência de 50 Hz foi aplicado um único período de estimulação durante 15 segundos (○) ou uma série de cinco tétanos de 3 segundos cada (150 pulsos) intervalados de 20 segundos de repouso (●). Foram aplicados dois períodos de estimulação (S_1 e S_2) ao 12 minutos e 39 minutos contados a partir do fim do período de lavagem (tempo zero). O $CdCl_2$ (0.5 mM) (B) foi adicionado ao meio de incubação 15 minutos antes de S_2 (barra horizontal). A libertação espontânea não foi significativamente alterada na presença de $CdCl_2$.

Para investigar a contribuição de diferentes subtipos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (CCSV) para a libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras estimuladas electricamente, avaliou-se o efeito de vários bloqueadores selectivos para os vários tipos de CCSVs. Os fármacos utilizados foram: a ω-agatoxina IVA (ω-AgaTx IVA), que bloqueia canais de cálcio $Ca_V2.1$ (tipo P) em concentrações de ordem nanomolar (Zang *et al.*, 1993); a ω-conotoxina GVIA (ω-CgTx GVIA), que bloqueia selectivamente os canais de cálcio $Ca_V2.2$ (tipo N) (Olivera *et al.*, 1994; Dunlap *et al.*, 1995); a ω-conotoxina MVIIC (ω-CmTx MVIIC), um bloqueador dos canais de cálcio $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) e $Ca_V2.2$ (tipo N) (Wheeler *et al.*, 1994), e a nifedipina, um bloqueador dos canais de cálcio Ca_V1 (tipo L) (Olivera *et al.*, 1994; Dunlap *et al.*, 1995). Devido à cinética de ligação lenta dos péptidos aos canais respectivos, realizaram-se experiências onde o tempo de pré-incubação com estes compostos foi prolongado de 15 para 45 minutos, mas os resultados não foram estatisticamente diferentes ($P>0.05$) (ver também *e.g.* Correia-de-Sá *et al.*, 2000b). A libertação de [^{3}H]-ACh não foi afectada pela ω-CgTx GVIA (1 μM) nem pela ω-CmTx MVIIC (150 nM) (resultados não apresentados), indicando que os canais $Ca_V2.2$ (tipo N) e $Ca_V2.1$ (tipo Q) não parecem estar envolvidos no processo de libertação. A aplicação de ω-AgaTx IVA numa concentração (100 nM) capaz de bloquear selectivamente os canais $Ca_V2.1$ (do tipo P) (Dunlap *et al.*, 1995), reduziu a libertação de [^{3}H]-ACh de -21±4% (n=4) e -40±10% (n=6) quando o nervo frénico foi estimulado continuamente com pulsos aplicados com a frequência de 5 e 50 Hz- *"Trains"*, respectivamente (Figura 3.17, (A) e (C)). No entanto, a ω-AgaTx IVA (100 nM) não alterou a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos tetânicos breves intercalados por períodos de repouso (50 Hz- *"Bursts"* (Figura 3.17 (B) e (C)). Contrariamente, a nifedipina (1 μM) inibiu (-21±7%, n=4) a libertação de [^{3}H]-ACh sómente quando o nervo frénico foi estimulado com este último padrão de estimulação, sem contudo ter sido

observada qualquer alteração significativa quando o nervo frénico foi estimulados continuamente com pulsos aplicados com frequências de 5 e 50 Hz (Figura 3.17 (C)).

Estes resultados mostram que a exocitose de ACh a partir das terminações nervosas motoras resulta principalmente do influxo de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.1$ (tipo P) durante estímulos contínuos aplicados com frequências de 5 e 50 Hz. No entanto, pode haver recrutamento alternativo de correntes de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) durante estímulos tetânicos interpolado (50 Hz- *"Bursts"*). A activação destes canais pode ser particularmente relevante para manter os níveis de libertação do neurotransmissor durante estímulos repetidos de elevada intensidade. Pelos dados apresentados não foi possível excluir a participação dos canais $Ca_V2.3$ (tipo R, "resistentes" aos fármacos) na libertação de [^{3}H]-ACh a partir dos terminais nervosos motores (ver *e.g.* Lang *et al*, 2003).

3.3.2 A Activação tónica dos receptores facilitatórios A_{2A} da adenosina desvia o influxo de Ca^{2+} dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) para os canais Ca_V1 (tipo L) durante estímulos interpolados de elevada frequência (50 Hz- *"Bursts"*)

Conforme referido anteriormente (Secção 3.4.2), o balanço da activação tónica dos receptores A_1/A_{2A} depende da concentração de adenosina na fenda sináptica, que é estritamente regulada pelas condições de estimulação nervosa (Correia-de-Sá *et al.*, 1996). A remoção da adenosina endógena através da aplicação da desaminase da adenosina (ADA, 0.5 U/mL) facilitou (+19±3%, n=4) a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos de 5 Hz, mas reduziu (-54±8%, n=5) significativamente (P<0.05) a libertação do neurotransmissor durante estímulos de elevada frequência 50 Hz – *"Bursts"* (Figura 3.17 (C)). Na Figura 3.18 (B), mostra-se que a acumulação de adenosina na fenda sináptica bloqueando a recaptação do nucleósido com S-(p-nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI, 5 μM)

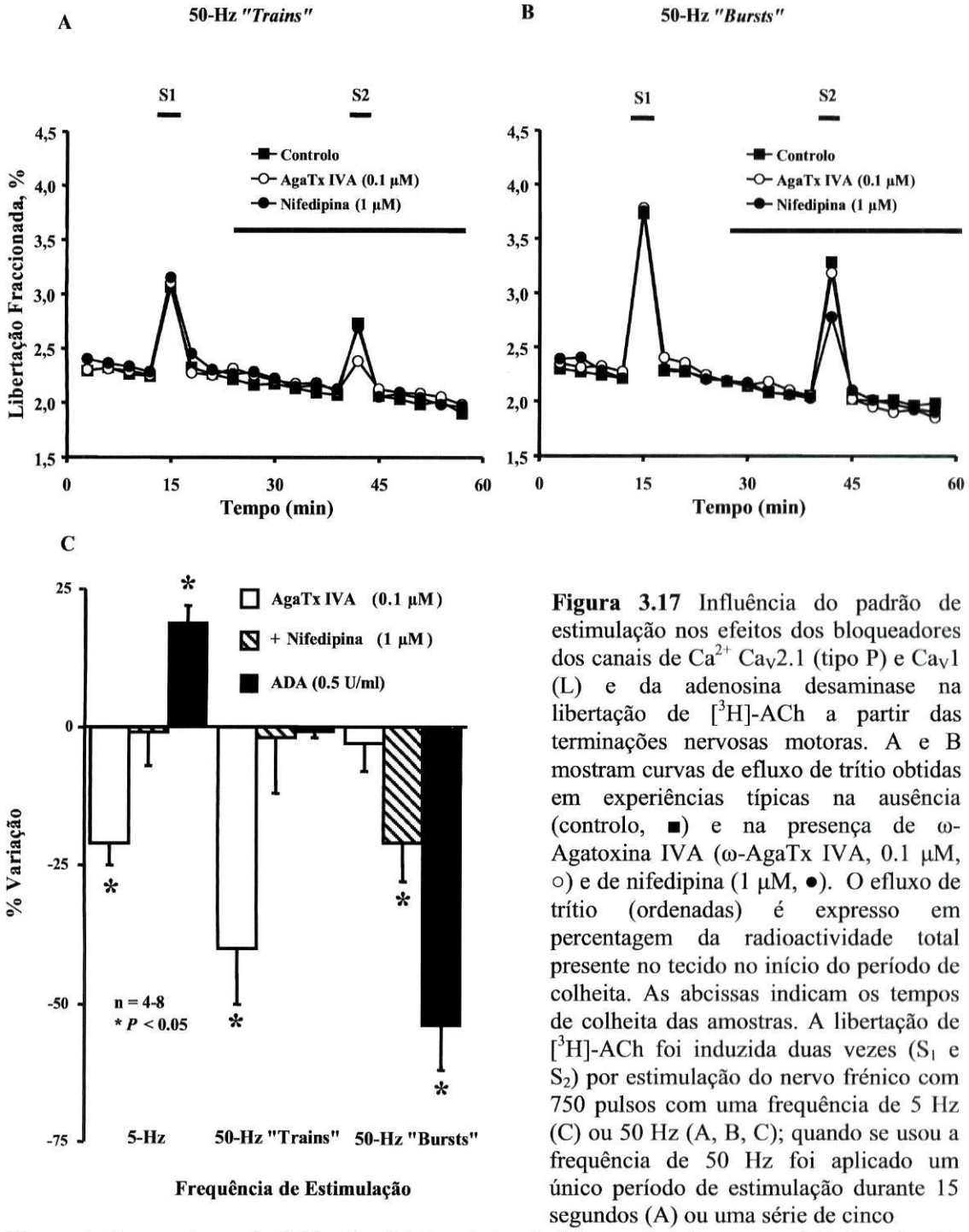


Figura 3.17 Influência do padrão de estimulação nos efeitos dos bloqueadores dos canais de Ca^{2+} $Ca_V2.1$ (tipo P) e Ca_V1 (L) e da adenosina desaminase na libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras. A e B mostram curvas de efluxo de trítio obtidas em experiências típicas na ausência (controlo, ■) e na presença de ω-Agatoxina IVA (ω-AgaTx IVA, 0.1 μM, ○) e de nifedipina (1 μM, ●). O efluxo de trítio (ordenadas) é expresso em percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita. As abcissas indicam os tempos de colheita das amostras. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida duas vezes (S_1 e S_2) por estimulação do nervo frénico com 750 pulsos com uma frequência de 5 Hz (C) ou 50 Hz (A, B, C); quando se usou a frequência de 50 Hz foi aplicado um único período de estimulação durante 15 segundos (A) ou uma série de cinco tétanos de 3 segundos cada (150 pulsos) intervalados de 20 segundos de repouso (B). A ω-AgaTx IVA (0.1 μM), a nifedipina (1 μM) e a adenosina desaminase (ADA, 0.5 U/ml) foram aplicados 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2) (barras horizontais). A libertação espontânea não foi significativamente alterada na presença dos fármacos. Em C, as ordenadas representam a percentagem de variação nas razões S_2/S_1 na presença dos fármacos teste quando comparado com a razão S_2/S_1 em experiências controlo usando os mesmos parâmetros de estimulação. As linhas verticais representam ± erro padrão da média (SEM). Valores de $*P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com a razão S_2/S_1 nas experiências controlo.

(Paterson *et al.*, 1977), aumentou a libertação de [^{3}H]-ACh em 24±8% (n=5) quando o nervo frénico foi estimulado com pulsos de elevada frequência 50 Hz- *"Bursts"*. Estes resultados contrastam, com a (1) ausência de efeito do NBTI (5 μM) sobre a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos contínuos de elevada frequência (50 Hz- *"Trains"*) (Fig. 3.18 (A)) bem como (2) com a inibição (18±3%, n=5) verificada na presença de NBTI (5 μM) quando o nervo frénico foi estimulado com pulsos de baixa frequência (5 Hz, 150 segundos) (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1996a). Estes resultados confirmam a predominância do tónus facilitatório mediado pelos receptores A_{2A} da adenosina durante estímulos de elevada frequência 50 Hz – *"Bursts"* (ver Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). A estimulação de elevada frequência (50 Hz) causa a libertação massiça de ATP (Magalhães-Cardoso *et al.*, 2003), situação que pode bloquear da formação de adenosina durante um período de tempo necessário para que os níveis de ATP e ADP diminuam para níveis inferiores àqueles responsáveis pela inibição anterógrada da ecto-5′-nucleotidase (Cunha *et al.*, 1996; Magalhães-Cardoso *et al.*, 2003). Estes resultados permitem explicar a ausência do efeito da ADA (0.5 U/mL) e do NBTI (5 μM) quando a libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estímulos contínuos de frequência elevada (50 Hz- *"Trains"*) (Figura 3.17 (C) e 3.18 (A)). Para investigar esta hipótese, realizaram-se experiências com o percursor da adenosina que é inactivo sobre a ecto-5'-nucleotidase, AMP (100 μM), usando estímulos de elevada frequência (50 Hz) aplicados continuamente (15 segundos- *"Trains"*) ou intercalados (5 x 3 segundos) por períodos de repouso de 20 segundos (*"Bursts"*). Na Figura 3.18 mostra-se que o AMP (100 μM) causou o aumento (26±1%, n=5) da libertação de [^{3}H]-ACh durante a aplicação de um estímulo 50 Hz – *"Trains"* (A), e que este efeito foi significativamente (P<0.05) potenciado (+44±6%, n=5) quando o nervo frénico foi estimulado por pulsos de elevada frequência 50 Hz – *"Bursts"* (B). A aplicação exógena de adenosina (100-500 μM) aumentou significativamente (P<0.05) a libertação de [^{3}H]-ACh de um modo

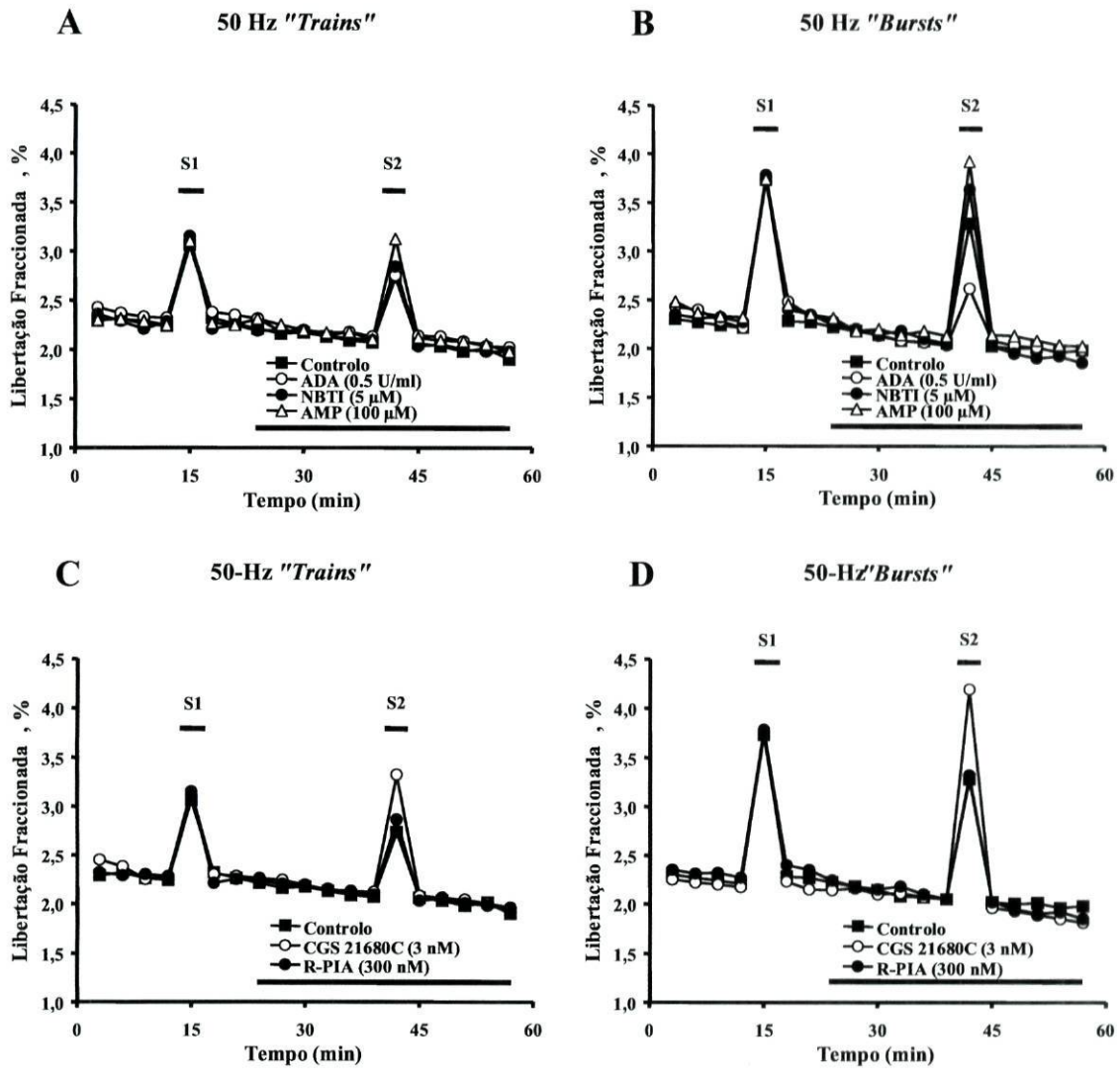


Figura 3.18 Modulação pela adenosina da libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estimulação nervosa de elevada frequência (50 Hz) contínua (15 segundos- *"Trains"*) ou intercalada (5 x 3 segundos) por períodos de repouso de 20 segundos (*"Bursts"*). O efluxo de trítio (ordenadas) é expresso em percentagem da radioactividade total presente no tecido no início do período de colheita. As abcissas indicam os tempos nos quais as amostras foram colhidas. A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida duas vezes (S_1 e S_2) por estimulação contínua (15 segundos) ou interpolada (5 x 3 segundos) do nervo frénico com uma frequência de 50 Hz (750 pulsos). A adenosina desaminase (ADA, 0.5 U/ml), o S-(*p*-nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI, 5 µM), a adenosina 5'-monofosfato (AMP, 100 µM), o CGS21680C (3 nM) e a R-N^6-fenilisopropil adenosina (R-PIA, 300 nM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2) (barras horizontais). A libertação espontânea não foi significativamente alterada na presença dos fármacos.

dependente da concentração, independentemente do protocolo de estimulação do nervo frénico utilizado; por exemplo, a adenosina (500 µM) aumentou a libertação de [^{3}H]-ACh de 44±3% (*n*=4) e de 49±16% (*n*=4) usando estímulos de elevada frequência 50 Hz-

"Trains" e 50 Hz – *"Bursts"*, respectivamente. Do mesmo modo, o agonista selectivo dos receptores A_{2A} da adenosina, CGS21680C (3 nM), facilitou consistentemente (~60%) a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos de elevada frequência (Figura 3.18 (C) e (D), ver Correia-de-Sá *et al.*, 1996). Contrariamente, o agonista dos receptores A_1 da adenosina, R-PIA (300 nM), não alterou a libertação de [^{3}H]-ACh (Figura 3.18 (C) e (D)) durante períodos de estimulação de elevada frequência (50 Hz), indicando que a inibição da libertação de [^{3}H]-ACh mediada pelos receptores A_1 torna-se menos evidente durante estímulos de elevada frequência, tal como foi observado para outros receptores pré-sinápticos inibitórios (Duckles & Budai, 1990).

