



Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

Cátia Andreia Rodrigues Vieira

**Distribuição dos receptores da
adenosina no plexo mioentérico –
músculo longitudinal do íleo de rato:
Implicações funcionais**

Dissertação de Mestrado em
Tecnologia Bioquímica em Saúde

Junho 2011

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

ESTSP | **POLITÉCNICO
DO PORTO**

U. PORTO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Cátia Andreia Rodrigues Vieira

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico –
músculo longitudinal de íleo de rato: Implicações funcionais**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá, sob a co-orientação da Dr.^a Margarida Duarte-Araújo, e sob a co-orientação institucional do Professor Doutor Ruben Fernandes.

Junho de 2011

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

*Aos meus pais e ao “meu mais que tudo”, pelo apoio incondicional em todos e
qualquer momento da minha vida...*

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Paulo Correia-de-Sá pela oportunidade de fazer parte deste grupo fantástico, pela sua orientação técnica e científica, pela disponibilidade permanente e pelos seus sábios ensinamentos.

Ao Prof. Doutor Ruben Fernandes, pela sua co-orientação institucional sempre presente e pela ajuda constante ao longo de todo o mestrado.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, FCT, pelo financiamento do projecto que permitiu a realização deste trabalho.

À Doutora Fátima Ferreirinha, por toda a disponibilidade, ajuda e orientação científica na execução das experiências de imunofluorescência.

Às “*Plexi-Girls*” pelos momentos inigualáveis de excelente boa-disposição e espírito de inter-ajuda que foram partilhados ao longo deste tempo.

À Prof.^a Doutora Graça Lobo e à Dr.^a Alexandrina Timóteo, um obrigado muito especial por todo o apoio, carinho e amizade inestimável.

Aos restantes elementos do laboratório que são muitos, se calhar uma página já não seria suficiente para descrever todos os nomes que todos os dias fazem parte desta equipa, pelo excelente companheirismo, carinho, amizade e pelos momentos de boa disposição e partilha. A todos eles, o meu muito obrigado pela forma como me acarinharam e apoiaram em todos os momentos, sempre com aquele inesgotável e contagiante largo sorriso no rosto.

À D. Belmira e à D. Helena pelo apoio técnico e pela disponibilidade diária.

À minha família, ao meus pais e aos meus irmãos, por todo o seu amor e carinho que sempre me dedicaram, por toda a sua ajuda, apoio, encorajamento e pelas palavras de incentivo em todos os momentos sem qualquer excepção.

Ao *meu mais que tudo*, por todo o seu apoio, carinho, amizade e por todo o seu amor e dedicação a cada dia que passa...

Palavras-chave

Libertação de acetilcolina; Microscopia confocal; Plexo mioentérico; Receptores nicotínicos pré-juncionais; Sistema Nervoso Entérico (SNE); Subtipos de receptores da adenosina.

Resumo

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor mais importante no controlo da motilidade gastrointestinal. A libertação de ACh dos neurónios entéricos é regulada por receptores neuronais específicos (De Man *et al.*, 2003). Estudos prévios demonstraram que a adenosina exerce um papel duplo na libertação de ACh dos neurónios entéricos através da activação dos receptores inibitórios A_1 e facilitatórios A_{2A} (Duarte-Araújo *et al.*, 2004). O potencial terapêutico dos compostos relacionados com a adenosina no controlo da motilidade e da inflamação intestinal, levou-nos a investigar o papel dos receptores com baixa afinidade para a adenosina, A_{2B} e A_3 , na libertação de acetilcolina induzida por estimulação eléctrica nos neurónios mioentéricos.

Estudos de imunolocalização mostraram que os receptores A_{2B} exibem um padrão de distribuição semelhante ao do marcador de células gliais (GFAP). No que respeita aos receptores A_1 e A_3 , estes encontram-se distribuídos principalmente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A_{2A} estão localizados predominantemente nos terminais nervosos colinérgicos. Neste trabalho mostrou-se que a modulação da libertação de ACh- $[^3H]$ (usando os antagonistas selectivos DPCPX, ZM241385 e MRS1191) é balanceada através da activação tónica dos receptores inibitórios (A_1) e facilitatórios (A_{2A} e A_3) pela adenosina endógena.

O antagonista selectivo dos receptores A_{2B} , PSB603, não foi capaz de modificar o efeito inibitório da NECA (análogo da adenosina com afinidade para receptores A_2). O efeito facilitatório do agonista dos receptores A_3 , 2-Cl-IB MECA (1-10 nM), foi atenuado pelo MRS1191 e pelo ZM241385, os quais bloqueiam respectivamente os receptores A_3 e A_{2A} . Contrariamente à 2-Cl-IB MECA, a activação dos receptores A_{2A} pelo CGS21680C, atenuou a facilitação da libertação de ACh induzida pela activação dos receptores nicotínicos numa situação em que a geração do potencial de acção neuronal foi bloqueada pela tetrodotoxina.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

A localização diferencial dos receptores excitatórios A_3 e A_{2A} ao longo dos neurónios mioentéricos explica porque razão a estimulação dos receptores A_3 (com 2-Cl-IB MECA) localizados nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos exerce um efeito sinérgico com os receptores facilitatórios A_{2A} dos terminais nervosos no sentido de aumentarem a libertação de ACh.

Os resultados apresentados consolidam e expandem a compreensão actual da distribuição e função dos receptores da adenosina no plexo mioentérico do íleo de rato, e devem ser tidos em consideração para a interpretação de dados relativos às implicações fisiopatológicas da adenosina nos transtornos da motilidade intestinal.

Abstract

Acetylcholine (ACh) is the most important neurotransmitter in the control of gastrointestinal motility. The release of ACh from enteric neurons is regulated by specific neuronal receptors (De Man *et al.*, 2003). Previous studies have shown that adenosine exerts a dual role in the release of ACh from enteric neurons by activation of inhibitory receptors A_1 and facilitatory A_{2A} (Duarte-Araújo *et al.*, 2004). The therapeutic potential of compounds related to adenosine in the control of intestinal motility and inflammation led us to investigate the role of receptors with low affinity for adenosine A_{2B} and A_3 on the release of acetylcholine induced by electrical stimulation in myenteric neurons. Immunolocalization studies showed that A_{2B} receptors exhibit a distribution pattern similar to the glial cell marker (GFAP). With respect to A_1 and A_3 receptors, they are distributed mainly in cell bodies of myenteric ganglion neurons, while the A_{2A} receptors are located predominantly in cholinergic nerve terminals. This work showed that the modulation of ACh release-[3H] (using selective antagonists DPCPX, ZM241385 and MRS1191) is balanced by activation of tonic inhibitory receptors (A_1) and facilitatory (A_{2A} and A_3) by endogenous adenosine.

The A_{2B} receptor selective antagonist, PSB603 was not able to modify the inhibitory effect of NECA (adenosine analogue with similar affinity for A_2). The facilitatory effect of the A_3 receptor agonist, 2-Cl-IB MECA (1-10 nM) was attenuated by MRS1191 and by ZM241385, which block respectively A_3 and A_{2A} receptors. In contrast to 2-Cl-IB MECA, activation of A_{2A} receptors with CGS21680C attenuated nicotinic facilitation of ACh release induced by focal depolarization of myenteric nerve terminals in the presence of tetrodotoxin. Tandem localization of excitatory A_3 and A_{2A} receptors along myenteric neurons explains why stimulation of A_3 receptors (with 2-Cl-IB MECA) on nerve cell bodies acts cooperatively with prejunctional facilitatory A_{2A} receptors to up-regulate acetylcholine release. The results presented herein consolidate and expand the current understanding of adenosine receptor distribution and function in the myenteric plexus of the rat ileum, and should be taken into consideration for data interpretation regarding pathophysiological implications of adenosine on rat intestinal motility disorders.

