

ABSTRACT

Characterization of cellular structures, such as membrane receptors, through the use of different methodologies, is a practice with an ever increasing importance in recent years. Adenosine receptors are examples whose pharmacological characterization has several limitations, particularly the A_{2B} - and A_3 -adenosine receptor subtypes, namely due to the lack of selective pharmacological tools. Therefore, the development of complementary methods that allow a more complete knowledge and characterization of receptors is still highly desirable.

The results presented in this thesis were obtained by conducting electrically-evoked noradrenaline release and immunohistochemical experiments with confocal microscopy visualization, which provided functional and morphological data for a more detailed characterization of presynaptic adenosine receptors at postganglionic sympathetic nerves of mesenteric blood vessels, preponderant vascular territories in blood pressure control. This combination of methodologies was applied in both physiological and pathological contexts, using the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) as model of genetic hypertension. These approaches allowed to test the added value of this combination of methodologies on the identification of the putative roles played by adenosine receptors on hypertensive disease.

The results presented in this thesis help to clarify the contribution of adenosine receptors (inhibitory A_1 and A_3 and facilitatory A_{2A} and A_{2B} subtypes) on the modulation of noradrenaline release from both mesenteric artery and vein perivascular sympathetic nerve terminals. In both normotensive WKY and hypertensive SHR animals, activation of A_1 -adenosine receptors by the selective agonist CPA induced a concentration-dependent inhibitory effect on noradrenaline release, significantly more pronounced in WKY comparatively to SHR mesenteric vessels. Overall, this inhibitory effect was more pronounced in mesenteric veins than in mesenteric arteries. The selective A_3 -adenosine receptor agonist IB-MECA induced an inhibitory effect only in WKY mesenteric veins. CGS 21680, a selective A_{2A} -adenosine receptor agonist, induced an identical facilitatory effect, only observed in mesenteric arteries from both strains. No effects were observed for A_{2B} -adenosine receptors, in any mesenteric vessel from both strains.

Immunohistochemistry revealed detailed features related to WKY and SHR mesenteric vessels. Sympathetic nerve terminals were clearly observed in mesenteric vessels adventitia, revealing their typical branched and contorted shape. Immunoreactivities for all four adenosine receptor subtypes were found in the vicinity of structures labeled with neuronal markers. Immunohistochemical studies also revealed the presence of adenosine receptor subtypes in unexpected locations, including a perinuclear location in normal and apoptotic nuclei, and differences on the pattern of distribution among different cell layers.

In summary, the combination of electrically-evoked noradrenaline release and immunohistochemical methodologies yielded gains in the information obtained, and has revealed itself an important approach, since i) provides additional information on receptors whose pharmacological characterization present limitations, due to the lack of selective drugs, ii) gives information concerning the presence of receptors on neuronal and non-neuronal structures, including their striking appearance near nuclei. This combination of

methodologies can improve receptor characterization and even open new possibilities as to their involvement in different physiological and pathophysiological processes.

Keywords

Receptor characterization, adenosine receptors, noradrenaline release, confocal microscopy, hypertension.

RESUMO

A caracterização de estruturas celulares, tais como recetores de membrana, através do uso de diferentes metodologias, é uma prática com uma importância cada vez maior nos últimos anos. Os recetores de adenosina são exemplos cuja caracterização farmacológica possui diversas limitações, em particular os recetores de adenosina dos subtipos A_{2B} e A_3 , nomeadamente devido à falta de ferramentas farmacológicas seletivas. Por isso, o desenvolvimento de métodos complementares que permitam um conhecimento mais completo e a caracterização de recetores é ainda altamente desejável.

Os resultados apresentados nesta tese foram obtidos através da realização de experiências de libertação de noradrenalina induzida eletricamente e experiências de imunohistoquímica com visualização por microscopia confocal, as quais forneceram dados funcionais e morfológicos para uma caracterização mais detalhada dos recetores de adenosina pré-sinápticos nos nervos simpáticos pós-ganglionares dos vasos sanguíneos mesentéricos, territórios vasculares preponderantes no controlo da pressão arterial. Esta combinação de metodologias foi aplicada nos contextos fisiológico e patológico, usando o rato espontaneamente hipertenso (SHR) como modelo de hipertensão genética. Estas abordagens permitiram testar o valor acrescentado desta combinação de metodologias na identificação dos prováveis papéis desempenhados pelos recetores de adenosina na doença hipertensiva.

Os resultados apresentados nesta tese ajudam a clarificar a contribuição dos recetores de adenosina (subtipos inibitórios A_1 e A_3 e facilitatórios A_{2A} e A_{2B}) na modulação da libertação de noradrenalina a partir dos terminais nervosos simpáticos perivasculares da artéria e veia mesentérica. Nos animais WKY normotensos e SHR hipertensos, a ativação dos recetores de adenosina A_1 pelo agonista seletivo CPA induziu um efeito inibitório dependente da concentração na libertação de noradrenalina, significativamente mais pronunciado nos vasos mesentéricos de WKY comparativamente aos dos SHR. Globalmente, este efeito inibitório foi mais pronunciado nas veias mesentéricas do que nas artérias mesentéricas. O agonista seletivo dos recetores de adenosina A_3 , IB-MECA, induziu um efeito inibitório apenas nas veias mesentéricas dos WKY. CGS 21680, um agonista seletivo dos recetores de adenosina A_{2A} , induziu um efeito facilitatório idêntico, apenas observado nas artérias mesentéricas das duas estirpes. Não se observaram efeitos para os recetores de adenosina A_{2B} em nenhum vaso mesentérico de ambas as estirpes.

A imunohistoquímica revelou características detalhadas sobre os vasos mesentéricos dos WKY e dos SHR. Os terminais nervosos simpáticos foram observados claramente na adventícia dos vasos mesentéricos, revelando a sua forma ramificada e contorcida típica. Encontraram-se imunorreatividades para os quatro subtipos de recetores de adenosina na vizinhança de estruturas marcadas com marcadores neuronais. Os estudos imunohistoquímicos também revelaram a presença dos subtipos de recetores de adenosina em localizações inesperadas, incluindo uma localização perinuclear em núcleos normais e apoptóticos, e diferenças no padrão de distribuição entre diferentes camadas celulares.

Em síntese, a combinação de metodologias de libertação de noradrenalina induzida eletricamente e de imunohistoquímica proporcionou ganhos na informação obtida e revelou-

se uma abordagem importante, pois i) fornece informação adicional sobre recetores cuja caracterização farmacológica apresenta limitações, devido à falta de fármacos seletivos, ii) dá informação relativa à presença de recetores em estruturas neuronais e não neuronais, incluindo o seu aparecimento surpreendente perto dos núcleos. Esta combinação de metodologias pode melhorar a caracterização de recetores e mesmo abrir novas possibilidades quanto ao seu envolvimento em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos.

Palavras-chave

Caracterização de recetores, recetores de adenosina, libertação de noradrenalina, microscopia confocal, hipertensão.