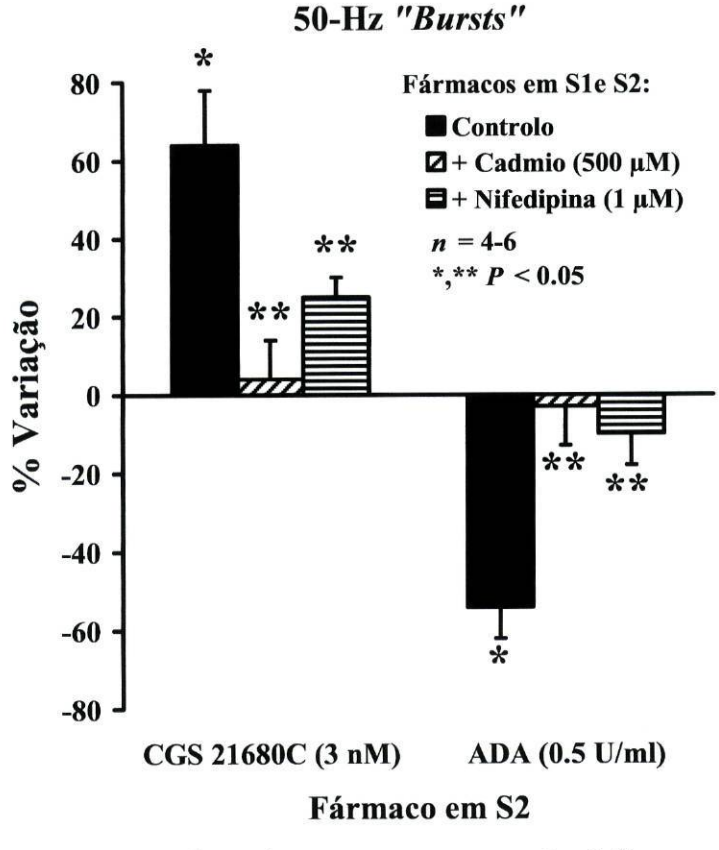


Figura 3.19 A facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh a partir das terminações nervosas motoras de rato mediada pela activação tónica dos receptores da adenosina A_{2A} depende do influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L). A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico durante dois períodos (S_1 e S_2) com uma frequência de 50 Hz (5 x 3 segundos) intercaladas por períodos de 20 segundos de repouso. O CGS21680C (3 nM) e a adenosina desaminase (ADA, 0.5 U/ml), foram aplicados ao meio de incubação 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2); o $CdCl_2$ (0.5 mM) e a nifedipina (1 µM) foram adicionados ao meio de incubação no início do período de libertação (tempo 0), *i.e.* estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As ordenadas representam a variação das percentagens nas razões S_2/S_1 na presença de CGS21680C (3 nM) e de ADA (0.5 U/ml) quando comparadas com as razões S_2/S_1 em situação controlo na ausência e na presença de $CdCl_2$ (0.5 mM) ou de nifedipina (1 µM). Valores de *,**P<0.05 foram considerados significativos quando comparados com com a razão S_2/S_1 nas experiências controlo ou com os efeitos do CGS21680C (3 nM) ou da ADA (0.5 U/ml) em S_2, respectivamente

Usando estímulos de elevada frequência 50 Hz- *"Bursts"*, uma situação onde a exocitose ACh depende predominantemente do influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L, ver acima), tanto o $CdCl_2$ (500 μM) como a nifedipina (1 μM) reduziram significativamente ($P<0.05$) a facilitação da libertação induzida pelo CGS 21680C (3 nM, +64±14%, $n=4$) (Figura 3.19). Estes resultados sugerem que a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh induzida por activação dos receptores A_{2A} depende do influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L). Do mesmo modo, o bloqueio dos canais Ca_V1 (tipo L) com $CdCl_2$ (500 μM) ou com nifedipina (1 μM) aboliu o efeito inibitório da ADA (0.5 U/mL) (Figura 3.20), indicando que o influxo de cálcio pelos canais Ca_V1 (tipo L) é necessário para facilitar a libertação do neurotransmissor devido à adenosina endógena.

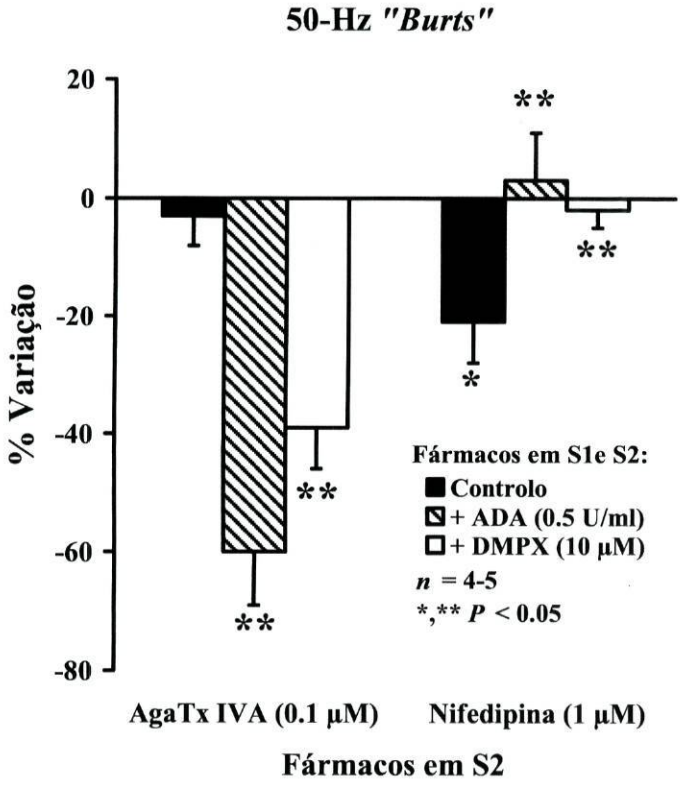


Figura 3.20 A activação dos receptores facilitatórios A_{2A} pela adenosina endógena desvia o influxo de Ca^{2+} responsável pela libertação de [^{3}H]-ACh dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) para os canais Ca_V1 (tipo L). A libertação de [^{3}H]-ACh foi induzida por estimulação do nervo frénico durante dois períodos (S_1 e S_2) com uma frequência de 50 Hz (5 x 3 segundos) intercaladas por períodos de 20 segundos de repouso. A ω-AgaTx IVA (0.1 μM) e a nifedipina (1 μM) foram adicionados ao meio de incubação 15 minutos antes do segundo período de estimulação (S_2). A adenosina desaminase (ADA, 0.5 U/ml) e o antagonista dos receptores da adenosina A_{2A}, 3,7-dipropil-1-propargilxantina (DMPX, 10 μM) foram adicionados ao meio de incubação no início do período de libertação (tempo 0), *i.e.* estiveram presentes durante todo o período experimental, incluindo S_1 e S_2. As ordenadas representam a variação percentual das razões S_2/S_1 na presença de ω-AgaTx IVA (0.1 μM) ou nifedipina (1 μM) quando comparado com as razões S_2/S_1 em situação controlo, na ausência de ADA, 0.5 U/ml) ou de DMPX (10 μM). Valores de *,**$P<0.05$ foram considerados significativos quando comparados com a razão S_2/S_1 nas experiências controlo ou com os efeitos da ω-AgaTx IVA (0.1 μM) e da nifedipina (1 μM) aplicados em S_2, respectivamente

Atendendo à relação existente entre a formação de adenosina endógena e o influxo de Ca^{2+} através dos diversos canais sensíveis à voltagem, investigou-se a possibilidade do recrutamento de cálcio pelos canais do $Ca_V2.1$ (tipo P) ou Ca_V1 (tipo L) ser controlado pela adenosina gerada durante a actividade neuronal bloqueando a activação tónica dos receptores A_{2A}, com ADA (0.5 U/mL) ou com o antagonista A_{2A}, 3,7-dipropil-1-propargilxantina (DMPX). Tanto a ADA (0.5 U/mL) como a DMPX (10 μM) modificaram o tipo de canais de Ca^{2+} envolvidos na libertação de [^{3}H]-ACh durante a estimulação tetânica (50 Hz) do nervo frénico intercalada com períodos de repouso de 20 segundos, *i.e.* nestas condições experimentais, o efeito inibitório da nifedipina (1 μM) foi prevenido, enquanto a inibição causada pela ω-AgaTx IVA (100 nM) foi restabelecida para valores semelhantes aos observados nas situações onde a adenosina não exerce qualquer efeito tónico (*e.g.* estímulos tetânicos continuados). Estes resultados sugerem que o influxo de cálcio através de canais $Ca_V2.1$ (tipo P) ou Ca_V1 (tipo L) pode ser regulado pela acumulação de adenosina na fenda sináptica durante a actividade nervosa.

CAPÍTULO 5 – Discussão

5.1 A libertação de ACh na junção neuromuscular de rato é regulada pela activação tónica de receptores muscarínicos M_1-facilitatórios e M_2-inibitórios

A literatura fornece dados bastante controversos relativamente à modulação da eficácia sináptica mediada por autoreceptores muscarínicos (ver a revisão de Re, 1999). O estudo da actividade dos autoreceptores muscarínicos e da sua interacção com outros receptores pré-sinápticos na junção neuromuscular tem sido dificultada, em parte, por falta de sintonia metodológica (Wessler et al., 1988; Vizi & Somogyi, 1989; Halmiton & Smith, 1991). Neste trabalho, investigou-se a influência da adenosina na actividade muscarínica facilitatória e inibitória mediada respectivamente por autoreceptores M_1 e M_2 no controlo da libertação de [^{3}H]-ACh induzida por diferentes padrões de estimulação nervosa (5-50 Hz) com relevância fisiológica, já que correspondem à taxa de disparo dos neurónios motores do frénico de rato em situações de repouso e de esforço muscular (ver *e.g.*, Monteiro & Ribeiro, 1987; Roszek *et al.*, 1994). Na generalidade, as experiências foram realizadas mantendo a concentração de cálcio (1.8 mM) original da solução de Tyrode para evitar variações no conteúdo quântico do terminal nervoso (Correia-de-Sá *et al.*, 1991). A libertação de [^{3}H]-ACh foi avaliada na presença de um inibidor da recaptação de colina, HC-3 e sem inibir a actividade da colinesterase de modo a evitar a superestimulação dos autoreceptores colinérgicos (Wessler & Kilbinger, 1986). Como após o período de marcação com [^{3}H]-colina o hemicolíni-3 foi aplicado sistematicamente os níveis de [^{3}H]-ACh libertados corresponde somente à componente exócitica, uma vez, a libertação espontânea é esgotada (minutos) na presença de hemicolínio-3 (Nikolsky *et al.*, 1991).

Foram, ainda, realizados esforços para normalizar a quantidade de neurotransmissor libertado durante as diferentes condições de estimulação (ver Material e Métodos).

Estudos sobre o papel funcional da modulação muscarínica em preparações contendo músculo liso (*e.g.* bexiga, vesícula biliar) mostraram a presença de ambos os receptores muscarínicos M_1 (facilitatórios) e M_2 (inibitórios) nas terminações colinérgicos (Somogyi *et al.*, 1994; Parkman *et al.*, 1999). Usando antagonistas capazes de discriminar receptores muscarínicos facilitatórios M_1 e inibitórios M_2, nomeadamente a toxina muscarínica MT-7 (0.1-1 nM) ou a pirenzepina (1-30 nM) e o AF-DX 116 (0.01-10 μM), demonstrou-se a presença de dois subtipos de receptores muscarínicos responsáveis pela regulação bifásica da libertação de [^{3}H]-ACh na junção neuromuscular de rato. Apesar de não se encontrarem actualmente disponíveis antagonistas muscarínicos altamente selectivos (excepção feita para a toxina MT-7 relativamente ao receptor M_1,), a libertação de [^{3}H]-ACh foi inibida na presença de MT-7 (0.1-1 nM), 4-DAMP (1-10 nM) e pirenzepina (1-30 nM), quando estes fármacos foram aplicados em concentrações próximas da constante de afinidade para a ligação ao receptor de subtipo M_1 (valores de $pK_B \sim 9.8$; 8.6-9.2 e 7.8-8.5, respectivamente). O perfil de antagonistas (MT-7 > 4-DAMP >pirenzepina) obtido torna improvável o envolvimento de receptores muscarínicos facilitatórios dos subtipos M_3 (e M_5); é de realçar que a caracterização farmacológica de receptores M_5 em estudos funcionais não foi ainda possível de concretizar (ver a revisão de Caulfield & Birdsall, 1998). O antagonista muscarínico, pirenzepina, mostrou-se eficaz no bloqueio de receptores do subtipo M_1 noutras preparações neuronais (*e.g.* gânglio autonómico, membranas corticais, neurónios motores) quando usado em concentrações semelhantes (Kilbinger & Nafziger, 1985; Giachetti *et al.*, 1986; Wessler *et al.*, 1988). Mostrou-se, ainda, que a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh induzida por um agonista muscarínico que activa preferencialmente receptores muscarínicos M_1, McN-A-343 (3

μM), foi antagonizado pela toxina MT-7 (0.1 nM) e pela pirenzepina (1 nM), aplicadas em concentrações baixas. Em condições experimentais semelhantes (estimulação nervosa com 750 pulsos aplicados com a frequência de 5 Hz), o antagonista muscarínico não selectivo diciclomina foi mais eficaz a produzir inibição (3-100 nM) do que facilitação (1-10 μM) da libertação de ACh; a diciclomina foi aproximadamente 10-100 vezes menos potente que a pirenzepina e a toxina MT-7 a provocar o bloqueio dos receptores muscarínicos M_1. Wessler e colaboradores (1988) encontraram um padrão bifásico oposto para o efeito da diciclomina (0.001-10 μM) quando manipularam a duração do período de estimulação de 100 até 1500 pulsos. Estes resultados foram interpretados sem considerar as variações que ocorrem na libertação dos neurotransmissores e outros neuromoduladores durante a estimulação nervosa repetitiva e que podem influenciar significativamente a actividade dos receptores pré-sinápticos (Correia-de-Sá *et al.*, 1996).

O antagonista dos receptores M_2, AF-DX 116 (10 nM-10 μM), facilitou a libertação de [^{3}H]-ACh de um modo dependente da concentração. Estes resultados são compatíveis com o aumento da amplitude das contracções induzidas por estimulação do nervo frénico após a aplicação do AF-DX 116 observado por Alves-do-Prado & Prado (1993). Estes resultados são fisiologicamente relevantes na medida em que o bloqueio dos receptores M_4 pelo AF-DX 116 não deve ser considerado relevante, já que o antagonista selectivo dos receptores M_4, a toxina MT-3 (1-10 nM), foi desprovido de efeito na libertação de [^{3}H]-ACh nas mesmas condições experimentais. Em suma, estes resultados demonstram o envolvimento de autoreceptores muscarínicos do subtipo M_2 na regulação da libertação de ACh induzida por estimulação eléctrica do nervo frénico de rato. Como, o AF-DX 116 (10 nM) preveniu a inibição na libertação de [^{3}H]-ACh induzida pela oxotremorina e, também, a depressão da transmissão neuromuscular (*cf.* Alves-do-Prado, 1993), enquanto o bloqueio dos receptores muscarínicos M_1 pela pirenzepina (1 nM) potenciou

significativamente o efeito inibitório da oxotremorina, é possível concluir que a activação de autoreceptores M_1 contraria a inibição mediada pelos receptores M_2. Estes dados, conjuntamente com a observação de que a diciclomina (aplicada em concentrações baixas) reduz significativamente a libertação de ACh, sugerem ao existência de um tonus muscarínico facilitatório M_1 predominante relativamente à activação dos receptores muscarínicos inibitórios M_2 durante estímulos de baixa frequência (5 Hz, 750 pulsos).

A ACh pode aumentar a sua própria libertação durante períodos de estimulação nervosa motora repetitiva por activação de autoreceptores nicotínicos contendo subunidades α3β2 (Faria *et al.*, 2003). Dados obtidos através de ensaios electrofisiológicos e bioquímicos demonstraram que a facilitação nicotínica pré-sináptica é auto-limitada devido à dessensibilização rápida destes receptores (Colquhoun *et al.*, 1989; Wessler, 1989) e, também, através da interacção com a adenosina formada durante períodos de intensa actividade nervosa (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994b; Timóteo *et al.*, 2003). Contudo, não foram detectadas interacções funcionais entre os receptores muscarínicos e nicotínicos (ver também Oliveira *et al.*, 2002, Faria *et al.*, 2003), já que a aplicação simultânea de agonistas para os receptores muscarínico M_1 (McN-A-343) e nicotínico (DMPP) facilitaram a libertação de ACh de um modo aditivo, *i.e.* a magnitude do efeito resultante foi semelhante à soma algébrica dos efeitos individuais dos dois agonistas. Ao contrário da transitoriedade da excitação nicotínica, os receptores muscarínicos M_1 facilitam a libertação de neurotransmissores numa escala de tempo diferente, que geralmente requer a activação do sistema da fosfolipase C / IP_3 e consequente a mobilização de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente, já que a facilitação causada pelo agonista M_1 (McN-A-343, 3 μM) foi prevenida pelo LiCl (10 mM) e por bloqueadores dos receptores intracelulares do IP_3, 2-APB (30 μM) e flunarizina (3 μM). Outros autores mostraram que o IP_3 aumenta a

libertação do neurotransmissor a partir de terminais nervosos motores de anfíbios (*e.g.* Sebastião & Ribeiro, 1999; Brailoiu & Miyamoto, 2000). Também foi demonstrado que a activação simultânea da PKC pelo diacilglicerol resultante da actividade da fosfolipase C não parece participar directamente no mecanismo de autofacilitação muscarínica M_1, porque a inibição selectiva da actividade da PKC pela CHL (5 μM) não alterou o efeito do McN-A-343 (3 μM).