Índice

Agradecimentos	III
Palavras-chave	IV
Resumo	IV
Abstract.....	VI
Índice de Abreviaturas.....	X
CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica.....	1
1. Sistema Nervoso Entérico	2
i. Plexo mioentérico	3
2. Transmissão purinérgica.....	5
i. Receptores Purinérgicos.....	7
ii. Receptores da adenosina (P1)	7
iii. Metabolismo da adenosina: Vias de produção, libertação e inactivação.....	9
3. Transmissão colinérgica	10
4. Transmissão purinérgica e colinérgica no plexo mioentérico	13
5. Objectivos.....	14
CAPÍTULO II - Métodos	16
1. Preparação e montagem do plexo mioentérico de rato.....	17
2. Quantificação da libertação de ACh-[³ H].....	19
i. Período de Equilíbrio	19
ii. Período de Marcação.....	19
iii. Período de Lavagem	20
iv. Período de Libertação	20

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

v.	Quantificação da ACh-[³ H].....	21
vi.	Efeitos dos fármacos e interações farmacológicas.....	21
3.	Experiências de Imunofluorescência	22
3.1.	Processamento dos tecidos	22
i.	Fixação.....	22
ii.	Bloqueio e Permeabilização.....	23
iii.	Marcação com anticorpos	24
iv.	Incubação com anticorpos primários	24
v.	Incubação com anticorpos secundários.....	25
3.2.	Microscopia confocal	26
4.	Fármacos.....	27
5.	Tratamento estatístico.....	28
CAPÍTULO III - Resultados		29
1.	Os receptores A ₁ da adenosina estão localizados predominantemente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A _{2A} se encontram nos terminais nervosos colinérgicos.....	30
2.	Os receptores A _{2B} são desprovidos de qualquer efeito na libertação de ACh dos neurónios mioentéricos e possuem um padrão de distribuição semelhante ao marcador de células gliais GFAP	32
3.	A activação dos receptores A ₃ da adenosina localizados nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos facilita a libertação de ACh	35
4.	A modulação da libertação de ACh pela adenosina endógena é balanceada através da activação tónica dos receptores extrajuncionais inibitórios A ₁ e facilitatórios A ₃ e dos receptores juncionais facilitatórios A _{2A}	41
CAPÍTULO IV - Discussão.....		43
Conclusão		50

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

Referências Bibliográficas.....	51
Anexos.....	55
1. Publicações científicas.....	55
i. Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica.	55
ii. Resumos publicados em revistas	55
2. Comunicações em Reuniões científicas	55
iii. Comunicações orais	55
iv. Comunicações em painel	56

Índice de Abreviaturas

ACh	– Acetilcolina
AChE	– Acetilcolinesterase
ACh-[³H]	– Acetilcolina tritiada
ADA	– Desaminase da adenosina
ADO	– Adenosina
ADP	– Adenosina 5'-difosfato
AK	– Cinase da adenosina
AMP	– Adenosina 5'-monofosfato
ATP	– Adenosina 5'-trifosfato
CGRP	– Péptido relacionado com o gene da calcitonina
CGS21680C	– 2-p-(2-Carboxietil)fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
2-Cl-IB MECA	– 1-[2-Cloro-6-[(3-iodofenil)metil]amino]-9H-purina-9-il]-1-desoxi-N-metil-b-D-ribofuranuronamida
ChAT	– Acetiltransferase da colina
DMPP	– 1,1-Dimetil-4-fenilpiperazinium
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DPCPX	– 1,3-Dipropil-8-ciclopentilxantina
DPM	– Desintegrações por minuto
EFS	– Estimulação eléctrica de campo
GFAP	– Proteína acídica fibrilar da glia
GI	– Tracto gastrointestinal
GPCR	– Receptor acoplado à proteína G
ICC-IM	– Células intersticiais de Cajal intramusculares
5-HT	– Serotonina
IMP	– 5'-Monofosfato de inosina
INO	– Inosina
IP₃	– Trifosfato de inositol
IPAN's	– Neurónios aferentes intrínsecos primários
IUPHAR	– International Union of Pharmacology
LDH	– Desidrogenase do lactato
MC	– Músculo circular

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

Min	– Minutos
ML	– Músculo longitudinal
MM	– Mucosa muscular
MRS 1191	– 3-Etil-5-benzil-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-(±)-diidropiridina-3,5-dicarboxilato
Muc	– Mucosa
nAChR	– Receptores nicotínicos para a acetilcolina
NADH	– Nicotinamida mononucleótido
NANC	– Neurónios não-colinérgicos não-adrenérgicos
NECA	– 5'-(N-Etilcarboxamida) adenosina
NO	– Monóxido de azoto
PBS	– Solução salina de fosfato
PM	– Plexo mioentérico
PM-ML	– Plexo mioentérico-músculo longitudinal
PSB 603	– 8-[4-[4-(4-Clorofenzil) piperazida-1-sulfonil]fenil]-1-propilxantina
PSM	– Plexo submucoso
SAH	– S-adenosil homocisteína
SNA	– Sistema nervoso autónomo
SNAP-25	– Sintaxina
SNC	– Sistema nervoso central
SNE	– Sistema nervoso entérico
SNP	– Sistema nervoso periférico
SP	– Substância P
VAcHT	– Transportador vesicular da acetilcolina
VAMPs	– Proteínas específicas da membrana vesicular
VIM	– Vimentina
VIP	– Péptido intestinal vasoactivo
ZM 241385	– 4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazina-5-ilamino]etil)fenol
TTX	– Tetrodotoxina

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica

1. Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso exerce uma influência profunda em todos os processos digestivos, nomeadamente ao nível da motilidade, do transporte iónico associado à secreção e absorção, e do fluxo sanguíneo gastrointestinal. Parte do controlo das funções digestivas resulta do efeito regulador exercido pelo sistema nervoso central através dos nervos autonómicos. No entanto, o sistema digestivo pode funcionar independentemente das suas conexões com o sistema nervoso central. O tracto gastrointestinal é composto por um sistema nervoso próprio que contém tantos neurónios quantos tem a medula espinal, denominado sistema nervoso entérico (SNE).

O SNE pode ser então considerado um sistema nervoso independente formado por uma série de circuitos neuronais. Estes são os responsáveis pelo controlo e coordenação de funções motoras, do fluxo sanguíneo local, das secreções gastrointestinais, e ainda pela modulação de funções de carácter endócrino e imunitário (Costa *et al.*, 2000).

O SNE é representado essencialmente pela presença de células nervosas (neurónios) e pela presença de células de suporte (glia). As células da glia encontram-se em justaposição com os neurónios numa razão de 4:1 (Bassoti *et al.*, 2007; Rühl *et al.*, 2004).

Os componentes principais do SNE são duas redes ou plexos neuronais: (1) um plexo externo, situado entre as camadas musculares longitudinal e circular, denominado plexo mioentérico (ou de Auerbach); e (2) um plexo interno, denominado plexo submucoso (ou de Meissner), localizado na submucosa (figura I). O plexo mioentérico controla principalmente os movimentos gastrointestinais e a secreção de enzimas de órgãos adjacentes, enquanto o plexo submucoso controla sobretudo a secreção gastrointestinal e o fluxo sanguíneo local.

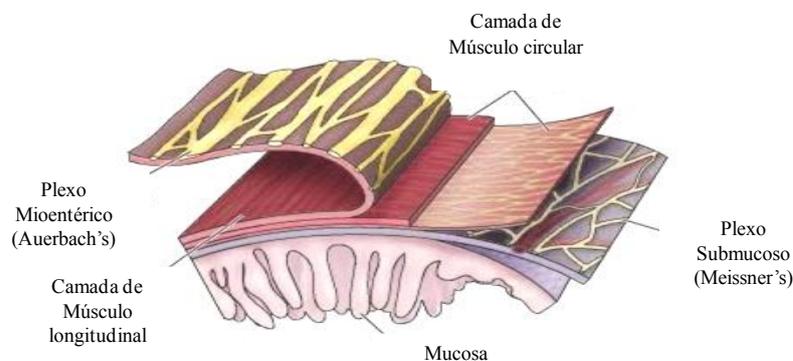


Figura I- Organização do sistema Nervoso Entérico (Adaptado de Purves *et al.*, 2001)

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

i. Plexo mioentérico

O plexo mioentérico consiste numa extensa rede neuronal que se estende por todo o comprimento do tracto gastrointestinal, que é coadjuvada na sua função de controlar a actividade muscular, glandular e vascular, por células gliais e pelas células intersticiais de Cajal. Em resposta a um estímulo, os seus principais efeitos consistem num aumento da contracção tónica da parede intestinal, num aumento de intensidade das contracções rítmicas, num ligeiro aumento na frequência do ritmo de contracção e numa maior velocidade de condução das ondas excitatórias ao longo da parede intestinal, resultando em movimentos mais rápidos das ondas peristálticas.

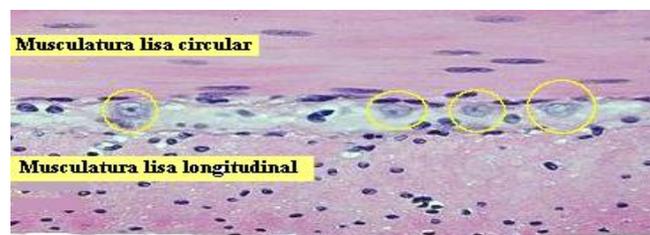


Figura II- Cadeias lineares de neurónios interconectados no plexo mioentérico.

Os neurónios entéricos sintetizam uma grande variedade de substâncias neuroactivas (e.g. ACh, noradrenalina, serotonina, péptidos, NO), muitas das quais são neurotransmissores existentes em neurónios não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC), nas quais se incluem: NO, purinas (ATP e adenosina), aminoácidos e polipéptidos (Costa *et al.*, 1996).