5.2 O balanço da activação dos autoreceptores muscarínicos M_1 vs M_2 é regulado pela adenosina gerada durante a actividade neuronal

A adenosina presente na junção neuromuscular resulta maioritariamente da hidrólise do ATP co-libertado com a ACh (Cunha & Sebastião, 1993; Smith, 1991; Silinsky & Redman, 1996). Os seus efeitos são mediados pela da activação de receptores A_1-inibitórios e A_{2A}-facilitatórios, que se encontram co-localizados nas terminações nervosas motoras (Correia-de-Sá *et al.*, 1991). Para além de interferirem com a função neuronal, estes receptores interactuam com outros neuromoduladores (*e.g.* ACh, péptido relacionado com o gene da calcitonina, péptido intestinal vasoactivo) através dos sistemas de sinalização intracelular (ver a revisão de Sebastião & Ribeiro, 2000). Neste trabalho avaliou-se a possibilidade da adenosina gerada durante a actividade nervosa interferir com a regulação muscarínica da transmissão neuromuscular. Durante a estimulação do nervo frénico com uma frequência de 5 Hz, a autofacilitação muscarínica mediada por receptores M_1 predomina sobre o tónus inibitório M_2, enquanto a adenosina regula a libertação excessiva de ACh através da activação de receptores inibitórios do subtipo A_1 (Correia-de-Sá *et al.*, 1996). Neste contexto, deve realçar-se a inexistência de interacções funcionais entre os receptores muscarínicos facilitatórios M_1 e os receptores inibitórios A_1 da adenosina (Tabela 3.1 e Figura 3.6). Este conceito é reforçado pelo facto das interacções

observadas entre os receptores M_2 e os receptores A_1 e M_1 serem operadas por mecanismos distintos, já que a prevenção do efeito inibitório da oxotremorina (10 μM) pela R-PIA (100 nM) foi observado tanto na presença como na ausência do antagonista M_1, pirenzepina (1 nM). Existem evidências sugerindo que a adenosina e a ACh actuam de um modo não aditivo reduzindo as correntes de Ca^{2+} nos terminais nervosos motores de rato através da activação de receptores inibitórios A_1 e M_2; presumivelmente, estes receptores partilham a mesma proteína G sensível à toxina pertússica (Hamilton & Smith, 1991). Contrariamente, os receptores pré-sinápticos facilitatórios muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina parecem ser mutuamente exclusivos. Tal é indicado pela supressão da facilitação induzida pelo CGS 21680C (2 nM) após pré-tratamento com o McN-A-343 (3 μM) e *vice-versa*. Finalmente, a activação dos receptores A_{2A} da adenosina parece amplificar indirectamente a actividade inibitória dos receptores muscarínicos M_2 devido à redução do efeito frenador desempenhado pela activação M_1. Os mecanismos intracelulares envolvidos nestas interacções funcionais serão discutidos posteriormente nesta Secção.

Através da análise de resultados de estudos electrofisiológicos, farmacológicos e bioquímicos foi demonstrado que os teores em nucleótidos de adenina e adenosina na junção neuromuscular podem ser correlacionados com frequência de estimulação nervosa (Silinsky, 1975; Smith, 1991; Cunha & Sebastião, 1993). Foi também demonstrado que a formação de adenosina a partir dos nucleótidos de adenina é um processo regulado pelo ATP (e ADP) libertado através da inibição anterógrada da ecto-5'-nucleotidase, a enzima limitante da via das ecto-nucleotidases (James & Richardson, 1993; Meghji *et al.*, 1992). Considerando que os níveis extracelulares de ATP aumentam significativamente durante estímulos de elevada frequência (50 Hz), a formação de adenosina pode ser dificultada durante o tempo necessário para que a concentração de ATP e ADP na sinapse diminua para níveis inferiores aos necessários para que se verifique inibição enzimática. Conforme

demonstrado anteriormente, a inibição anterograda da ecto-5′-nucleotidase na junção neuromuscular de rato pode ser ultrapassada aplicando 5 estímulos eléctricos de elevada frequência (50 Hz durante 3 segundos) intercalados por períodos de repouso de 20 segundos-*"Bursts"* (*cf.* Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Usando este padrão de estimulação, verificou-se que a inactivação da adenosina endógena com ADA (0.5 U/mL) reduziu significativamente (~50%) a libertação de [^{3}H]-ACh. Esta observação, conjuntamente com a constatação de que o tónus inibitório mediado pelos receptore A_1 predomina apenas quando o nervo frénico é estimulado com pulsos de baixa frequência (5 Hz) (*i.e.* quando os níveis de adenosina na fenda sináptica são relativamente baixos) (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b), sugerem que a formação maciça de adenosina a partir do catabolismo do ATP pode ser em parte responsável pela activação preferencial dos receptores A_{2A} (Cunha *et al.*, 1996). Foi também anteriormente demonstrado que a activação do receptor inibitório A_1 da adenosina por agonistas exógenos (*e.g.* R-PIA) é menos eficaz durante estímulos de elevada frequência (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Todas estas observações experimentais contribuem para explicar porque razão o padrão da actividade neuronal pode ser responsável pela alteração do tónus mediado pela activação de receptores A_1 e A_{2A} da adenosina. Assim, a actividade tónica predominante da adenosina na transmissão neuromuscular pode ser modulada por um conjunto de factores, nomeadamente (1) as vias extracelulares que regulam o ciclo de formação/inactivação do nucleósido (Correia-de-Sá *et al.*, 1996a; Cunha *et al.*, 1996), e (2) os mecanismos intracelulares resultantes da interacção com a actividade de outros receptores pré-sinápticos (ver a revisão de Correia-de-Sá *et al.*, 1997) ou os ajustamentos necessários à mobilização do cálcio (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a).

Surpreendentemente, não se observaram diferenças significativas na quantidade total de [^{3}H]-ACh libertada após a estimulação eléctrica do nervo frénico com 750 pulsos

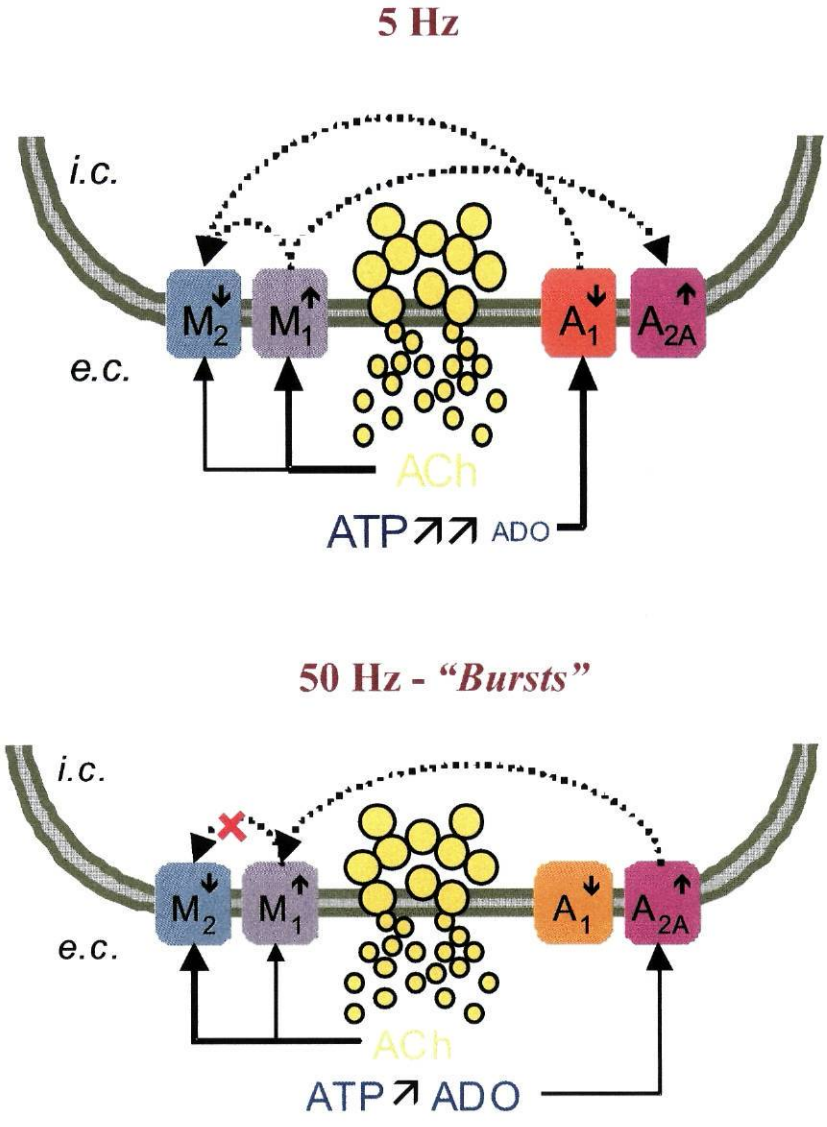


Figura 4.1 Regulação da actividade dos auto-receptores muscarínicos M_1-facilitatórios e M_2-inibitórios pela adenosina formada durante a actividade neuronal. O balanço da actividade tónica A_1 *vs* A_{2A} é determinado pelo padrão de estimulação nervosa (*e.g* estímulos contínuos de 5 Hz e estímulos tetânicos (50 Hz) interpolados) que regula os níveis extracelulares de adenosina formada a partir do ATP. Quando a quatidade de ATP libertada é pequena, o efeito inibitório mediado pelos receptores A_1 da adenosina prevalece; já quando os níveis de ATP libertado são elevados, pode ocorrer a formação de grandes quantidades de adenosina capazes de activarem receptores do subtipo A_{2A}. Paralelamente ao aumento do tónus A_{2A}, assiste-se ao desvio coordenado do controlo muscarínico da libertação de ACh; da predominância facilitatória M_1 favorece-se a actividade inibitória dos receptores M_2 durante estímulos tetânicos (50 Hz) interpolados. As setas rectilíneas a cheio representam a activação de receptores pré-sinápticos; a espessura das setas indica a proporção de receptores activados. As setas curvilíneas tracejadas indicam a supressão da actividade de determinado receptor específico. Os quadrados representam receptores pré-sinápticos.

aplicados ininterruptamente com um frequência de 5 Hz (150 segundos) ou após 5 períodos de estimulação 3 segundos com uma frequência de 50 Hz intercalados por períodos de repouso de 20 segundos – *"Bursts"* (ver a Tabela 2.1). Este facto permitiu explorar o papel dos autoreceptores muscarínicos na transmissão neuromuscular em diferentes condições de estimulação sem a correspondente variação dos níveis de ACh endógena. A estimulação do nervo frénico com estímulos tetânicos interpolados (50 Hz) causou uma alteração na modulação muscarínica, passando-se de uma activação preferencial dos receptores muscarínicos M_1-facilitatórios observada durante estímulos contínuos de 5 Hz para um fenómeno de autoinibição da libertação de ACh mediada pelos receptores M_2 quando se aumentou a frequência de estimulação (Figura 4.1). De forma semelhante, a estimulação contínua dos nervos colinérgicos pós-ganglionares da bexiga de rato induziu a activação preferencial de receptores muscarínicos facilitatórios do subtipo M_1 à medida que a inibição M_2 era prevenida (Somogyi *et al.*, 1994). A predominância do mecanismo de autoregulação negativo mediado pelos receptores muscarínicos M_2 aparece paralelamente à supressão da facilitação muscarínica M_1 que é observada durante estímulos intermitentes de elevada frequência (Vizi & Somogyi, 1989; Somogyi *et al.*, 1994). Atendendo à plasticidade dos mecanismos envolvidos na modulação neuronal pela adenosina endógena produzida durante estímulos interpolados de elevada frequência (50 Hz), colocou-se a hipótese da activação tónica dos receptores A_{2A} ser a principal responsável pela supressão da actividade M_1. Os resultados obtidos apoiam esta premissa, já que a facilitação induzida pelo agonista M_1, McN-A-343 (3 μM), foi prevenida (1) após a activação dos receptores A_{2A} da adenosina, pela adenosina endógena (na presença de 2.5 nM do antagonista A_1, DPCPX) ou pelo agonista CGS 21680C (2 nM), ou (2) durante a estimulação nervosa interpolada de elevada frequência (50 Hz), uma a situação onde o efeito tónico mediado pelo receptor A_{2A} predomina. Por outro lado, a activação tónica dos

receptores A_{2A} alivia a actividade supressiva exercida pelos receptores muscarínicos M_1 sobre o controlo inibitório da libertação do neurotransmissor mediada pelos receptores M_2, facto que deve ser considerado para explicar a predominância da autoinibição muscarínica (M_2) durante estímulos de elevada frequência. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente através da observação de que o pré-tratamento com o antagonista selectivo dos receptores A_{2A} da adenosina, ZM 241385 (10 nM), suprimiu o efeito inibitório da oxotremorina (10 μM) durante estímulos tetânicos 50 Hz - *"Bursts"*.

5.3 A facilitação da libertação de ACh causada pelo receptor muscarínico M_1 pode ser dissociada da sua interacção com a actividade dos receptores M_2-inibitório e A_{2A}-facilitatório na placa motora

O estudo do funcionamento celular pode complicar-se devido à presença de múltiplos receptores acoplados a proteínas G capazes de interactuarem entre si ao nível dos segundos mensageiros e dos mecanismos efectores intracelulares. Neste trabalho investigou-se a interacção entre receptores muscarínicos (M_1 e M_2) e receptores da adenosina (A_1 e A_{2A}) co-localizados nas terminações nervosas motoras e responsáveis pela regulação da libertação de [^{3}H]-ACh. Os resultados experimentais sugerem a existência de interacções mútuas entre os receptores muscarínicos (M_1 e M_2) e os receptores A_{2A} da adenosina, e que essas interacções ocorrem ao nível das vias de sinalização intracelulares. A supressão da actividade dos receptores muscarínicos M_2 e A_{2A} da adenosina parece resultar da inibição da actividade da adenilciclase por fosforilação pela PKC induzida pela activação dos receptores M_1. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente já que a supressão dos efeitos facilitatório do CGS21680C (2 nM) e inibitório da oxotremorina (10 μM) pelo agonista M_1, McN-A-343 (3 μM), foi restabelecida na presença do inibidor selectivo da PKC, a CHL (5 μM). Contrariamente, os efeitos do CGS21680C (2 nM) e da

oxotremorina (10 μM) não foram afectados quando as preparações foram pré-tratadas com LiCl (10 mM), tanto na ausência como na presença de McN-A-343 (3 μM). Estes resultados indicam que o ciclo dos fosfatos de inositol não parece estar envolvido na regulação da actividade dos receptores A_{2A} e M_2 e, portanto, as interacções receptor-receptor podem ser dissociadas do mecanismo responsável pelo efeito facilitatório operado pelos receptores M_1 que depende do recrutamento de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares sensíveis ao IP_3 (ver acima). A participação da PKC na interacção operada pelos receptores muscarínicos M_1 foi consubstanciada pelo facto do ester de forbol activo sobre a PKC (*e.g.* PMA, 10 μM) simular o efeito supressivo do McN-A-343 (3 μM) sobre a actividade dos receptores A_{2A} e M_2. Tanto o McN-A-343 (3 μM) como o PMA (10 μM), preveniram os efeitos facilitatórios de fármacos capazes de aumentar os níveis intracelulares de AMP cíclico, devido à activação directa da subunidade catalítica da adenilciclase, com a FSK (3 μM) (Seamon *et al.*, 1981), ou devido à inibição da actividade da fosfodiesterase do tipo IV, com o ROL (300 μM) (Beavo & Reifsnyder, 1990).

A inibição da actividade das fosfodiesterases devida à fosforilação pela PKC tem sido descrita em diferentes tipos de células (ver a revisão de Houslay, 1991), no entanto nas terminações nervosas do frénico de rato este mecanismo não parece ser relevante, uma vez que o éster de forbol, PMA (10 μM), atenuou os efeitos facilitatórios do CGS21680C, da FSK e do ROL, em vez de potenciar as suas acções como seria de supor. Tem sido demonstrado que a PKC desempenha um papel crucial na regulação funcional de uma variedade de vias de sinalização intracelular, nomeadamente aquela que envolve o metabolismo do AMP cíclico (revisto por Houslay, 1991). A PKC estimula o funcionamento de diversas isoformas de adenilciclase (tipos I, II, III e V; ver a revisão de Choi *et al.*, 1993), mas inibe especificamente a actividade da adenilciclase do tipo VI; a fosforilação desta isoforma pela PKC foi responsabilizada pela dessensibilização dos

receptores A_{2A} da adenosina em células PC12 de rato (Lai *et al.*, 1997). A adenilciclase do tipo VI parece estar também envolvida na resposta inibitória resultante da activação do receptor muscarínico M_2 acoplado a proteínas G_i (sensíveis à toxina pertússica), semelhante ao existente nas terminações nervosas motoras (Hamilton & Smith, 1991). Apesar dos resultados preencherem os requisitos para que a isoforma de adenilciclase envolvida na regulação da actividade dos receptores pré-sinápticos A_{2A} e M_2 corresponda ao tipo VI, faltam provas inequívocas da sua presença nas terminações nervosas motoras de rato.

5.4 As vias de sinalização intracelular activadas pelos receptores facilitatórios M_1 e A_{2A} convergem para a activação da PKA e o influxo de Ca^{2+} por canais Ca_V1 (tipo L).

Os receptores A_{2A} da adenosina nas terminações nervosas periféricas (*e.g.* neurónios motores) estão positivamente acoplados ao sistema de transdução adenilciclase / AMPc (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994a; revisto por Sebastião & Ribeiro, 2000). Esta via de sinalização configurava-se como a candidata ideal que permitiria explicar a acção supressiva dos receptores A_{2A} sobre a actividade autofacilitatória M_1. Os resultados obtidos suportam esta hipótese, já que o pré-tratamento com o antagonista do AMP cíclio, Rp-cAMPS, reverteu parcialmente a supressão do efeito facilitatório do McN-A-343 induzida pelo CGS21680C. Por outro lado, os compostos activadores da cascata de sinalização adenilciclase / AMPc, FSK, ROL, e 8-Br-AMPc, reproduziram a actividade supressiva da facilitação M_1 causada pelo CGS21680C. Apesar da demonstração de que a PKC pode mediar alguns dos efeitos A_{2A} no sistema nervoso central (Dixon *et al*, 1997; Lopes *et al.*, 1999), os resultados apresentados neste trabalho não suportam essa possibilidade já que a inibição da actividade da PKC pela CHL não modificou o efeito facilitatório do CGS21680C (ver Oliveira & Correia-de-Sá, 2005), apesar da CHL ter sido usada numa

concentração (5 μM) capaz de bloquear o efeito facilitatório do PMA. A ausência de efeito da CHL sobre a facilitação induzida pelo CGS21680C torna também improvável a ocorrência de interferências (antagonismo) entre o inibidor da PKC e os receptores A_{2A} da adenosina (Schulte & Fredholm, 2002). Contrariamente, a CHL restituiu a capacidade do CGS21680C para facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh na presença do agonista M_1.