A maior parte dos neurónios entéricos envolvidos nas funções motoras do intestino estão localizados no plexo mioentérico (figura II). Estudos funcionais demonstraram essencialmente a existência de neurónios sensitivos, interneurónios (orientados longitudinalmente no sentido oral e anal), e neurónios motores inibitórios e excitatórios (Costa *et al.*, 1996). Através de inúmeros estudos imunohistoquímicos foi possível a identificação de diferentes populações de neurónios mioentéricos (Costa *et al.*, 1996).

Aproximadamente 30% dos neurónios entéricos estimulam a contracção do músculo longitudinal e apresentam imunoreactividade para a acetiltransferase da colina (ChAT, a enzima que sintetiza a ACh) e para a substância P (SP); estes dois neurotransmissores estão também localizados (1) num grande número de neurónios sensoriais (30%) provenientes

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

dos neurónios mecano-sensoriais existentes no músculo circular e na mucosa, (2) em alguns neurónios motores que inervam o músculo circular (12%), e (3) em interneurónios de trajectória ascendente (5%). Os neurónios motores inibitórios e os interneurónios com trajectória descendente utilizam como neurotransmissor o péptido intestinal vasoactivo (VIP), o monóxido de azoto (NO) e alguns péptidos opióides. Foram ainda detectados nos neurónios entéricos agentes vasomotores e secretagogos, como a somatostatina, o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e a serotonina (5-HT) (Costa *et al.*, 2000).

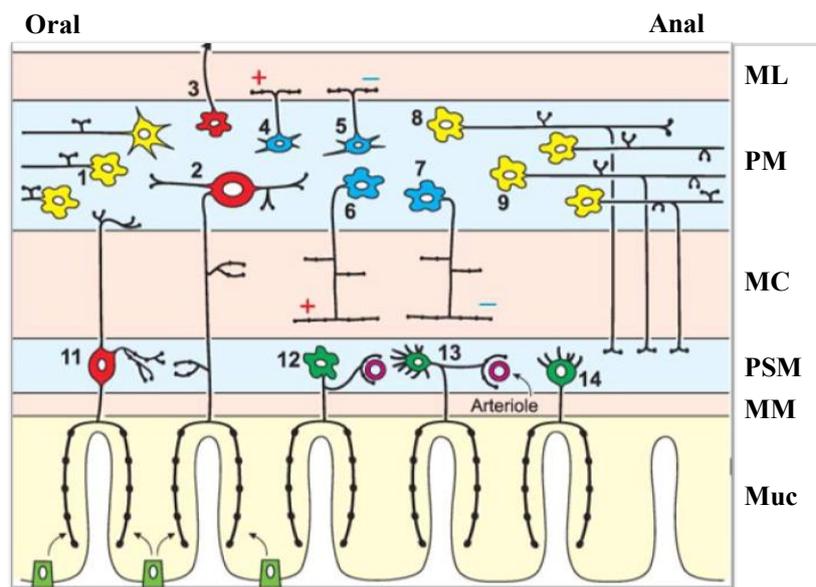


Figura III- Tipos de neurónios presentes no intestino delgado de porquinho-da-índia:

(1) Interneurónios ascendentes; (2) Neurónios aferentes primários intrínsecos mioentéricos; (3) Neurónios intestinofugais; (4) Neurónios excitatórios do músculo longitudinal; (5) Neurónios motores inibitórios do músculo longitudinal; (6) Neurónios motores excitatórios do músculo circular; (7) Neurónios motores inibitórios do músculo circular; (8) Interneurónios descendentes (reflexo local); (9) Interneurónios descendentes (reflexo secretomotor); (10) Interneurónios descendentes (complexo mioeléctrico migratório); (11) Neurónios aferentes primários intrínsecos submucosa; (12) Neurónios vasodilatadores/secretomotores não-colinérgicos; (13) neurónios vasodilatadores/secretomotores colinérgicos; (14) Neurónios (não vasodilatadores) secretomotores colinérgicos. ML – Músculo longitudinal; PM – Plexo mioentérico; MC - Músculo circular; PSM – Plexo submucoso; MM- Mucosa muscular; Muc. – Mucosa (Adaptado de Furness, 2006)

No presente trabalho foi usada uma preparação de plexo mioentérico-músculo longitudinal (PM-ML) do íleo de rato. Esta preparação é rica em neurónios colinérgicos, principalmente neurónios excitatórios que se encontram projectados para o músculo

Implicações funcionais

longitudinal (25%). Estes recebem impulsos das vias intrínsecas aferentes primárias (26%) e das vias ascendentes e descendentes (17%) (Costa *et al.*, 1996). Embora a acetilcolina (ACh) possa ser originada nas terminações nervosas colinérgicas pré-ganglionares, esta representa apenas uma pequena proporção do conteúdo total da ACh medida experimentalmente. Este facto deve-se à existência de um número excessivo de fibras ganglionares no PM-ML relativamente às fibras pré-ganglionares extrínsecas observadas na mesma preparação (Paton & Vizi, 1969).

2. Transmissão purinérgica

A primeira descrição da acção extracelular dos nucleótidos e nucleósidos de adenina foi publicada em 1929 por Drury e Szent-Györgyi. Estes autores estudaram os efeitos das purinas no sistema cardiovascular de mamíferos. Apesar da clareza das primeiras evidências, o reconhecimento do papel fisiológico das purinas como agentes reguladores da comunicação intercelular gerou alguma resistência durante longos anos. Em 1972, Burnstock e seus colaboradores conseguiram estabelecer definitivamente a importância desempenhada pelo ATP, propondo na ocasião a utilização dos termos “purinérgico” (relativo aos mecanismos extracelulares mediados pelas purinas) e “transmissão purinérgica” (referindo-se ao papel do ATP como neurotransmissor).

Hoje em dia, não restam dúvidas sobre a acumulação de moléculas de ATP juntamente com a acetilcolina (ACh) nas vesículas sinápticas (Dowdall *et al.*, 1974), tendo sido também demonstrado por Burnstock a sua libertação concomitante com a ACh por exocitose dependente de cálcio (Ca^{2+}) extracelular. A co-transmissão ACh/ATP é responsável por inúmeros efeitos resultantes da estimulação do sistema nervoso autónomo (SNA), podendo também ocorrer nos terminais nervosos motores da junção neuromuscular (Silinsky, 1975). Noutras sinapses foi também demonstrada a libertação de ATP de forma independente da libertação de ACh (Marsal *et al.*, 1987).

O ATP libertado pelas células é rapidamente hidrolisado pelas ecto-nucleotidases existentes na fenda sináptica, dando origem a produtos biologicamente activos, como o ADP, o AMP e a adenosina (ver a revisão de Zimmermann, 2000). Assim, o ATP libertado pode exercer efeitos directos, através da activação de receptores do tipo P2, ou indirectos, através da activação de receptores P2 (sensíveis aos metabolitos nucleotídicos) e P1 (activados pela adenosina).

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

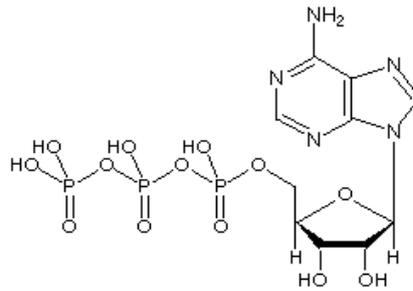


Figura IV- Estrutura química do ATP (Fonte: <http://www.worldofmolecules.com>)

A adenosina é um metabolito celular ubiqüitário, que está directamente envolvido na comunicação intercelular, nomeadamente no sistema nervoso (Ribeiro *et al.*, 2003). O principal papel da adenosina em diferentes tipos celulares é a sua capacidade de refrear o metabolismo celular em resposta a situações de stress (McIlwain, 1979; Kulinski *et al.*, 1987; Daval & Nicolas, 1998; Zhong *et al.*, 1998). No entanto, o seu papel fisiológico na manutenção da homeostasia interna tem merecido uma atenção particular (Cunha, 2001).