Dependendo do tipo de célula, múltiplos têm sido os mecanismos sugeridos para explicar a interacção negativa entre a via da adenilciclase e o sistema da fosfolipase C. A maioria das evidências aponta a estimulação da PKA como a principal responsável das respostas mediadas pela activação da Gq (Cordeaux & Hill, 2002). Foi demonstrado que a PKA pode fosforilar a fosfolipase C e dessa forma promover a sua inactivação (Liu & Simon, 1996; Rhee & Bae, 1997). Se esta fosse a situação na placa motora de rato, a inibição da PKA pelo Rp-cAMPS teria aumentando, em vez de diminuir, o efeito facilitatório do McN-A-343. A PKA pode, ainda, fosforilar os receptores do IP_3 aumentando da sua actividade (Wojcikiewicz & Luso, 1998). Este facto parece ser também improvável, uma vez que o efeito do McN-A-343 foi prevenido pelo agonista A_{2A}, CGS21680C, assim como pelos compostos usados para activar a cascata do AMP cíclico, FSK, ROL e 8-Br-AMPc.

A activação pré-sináptica da PKA e da PKC facilita a libertação de neurotransmissores em várias regiões do sistema nervoso (*e.g.* Parfitt & Madison, 1993; Chavez-Noriega & Stevens, 1994; Correia-de-Sá *et al.*, 1994a). Apesar de existir alguma controvérsia relativamente ao mecanismo exacto envolvido na regulação da libertação dos neurotransmissores pelos receptores acoplados à PKA e à PKC, a observação de que os efeitos facilitatórios mediados pela activação de receptores A_{2A} da adenosina e muscarínicos M_1 são mutuamente exclusivos sugeriu a hipótese de que as respectivas vias

de sinalização intracelulares poderiam partilhar um alvo comum. Esta hipótese é possível porque estão descritas diversas acções partilhadas pelas duas enzimas. Uma das possibilidades equacionadas incluía a fosforilação da Rab3A (uma proteína ancorada às vesículas sinápticas capaz de ligar o GTP) e dos seus efectores (como a rabfilina), que têm sido associadas tanto ao tráfego das vesículas sinápticas como a efeitos na fase tardia do processo exocitótico dependente do Ca^{2+} (Turner *et al.*, 1999). Sabendo que a actividade sináptica de ratinhos que não expressam a proteína Rab3A está profundamente deprimida durante a estimulação repetida (Silinsky, 2004), pode especular-se sobre a possibilidade das proteínas da família Rab serem substrato da actividade facilitatória operada pelos receptores A_{2A} e M_1 na junção neuromuscular. Mais estudos usando animais modificados geneticamente são necessários para investigar a importância funcional da fosforilação das proteínas Rab na interacção dos receptores A_{2A} e M_1 na placa motora. Outra das possibilidades prende-se com a constatação do aumento da libertação do neurotransmissor em consequência do influxo de Ca^{2+} para o interior dos terminais nervosos através de canais Ca_V1 (tipo L) fosforilados (Carbonne *et al.*, 2001; Arenson & Evans, 2001). Esta hipótese foi testada neste trabalho avaliando os efeitos resultantes da aplicação conjunta de McN-A-343 e CGS21680C após pré-tratamento das preparações com o bloqueador dos canais Ca_V1 (tipo L), nifedipina. A aplicação de nifedipina (1 μM) suprimiu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh induzida pela activação simultânea dos receptores muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina, confirmando a suspeita de que a activação paralela das enzimas PKC e PKA podem finalmente convergir para uma via comum que favoreça o influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L). O mecanismo pelo qual os receptores muscarínicos M_1 podem recrutar Ca^{2+} alternativamente através de canais Ca_V1 (tipo L) depende da activação da PKC (Somogyi *et al.*, 1996; Sculptoreanu *et al.*, 2001), tal como foi observado neste trabalho quando o ciclo dos fosfatos de inositol foi bloqueado com LiCl

(10 mM). Os resultados obtidos confirmam as suspeitas derivadas dos estudos realizados em ratinhos transgénicos onde se verificou o acoplamento dos receptores M_1 a um mediador intracelular difusível capaz de regular a actividade dos canais Ca_V1 (tipo L) (Shapiro *et al.*, 1999). Tipicamente, a activação dos receptores muscarínicos M_1 acoplados à fosfolipase C, inicia-se com a formação de IP_3 responsável pela mobilização do Ca^{2+} a partir dos reservatórios intracelulares sensíveis ao IP_3. Durante a activação sustentada dos receptores M_1 observa-se o influxo de Ca^{2+} (provavelmente através de canais Ca_V1), que poderá actuar como gatilho desencadeando a libertação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} a partir de reservas sensíveis à tapsigargina mas insensíveis ao IP_3 (Berridge & Irvine, 1989). O acoplamento funcional entre canais Ca_V1 (tipo L) e o processo de libertação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares insensíveis ao IP_3 foi anteriormente descrito em preparações neuronais (*e.g.* Chavis *et al.*, 1996). Isto poderá explicar a interacção sinérgica entre a nifedipina e a tapsigargina, um fármaco que causa a depleção das reservas intracelulares de Ca^{2+} por inibição da Ca^{2+}-ATPase do retículo endoplasmático (Thastrup *et al.*, 1990), nas terminações nervosas motoras durante períodos de estimulação intensa (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Estas observações contrastam com a ausência de interacções verificadas entre a nifedipina e fármacos que bloqueiam a via do IP_3, tal como LiCl e o 2-APB.

Outro aspecto inovador do presente trabalho, consiste na demonstração de que a mobilização de Ca^{2+} através de canais normalmente "quiescentes" do tipo Ca_V1 desencadeada pelos receptores muscarínicos M_1 requer a activação tanto da PKC como da PKA, enquanto os efeitos mediados pelos receptores A_{2A} depende exclusivamente da estimulação da PKA. O bloqueio da inibição da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela nifedipina na presença de McN-A-343 após o pré-tratamento das preparações com CHL ou Rp-cAMPS é consistente com a hipótese proposta. Embora menos frequente, a activação

da cascata do AMP cíclico pelos receptores M_1 já foi demonstrada em vertebrados (Brown & Rietow, 1981; Enyedi *et al.*, 1982). Também se demonstrou neste trabalho que a activação da PKA pode facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh independentemente da actividade da PKC, uma vez que a CHL não modificou o efeito facilitatório do activador da PKA, 8-Br-AMPc. Contrariamente, a capacidade do PMA facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh necessitou da activação simultânea da PKA, já que o seu efeito foi abolido pelo antagonista do AMP cíclico, Rp-cAMPS. Estes resultados sugerem que o envolvimento da PKA na mobilização de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) poderá ser secundário à activação da PKC pelos receptores M_1. A activação sequencial das duas cascatas de sinalização foi previamente descrita em sistemas de expressão heteróloga (Felder *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1991). A fosforilação reversível dos canais Ca_V1 (tipo L) pela PKA está relacionada com o aumento da libertação de neurotransmissores dependente da actividade sináptica (Sculptoreanu *et al.*, 1995). A fosforilação constitutiva dos canais Ca_V1 pode fornecer uma explicação alternativa para as experiências em que o Rp-cAMPS inibiu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh mediada pela activação da PKC pelos receptores M_1. No entanto, o envolvimento deste mecanismo não explica a redução da facilitação induzida pelo McN-A-343 na presença dos activadores do sistema de transdução adenilciclase / AMP cíclico, FSK, ROL e 8-Br-AMPc (*cf.* Sculptoreanu *et al.*, 2001).

Em suma, os resultados experimentais sugerem que a interacção mutuamente exclusiva entre os receptores pré-sinápticos facilitatórios M_1 e A_{2A} pode resultar do acoplamento destes receptores a cascatas de sinalização convergentes para uma via comum que envolve a activação da PKA e o recrutamento de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) que estão habitualmente "quiescentes". Este mecanismo pode ser fundamental para prevenir a espoliação de neurotransmissor durante períodos de actividade neuronal intensa (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Os dados apresentados também providenciam uma hipótese

molecular para explicar algumas das incongruências encontradas na literatura sobre o papel regulador dos receptores muscarínicos na transmissão neuromuscular.

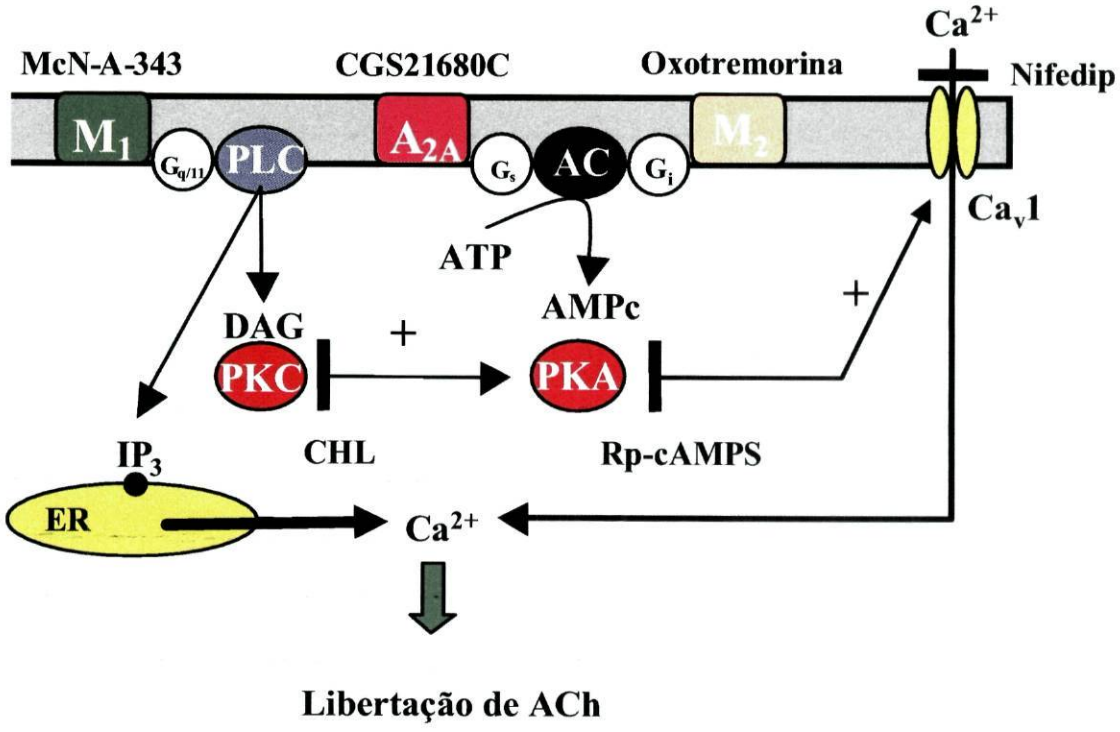


Figura 4.2 Representação esquemática dos segundos mensageiros intracelulares envolvidos na interacção entre os receptores pré-sinápticos muscarínicos M_1e A_{2A} da adenosina. A estimulação dos receptores A_{2A} da adenosina activa a adenilciclase (AC) induzindo o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc) e, consequentemente, a activação da proteína cinase A (PKA). A activação dos receptores M_1 estimulam a fosfolipase C (PLC) levando à produção de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3) e de diacilglicerol (DAG); estes por sua vez causam a libertação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares sensíveis ao IP_3 e a activação da proteína cinase C (PKC), respectivamente. A activação sequencial das cinases PKC e PKA devido à activação dos receptores M_1 precede o influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) responsáveis pela facilitação da libertação de ACh. Foi também discutida no texto, a possibilidade da ocorrência de uma interacção secundária à activação da PKC pelos receptores M_1 e outros receptores acoplados à adenilcilase (M_2 inibitórios e A_{2A} facilitatórios).

5.5 A activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina atenua a depressão tetânica durante a actividade neuronal através do recrutamento de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L)

Neste trabalho provou-se, ainda, que o influxo de Ca^{2+} através de canais distintos dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P), habitualmente relacionados com a exocitose de ACh, poderiam

ser recrutados durante estímulos interpolados de elevada frequência; em particular, os resultados sugerem a participação de canais Ca_V1 (tipo L) localizados nas terminações nervosas motoras de rato na facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh nestas condições experimentais. A regulação do influxo de Ca^{2+} por canais $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) ou Ca_V1 (tipo L) parece ser regulada pela activação de receptores pré-sinápticos A_{2A} pela adenosina endógena. Na sua globalidade, os resultados demonstram que a depressão tetânica da libertação de ACh pode ser ultrapassada quando os períodos de estimulação (50 Hz – *"Bursts"*)são interrompidos por períodos de repouso de 20 segundos, uma situação que favorece a activação tónica de receptores A_{2A} da adenosina capazes de induzirem o recrutamento adicional de Ca^{2+} por canais Ca_V1 (tipo L).

A falência da transmissão sináptica pode dever-se a três mecanismos principais: (1) à falha na condução do potencial de acção ao longo do axónio; (2) à diminuição da libertação do neurotransmissor pelo terminal nervoso; e (3) à redução da excitabilidade da placa motora devido à dessensibilização dos receptores pós-sinápticos. O potencial de placa motora diminui rápida e significativamente durante estímulos contínuos aplicados com frequências que variam entre 5 a 100 Hz sem, contudo, se observarem alterações significativas na amplitude dos potenciais de placa miniatura (MEPPs) (Moyer & Van Lunteren, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho, avaliando directamente a libertação de [^{3}H]-ACh, concordam com a interpretação que a depressão dos potenciais de placa verificada durante estímulos de elevada frequência se deve a uma alteração rápida na taxa de libertação do neurotransmissor, sem que seja necessário alterar a condução axonal ou causar a dessensibilização dos receptores pós-sinápticos. As estimativas anteriores sobre a repercussão funcional da falência da neurotransmissão foram baseadas quase exclusivamente em protocolos experimentais resultantes da estimulação ininterrupta dos nervos motores (*e.g.* Wilson, 1979; Hong & Chang, 1991; Fournier *et al.*, 1991; Bazzy,

aplicados ininterruptamente com um frequência de 5 Hz (150 segundos) ou após 5 períodos de estimulação 3 segundos com uma frequência de 50 Hz intercalados por períodos de repouso de 20 segundos – *"Bursts"* (ver a Tabela 2.1). Este facto permitiu explorar o papel dos autoreceptores muscarínicos na transmissão neuromuscular em diferentes condições de estimulação sem a correspondente variação dos níveis de ACh endógena. A estimulação do nervo frénico com estímulos tetânicos interpolados (50 Hz) causou uma alteração na modulação muscarínica, passando-se de uma activação preferencial dos receptores muscarínicos M_1-facilitatórios observada durante estímulos contínuos de 5 Hz para um fenómeno de autoinibição da libertação de ACh mediada pelos receptores M_2 quando se aumentou a frequência de estimulação (Figura 4.1). De forma semelhante, a estimulação contínua dos nervos colinérgicos pós-ganglionares da bexiga de rato induziu a activação preferencial de receptores muscarínicos facilitatórios do subtipo M_1 à medida que a inibição M_2 era prevenida (Somogyi *et al.*, 1994). A predominância do mecanismo de autoregulação negativo mediado pelos receptores muscarínicos M_2 aparece paralelamente à supressão da facilitação muscarínica M_1 que é observada durante estímulos intermitentes de elevada frequência (Vizi & Somogyi, 1989; Somogyi *et al.*, 1994). Atendendo à plasticidade dos mecanismos envolvidos na modulação neuronal pela adenosina endógena produzida durante estímulos interpolados de elevada frequência (50 Hz), colocou-se a hipótese da activação tónica dos receptores A_{2A} ser a principal responsável pela supressão da actividade M_1. Os resultados obtidos apoiam esta premissa, já que a facilitação induzida pelo agonista M_1, McN-A-343 (3 μM), foi prevenida (1) após a activação dos receptores A_{2A} da adenosina, pela adenosina endógena (na presença de 2.5 nM do antagonista A_1, DPCPX) ou pelo agonista CGS 21680C (2 nM), ou (2) durante a estimulação nervosa interpolada de elevada frequência (50 Hz), uma a situação onde o efeito tónico mediado pelo receptor A_{2A} predomina. Por outro lado, a activação tónica dos

receptores A_{2A} alivia a actividade supressiva exercida pelos receptores muscarínicos M_1 sobre o controlo inibitório da libertação do neurotransmissor mediada pelos receptores M_2, facto que deve ser considerado para explicar a predominância da autoinibição muscarínica (M_2) durante estímulos de elevada frequência. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente através da observação de que o pré-tratamento com o antagonista selectivo dos receptores A_{2A} da adenosina, ZM 241385 (10 nM), suprimiu o efeito inibitório da oxotremorina (10 μM) durante estímulos tetânicos 50 Hz - *"Bursts"*.