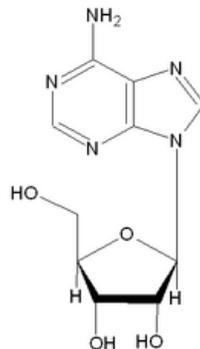


Figura V- Estrutura química da adenosina (Fonte: <http://www.worldofmolecules.com>)

Contrariamente ao ATP, a adenosina não funciona como um neurotransmissor clássico, não sendo armazenada nem libertada a partir de vesículas sinápticas. Para além da sua origem a partir do catabolismo extracelular dos nucleótidos de adenina, a adenosina pode ser libertada para o meio extracelular através da inversão do transporte equilibrativo de nucleósidos (Ribeiro *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 1995).

i. Receptores Purinérgicos

Os nucleótidos e nucleósidos de adenina modulam a função neuronal através da activação de receptores localizados nas membranas celulares. Burnstock propôs a base para distinguir dois tipos de receptores purinérgicos, designados por receptores P1 e P2. Os primeiros (P1) são activados preferencialmente pela adenosina, e os últimos (P2) são activados preferencialmente por nucleótidos purínicos (ATP, ADP, polifosfatos de adenosina) e pirimidínicos (UTP, UDP). Esta nomenclatura foi adoptada pela *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) (Abbracchio & Burnstock, 1998).

ii. Receptores da adenosina (P1)

A neuromodulação pela adenosina é exercida através da activação de receptores de elevada (A_1 e A_{2A}) e de baixa afinidade (A_{2B} e A_3) para o nucleósido. Os receptores de elevada afinidade têm uma importância fisiológica comprovada, enquanto os receptores de baixa afinidade parecem desempenhar um papel relevante apenas em situações patológicas, quando os níveis extracelulares de adenosina se tornam mais elevados (*e.g.* hipóxia, isquémia, inflamação, redução da carga energética celular por activação excessiva). Estes receptores são designados por receptores P1 e pertencem à família dos receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

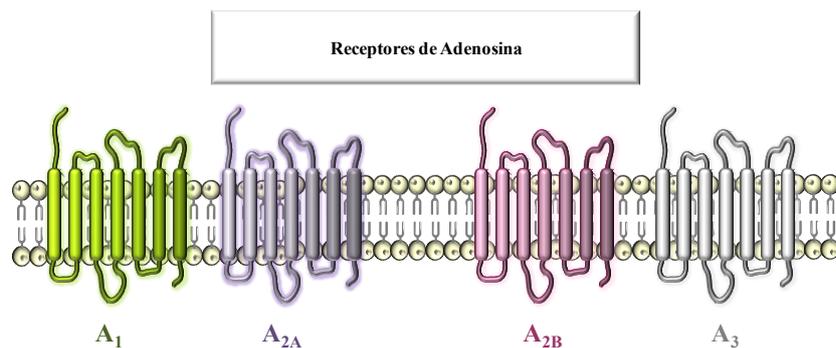


Figura VI- Representação esquemática dos diferentes subtipos de receptores da adenosina.

A terminologia A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , coerente com os princípios da nomenclatura de receptores adoptada pela NC-IUPHAR (Fredholm *et al.*, 2001), baseia-se no perfil farmacológico de cada subtipo de receptor proposto, bem como no tipo de segundo mensageiro envolvido na sua resposta biológica e na demonstração inequívoca da

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

existência do gene correspondente. Inicialmente foram identificados apenas dois tipos de receptores, A_1 e A_2 (Van Calker *et al.*, 1979). Estes autores demonstraram que a activação de receptores A_1 pela adenosina e pelos seus análogos estáveis promovia a inibição da adenilciclase em culturas de células de cérebro de rato, obtendo-se o efeito oposto quando eram activados receptores do subtipo A_2 . Londos e seus colaboradores, em 1980, realizaram experiências semelhantes usando adipócitos e hepatócitos. Também eles demonstraram que a ordem da potência dos análogos de adenosina era diferente nos adipócitos (onde a adenilciclase era inibida) e nos hepatócitos (onde a adenilciclase era estimulada). Estes autores denominaram os receptores inibitórios da adenosina, R_i , e os receptores facilitatórios, de R_a . Estes receptores são os equivalentes aos receptores A_1 e A_2 descritos pelo grupo de Van Calker, segundo a nomenclatura aceite pela IUPHAR.

Os receptores A_2 subdividem-se ainda em receptores A_{2A} e A_{2B} devido ao reconhecimento de que a activação da adenilciclase pela adenosina era mediada por dois locais de ligação diferentes, um de elevada afinidade (A_{2A}) e outro de baixa afinidade (A_{2B}). Esta hipótese, proposta inicialmente por Daly e colaboradores em 1983, foi posteriormente validada pela existência de diferentes perfis farmacológicos entre os dois subtipos de receptores (A_{2A} e A_{2B}) e após clonagem e sequenciação destes mesmos receptores (Fredholm *et al.*, 2001). O membro mais recente da família de receptores da adenosina, o receptor A_3 , tem um perfil farmacológico e uma distribuição tecidual distinta dos restantes receptores, sendo como o receptor A_{2B} , um receptor com baixa afinidade para a adenosina nos roedores. Este receptor comporta-se como um receptor de elevada afinidade no homem, onde pode ser activado também pela inosina resultante da desaminação extracelular da adenosina endógena.

Os receptores A_{2A} e A_{2B} interagem preferencialmente com os membros da família das proteínas G_s e os receptores A_1 e A_3 com os membros da família das proteínas $G_{i/o}$ (Fredholm *et al.*, 2001). O receptor A_1 é pleiotrópico, podendo também actuar sobre canais de potássio e de cálcio, sobre fosfolipases A_2 ou C e sobre a guanilciclase (Collis *et al.*, 1993). O receptor A_3 pode ainda activar a cascata da fosfolipase C/ IP_3 / diacilglicerol por intermédio de uma proteína $G_{q/11}$.

A activação dos receptores da adenosina depende dos níveis basais de adenosina endógena. No rato, os receptores A_1 e A_{2A} requerem cerca de 10^{-8} a 10^{-7} M de adenosina endógena para serem activados, enquanto os receptores A_3 apresentam um valor de K_i estimado na ordem dos 10^{-6} M para a adenosina. Desta feita, os receptores A_1 e A_{2A} são considerados receptores de elevada afinidade (activados com níveis basais de adenosina),

enquanto os receptores A_{2B} e A_3 são considerados receptores de baixa afinidade, no rato. Estes dois últimos receptores podem ser activados durante condições fisiopatológicas, quando os níveis de adenosina estão aumentados (Antonioli *et al.*, 2008; Bozarov *et al.*, 2009).

iii. Metabolismo da adenosina: Vias de produção, libertação e inactivação

Quanto ao metabolismo da adenosina podem distinguir-se três vias principais: produção, libertação e inactivação. A adenosina pode ser produzida no interior das células nervosas maioritariamente a partir do catabolismo do AMP, podendo também resultar da metabolização extracelular dos nucleótidos de adenina libertados. Quando as necessidades energéticas excedem o aporte, o ATP citoplasmático é convertido em ADP e AMP. A enzima 5'-nucleotidase intracelular desfosforila o AMP formando adenosina que pode, então, ser transportada para o exterior da célula por um processo de difusão facilitada através de um transportador bidireccional equilibrativo. Esta via de produção de adenosina está indirectamente relacionada com a actividade celular. Alternativamente, a adenosina pode ser formada extracelularmente a partir do ATP libertado das vesículas sinápticas conjuntamente com outros neurotransmissores (Dowdall *et al.*, 1974; Silinsky, 1975). Subsequentemente, o ATP libertado é metabolizado pelas ecto-nucleotidasas com formação sequencial de ADP, AMP e adenosina. Quer a adenosina quer os metabolitos nucleotídicos do ATP podem actuar em receptores de membrana para modular a actividade neuronal. O mecanismo pelo qual esta regulação se processa continua a ser alvo de estudo intenso. Diversas observações sugerem, ainda, que a libertação não-neuronal (*e.g.* células da glia, células inflamatórias, etc.) de purinas pode ter implicações directas na modulação purinérgica. É difícil determinar qual destes mecanismos é o responsável pela produção destes mediadores em diferentes tecidos e qual a contribuição de cada um individualmente para os seus efeitos fisiológicos.

A adenosina é inactivada após recaptação pelos neurónios e/ou células vizinhas, quer por fosforilação pela cinase da adenosina (AK), quer por desaminação pela desaminase da adenosina (ADA). A AK tem uma localização exclusivamente citoplasmática e possui uma afinidade para a adenosina 10-100 vezes maior do que a ADA. Dado que, em circunstâncias normais, os níveis intracelulares de adenosina são

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

A descoberta da acção farmacológica da ACh provém de estudos realizados com glândulas supra-renais. Sabia-se que os extractos supra-renais provocavam um aumento da pressão arterial em virtude do seu conteúdo em adrenalina. Em 1900, Reid Hunt constatou que, após a remoção da adrenalina desses extractos, eles produziam uma diminuição da pressão arterial. Este autor atribuiu esta diminuição à presença de um derivado mais potente da colina. Com Taveau, Hunt testou vários derivados da colina e descobriu que a ACh era cerca de 100000 vezes mais activa do que a colina na redução da pressão arterial de coelho. Embora os estudos de Hunt tenham sugerido a presença de ACh nos tecidos, a sua função fisiológica não ficou claramente esclarecida durante essa época. Desta feita, a ACh continuou a ser alvo da curiosidade farmacológica até à descoberta do seu papel como transmissor na década de 30, por Dale e seus colaboradores. Dale, em 1953, foi o responsável pelo estabelecimento do termo colinérgico, para se referir a qualquer neurónio que liberta a acetilcolina como neurotransmissor.