5.3 A facilitação da libertação de ACh causada pelo receptor muscarínico M_1 pode ser dissociada da sua interacção com a actividade dos receptores M_2-inibitório e A_{2A}-facilitatório na placa motora

O estudo do funcionamento celular pode complicar-se devido à presença de múltiplos receptores acoplados a proteínas G capazes de interactuarem entre si ao nível dos segundos mensageiros e dos mecanismos efectores intracelulares. Neste trabalho investigou-se a interacção entre receptores muscarínicos (M_1 e M_2) e receptores da adenosina (A_1 e A_{2A}) co-localizados nas terminações nervosas motoras e responsáveis pela regulação da libertação de [^{3}H]-ACh. Os resultados experimentais sugerem a existência de interacções mútuas entre os receptores muscarínicos (M_1 e M_2) e os receptores A_{2A} da adenosina, e que essas interacções ocorrem ao nível das vias de sinalização intracelulares. A supressão da actividade dos receptores muscarínicos M_2 e A_{2A} da adenosina parece resultar da inibição da actividade da adenilciclase por fosforilação pela PKC induzida pela activação dos receptores M_1. Esta hipótese foi confirmada experimentalmente já que a supressão dos efeitos facilitatório do CGS21680C (2 nM) e inibitório da oxotremorina (10 μM) pelo agonista M_1, McN-A-343 (3 μM), foi restabelecida na presença do inibidor selectivo da PKC, a CHL (5 μM). Contrariamente, os efeitos do CGS21680C (2 nM) e da

oxotremorina (10 μM) não foram afectados quando as preparações foram pré-tratadas com LiCl (10 mM), tanto na ausência como na presença de McN-A-343 (3 μM). Estes resultados indicam que o ciclo dos fosfatos de inositol não parece estar envolvido na regulação da actividade dos receptores A_{2A} e M_2 e, portanto, as interacções receptor-receptor podem ser dissociadas do mecanismo responsável pelo efeito facilitatório operado pelos receptores M_1 que depende do recrutamento de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares sensíveis ao IP_3 (ver acima). A participação da PKC na interacção operada pelos receptores muscarínicos M_1 foi consubstanciada pelo facto do ester de forbol activo sobre a PKC (*e.g.* PMA, 10 μM) simular o efeito supressivo do McN-A-343 (3 μM) sobre a actividade dos receptores A_{2A} e M_2. Tanto o McN-A-343 (3 μM) como o PMA (10 μM), preveniram os efeitos facilitatórios de fármacos capazes de aumentar os níveis intracelulares de AMP cíclico, devido à activação directa da subunidade catalítica da adenilciclase, com a FSK (3 μM) (Seamon *et al.*, 1981), ou devido à inibição da actividade da fosfodiesterase do tipo IV, com o ROL (300 μM) (Beavo & Reifsnyder, 1990).

A inibição da actividade das fosfodiesterases devida à fosforilação pela PKC tem sido descrita em diferentes tipos de células (ver a revisão de Houslay, 1991), no entanto nas terminações nervosas do frénico de rato este mecanismo não parece ser relevante, uma vez que o éster de forbol, PMA (10 μM), atenuou os efeitos facilitatórios do CGS21680C, da FSK e do ROL, em vez de potenciar as suas acções como seria de supor. Tem sido demonstrado que a PKC desempenha um papel crucial na regulação funcional de uma variedade de vias de sinalização intracelular, nomeadamente aquela que envolve o metabolismo do AMP cíclico (revisto por Houslay, 1991). A PKC estimula o funcionamento de diversas isoformas de adenilciclase (tipos I, II, III e V; ver a revisão de Choi *et al.*, 1993), mas inibe especificamente a actividade da adenilciclase do tipo VI; a fosforilação desta isoforma pela PKC foi responsabilizada pela dessensibilização dos

receptores A_{2A} da adenosina em células PC12 de rato (Lai *et al.*, 1997). A adenilciclase do tipo VI parece estar também envolvida na resposta inibitória resultante da activação do receptor muscarínico M_2 acoplado a proteínas G_i (sensíveis à toxina pertússica), semelhante ao existente nas terminações nervosas motoras (Hamilton & Smith, 1991). Apesar dos resultados preencherem os requisitos para que a isoforma de adenilciclase envolvida na regulação da actividade dos receptores pré-sinápticos A_{2A} e M_2 corresponda ao tipo VI, faltam provas inequívocas da sua presença nas terminações nervosas motoras de rato.

5.4 As vias de sinalização intracelular activadas pelos receptores facilitatórios M_1 e A_{2A} convergem para a activação da PKA e o influxo de Ca^{2+} por canais Ca_V1 (tipo L).

Os receptores A_{2A} da adenosina nas terminações nervosas periféricas (*e.g.* neurónios motores) estão positivamente acoplados ao sistema de transdução adenilciclase / AMPc (Correia-de-Sá & Ribeiro, 1994a; revisto por Sebastião & Ribeiro, 2000). Esta via de sinalização configurava-se como a candidata ideal que permitiria explicar a acção supressiva dos receptores A_{2A} sobre a actividade autofacilitatória M_1. Os resultados obtidos suportam esta hipótese, já que o pré-tratamento com o antagonista do AMP cíclio, Rp-cAMPS, reverteu parcialmente a supressão do efeito facilitatório do McN-A-343 induzida pelo CGS21680C. Por outro lado, os compostos activadores da cascata de sinalização adenilciclase / AMPc, FSK, ROL, e 8-Br-AMPc, reproduziram a actividade supressiva da facilitação M_1 causada pelo CGS21680C. Apesar da demonstração de que a PKC pode mediar alguns dos efeitos A_{2A} no sistema nervoso central (Dixon *et al*, 1997; Lopes *et al.*, 1999), os resultados apresentados neste trabalho não suportam essa possibilidade já que a inibição da actividade da PKC pela CHL não modificou o efeito facilitatório do CGS21680C (ver Oliveira & Correia-de-Sá, 2005), apesar da CHL ter sido usada numa

concentração (5 μM) capaz de bloquear o efeito facilitatório do PMA. A ausência de efeito da CHL sobre a facilitação induzida pelo CGS21680C torna também improvável a ocorrência de interferências (antagonismo) entre o inibidor da PKC e os receptores A_{2A} da adenosina (Schulte & Fredholm, 2002). Contrariamente, a CHL restituiu a capacidade do CGS21680C para facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh na presença do agonista M_1.

Dependendo do tipo de célula, múltiplos têm sido os mecanismos sugeridos para explicar a interacção negativa entre a via da adenilciclase e o sistema da fosfolipase C. A maioria das evidências aponta a estimulação da PKA como a principal responsável das respostas mediadas pela activação da Gq (Cordeaux & Hill, 2002). Foi demonstrado que a PKA pode fosforilar a fosfolipase C e dessa forma promover a sua inactivação (Liu & Simon, 1996; Rhee & Bae, 1997). Se esta fosse a situação na placa motora de rato, a inibição da PKA pelo Rp-cAMPS teria aumentando, em vez de diminuir, o efeito facilitatório do McN-A-343. A PKA pode, ainda, fosforilar os receptores do IP_3 aumentando da sua actividade (Wojcikiewicz & Luso, 1998). Este facto parece ser também improvável, uma vez que o efeito do McN-A-343 foi prevenido pelo agonista A_{2A}, CGS21680C, assim como pelos compostos usados para activar a cascata do AMP cíclico, FSK, ROL e 8-Br-AMPc.

A activação pré-sináptica da PKA e da PKC facilita a libertação de neurotransmissores em várias regiões do sistema nervoso (*e.g.* Parfitt & Madison, 1993; Chavez-Noriega & Stevens, 1994; Correia-de-Sá *et al.*, 1994a). Apesar de existir alguma controvérsia relativamente ao mecanismo exacto envolvido na regulação da libertação dos neurotransmissores pelos receptores acoplados à PKA e à PKC, a observação de que os efeitos facilitatórios mediados pela activação de receptores A_{2A} da adenosina e muscarínicos M_1 são mutuamente exclusivos sugeriu a hipótese de que as respectivas vias

de sinalização intracelulares poderiam partilhar um alvo comum. Esta hipótese é possível porque estão descritas diversas acções partilhadas pelas duas enzimas. Uma das possibilidades equacionadas incluía a fosforilação da Rab3A (uma proteína ancorada às vesículas sinápticas capaz de ligar o GTP) e dos seus efectores (como a rabfilina), que têm sido associadas tanto ao tráfego das vesículas sinápticas como a efeitos na fase tardia do processo exocitótico dependente do Ca^{2+} (Turner *et al.*, 1999). Sabendo que a actividade sináptica de ratinhos que não expressam a proteína Rab3A está profundamente deprimida durante a estimulação repetida (Silinsky, 2004), pode especular-se sobre a possibilidade das proteínas da família Rab serem substrato da actividade facilitatória operada pelos receptores A_{2A} e M_1 na junção neuromuscular. Mais estudos usando animais modificados geneticamente são necessários para investigar a importância funcional da fosforilação das proteínas Rab na interacção dos receptores A_{2A} e M_1 na placa motora. Outra das possibilidades prende-se com a constatação do aumento da libertação do neurotransmissor em consequência do influxo de Ca^{2+} para o interior dos terminais nervosos através de canais Ca_V1 (tipo L) fosforilados (Carbonne *et al.*, 2001; Arenson & Evans, 2001). Esta hipótese foi testada neste trabalho avaliando os efeitos resultantes da aplicação conjunta de McN-A-343 e CGS21680C após pré-tratamento das preparações com o bloqueador dos canais Ca_V1 (tipo L), nifedipina. A aplicação de nifedipina (1 μM) suprimiu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh induzida pela activação simultânea dos receptores muscarínicos M_1 e A_{2A} da adenosina, confirmando a suspeita de que a activação paralela das enzimas PKC e PKA podem finalmente convergir para uma via comum que favoreça o influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L). O mecanismo pelo qual os receptores muscarínicos M_1 podem recrutar Ca^{2+} alternativamente através de canais Ca_V1 (tipo L) depende da activação da PKC (Somogyi *et al.*, 1996; Sculptoreanu *et al.*, 2001), tal como foi observado neste trabalho quando o ciclo dos fosfatos de inositol foi bloqueado com LiCl

(10 mM). Os resultados obtidos confirmam as suspeitas derivadas dos estudos realizados em ratinhos transgénicos onde se verificou o acoplamento dos receptores M_1 a um mediador intracelular difusível capaz de regular a actividade dos canais Ca_V1 (tipo L) (Shapiro *et al.*, 1999). Tipicamente, a activação dos receptores muscarínicos M_1 acoplados à fosfolipase C, inicia-se com a formação de IP_3 responsável pela mobilização do Ca^{2+} a partir dos reservatórios intracelulares sensíveis ao IP_3. Durante a activação sustentada dos receptores M_1 observa-se o influxo de Ca^{2+} (provavelmente através de canais Ca_V1), que poderá actuar como gatilho desencadeando a libertação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} a partir de reservas sensíveis à tapsigargina mas insensíveis ao IP_3 (Berridge & Irvine, 1989). O acoplamento funcional entre canais Ca_V1 (tipo L) e o processo de libertação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares insensíveis ao IP_3 foi anteriormente descrito em preparações neuronais (*e.g.* Chavis *et al.*, 1996). Isto poderá explicar a interacção sinérgica entre a nifedipina e a tapsigargina, um fármaco que causa a depleção das reservas intracelulares de Ca^{2+} por inibição da Ca^{2+}-ATPase do retículo endoplasmático (Thastrup *et al.*, 1990), nas terminações nervosas motoras durante períodos de estimulação intensa (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a). Estas observações contrastam com a ausência de interacções verificadas entre a nifedipina e fármacos que bloqueiam a via do IP_3, tal como LiCl e o 2-APB.

Outro aspecto inovador do presente trabalho, consiste na demonstração de que a mobilização de Ca^{2+} através de canais normalmente "quiescentes" do tipo Ca_V1 desencadeada pelos receptores muscarínicos M_1 requer a activação tanto da PKC como da PKA, enquanto os efeitos mediados pelos receptores A_{2A} depende exclusivamente da estimulação da PKA. O bloqueio da inibição da libertação de [^{3}H]-ACh causada pela nifedipina na presença de McN-A-343 após o pré-tratamento das preparações com CHL ou Rp-cAMPS é consistente com a hipótese proposta. Embora menos frequente, a activação

da cascata do AMP cíclico pelos receptores M_1 já foi demonstrada em vertebrados (Brown & Rietow, 1981; Enyedi *et al.*, 1982). Também se demonstrou neste trabalho que a activação da PKA pode facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh independentemente da actividade da PKC, uma vez que a CHL não modificou o efeito facilitatório do activador da PKA, 8-Br-AMPc. Contrariamente, a capacidade do PMA facilitar a libertação de [^{3}H]-ACh necessitou da activação simultânea da PKA, já que o seu efeito foi abolido pelo antagonista do AMP cíclico, Rp-cAMPS. Estes resultados sugerem que o envolvimento da PKA na mobilização de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) poderá ser secundário à activação da PKC pelos receptores M_1. A activação sequencial das duas cascatas de sinalização foi previamente descrita em sistemas de expressão heteróloga (Felder *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1991). A fosforilação reversível dos canais Ca_V1 (tipo L) pela PKA está relacionada com o aumento da libertação de neurotransmissores dependente da actividade sináptica (Sculptoreanu *et al.*, 1995). A fosforilação constitutiva dos canais Ca_V1 pode fornecer uma explicação alternativa para as experiências em que o Rp-cAMPS inibiu a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh mediada pela activação da PKC pelos receptores M_1. No entanto, o envolvimento deste mecanismo não explica a redução da facilitação induzida pelo McN-A-343 na presença dos activadores do sistema de transdução adenilciclase / AMP cíclico, FSK, ROL e 8-Br-AMPc (*cf.* Sculptoreanu *et al.*, 2001).

Em suma, os resultados experimentais sugerem que a interacção mutuamente exclusiva entre os receptores pré-sinápticos facilitatórios M_1 e A_{2A} pode resultar do acoplamento destes receptores a cascatas de sinalização convergentes para uma via comum que envolve a activação da PKA e o recrutamento de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) que estão habitualmente "quiescentes". Este mecanismo pode ser fundamental para prevenir a espoliação de neurotransmissor durante períodos de actividade neuronal intensa (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Os dados apresentados também providenciam uma hipótese

molecular para explicar algumas das incongruências encontradas na literatura sobre o papel regulador dos receptores muscarínicos na transmissão neuromuscular.

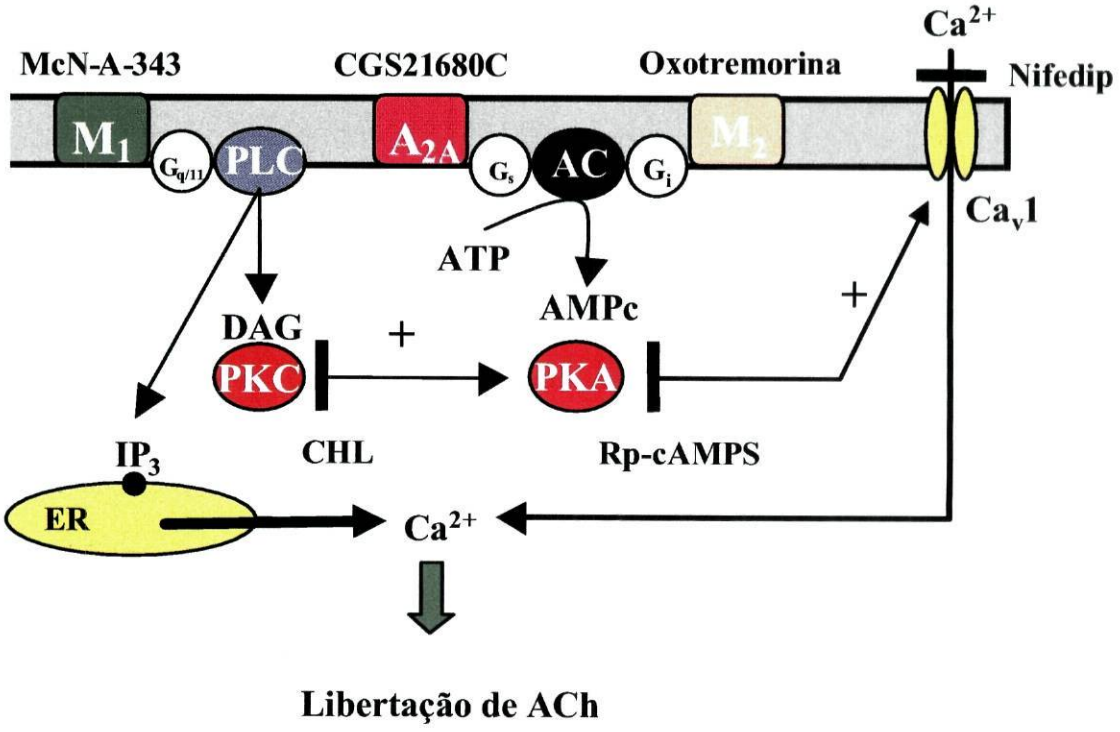


Figura 4.2 Representação esquemática dos segundos mensageiros intracelulares envolvidos na interacção entre os receptores pré-sinápticos muscarínicos M_1e A_{2A} da adenosina. A estimulação dos receptores A_{2A} da adenosina activa a adenilciclase (AC) induzindo o aumento dos níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc) e, consequentemente, a activação da proteína cinase A (PKA). A activação dos receptores M_1 estimulam a fosfolipase C (PLC) levando à produção de inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3) e de diacilglicerol (DAG); estes por sua vez causam a libertação de Ca^{2+} dos reservatórios intracelulares sensíveis ao IP_3 e a activação da proteína cinase C (PKC), respectivamente. A activação sequencial das cinases PKC e PKA devido à activação dos receptores M_1 precede o influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L) responsáveis pela facilitação da libertação de ACh. Foi também discutida no texto, a possibilidade da ocorrência de uma interacção secundária à activação da PKC pelos receptores M_1 e outros receptores acoplados à adenilcilase (M_2 inibitórios e A_{2A} facilitatórios).

5.5 A activação tónica dos receptores A_{2A} da adenosina atenua a depressão tetânica durante a actividade neuronal através do recrutamento de Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 (tipo L)

Neste trabalho provou-se, ainda, que o influxo de Ca^{2+} através de canais distintos dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P), habitualmente relacionados com a exocitose de ACh, poderiam

ser recrutados durante estímulos interpolados de elevada frequência; em particular, os resultados sugerem a participação de canais Ca_V1 (tipo L) localizados nas terminações nervosas motoras de rato na facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh nestas condições experimentais. A regulação do influxo de Ca^{2+} por canais $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) ou Ca_V1 (tipo L) parece ser regulada pela activação de receptores pré-sinápticos A_{2A} pela adenosina endógena. Na sua globalidade, os resultados demonstram que a depressão tetânica da libertação de ACh pode ser ultrapassada quando os períodos de estimulação (50 Hz – *"Bursts"*)são interrompidos por períodos de repouso de 20 segundos, uma situação que favorece a activação tónica de receptores A_{2A} da adenosina capazes de induzirem o recrutamento adicional de Ca^{2+} por canais Ca_V1 (tipo L).