A ACh é uma molécula simples, sintetizada nos terminais axoniais dos neurónios colinérgicos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT). Esta enzima cataliza a reacção de condensação aldólica entre a acetil coenzima A e a colina, obtendo-se como produtos a acetilcolina e a coenzima A. Apesar de a ChAT ser uma enzima citosólica, existe em maior densidade junto à membrana externa das vesículas sinápticas. Esta localização preferencial favorece a captação rápida da ACh sintetizada de novo pelos seus locais de armazenamento, as vesículas sinápticas. A colina necessária à síntese da ACh é originada a partir (1) da colina livre do plasma, (2) da hidrólise dos fosfolípidos das membranas celulares e (3) da reciclagem da colina, resultante da acção da acetilcolinesterase (AChE) sobre a ACh libertada para a fenda sináptica. A colina, como outras bases quaternárias, difunde-se muito lentamente através das membranas celulares; no entanto, a maioria das células é capaz de a captar do meio extracelular por intermédio de um processo saturável mediado por um transportador com grande afinidade para a colina (K_m entre 20 e 100 μM). Nas terminações nervosas colinérgicas existe um transportador concentrativo adicional. Este transportador possui uma elevada afinidade para a colina (K_m entre 1 e 5 μM) e depende da temperatura e da concentração extracelular de Na^+ para o seu funcionamento; compostos estruturalmente similares à colina, como o hemicolínio-3, podem inibir este transportador. A capacidade de concentrar colina no interior do terminal nervoso é particularmente relevante durante a actividade sináptica, para acelerar a síntese de ACh. Como referido anteriormente, a síntese de ACh é limitada pela disponibilidade de colina,

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

fazendo com que o transporte de colina seja o factor regulador mais importante desta via metabólica.

Após a síntese, a ACh é transportada para o interior das vesículas sinápticas através de um mecanismo de anti-porte movido por um gradiente electroquímico de prótons. O vesamicol inibe este sistema de transporte, bloqueando a libertação de ACh. O armazenamento resulta do empacotamento de quantidades relativamente constantes de ACh (cada “quantum” contém geralmente 1000-50000 moléculas) em cada vesícula sináptica. A concentração de ACh no interior de cada vesícula pode atingir 100 mM.

A libertação de ACh ocorre quando um potencial de acção atinge as terminações nervosas e desencadeia o influxo de Ca^{2+} extracelular em quantidade suficiente. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} favorece a aproximação das vesículas sinápticas da zona activa da membrana pré-sináptica, interagindo com proteínas específicas da membrana vesicular (VAMPs) pertencentes ao sistema de ancoragem. A fusão entre a membrana das vesículas e a membrana do terminal sináptico processa-se através da interacção de proteínas vesiculares (*e.g.* sinaptotagmina, sinaptobrevina) com proteínas ligadas à membrana celular (*e.g.* SNAP-25, syntaxina). A fusão das membranas desencadeia a libertação exocitótica de centenas de quanta de ACh para a fenda sináptica.

Após a libertação da ACh, a sua concentração na fenda sináptica diminui rapidamente mesmo durante a actividade neuronal intensa, limitando a extensão dos efeitos sobre os seus receptores de membrana. São três os mecanismos implicados na remoção da ACh da fenda sináptica: inactivação enzimática pela acetilcolinesterase (AChE), captação ou recaptção neuronal e difusão para fora da sinapse.

Implicações funcionais

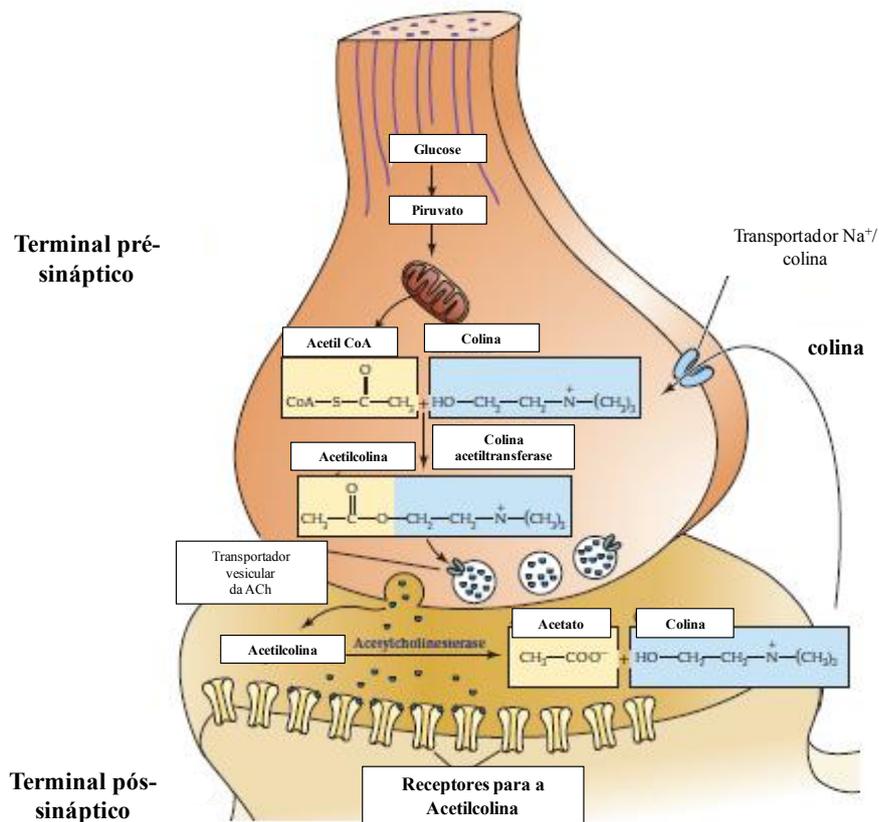


Figura VIII- Metabolismo da acetilcolina nos terminais nervosos colinérgicos. A síntese de ACh a partir da colina e do acetil CoA requer a presença da colina acetiltransferase. O acetil CoA surge a partir do piruvato originado, por sua vez, a partir da glucose. A colina é transportada para os terminais através de um transportador dependente de Na⁺, a acetilcolina é acumulada em vesículas sinápticas, libertada e rapidamente metabolizada pela acetilcolinesterase, e, a colina é recaptada para dentro do terminal para que seja possível ocorrer nova síntese de ACh (Adaptado de Purves *et. al.*, 2004).

4. Transmissão purinérgica e colinérgica no plexo mioentérico

A ACh é o regulador principal da motilidade intestinal e o neurotransmissor excitatório mais importante no plexo mioentérico. No plexo mioentérico, o ATP é co-libertado com outros neurotransmissores (*e.g.* ACh) (White, 1982) podendo exercer efeitos excitatórios ou inibitórios dependendo do tipo de receptores ativado, da sua localização e do tipo de células estimuladas.

A libertação de acetilcolina dos nervos entéricos colinérgicos é regulada pré-sinápticamente pela presença e envolvimento de receptores neuronais específicos. Entre estes, encontram-se os receptores purinérgicos P1 e P2, que quando ativados (pela

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

adenosina ou pelo ATP, respectivamente) podem promover ou inibir a libertação de ACh (De Man *et al.*, 2003).

5. Objectivos

Actualmente existe um grande interesse no desenvolvimento de fármacos como opções terapêuticas para o tratamento das doenças gastrointestinais (tais como a doença de Crohn ou a colite ulcerosa). Destes, foram propostos fármacos que actuam por estimulação directa dos receptores da adenosina, ou, através do aumento dos níveis locais de adenosina, em modelos de doença em animais roedores (Antonioli *et al.*, 2008). Hoje em dia sabe-se que todo o sistema que envolve a adenosina, incluindo os nucleósidos, os receptores, os transportadores e as enzimas metabólicas, desempenha funções importantes de imunoregulação e de neuromodulação no tracto gastrointestinal humano (revisto por Antonioli *et al.*, 2008). Em publicações anteriores, foram usados agonistas e antagonistas selectivos para os receptores da adenosina no plexo mioentérico - músculo longitudinal de íleo de rato. Foi demonstrado que a adenosina exerce um papel bifásico na libertação de ACh dos neurónios motores mioentéricos, mediado através da activação de receptores juncionais facilitatórios do subtipo A_{2A} e extrajuncionais inibitórios do subtipo A₁ (Duarte-Araújo *et al.*, 2004). Tendo em vista o potencial terapêutico dos compostos relacionados com a adenosina para controlar as alterações da motilidade intestinal (*e.g.* Akkari *et al.*, 2006), resolvemos investigar especificamente a distribuição geográfica dos receptores de adenosina de baixa afinidade (A_{2B} e A₃) no plexo mioentérico - músculo longitudinal do íleo de rato, que podem ser mais facilmente activados em condições patológicas.