A falência da transmissão sináptica pode dever-se a três mecanismos principais: (1) à falha na condução do potencial de acção ao longo do axónio; (2) à diminuição da libertação do neurotransmissor pelo terminal nervoso; e (3) à redução da excitabilidade da placa motora devido à dessensibilização dos receptores pós-sinápticos. O potencial de placa motora diminui rápida e significativamente durante estímulos contínuos aplicados com frequências que variam entre 5 a 100 Hz sem, contudo, se observarem alterações significativas na amplitude dos potenciais de placa miniatura (MEPPs) (Moyer & Van Lunteren, 1999). Os resultados obtidos neste trabalho, avaliando directamente a libertação de [^{3}H]-ACh, concordam com a interpretação que a depressão dos potenciais de placa verificada durante estímulos de elevada frequência se deve a uma alteração rápida na taxa de libertação do neurotransmissor, sem que seja necessário alterar a condução axonal ou causar a dessensibilização dos receptores pós-sinápticos. As estimativas anteriores sobre a repercussão funcional da falência da neurotransmissão foram baseadas quase exclusivamente em protocolos experimentais resultantes da estimulação ininterrupta dos nervos motores (*e.g.* Wilson, 1979; Hong & Chang, 1991; Fournier *et al.*, 1991; Bazzy,

1994). Se em alguns tipos de músculos, particularmente aqueles usados na manutenção da postura corporal, este padrão da estimulação nervosa é fisiologicamente relevante, já nos músculos torácicos envolvidos no processo de respiração, o tipo de actividade predominante é geralmente intermitentemente evoluindo em ciclos de frequência curta (~0.25-0.35, ver Kong & Berger, 1986). Potencialmente, este padrão de actividade descontínua permite a recuperação da depressão da transmissão neuromuscular verificada durante estímulos consecutivos de elevada frequência, preservando deste modo a eficácia da transmissão sináptica no início do ciclo seguinte. A recuperação da depressão tetânica da libertação de [^{3}H]-ACh após estimulações tetânicas (50 Hz - *"Bursts"*) concorda com resultados anteriores mostrando o restabelecimento completo da queda na amplitude dos potencial de placa motora durante períodos de estimulação intermitentes (Moyer & Van Lunteren, 1999). Apesar, do intervalo (20 segundos) usado entre os tétanos (50 Hz) neste trabalho ser superior àquele que ocorre fisiologicamente nas actividades rítmicas, os resultados sugerem que a recuperação dos níveis de libertação do neurotransmissor observada entre os períodos de estimulação pode ser suficiente para aumentar significativamente a eficácia da transmissão neuromuscular.

Desconhece-se qual a relevância da modulação da libertação quântica espontânea (assíncrona) na transmissão neuromuscular. Sabe-se que a estimulação contínua (20-50 Hz) dos nervos motores provoca um aumento lento mas transitório na frequência dos potenciais de placa miniatura e da concentração de Ca^{2+} livre no interior das terminações nervosas motoras (Narita *et al.*, 1998). Este mecanismo não parece contribuir para a facilitação da libertação de [^{3}H]-ACh durante estímulos tetânicos (50 Hz) interpolados, porque interrupções curtas do tétano (5-9 segundos) aplicadas durante o período de aumento da frequência dos MEPPs causaram o restabelecimento da sua frequência para os níveis basais (Narita *et al.*, 1998). Estes autores mostraram, ainda, que a aplicação de um

novo tétano tornou a aumentar a frequência dos MEPPs para os níveis observados anteriormente ou até para níveis superiores ao controlo, e que este fenómeno era inversamente proporcional à duração da pausa entre os tétanos (< 1 min). Estas observações são contrárias aos resultados obtidos neste trabalho tendo-se mostrado uma relação directamente proporcional entre o aumento nos níveis de [^{3}H]-ACh libertada e a duração do intervalo entre os tétanos (0-20 segundos), para permitir a formação de adenosina endógena suficiente para activar os receptores facilitatórios A_{2A} (Correia-de-Sá *et al.*, 1996b). Apesar, de ter sido demonstrado que a adenosina endógena (via receptores A_1) pode reduzir a libertação espontânea de ACh regulando o influxo de cálcio por canais Ca_V1 nos neurónios motores de ratinho (De Lorenzo *et al.*, 2004), os resultados agora apresentados mostraram que a activação de receptores A_1 da adenosina com R-PIA (300 nM) não alterou a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos nervosos de elevada frequência. A ausência de efeito da R-PIA (300 nM) sobre a libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos tetânicos não parece dever-se à ocupação dos receptores A_1 pela adenosina endógena, porque (1) o K_d da R-PIA para os receptores A_1 é muito inferior (nanomolar) ao da adenosina (micromolar) para os mesmos receptores (*e.g.* Jacobson *et al.*, 1992), e porque (2) o efeito da R-PIA (300 nM) não foi significativamente alterado na presença da ADA (0.5 U/mL) (ver *e.g.* Correia-de-Sá *et al.*, 1996). Além disso, tanto a adenosina (500 μM) como o agonista selectivo dos receptores A_{2A}, CGS21680C (3 nM), facilitaram a libertação de [^{3}H]-ACh independentemente do protocolo de estimulação utilizado, sem alterar significativamente o efluxo basal de trítio.

O influxo de Ca^{2+} por canais sensíveis à voltagem relaciona a despolarização da membrana com a exocitose das vesículas sinápticas nos terminais nervosos. A quantidade de neurotransmissor libertada é dependente das concentrações de Ca^{2+} nos terminais pré-sinápticos (Dodge & Rahamimoff, 1967; Mintz *et al.*, 1995), de tal modo que o aumento

ou a diminuição no influxo de Ca^{2+} pode influenciar drasticamente a transmissão nervosa. Geralmente, a libertação de ACh a partir das terminações nervosas motoras adultas é regulada pelo influxo de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.1$ (tipo P) (*e.g.* Atchison, 1998; Protti & Uchitel, 1993; Wessler *et al.*, 1995; Correia-de-Sá *et al*, 2000a). No presente estudo, mostrou-se que a nifedipina não possuía qualquer efeito na libertação de [^{3}H]-ACh induzida por estímulos contínuos de 5 Hz e 50 Hz, mas aquele bloqueador dos canais Ca_V1 inibiu significativamente a libertação de [^{3}H]-ACh durante estímulos tetânicos (50 Hz) intercalados por períodos de repouso de 20 segundos, uma situação em que o bloqueio dos canais $Ca_V2.1$ com ω-AgaTx IVA foi ineficaz. A libertação do neurotransmissor não foi alterada na presença do bloqueador dos canais $Ca_V2.2$, ω-CgTx GVIA (1 μM) (Olivera *et al.*, 1994; Dunlap *et al.*, 1995), ou da ω-CmTx MVIIC (150 nM), que bloqueia os canais $Ca_V2.2$ e $Ca_V2.1$ (Wheeler *et al.*, 1994). Estes dados são consistentes com a hipótese sugerindo que o influxo de Ca^{2+} por intermédio de canais Ca_V1 (tipo L) pode representar uma resposta adaptativa secundária à redução da actividade dos canais dominantes $Ca_V2.1$ durante períodos de estimulação prolongados de elevada intensidade (Correia-de-Sá *et al.*, 2000a; ver também Urbano & Uchitel, 1999). A inactivação dos canais $Ca_V2.1$ pode ser favorecida pelo influxo adicional de Ca^{2+} através de canais localizados na proximidade (ver a revisão de Tareilus & Breer, 1995), enquanto o recrutamento de Ca^{2+} através dos canais Ca_V1 requer despolarizações mais intensas para que se tornem funcionais (Miller, 1987). Isto pode acontecer, porque os canais Ca_V1 estão localizados preferencialmente fora das zonas activas (Tsien *et al.*, 1988; Robitaille *et al.*, 1990), são mais resistentes à inactivação que os seus congéneres, e possuem uma elevada condutância (~ 25 pS) que permite a saturação dos tampões intraterminais que limitam a difusão do Ca^{2+} para junto da maquinaria exocitótica (ver a revisão de Tareilus & Breer, 1995).

Conforme referido anteriormente o predomínio do tónus A_1 *vs* A_{2A} é balanceado pelo padrão de estimulação. A inibição mediada pelos receptores A_1 predomina se a libertação de ATP é reduzida, enquanto a activação preferencial dos receptores A_{2A} torna-se evidente quando a libertação de ATP permite o aumento da formação de adenosina na fenda sináptica. O aumento da acção tónica facilitatória mediada pelos receptores A_{2A} relacionada com o aumento da frequência de estimulação pode também dever-se à atenuação do efeito inibitório mediado pelos receptores A_1 (ver acima).

Paralelamente, os resultados mostraram um desvio correlacionado com o aumento dos níveis da adenosina na fenda sináptica dos subtipos de canais de Ca^{2+} envolvidos na exocitose de ACh em função das condições de estimulação nervosa. Os canais $Ca_V2.1$ (tipo P) estão operacionais enquanto os níveis de adenosina endógena são baixos, uma situação em que o nucleosideo activa preferencialmente os receptores inibitórios do subtipo A_1. Durante estímulos tetânicos (50 Hz) interpolados, a activação dos receptores A_{2A} pela adenosina endógena promove o recrutamento do Ca^{2+} pelos canais Ca_V1 habitualmente "quiescentes", compensando a diminuição da actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P). O bloqueio da activação dos receptores A_{2A} pela aplicação de ADA ou de DMPX causou o restabelecimento da actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P). Além disso, a facilitação da libertação da [^{3}H]-ACh causada pelos receptores A_{2A} parece depender do influxo de cálcio através de canais Ca_V1 (tipo L), porque a nifedipina eliminou em grande parte, mas não totalmente, o efeito excitatório do CGS21680C. Isto pode ser explicado porque a activação dos receptores A_{2A} da adenosina pode mobilizar alternativamente as reservas intracelulares de Ca^{2+} sensíveis à tapsigargina na presença da nifedipina (Correia-de-Sá *et al.*, 2000b). Sabe-se que a actividade dos canais de Ca^{2+} pré-sinápticos é modulada por uma via de sinalização circunscrita à membrana envolvendo proteínas G e, também, por segundos mensageiros citoplasmáticos. Por exemplo, níveis intracelulares elevados de AMP cíclico

aumentam a probabilidade de abertura, reduzem a inactivação, e causam o recrutamento de novos canais de Ca_V1 (revisto por Carbone *et al.*, 2001). Do mesmo modo, a fosforilação da PKC aumenta a libertação quântica de ACh através da abertura de canais Ca_V1 (tipo L) que estão habitualmente "quiescentes" nos terminais nervosos motores de rã durante o potencial de repouso, *i.e.* sem necessitar da despolarização do terminal (Arenson & Evans, 2001). Contrariamente, os canais $Ca_V2.2$ (tipo N) e $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) podem ser inibidos por moduladores estimulados por receptores acoplados a proteínas G, devido a uma interacção directa entre as subunidades $G_{\beta\gamma}$ e as subunidades dos canais iónicos (Sandoz *et al.*, 2004; ver a revisão de Jarvis & Zamponi, 2001). Estes factos apoiam a hipótese de que, para além da perda da actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P), a estimulação da via de transdução adenilciclase / AMP cíclico pelos receptores A_{2A} (Correia-de-Sá & Ribeiro 1994) pode activar correntes de Ca^{2+} do tipo Ca_v1 (tipo L) por intermédio da fosforilação mediada pela PKA (ver *e.g.* Miller, 1987; Artalejo *et al.*, 1992;). Deste modo, a entrada de Ca^{2+} por esta via facilita a libertação de [^{3}H]-ACh, contribuindo para ultrapassar a depressão tetânica. A formação endógena de adenosina durante a actividade neuronal parece ser, assim, a responsável por um novo mecanismo de plasticidade sináptica na placa motora de rato envolvendo o recrutamento de Ca^{2+} através de diferentes subtipos de canais.

O significado fisiológico da expressão dos múltiplos subtipos de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem nos terminais nervosos ainda não é completamente entendido. Os diversos subtipos de canais de Ca^{2+} diferem uns dos outros pelas suas propriedades biofísicas, pela sua sensibilidade diferencial aos mediadores libertados durante a actividade celular e pelo seu grau variável de acoplamento às vias de sinalização intracelulares (ver a revisão de Miller, 1987). A existência de diferentes subtipos de canais nas terminações nervosas motoras poderá permitir uma maior flexibilidade e versatilidade na regulação da libertação de ACh, em particular em situações distintas da normalidade. Os diferentes

canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem parecem desempenhar papéis relevantes durante o desenvolvimento e regeneração da junção neuromuscular (Gray *et al.*, 1992; Fu & Huang, 1994; Santafé *et al.*, 2001) e em patologias que afectem a libertação do neurotransmissor. Por exemplo, a miastenia de Lambert-Eaton (LEMS) é uma desordem autoimune associada a uma perda da actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) nos neurónios motores motivada pelo por um elevado título de anticorpos dirigidos contra este tipo de canais. Esta patologia é caracterizada pela diminuição da libertação vesicular (conteudo quântico) em resposta a um único impulso nervoso; no entanto, a aplicação sucessiva de estímulos com uma frequência elevada dá origem a respostas musculares de amplitude normal (Lambert & Elmqvist, 1971). Experimentalmente, a aplicação de soro de doentes com LEMS causa perda da actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) que é acompanhada pelo aumento concomitante do influxo de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) sensíveis às dihidropiridinas, e também de correntes de Ca^{2+} veiculadas por canais "resistentes" aos bloqueadores habituais, do tipo $Ca_V2.3$ (tipo R) (ver a revisão de Lang *et al.*, 2003). De um modo semelhante, observou-se um aumento compensatório na proporção das correntes de Ca^{2+} de tipo facilitatório (Ca_V1, tipo L) nas junções neuromusculares de roedores após o tratamento com IgG de pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA) (Fratantoni *et al.*, 2000). Em condições normais, o influxo de Ca^{2+} através de canais $Ca_V2.1$ (tipo P/Q) representa mais de 95% das correntes de Ca^{2+} observadas na junção neuromuscular de mamíferos. A possibilidade de regular dinamicamente os diversos canais de Ca^{2+} implicados na libertação de ACh pode explicar porque razão estes doentes não são mais gravemente afectados do que na realidade se verifica. Os resultados deste trabalho mostram pela primeira vez que, a adenosina endógena formada durante a actividade nervosa intermitente pode facilitar o influxo de Ca^{2+} através de canais geralmente silenciosos do tipo Ca_V1. Especificamente, a activação tónica dos receptores A_{2A} da

adenosina causa o desvio do influxo de Ca^{2+} para o interior das terminações nervosas motoras mediado por canais $Ca_V2.1$ (tipo P), caracterizados por dessensibilizarem rapidamente, para canais de elevada conductância e inactivação lenta do Ca_V1 (tipo L), permitindo a recuperação quase completa dos níveis de libertação do neurotransmissor perdida durante o tétano anterior. Com base neste pressuposto, é provável que a manipulação da activação dos receptores A_{2A} da adenosina venha a revelar-se de interesse clínico para recrutar canais de Ca^{2+} habitualmente "silenciosos" de modo a preservar a eficácia da transmissão neuromuscular em placas motoras afectadas por patologias que reduzem a margem de segurança, particularmente as que afectam os músculos respiratórios.

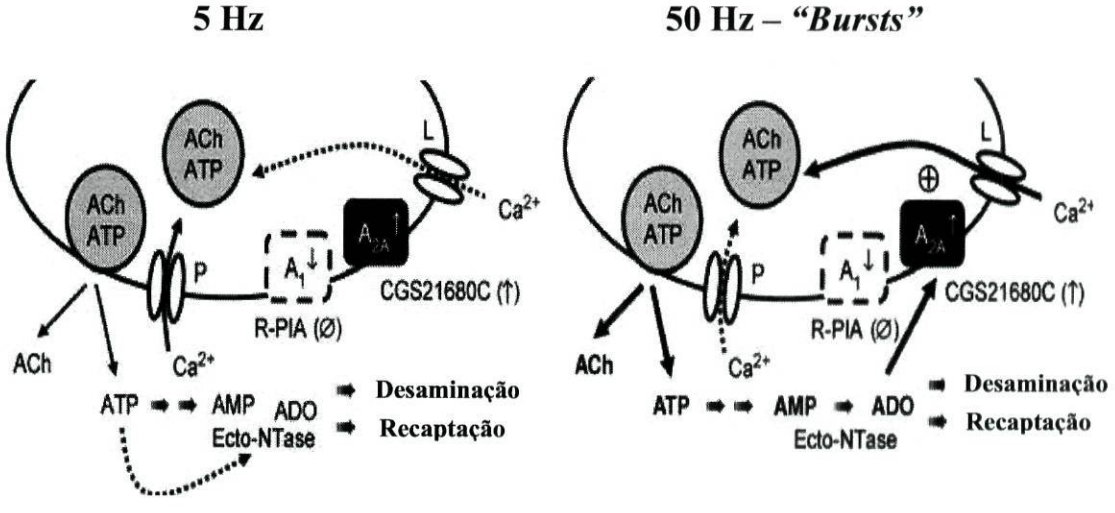


Figura 4.3 Regulação do recrutamento do Ca^{2+} por canais $Ca_V2.1$ (tipo P e Ca_V1 (tipo L) pela adenosina endógena formada durante a actividade neuronal.
Durante períodos de estimulação contínuos e de curta duração, os canais $Ca_V2.1$ (tipo P) localizados junto às zonas activas de libertação controlam a libertação de ACh induzida por estimulação dos terminais nervosos motores em mamíferos adultos. A actividade dos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) decresce rapidamente em virtude da sua inactivação dependente do Ca^{2+}, facto que poderá contribuir para o aparecimento da depressão tetânica da neurotransmissão. Durante estímulos tetânicos (50 Hz) intermitentes, o declínio na transmissão neuromuscular evidente durante cada tétano poderá recuperar completamente até ao inicio do tétano seguinte devido ao recrutamento de Ca^{2+} através de canais Ca_V1 (tipo L) que possuem uma elevada capacitância, inactivação lenta e localização afastada das zonas activas. O controlo do influxo de Ca^{2+} pelos canais $Ca_V2.1$ (tipo P) e/ou Ca_V1 (tipo L) parece ser mediado pela adenosina endógena. O predomínio do tónus inibitório A_1 / facilitatório A_{2A} é regulado pelo padrão de estimulação nervosa (estímulos contínuos *versus* tétanos interpolados) e deve-se ao aumento dos níveis de adenosina extracelular formada a partir do ATP libertado. Devido à libertação sincronizada da ATP e de ACh de forma dependente da frequência de estimulação, o nucleótido pode atingir níveis elevados durante estímulos de

frequência elevada (50-Hz) de forma a inibir a ecto-5´-nucleotidase (ecto-Ntase), a enzima limitante da formação de adenosina a partir dos nucleotidos de adenina. Os períodos de repouso entre tétanos sucessivos favorece a recuperação da inibição enzimática, dando origem à formação maciça de adenosina capaz de atingir níveis suficientes para causar a activação de receptores facilitatórios do subtipo A_{2A}. Paralelamente, assiste-se a um desvio coordenado na dinâmica dos canais de Ca^{2+} responsáveis pela exocitose de ACh; dos canais predominantes do tipo $Ca_V2.1$ (P) para os canais com características "facilitatórios" do tipo Ca_V1 (L), de uma forma reversível através do bloqueio da activação dos receptores A_{2A}. Este mecanismo representa um novo modelo de plasticidade sináptica mediada pelos receptores da adenosina na placa motora de rato que poderá estar envolvido na recuperação da depressão tetânica durante a actividade neuronal intermitente.