Os vários subtipos de receptores de adenosina são amplamente expressos no tracto gastrointestinal humano, e estendem-se desde as camadas de mucosa/submucosa até ao compartimento neuromuscular do intestino grosso e delgado, como foi demonstrado previamente pela reacção em cadeia da polimerase *via* transcriptase reversa (RT-PCR) e através de estudos imunohistoquímicos (Dixon *et al.*, 1996; Christofi *et al.*, 2001). No que respeita aos animais roedores, a maioria dos resultados obtidos na distribuição dos receptores da adenosina no rato, foram baseados em estudos feitos para a identificação do mRNA, sem qualquer caracterização da sua localização celular (revisto por Antonioli *et al.*, 2008). Esta falta de informação levou-nos a investigar a distribuição regional dos quatro subtipos de receptores da adenosina em preparações de plexo mioentérico-músculo

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

longitudinal (PM-ML) de íleo de rato, marcados com anticorpos fluorescentes, por microscopia confocal.

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

CAPÍTULO II - Métodos

1. Preparação e montagem do plexo mioentérico de rato

Foram utilizadas preparações de plexo mioentérico-músculo longitudinal (PM-ML), retiradas de íleo de ratos da estirpe Wistar (Charles River – CRIFFA, Barcelona, Espanha; Biotério do ICBAS, Porto, Portugal) de ambos os sexos com peso médio aproximadamente de 200g. Os animais foram mantidos a uma temperatura constante (21 ° C), com ciclos de luminosidade (06.30-19.30h) e de obscuridade (19.30-06.30h) regulares, com acesso livre a comida e água. Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina. A manipulação animal seguiu as orientações definidas pela Comunidade Europeia do Conselho (86/609/CEE).

As experiências foram realizadas *in vitro*, segundo a técnica descrita por Paton & Vizi (1969). Após abertura do abdómen, o cego e o íleo foram identificados pelas suas características anatómicas.

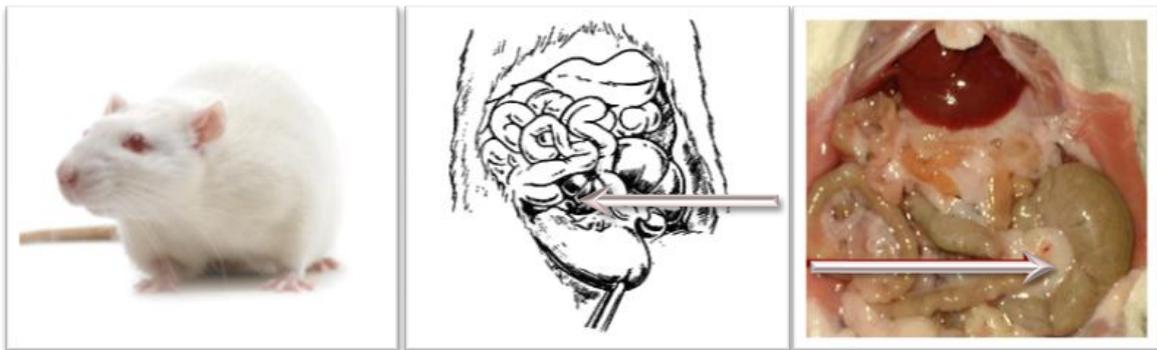


Figura IX- Localização da junção íleo-cecal

O intestino foi cuidadosamente separado das suas aderências mesentéricas e, conseqüentemente, do seu pedículo vasculo-nervoso, evitando-se a lesão da parede intestinal com o material cirúrgico. Foi retirado um fragmento com cerca de 12 centímetros da porção distal do íleo, tendo sido excluídos sistematicamente os 2 centímetros proximais ao cego. Os fragmentos isolados foram colocados numa caixa de Petri contendo uma solução de Tyrode com a seguinte composição (mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 1; NaH₂PO₄ 0,4; NaHCO₃ 11,9; glucose 11,2) com cloreto de colina (0,001), oxigenada com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%), à temperatura ambiente. Nesse ambiente, procedeu-se ao esvaziamento do conteúdo fecal por instilação da solução de Tyrode através do lúmen intestinal com o auxílio de uma seringa. Para facilitar a dissecação

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

do plexo mioentérico e do músculo longitudinal aderente, foi introduzida uma vareta de vidro no lúmen do fragmento do íleo isolado. As camadas superficiais do intestino correspondentes à serosa, músculo longitudinal e plexo mioentérico foram seccionadas longitudinalmente com o auxílio de um bisturi, tendo o cuidado de não atingir a camada muscular circular, de forma a ser possível isolá-las em toda a sua circunferência, usando duas gazes embebidas na solução de Tyrode.

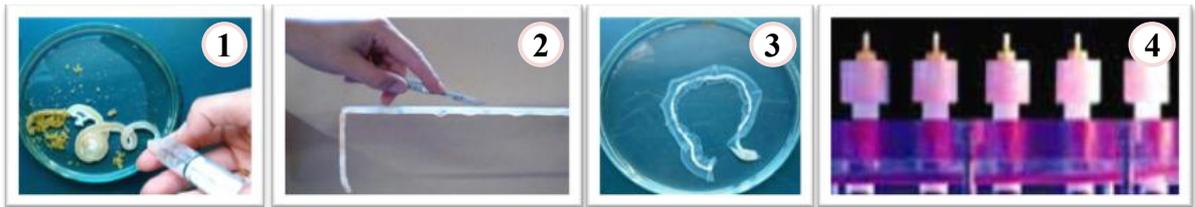
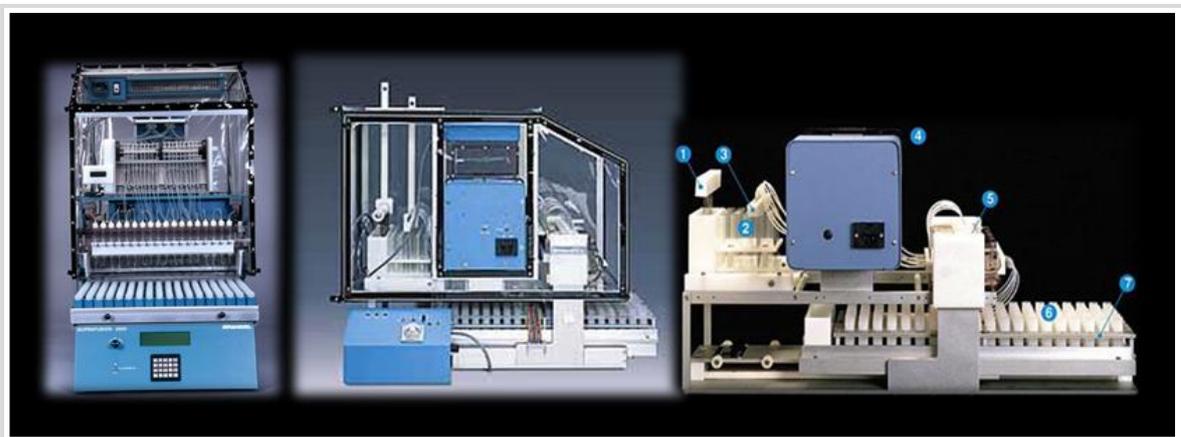


Figura X – (1) Caixa de Petri onde o fragmento de íleo isolado foi lavado com solução de Tyrode oxigenada, com o auxílio de uma seringa; (2) Vareta de vidro inserida no lúmen do fragmento do íleo para remoção do plexo mioentérico; (3) Preparação PM-ML; (4) Câmaras de perfusão verticais onde a preparação foi fixada entre os eléctrodos de prata para realização das experiências.

As preparações isoladas foram montadas entre dois eléctrodos de prata inseridos nas suas extremidades, e seguidamente colocadas num sistema Brandel com 12 câmaras de perfusão (Valley International Corp., Austin, USA) (figura XI) com 0,365 mL de capacidade, nas quais decorreram as experiências. A temperatura de 37°C foi mantida constante durante todo o procedimento experimental através da circulação de água pelo compartimento exterior à câmara de perfusão. Esta água foi bombeada a partir de um banho termostatzado que serviu também para o aquecimento das soluções utilizadas na perfusão. A solução de incubação/perfusão foi mantida em agitação constante através do arejamento com uma mistura de O₂ (95%) e CO₂ (5%).



Implicações funcionais

Figura XI- Sistema Brandel com 12 câmaras de perfusão (Valley International Corp., Austin, USA): (1) Sistema de oxigenação; (2) Tubos de ensaio onde é possível serem testados diferentes fármacos em simultâneo; (3) Sistema de agulhas por onde são injectadas as soluções; (4) Bomba peristáltica; (5) Câmaras ou banhos de órgãos com dois eléctrodos de prata, onde são colocados os tecidos; (6) Tubos onde são efectuadas as colheitas das amostras; (7) Colector de fracções.

2. Quantificação da libertação de ACh-[³H]

O procedimento empregue para a marcação das preparações e quantificação da libertação de ACh-[³H] foi descrito previamente (*e.g.* Duarte-Araújo *et al.*, 2004a) e seguido com pequenas modificações.

i. Período de Equilíbrio

Inicialmente as preparações foram perfundidas com a solução de Tyrode oxigenada durante 30 minutos. O objectivo deste procedimento foi o de equilibrar a preparação com novo meio fisiológico e remover resíduos tecidulares resultantes da dissecação.

ii. Período de Marcação

Após o período de equilíbrio, os terminais nervosos colinérgicos foram incubados durante 40 minutos, com uma solução de Tyrode contendo 1 μM de colina-[³H] (actividade específica de 5 $\mu\text{Ci nmol}^{-1}$). Durante o período de marcação, as preparações foram estimuladas electricamente com pulsos de 0,5 ms de duração e intensidade supramáxima, aplicados com uma frequência de 1 Hz. Os estímulos gerados por um estimulador (Harvard Instruments, Germany) foram aplicados através de dois eléctrodos de prata colocados nas extremidades das câmaras onde se encontram as preparações (estimulação eléctrica longitudinal de campo). Estas condições favorecem a exaustão das reservas de acetilcolina endógena e a sua substituição por acetilcolina tritiada (ACh-[³H]) sintetizada de novo.

iii. Período de Lavagem

Terminado o período de marcação, a estimulação eléctrica foi interrompida e as preparações foram de novo perfundidas (1 mL min^{-1}) com uma solução de Tyrode contendo hemicolínio-3 ($10 \text{ } \mu\text{M}$), um inibidor da recaptção de colina com elevada afinidade para o transportador de colina dependente de Na^+ . A utilização deste inibidor após o período de marcação impede a síntese de novas moléculas de ACh não marcadas radioactivamente, evitando assim o enviesamento na determinação da quantidade total de acetilcolina. Após lavagem das preparações durante 120 minutos para retirar o excesso de radioactividade não incorporada nas terminações nervosas, suspendeu-se a perfusão e deu-se início ao período de libertação.

iv. Período de Libertação

A recolha das amostras ($0,365 \text{ mL}$) da solução de incubação foi realizada de minuto a minuto por esvaziamento completo e re-preenchimento dos banhos de órgãos com a solução em uso. Este procedimento foi completamente automatizado e executado por um colector de fracções pré-programado ligado a uma bomba peristáltica.

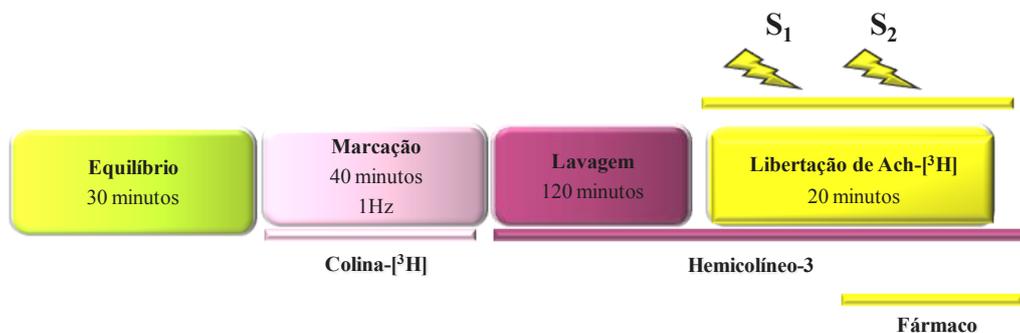


Figura XII- Representação esquemática do protocolo experimental seguido. As preparações de PM-ML foram equilibradas durante 30 minutos em solução de Tyrode perfundida a um fluxo constante. Depois passaram por um período de marcação com uma solução de Tyrode contendo $1 \text{ } \mu\text{M}$ de colina-[³H], durante 40 minutos. Nos 60 minutos seguintes, procedeu-se a um período de lavagem; as preparações foram de novo perfundidas (1 ml min^{-1}) com uma solução de Tyrode contendo o inibidor da recaptção de colina, hemicolínio-3 ($10 \text{ } \mu\text{M}$). Este período de lavagem foi antecedente ao período de libertação, em que estão compreendidos 2 períodos de estimulação eléctrica, o S₁, aos 4 minutos, e o S₂, aos 8 minutos. Ao longo destes 20 minutos de libertação foi feita a recolha das amostras ($0,365 \text{ mL}$) por esvaziamento completo e re-preenchimento dos banhos de órgãos com a solução em uso.

v. Quantificação da ACh-[³H]

A quantidade de radioactividade por amostra foi analisada por espectrometria de cintilação líquida (TriCarb2900TR, Perkin Elmer, Boston, USA) (percentagem de eficiência: 40±2%) após subtracção do valor basal, que nunca excedeu 5% da radioactividade total das amostras. A radioactividade foi expressa em DPM g⁻¹ do peso seco do tecido determinado no final da experiência. Para isso, a preparação foi pesada e imersa (durante a noite, à temperatura ambiente) em 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e determinado o conteúdo em trítio existente em 0,1 ml de sobrenadante. O efluxo de ACh-[³H] 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 10,648±324 x10³ dpm g⁻¹ e o valor do efluxo basal de trítio era de (0.12 ± 0.02) x 10⁶ dpm g⁻¹ no primeiro minuto do período de libertação (n=8). A libertação fraccionada de trítio na primeira amostra foi de 1.08±0.14% da radioactividade total presente no tecido no início do período de libertação.

A libertação de ACh-[³H] foi induzida por estimulação eléctrica de campo (EFS), utilizando 200 pulsos monofásicos rectangulares de 0,5 ms de duração, aplicados com uma frequência de 5 Hz. Foram realizados dois períodos de estimulação, ao 4.º (S₁) e ao 13.º (S₂) minuto após o fim do período de lavagem (tempo zero). A libertação de ACh-[³H] induzida por estimulação foi calculada subtraindo o efluxo basal de trítio ao efluxo total durante cada período de estimulação. Em alguns casos, a libertação de ACh foi induzida por dois períodos de estimulação (S₁ e S₂), sendo que o primeiro é resultante de um estímulo eléctrico e o segundo (S₂) resultante da aplicação de um agonista nicotínico (DMPP).

A libertação de ACh-[³H] a partir das terminações nervosas do plexo mioentérico resulta de um fenómeno de natureza excitotónica, já que foi prevenido na ausência de cálcio extracelular (Ca²⁺Ø + EGTA, 1 mM) e na presença de tetrodoxina (1 µM) (Duarte- Araújo *et al.*, 2004b).

vi. Efeitos dos fármacos e interacções farmacológicas

Os fármacos a testar foram aplicados 8 minutos antes de S₂ e mantiveram-se presentes até ao final da experiência. O efeito dos fármacos foi avaliado pelas razões S₂/S₁,

Implicações funcionais

i.e. as razões entre a libertação de ACh-[³H] calculada durante o segundo período de estimulação (na presença do fármaco) e a libertação de ACh-[³H] calculada durante o primeiro período de estimulação (na ausência do fármaco). Os valores expressos em percentagem correspondem à variação percentual das razões S_2/S_1 quando comparadas com a razão S_2/S_1 obtida nas experiências controlo. Zero por cento, indica uma igualdade entre as razões; valores positivos e negativos, representam aumentos e reduções da libertação induzida de ACh-[³H]. Quando foram avaliadas as mudanças no efeito dos fármacos testados induzidos por um modificador, o modificador foi aplicado 8 minutos antes de iniciar as colheitas das amostras e presente ao longo de S_1 e S_2 . Quando o mesmo fármaco esteve presente em S_1 e S_2 , as razões S_2/S_1 não foram significativamente ($P > 0.05$) diferentes daquelas obtidas em condições do controlo, isto é, sem adição de fármacos (0.80 ± 0.03 , $n=11$).

3. Experiências de Imunofluorescência

3.1. Processamento dos tecidos

Antes da marcação com anticorpos específicos, os tecidos foram processados por duas fases distintas: (1) fixação e (2) bloqueio e permeabilização do tecido aos anticorpos.

i. Fixação

A fixação dos tecidos é necessária para preservar adequadamente os componentes celulares, nomeadamente antigénios e enzimas e, ainda, facilitar as marcações convencionais e imunológicas (Ramos-Vara, 2005).

Sendo um processo progressivo, a fixação é dependente de factores como temperatura, pH e tempo. Embora não exista um tempo óptimo de fixação, um longo período de exposição ao fixador pode levar a uma diminuição da imunoreactividade de antigénios, assim como à produção de resultados falsos negativos, por formação de um excessivo número de ligações cruzadas (formação de ligações covalentes). Da mesma forma, se a reacção de fixação ocorrer num período de tempo reduzido, os resultados obtidos podem ficar aquém do esperado. Assim, a duração da fixação pode alterar as

reações imunohistoquímicas, podendo resultar na falha de detecção de determinado antígeno, numa reacção fraca, marcação inespecífica de fundo aumentada ou reactividade cruzada alterada (Ramos-Vara, 2005).