Agradecimentos

Ao **Professor Paulo Correia de Sá** que detêm a minha admiração e estima agradeço a sua acuidade científica, a sua orientação exemplar, a sua revisão critica e cuidada deste trabalho. À sua pessoa e ao seu exemplo devo a dedicação e orientação da minha vida profissional para a investigação científica

À equipe do laboratório de farmacologia, **Dra. Alexandrina Timóteo**, **Belmira Silva**, **Catarina Silva**, **Dra. Catia Vieira**, **Professora Doutora Graça Lobo**, **Helena Pascoal**, **Dra. Margarida Araújo**, **Dr. Miguel Faria**, **Suzete Liça** e **Dra. Teresa Magalhães Cardoso** agradeço o apoio sempre demonstrado e a amizade constante.

À **Dra. Teresa Magalhães Cardoso** a ajuda na elaboração do resumo em francês desta dissertação.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar por todas as facilidades concedidas para a realização do trabalho experimental, e à Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro.

Finalmente mas principalmente a **toda a família e amigos** que sempre me acompanharam, apoiaram e souberam compreender as vicissitudes da vida científica.

Referências Bibliográficas

Abbs, E.T. & Joseph, D.N. (1981) The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 481-483.

Adem, A. & Karlsson, E. (1997) Muscarinic receptor subtype selective toxins. *Life Sci.*, **60**, 1069-1076.

Alexander, S.P.H., Mathie, A. & Peters, J.A. (2005) Guide to receptors and channels: Ion channels. *Br. J. Pharmacol.*, **144**, S73-S94.

Alkadhi, K., Branisteanu, D. D., Henderson, E. G., Lambert, J. J. & Volle, R. L. (1980) Effects of McN-A-343, a cholinomimetic drug, on endplate currents in the frog. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmaco*l., **312**, 117-121.

Alves-do-Prado, W. & Prado, W. A. (1993) Neuromuscular facilitation induced by muscarinic antagonists in the rat isolated diaphragm. *Gen. Pharmacol.*, **24**, 1501-1504.

Arch, J.R.S. & Newsholme, E.A. (1978) The control of metabolism and the hormonal role of adenosine. In Essay in Biochemistry, Vol. 14 ed. Campbell, P. N. & Aldridge, W.N. pp. 82-123. New York: Academic Press.

Arenson M.S. & Evans, S.C. (2001) Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerve terminals by direct action on L-type Ca^{2+} channels and apparently not by depolarization of the terminal. *Neuroscience*, **104**, 1157-1164.

Artalejo C. R., Rossie, S., Perlman, R. L. & Fox A.P. (1992) Voltage dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature*, **358**, 63-66.

Atchison, W.D. (1989) Dihydropyridine-sensitive and –insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **251**, 672-678.

Augustine, G.J., Adler, E.M. & Charlton, M.P. (1991) The calcium signals for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.,* **635**, 365-381.

Bardenheuer, H. & Schrader, J. (1986) Supply-to-demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by the heart. *Am. J. Physiol.* **250**, H173-H180.

Baxter, R.L., Vega-Riveroll, L.J., Deuchars, J. & Parson, S.H. (2005) A_{2A} adenosine receptors are located on presynaptic motor nerve terminals in the mouse. *Synapse*, **57**, 229-234.

Bazzy, A.R. (1994) Development changes in rat diaphragm endplate response to repetitive stimulation. *Dev. Brain Res.*, **81**, 314-317.

Bean, B.P. (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J. Gen. Physiol.*, **86**, 1-30.

Beavo, J.A. & Reifsnyder, D.H. (1990) Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 150-155.

Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, **341**, 197-205.

Bowman W. C., Marshall I. G., Gibb, A. J. & Harbone A. J. (1988) Feedback control of transmitter release at the neuromuscular junction. *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 16-20.

Bowman W.C. (1980) Prejunctional and postjunctional cholinoceptors at the neuromuscular junction. *Anest. Analg.*, **59**, 935-943.

Brailoiu, E. & Miyamoto, M.D. (2000) Inositol trisphosphate and cyclic adenosine diphosphate-ribose increase quantal transmitter release at frog motor nerve terminals: possible involvement of smooth endoplasmatic reticulum. *Neuroscience*, **95**, 927-931.

Branisteanu, D.D. & Volle, R.L. (1975) Modification by lithium of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **194**, 362-372.

Brown, J. H. & Rietow M. (1981) Muscarinic-dopaminergic synergism on retinal cyclic AMP formation. *Brain Res.*, **215**, 388-392.

Brown, S.J., James, S., Reddington, M. & Richardson, P.J. (1990) Both A_1 and A_{2A} purine receptors regulate striatal acetylcholine release. *J. Neurochem.*, **55**, 31-38.

Bülbring, E. (1946) Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **1**, 38-61.

Burford, N.T. & Nahorski, S.R. (1996) Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by Gs and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. *Biochem. J.*, **315**, 883-888.

Carbone, E. & Lux, H.D. (1984) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.*, **46**, 413-418.

Carbonne, E., Carabelli, V., Cesetti, T., Baldelli, P., Hernández-Guijo, J.M. & Giusta, L. (2001) G-protein and cAMP-dependent L-channel gating modulation: a manifold system to control calcium entry in neuroscretory cells. *Pflügers Arch*, **442**, 801-813.

Catteral, W.A, Perez-Reyes, E., Snutch, T.P & Striessnig (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, **57**, 411-425.

Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. M. (1998) International Union of Pharmacology. XVII Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 279-290.

Chavez-Noriega, L.E. & Stevens, C.F. (1994) Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. *J. Neurosci.*, **14**, 310-317.

Chavis, P., Fagni, L., Lansman, J.B. & Bockaert, J. (1996) Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. *Nature*, **382**, 719-722.

Cherkesy, B.D., Sugimori, M. & Llinas, R.R. (1991) Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. *Ann. N.Y Acad. Sci. USA*, **82**, 1860-1863.

Choi, E.J. Xia, Z., Villacres, E.C & Storm, D.R. (1993) The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **5**, 269-273.

Colquhoun, D., Mathie, A., Mulrine, N.K. & Ogden, D. C. (1989) Studies on single acetylcholine-receptor channels in muscle endplate and sympathetic neurons. In Sellin, L.C. Libelius, R. & Thesleff, S. (eds), *Neuromuscular Junction*. Elsevier, Amsterdam, pp. 217-234.

Cordeaux, Y. & Hill, S.J (2002) Mechanisms of crosstalk between G-protein-coupled receptors. *Neurosignals*, **11**, 45-57.

Correia-de-Sá, P. (1994) Receptores pré-sinápticos da adenosina na junção neuromuscular. Tese de Doutoramento- Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Correia-de-Sá, P. & Ribeiro, J. A. (1991) Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptors agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve endings of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **103**, 1614-1620.

Correia-de-Sá, P. & Ribeiro, J. A. (1994a) Evidence that the presynaptic A_{2A} adenosine receptors of the rat motor nerve terminals is positively couple to adenylate cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **350**, 514-522.

Correia-de-Sá, P. & Ribeiro, J. A. (1994b) Tonic adenosine A_{2A} receptors activation modulates nicotinic autoreceptors function at the rat neuromuscular junction. *Eur. J. Pharmacol.*, **271**, 349-355.

Correia-de-Sá, P. & Ribeiro, J. A. (1994c) Potentiation by tonic A_{2A}-adenosine receptor activation of CGRP-facilitated [^{3}H]-ACh release from rat motor nerve endings. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 582-588.

Correia-de-Sá, P. & Ribeiro, J. A. (1996a) Adenosine uptake and deamination regulate tonic A_{2A} – receptor facilitation of evoked [^{3}H]-acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *Neuroscience*, **73**, 85-92.

Correia-de-Sá, P., Timóteo, M.A. & Ribeiro, J.A. (1996b) Presynaptic A_1 inhibitory/ A_{2A} facilitatory adenosine receptors activation balance depends on motor nerve stimulation paradigms at the rat hemidiaphragm. *J. Neurophysiol.*, **76**, 3910-3919.

Correia-de-Sá, P., Timóteo, M.A. & Ribeiro, J.A. (1997) Adenosine plays a key role on neuromuscular transmission to adjust the modulatory pattern (cholinergic *vs* peptidergic) to condition of motor nerve stimulation. *The role of Adenosina in the Nervous System.* (Exerta Medica International Congress Series), eds. Y. Okada, Elsivier Science B.V.-Amesterdam, **1140**, 79-87.

Correia-de-Sá, P., Timóteo, M.A. & Ribeiro, J.A. (2000a) A_{2A} adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: Influence of stimulus paradigm on calcium mobilization. *J. Neurochem.*, **74**, 2462-2469.

Correia-de-Sá, P., Timóteo, M.A., Ribeiro, J.A. (2000b). Influence of stimulation and Ca^{2+} recruitment triggering [^{3}H]-acetylcholine release from the rat motor-nerve endings. *Eur. J. Pharmacol.,* **406**, 355-362.

Correia-de-Sá, P., Timóteo, M.A., Ribeiro, J.A. (2001) Synergism between A_{2A}-adenosine receptor activation and vasoactive intestinal peptide to facilitate [^{3}H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neurosci. Lett.*, **309**, 101-104.

Crawford, A.C. (1975) Lithium ions and the release of transmitter at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **246**, 109-142.

Cunha R.A., Correia-de-Sá, P., Sebastião A. M. & Ribeiro, J.A. (1996) Preferential activation of excitatory adenosine receptors at the rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.*, **119**, 253-260.

Cunha, R.A. & Sebastião, A. M. (1993) Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibers upon electrical stimulation of innervated skeletal muscles of frog. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.*, **424**, 503-510.

Dan, Y. & Poo, Mu-ming (1992) Hebbian depression of isolated neuromuscular Synapses in vitro. *Science*, **256**, 1570-1573.

De Lorenzo, S., Veggetti, M., Muchnik, S. & Losavio, A. (2004) Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release induced by adenosine at the mouse neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 113-124.

del Catillo, J. & Katz, B. (1954) Quantal components of the end-plate potencial. *J. Physiol. (London)*, **124**, 560-573.

Dixon, A.K., Widdowson, L. & Richardson P.J. (1997) Desensitisation of adenosine A_1 receptor by the A_{2A} receptor in the rat striatum. *J. Neurochem*, **69**, 315-321.

Dodge, F.A. Jr & Rahamimoff, R. (1967) Co-operative action a calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **193**, 419-432.

Dowdall, M.J., Boyne, A.F. & Whittaker, V.P. (1974) Adenosine triphosphate: a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.*, **140**, 1-12.

Drury, A.N. & Szent-Györgi, A. (1929) The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (London)*, **68**, 213-237.

Duarte-Araújo, M, Timóteo, M..A. & Correia-de-Sá, P. (2004) Adenosine activating A_{2A}-receptors coupled to adenylate cyclase/cyclic AMP pathway dowregulates nicotinic autoreceptors function at the rat myenteric nerve terminals. *Neurochem. Int.*, **45**, 641-651.

Duckles, S.P & Budai, D. (1990) Stimulation intensity as critical determinant of presynaptic receptor effectiveness. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 440-443.

Duckles, S.P. & Budai, D. (1990) Stimulation intensity as critical determinant of presynaptic receptor effectiveness. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 440-443.

Dunlap, K., Luebke, J.I & Turner, T.J. (1995) Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.*, **18**, 89-98.

Ehrenstein, G., Stanley, E.F., Pocotte, S.L., Jia, M., Iwasa, K.H. & Krebs, K.E. (1991) Evidence of a model of exocytosis that involves calcium-activated channels. *Ann. N.Y. Acad. Sci,* **635**, 297-306.

Enyedi, P., Fredholm, B.B, Lundberg, J.M. & Änggard, A. (1982) Carbachol potentiates the cyclic AMP-stimulating effects of VIP in cat submandibular gland. *Eur. J. Pharmacol.*, **79**, 139-143.

Faria, M., Oliveira, L., Timóteo, M.A., Lobo, M.G. & Correia-de-Sá, P. (2003) Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing α3β2 subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse*, **49**, 77-88.

Fatt, P. & Katz, B. (1952) Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. (London)*, **117**, 109-128.

Fatt, P. & Katz, B. (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J. Physiol. (London)*, **120**, 171-204.

Felder C.C. (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J.*, **9**, 619-625.

Felder C.C., Kanterman R.Y., & Axelrod, J. (1989) A transfected m1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates adenylate cyclase via phosphatidylinositol hydrolysis. *J. Biol Chem*, **264**, 20356-20362.

Fisher, S.K. (1995) Homologous and heterologous regulation of receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis. *Eur. J. Pharmacol.*, **288**, 231-250.

Fournier, M., Alula, M. & Sieck, G.C. (1991) Neuromuscular transmission failure during postnatal development. *Neurosci. Lett.*, **125**, 34-36.

Fratantoni, S.A., Weisz, G., Pardal, A.M., Reisin, R.C. & Uchitel O.D. (2000) Amyotrophic lateral sclerosis IgG-treated neuromuscular junctions develop sensitivity to L-type calcium channel blocker. *Muscle Nerve*, **23**, 543-550.

Fredholm, B.B., Ijerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. & Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol. Rev.*, **53**, 527-552.

Frerking, M., Borges, S. & Wilson, M. Are some minis multiquantal? *J. Neurophysiol.* **78**, 1293-1304.

Fu, W.M. & Huang, F.L. (1994) L-type Ca^{2+} channel is involved in the regulation of spontaneous transmitter release at developing neuromuscular synapses. *Neuroscience*, **58**, 131-140.

Ganguly, D.K. & Das, M. (1979) Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature*, **278**, 645-648.

Garcia, K.D. & Beam, K.G. (1996) Reduction of calcium currents by Lambert-Eaton syndrome sera: motorneurons are preferentially affected, and L-type currents are spared. *J. Neurosci.*, **16**, 4903-4913.

Giachetti, A., Giraldo, E., Ladinsky, H., & Montagna, E. (1986) Binding and functional profiles of the selective M1 muscarinic receptor antagonists trihexylphenidyl and dicyclomine. *Br. J. Pharmacol.*, **89**, 83-90.

Ginsborg, B.L. & Hirst, G.D.S. (1972) The effect of adenosine on the release of transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol. (London)*, **224**, 629-645.

Gonçalves, J. & Queiroz, G. (1993) Facilitatory and inhibitory modulation by endogenous adenosine of noradrenaline release in the epididymal portion of rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **348**, 367-371.

Gundersen, C.B. & Jenden, D.J. (1980) Oxotremorine does not enhance acetylcholine release from the rat diaphragm preparations. *Br. J. Pharmacol.*, **70**, 8-10.

Hagiwara, S., Ozawa, S. & Sand, O. (1975) Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.*, **65**, 617-644.

Halmiton, B.R. & Smith, D.O. (1991) Autoreceptor-mediated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in rat. *J. Physiol (London)*, **432**, 327-341.

Hebb, D. O. (1949) The organization of behavior (Wiley, New York)

Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. & Maffrand, J.P. (1990) Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Biophys.Res. Comm.*, **172**, 993-999.

Hess, P., Lansman, J.B & Tsien, R.W. (1984) Different modes of calcium channels gating behavious favoured by dihydropyridine Calcium agonists and antagonists. *Nature*, **311**, 538-544.

Heuser, J.E. & Reese, T. S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.*, **57**, 315-344.

Hong, S.J. & Chang, C.C. (1991) Run-down of neuromuscular transmission during repetitive nerve activity by nicotinic antagonists in not due to desensitization of the postsynaptic receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 817-822.

Houslay, M.D. (1991) "CrosstalK": a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.*, **195**, 9-27.

Israeel, M., Gautron, J. & Lesbats, B. (1973) Fractionnement de l'organe electrique de la Torpille. In *La transmission Cholingique de L'excitatio,* pp. 61-69. Paris: INSERM.

Jacobson, K.A., van Galen, P.J.M. & Williams, M. (1992) Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationship, and the therapeutic potencial. *J. Med. Chem.*, **35**, 407-422.

James, S. & Richardson, P.J. (1993) Production of adenosine from extracelular ATP at the striatal cholinergic synapses. *J. Neurochem.*, **60**, 219-227.

Jarvis, S.E & Zamponi, G.W. (2001) Interactions between presynaptic Ca^{2+} channels, cytoplasmatic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 519-525.

Jones, S.F. & Kwanbunbumpen, S. (1970) The effects of nerve stimulation and hemicholinium on synaptic vesicles at the neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **207**, 31-51.

Jones, S.V. (1993) Muscarinic receptors subtypes: modulation of ion channels. *Life. Sci.*, **52**, 457-464.

Jones, S.V., Heilman, C.J. & Brann, M.R. (1991) Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *J. Mol. Pharmacol.*, **40**, 242-247.

Katz, B. (1966) Nerve Muscle and Synapse. McGraw-Hill. New York.

Katz, E., Ferro, P.A., Cherksey, B.D., Sugimori, M., Llinas, R. & Uchitel, O.D. (1995) Effects of calcium channels blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **486**, 695-706.

Kilbinger, H. & Nafziger, M. (1985) Two types of neuronal muscarine receptors modulating acetylcholine release from guinea-pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmaco*l., **328**, 304-309.

Kong, F.J & Berger, A.J. (1986) Firing properties and hypercapnic responses of single phrenic motor axons in the rat. *J. Appl. Physiol.*, **61**, 1999-2004.

Kull, B., Svenningsson, P. & Fredholm, B.B. (2000) Adenosine A_{2A} receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum.. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 771-777.

Lai, H.L., Yang, T.H., Messing, R.O., Ching, Y.H., Lin, S.C. & Chern, Y. (1997) Protein kinase C inhibits adenylate cyclase type VI activity during desensitization of the A_{2A}-adenosine receptor-mediated cAMP response. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4970-4977.

Lang, B., Pinto, A., Giovannini, F., Newson-Davis, J. & Vincent, A. (2003) Pathogenic autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. In Myasthenia Gravis & Related Disorders-Biochemical Basis for Disease of neuromuscular junction, eds. Agius, M.A., Richman, D.P, Fairclough, R.T. & Maselli, R.A., pp. 187-195. The New York Academy of sciences, New York.

Lanzafame, A.A., Christopoulos, A. & Mitchelson, F. (2003) Cellular signalling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels*, **9**, 241-260.

Laurenza, A., Sutkowski, E. McH. & Seamon, K. B. (1989) Forskolin: a specific stimulator of adenylate cyclase or a diterpene with multiple sites of action. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 442-447.

Liu, M. & Simon, M.I. (1996) Regulation by cAMP-dependent protein kinase of a G-protein-mediated phospholipase C. *Nature*, **382**, 83-87.

Long, J.P & Schueler, F.W. (1954) A new series of cholinesterase inhibitors. *J. Am. Pharmacol. Ass.*, **43**, 79-86.

Lopes, L.V, Cunha, R.A. & Ribeiro, J.A. (1999) Crosstalk between A_1 and A_{2A} adenosine receptors in the hippocamps and cortex of young adult and old rats. *J. Neurophysiol.*, **82**, 3196-3203.

Luebke, J.L., Dunlap, K. & Turner, T.J. (1993) Multiple calcium channels type control control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuron*, **11**, 895-902.

Maeno, T., Hara, N., Enomoto, K., Ichinose, M. & Sawada, M. (1995) Effects of inhibitors of ouabain-sensitive Na^+, K^+-ATPase and Li^+ ions on the neuromuscular transmission of the frog. *Jap. J. Physiol.*, **45**, 397-410.

Magalhães-Cardoso, M.T., Pereira, M.F, Oliveira, L., Ribeiro, J.A., Cunha R.A. & Correia-de-Sá, P. (2003) Ecto-AMP deaminase blunts the ATP-derived adenosine A_{2A} receptor facilitation of acetylcholine release at rat motor nerve terminals. *J. Physiol.* (London), **549**, 399-408.

Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. & Mikoshiba, K. (1997) 2-Aminoethoxydiphenil borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P_3-induced Ca^{2+} release. *Jpn. J. Biochem.*, **122**, 498-505.

McCormack, T., Vega-Saenz de Miera, E.C. & Rudy, B. (1990) Molecular cloning of a member of a third class Shaker-family K channel genes in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 5227-5231.

McIlwain, H. & Poll, J.D. (1986) Adenosine in cerebral homeostatic role: appraisal through actions of homocysteine, colchicine and dipyridamole. *J. Neurobiol.*, **17**, 39-49.

Meghji, P. (1991) Adenosine production and metabolism. In *Adenosine in the Nervous System,* ed. Stone, T. W., pp. 25-42. London, San Diego: Academic Press.

Meghji, P., Pearson, J.D. & Ryan, J.P. (1992) Regulation of extracelular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.*, **263**, H40-H47.

Michel, D.M., Stefanich, E. & Whiting, R. L. (1989) Direct labelling of rat M_3-muscarinic receptors by [^{3}H]-4-DAMP. *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 459-466.

Miller, R.J. (1987) Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, **235**, 46-52.

Mintz, I.M., Sabatini, B.L. & Regehr, W.G. (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse. *Neuron*, **15**, 675-688.

Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. & Adams, M.E. (1992) P-type calcium channels blocked by the spider omega-Aga-IVA. *Nature*, **355**, 827-829.

Miyamoto, M.D. (1978) The actions of cholinergic drugs on motor nerve terminals. *Pharmacol. Rev.*, **29**, 221-247.

Monteiro, E.C. & Ribeiro, J. A. (1987) Ventilatory effects of adenosine by carotid body chemoreceptors in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmaco*l., **335**, 143-148.

Mork, A. & Geisler, A. (1995) Effects of chronic lithium treatment on agonist-enhanced extracelular concentration of cyclic AMP in the dorsal hippocampus. *J. Neurochem*, **65**, 134-139.

Moyer, M. & Van Lunteren, E. (1999) Effect of phasic activation on endplate potencial in rat diaphragm. *J. Neurophysiol.*, **82**, 3030-3040.

Muscholl, E. Presynaptic muscarinic receptors and inhibition of release. (1979) In Paton D.M. (ed) *The release of catecholamines from adrenergic neurons*. Pergamon Press, Oxford New York, 87-110.

Narita, K., Akita, T., Osanai, M., Shirasaki, T., Kijima, H. & Kuba, K. (1998) A Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release mechanism involved in asynchonous exocytosis at frog motor nerve terminals. *J. Gen. Physiol.*, **112**, 593-609.

Nilkosky, E.E., Voronin, V.A., Oranska, T.L. & Vyskocil, F. (1991) The dependence of non-quantal acetylcholine release on the choline-up-take system in the mouse diaphragm. Pflüegers Arch., **418**, 74-78.

Niles, W.D. & Cohen, F.S. (1991) Video-microscopy studies of vesicule-planar membrane adhesion and fusion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **635**, 273-296.

Nordström, C.H., Rehncroma, S., Siesjo, B.K. & Westerberg, E. (1977) Adenosine in rat cerebral cortex: its determination, normal values, and correlation to AMP and cyclic AMP during shortlasting ischemia. *Acta Physiol. Scand.* **101**, 63-71.

Oliana, M.C. & Onali, P. (1992) Properties of muscarinic stimulated adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. *J. Neurochem*, **58**, 1723-1729.

Oliveira, L., Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2002) Modulation by adenosine of both muscarinic M_1-facilitaton and M_2-inhibition of [^{3}H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Eur. J. Neurosci.*, ***15***, 1728-1736.

Oliveira, L., Timóteo, M.A. & Correia-de-Sá, P. (2004) Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A_{2A} receptor facilitation of L-type Ca^{2+} influx into rat motor nerve terminals. *J. Physiol. (London), **560***, 157-168.

Olivera, B.M, Miljanich, G.P, Ramachandran, J. & Adams, M.E. (1994) Calcium channels diversity and neurotransmitter release: ω-conotoxins and ω-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 823-867.

Parfitt, K.D. & Madison, D.V. (1993) Phorbol, esters enhance synaptic transmission by a presynaptic, calcium-dependent mechanism in rat hippocampus. *J. Physiol. (London)*, **471**, 245-268.

Parkman, H.P., Pagano, A.P. & Ryan, J.P (1999) Subtypes of muscarinic receptors regulating gallbladder cholinergic contraction. *Am. J. Physiol.*, **276**, I243-I250.

Paterson, A.R, Babb, L.R., Paran, J.H. & Cass, C.E. (1977) Inhibition by nitrobenzyltionosine of adenosine uptake by asynchrous HeLa cells. *Mol. Pharmacol.*, **13**, 1147-1158.

Paton, W.D. & Waud, D.R. (1967) The margin of safety of neuromuscular transmission. *J. Physiol. (London)*, **191**, 59-90.

Perin, M.S., Brose, N., Jahn, R., Sudhof, T.C. (1991) Domain structure of synaptogamin (p65). *J. Biol. Chem.*, **266**, 623-629.

Perin, M.S., Fried, V.A, Mignery, G.A., Jahn, R., Sudhof, T.C. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, **345**, 60-263.

Phiel, C.J. & Klein, P.S. (2001) Molecular targets of lithium action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 789-813.

Potter, L.T. (1970) Synthesis, storage, and release of [^{14}C]-acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles. *J. Physiol. (London)*, **206**, 145-166.

Premont, R.T., Jacobowitz, O. & Iyengar, R. (1992) Lowered responsiveness of the catalyst of adenylate cyclase to stimulation by Gs in heterologous desensitization: A role for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Endocrinology*, **131**, 2774-2784.

Protti, D.A. & Uchitel, O.D. (1993) Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin ω–Aga-IVA. *Neuroreport.*, **5**, 333-336.

Pull, I. & McIlwain, H. (1972) Adenine derivatives as neurohumoral agents in the brain. The quantities liberated on excitation of superfused cerebral tissues. *Biochem. J.*, **130**, 975-981.

Ralevic, V. & Burnstock, G. (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines. *Parmacol. Rev.*, **50** (3), 413-492.

Re, L. (1999) Modulation of acetylcholine release by presynaptic muscarinic autoreceptors. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.*, **49**, 215-223.

Rhee, S.G. & Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15045-15048.

Ribeiro, J.A. & Sebastião, A.M. (1991) Purinergic modulation of neurotransmitter release in the peripheral and central nervous system. In *Presynptic Regulation of Neurotransmitter Release*, eds. Feigenbaum, J. & Hanani, M. London: Freund Publishing House.

Ribeiro, J.A. & Walker, J. (1975) The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.*, **54**, 213-218.

Road, J., Osborne, S. & Cains, A. (1995) Phrenic motoneuron firing rates during brief inspiratory resistive loads. *J. Appl. Physiol.*, **79**, 1540-1545.

Robitaille, R., Adler, E.M. & Charlton, M.P. (1990) Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular junction. *Neurons*, **5**, 773-779.

Ronziere, T., Auzou, P., Ozsancak, C., Magnier, P. Senant, J. & Hannequin, D. (2000) Myasthenic syndrome induced by lithium. *Press Med.*, **29**, 1043-1044.

Roszek, B. Baan, G.C. & Huijing, P.A. (1994) Decreasing stimulation frequency-dependent length-force characteristics of rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **77**, 2115-2124.

Salpetter, M.M. (1987) The Vertebrate Neuromuscular Junction. Alan R. Liss. New York.

Santafé, M.M, Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D. & Tomàs, J. (2003) Modulation of ACh by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 119-127.

Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E. & Tsien, R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channels alpha 1 subunits. *Neurons*, **11**, 291-303.

Schulte, G. & Fredholm, B.B. (2002) Diverse inhibitors of intracellular signalling act as adenosine receptor antagonists. *Cell Signal*, **14**, 109-113.

Schwartz, A.D, Whitacre, C.A., Lin, Y. & Wilson, D.F. (2003) Adenosine inhibits N-type calcium channels at the rat neuromuscular junction. *Clin. Experim. Pharmacol. Physiol.*, **30**, 174-177

Sculptoreanu., A., Figourov, A. de Groat, W.C. (2001) Voltage-dependent potentiation of neuronal L-type calcium channels due to state-dependent phosphorylation. *Am. J. Physiol.*, **269**, C725-C732.

Sculptoreanu., A., Yoshimura, N., de Groat, W.C. & Somogyi, G.T. (2001) Protein kinase C is involved in M_1-muscarinic receptors mediated facilitation of L-type Ca^{2+} channels in neurons of the major pelvic ganglion of the adult male rat. *Neurochem. Res.*, **26**, 933-942.

Seamon, K.B., Padgett, W. & Daly, J.W. Ribeiro, J.A. (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 3363-3367.

Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 3363-3367.

Sebastião, A.M. & Ribeiro, J.A. (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 341-346.

Selbie, L. A. & Hill, S. J. (1998) G-protein-coupled-receptor crosstalk: The fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 87-93.

Searl, T.J. & Silinsky, E.M. (1988) The phosphatylinositol 4-kinase inhibitor phenylarsine oxide blocks evoked neurotransmitter by reducing calcium entry through N-type calcium channels. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 418-424.

Shapiro, M.S., Loose, M.D., Halmiton, S.E., Nathanson, N.M., Gomeza, J., Wess, J. & Hille B. (1999) Assignment of muscarinic receptor subtype mediating G-protein modulation of Ca^{2+} channels by using knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10899-10904.

Silinsky, E. M. (1975) On the association between transmitter secretion and release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. (London)*, **247**, 145-162.

Silinsky, E. M. (2004) Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, **558**, 389-401.

Silinsky, E.M. & Redman, R.S. (1996) Synchronous release of ATP and neurotransmitter within milliseconds of a motor nerve impulse in the frog. J. *Physiol. (London)*, **492**, 815-822.

Smith, A.B. & Cunnane, T.C. (1996) Ryanodine-sensitive calcium stores involved in neurotransmitter release from sympathetic nerve terminals of the guinea-pig. *J. Physiol. (London)*, **497**, 657-661.

Smith, D.O. (1991) Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *J. Physiol. (London)*, **432**, 343-354.

Smith, S.J. & Augustine, G.J. (1988) Calcium ions, active zones, and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci.*, **10**, 458-464.

Somogyi, G.T., Tanowitz, M. & de Groat, W.C. (1994) M_1 muscarinic receptors-mediated facilitation of ACh release in the rat urinary bladder. *J. Physiol. (London)*, **480**, 81-89.

Somogyi, G.T., Tanowitz, M., Zernova, G. & de Groat, W.C. (1996) M_1 muscarinic receptors-mediated facilitation of ACh and noradrenaline release in the rat urinary bladder is mediated by protein kinace C. *J. Physiol. (London)*, **496**, 245-254.

Somogyi, G.T., Vizi, E.S., Chaudhry, I.A., Nagashima, H., Duncalf, D. Foldes, F.F. & Goldiner, P. L. (1987) Modulation of stimulation evoked release of newly formed acetylcholine from mouse hemidiaphragm preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **336**, 15-16.

Somogyi, G.T., Zernova, G., Tanowitz, M., & de Groat, W. C. (1997) Role of L- and N- type Ca^{2+} channels in muscarinic receptor-mediated facilitation of Ach and noradrenaline release in the rat urinary bladder. *J. Physiol. (London)*, **499**, 645-654.

Stanley, E.F. (1997) The calcium channels and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci.*, **20**, 404-409.

Sugiura, Y. & Ko, C.P. (1997) Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junction. *J. Neurosci.*, **17**, 1101-1111.

Takagi, H., Kojima, M., Nagata, M. & Kuromi, H. (1970) On the site of action of hemicholinium-3 at the rat phrenic nerve-diaphragm preparation with special references to its multiple presynaptic actions. *Neuropharmacol.*, **9**, 359-367.

Takahashi, T. & Momiyama, A. (1993) Different type of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, **366**, 156-158.

Tareilus, E. & Breer, H. (1995) Presynaptic calcium channels: pharmacology and regulation. *Neurochem. Int.*, **26**, 539-558.

Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumour promoter, discharges intracellular calcium stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2466-2470.

Timóteo, M.A., Faria, M., Correia-de-Sá, P. (2003). Endogenous adenosine prevents post-tetanic facilitation mediated by $\alpha 3\beta 2$ nicotinic autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **464**, 115-125.

Tsien, R.W., Lipscombe, D. Madison, D.V., Bley, K.R. & Fox, A.P. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.*, **11**, 431-438.

Turner,K.M., Burgoyne, R.D. & Morgan, A. (1999) Protein phosphorilation and the regulation of synaptic membrane traffic. *Trends Neurosci.*, **22**, 459-464.

Urbano, F.J. & Uchitel, O.D. (1999) L-type calcium channels unmasked by cell-permeant Ca^{2+} buffer at mouse motor nerve terminals. *Pfluegers Arch*, **437**, 523-528.

Van Calker, D., Muller, M. & Hamprecht, B. (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in culture brain cells. *J. Neurochem.*, **33**, 999-1005.

Vincent, A. (2001) The neuromuscular junction and neuromuscular transmission. *In Disorders of Voluntary Muscle*, pp. 142-167. Cambridge Univ. Press Cambridge.

Vizi, E.S. & Somogyi, G.T. (1989) Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic) – and negative (muscarinic) – feedback modulation. *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 65-70.

Wessler, I. & Kilbinger, H. (1986a) Release of [^{3}H]-acetylcholine from a modified rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **334**, 357-364.

Wessler, I. (1989) Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 110-114.

Wessler, I., Diener, A. & Offermann, M. (1988) Facilitatory and inhibitory muscarinic receptors on the rat phrenic nerve: effects of pirenzepine and dicyclomine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **338**, 138-142.

Wessler, I., Dooley, D.J., Osswald, H., & Schlemmer, F. (1990) Differential blockade by nifedipine and omega-conotoxin GVIA of alpha 1- and beta- 1- adrenoceptors-controlled calcium channels on motor nerve terminals of the rat. *Neurosci. Lett.*, **108**, 173-178.

Wessler, I., Halank, M., Rasbach, J. & Kilbinger, H. (1986b) Presynaptic nicotinic receptors mediating a positive feedback on transmitter release from the rat phrenic nerve. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **334**, 365-372.

Wessler, I., Karl, M., Mai, M. & Diener, A. (1987) Muscarinic receptors on the rat phrenic nerve, evidence for positive and negative muscarinic feedback mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **335**, 605-612.

Wheeler, D.B., Tsien, R.W. & Randall, A. (1994) Identification of calcium channels that control neurosecreation. *Science*, **266**, 830-831.

Whittaker, V.P. & Dowdall, M.J. (1973) Constituents of cholinergic vesicles. In *La transmission Cholingique de L'excitatio,* pp. 101-117. Paris: INSERM.

Wojcikiewicz, R.J. & Luso, S.G. (1998) Phosphorilation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors by cAMP-dependent protein kinase. Type I, II and III receptors are differentially susceptible to phosphorylated in intact cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5670-5677.

Wood, S.J. & Slater, C.R. (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog. Neurobiol.*, **64**, 393-429.

Worley, P.F., Heller, W.A., Snyder, S.H. & Baraban, J.M. (1988) Lithium blocks a phosphoinositide-mediated cholinergic response in hippocampal slices. *Science*, **239**, 1428-1429.

Zhang, J-F, Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwartz, T.L. & Tsien, R.W. (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacol.*, **32**, 1075-1088.

Zimmerberg, J., Curran, M. & Cohen, F.S. (1991) A lipid/protein complex hypothesis for exocytotic fusion pore formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **681**, 307-317.

oferta

BIBLIOTECA
DO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
"ABEL SALAZAR"