O formaldeído é um dos fixadores mais utilizados, que preserva principalmente péptidos e a estrutura geral dos organelos celulares. No entanto esta fixação pode levar a profundas alterações da conformação de macromoléculas (Ramos-Vara, 2005).

Neste trabalho, foi utilizado como fixador uma solução de PLP (paraformaldeído 2%, lisina 0.075 M, fosfato de sódio 0.037 M, periodato de sódio 0.01 M). Este fixador é capaz de preservar tanto a ultraestrutura do tecido como a sua antigenicidade (McLean & Nakane, 1974). As preparações de PM-ML foram dissecadas do íleo de rato, como descrito anteriormente, estiradas (com a ajuda de alfinetes) em placas de Petri revestidas com Sylgard, e fixadas em solução de PLP durante 16 horas e a 4°C. As preparações foram posteriormente lavadas com uma solução de tampão fosfato 0,1 M em 3 ciclos de 10 minutos; criopreservadas em solução crioprotectora (glicerol anidro 20%, tampão fosfato 0,1 M), durante 16 horas a 4°C, e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

ii. Bloqueio e Permeabilização

Depois de descongeladas as preparações de PM-ML foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com um tampão de bloqueio (soro bovino fetal 10%, albumina bovina sérica 1%, Triton X-100 0,3% em PBS) durante 2 horas e com agitação constante. Este passo é fundamental para bloquear ligações não específicas do antisoro primário, diminuindo a possibilidade de ocorrência de imagens não específicas “de fundo”.

Para além disso, o tampão de bloqueio usado possui na sua constituição o detergente Triton X-100, que a baixas concentrações aumenta a permeabilidade das proteínas dos tecidos e das membranas biológicas, facilitando a ligação dos anticorpos (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

iii. Marcação com anticorpos

Um dos conceitos fundamentais da imunohistoquímica é demonstrar a presença de antígenos (Ag) em secções de tecidos por meio de anticorpos (Ab) específicos. As ligações Ag–Ab podem ser demonstradas quer através de reacções histoquímicas colorimétricas que podem ser visualizadas com um microscópio convencional, quer através de fluorocromos podendo ser visualizadas com um microscópio de epifluorescência ou confocal.

No trabalho desenvolvido, a técnica de imunofluorescência aplicada envolveu uma marcação indirecta, isto é, dois conjuntos de anticorpos: um anticorpo primário, aplicado contra o antígeno de interesse; e um segundo anticorpo, acoplado a um fluoróforo, que reconhece o anticorpo primário.

iv. Incubação com anticorpos primários

Depois do bloqueio e permeabilização, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários escolhidos (ver Tabela I), diluídos em tampão de incubação (soro bovino fetal 5%, albumina sérica 1%, Triton X-100 0,3% em PBS), a 4°C e durante 16 horas.

Para protocolos de marcação dupla ou tripla, os anticorpos foram combinados antes de serem aplicados nas amostras, isto é, aquando a sua diluição no tampão de incubação.

Tabela I- Detalhes dos anticorpos primários usados

Antígeno	Código	Hospedeiro	Diluição	Fonte
Anticorpos primários				
▪ Receptor de adenosina A ₁	AB1587P	Coelho(rb)	1:50	Chemicon
▪ Receptor de adenosina A _{2A}	05-717	Ratinho (ms)	1:200	Chemicon
▪ Receptor de adenosina A _{2B}	AB1589P	Coelho (rb)	1:60	Chemicon
▪ Receptor de adenosina A ₃	(C-17) sc-7508	Cabra (gt)	1:25	Santa Cruz
▪ Transportador vesicular da ACh (VACHT)	AB1578	Cabra (gt)	1:1500	Chemicon
▪ Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)	Z0334	Coelho (rb)	1:750	Dako
▪ Produto da proteína gene 9.5 (PGP 9.5)	7863-1004	Ratinho (ms)	1:600	Serotec
▪ Vimentina (VIM)	M0725	Ratinho (ms)	1:75	Dako

Implicações funcionais

Após o período de incubação com os anticorpos primários (ver tabela 1), procedeu-se à lavagem das amostras de PM-ML com uma solução de PBS/ Triton-X 0,1%, em 3 ciclos de 10 minutos, preparando as amostras para a marcação com os anticorpos secundários.

v. Incubação com anticorpos secundários

Após a lavagem dos anticorpos primários as amostras foram então incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes.

Os anticorpos secundários escolhidos (ver tabela II) foram diluídos no tampão de incubação referido anteriormente e incubados nas amostras durante duas horas, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Todos os procedimentos a partir do momento da adição destes anticorpos foram efectuados no escuro para evitar a excitação dos fluorocromos. Os protocolos de marcação dupla ou tripla foram idênticos ao aplicado para os anticorpos primários.

Tabela II- Detalhes dos anticorpos secundários usados

Antigénio	Código	Hospedeiro	IgG anti -	Diluição	Fonte
Anticorpos secundários					
▪ Alexa Fluor 488 anti-rb	A-21206	Burro	Coelho(anti-rb)	1:1500	Molecular probes
▪ Alexa Fluor 568 anti-ms	A-10037	Burro	Ratinho (anti-ms)	1:1500	Molecular probes
▪ Alexa Fluor 633 anti-gt	A-21082	Burro	Cabra (anti-gt)	1:1500	Molecular probes

Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras de PM-ML sofreram novo período de lavagem com solução de PBS/Triton-X 0,1%, em três ciclos de 10 minutos.

As amostras foram finalmente montadas em lâminas de vidro e cobertas com meio de montagem VectaShield.

Para além destas experiências, fizeram-se também controlos de especificidade, por omissão dos anticorpos primários da solução de reacção.

3.2. Microscopia confocal

A microscopia confocal é uma técnica que permite otimizar e melhorar a resolução de imagens obtidas por um microscópio convencional, através da focalização do sinal em secções finas da amostra a ser analisada. O microscópio funciona recorrendo a uma iluminação da amostra ponto por ponto através de um laser de excitação com um comprimento de onda adequado, rejeitando toda a luz emitida que esteja fora de foco.

Assim, o objectivo é captar e ver apenas a imagem que se forma a partir do ponto de focagem escolhido (confocalidade).

Para além de promover uma melhor observação de pequenos detalhes, esta técnica de microscopia possibilita ainda a construção de modelos tri-dimensionais (3D) da amostra, por conjugação de imagens sucessivas de diferentes planos da mesma (Z-stack) (Semwogerere & Weeks, 2005).



Figura XIII- Microscópio confocal Olympus FV 1000 (Olympus, Japão) usado nas experiências

Após montagem das amostras de PM-ML em lâminas de vidro, estas foram examinadas com um microscópio confocal de varrimento por laser Olympus FluoView FV1000, usando os seguintes lasers: Ar-Ion, que emite na gama dos 488 nm e que, portanto, excita o fluoróforo Alexa Fluor 488; um laser de He-Ne, que emite no comprimento de onda de 543 nm e que vai excitar o fluoróforo Alexa Fluor 568; e ainda um laser de He-Ne, cujas emissões são na gama do invisível, a cerca de 633 nm, excitando o fluoróforo Alexa Fluor 633. As amostras do tecido foram sujeitas a um varrimento sequencial, sendo que em alguns casos foram adquiridas imagens em vários planos (Z-stack).

As imagens obtidas foram posteriormente tratadas usando o software associado ao microscópio confocal (Olympus FluoView, FV1000, Tóquio, Japão), o FluoViewer FV10-ASW 1.2.

4. Fármacos

2-p-(2-Carboxietil)fenetilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina (CGS 21680 C), 5'-(N-Etilcarboxamida) adenosina (NECA), 8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 3-Etil-5-benzil-2-metil-4-feniletinil-6-fenil-1,4-(±)-diidropiridina-3,5-dicarboxilato (MRS 1191), iodeto de 1,1-Dimetil-4-fenilpiperazinium (DMPP), cloreto de colina, paraformaldeído (prills), lisina, periodato de sódio, glicerol anidro, soro de bovino fetal foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). 1-[2-Cloro-6-[[3-iodofenil]metil]amino]-9H-purina-9-il]-1-deoxi-N-metil-b-D-ribofuranuronamida (2-Cl-IBMECA), 4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazina-5-ilamino]etil)fenol (ZM 241385), 8-[4-[4-(4-Clorofenil) piperazida-1-sulfonil]fenil]-1-propilxantina (PSB 603), citrato de Octahidro-12-(hidroximetil)-2-imino-5,9: 7,10a-dimetano-10aH-1,3]dioxocino[6,5d]pirimidina-4,7,10,11,12-pentol (citrato de TTX) foram adquiridos à Tocris Cookson Inc. (Bristol, UK). [metil-³H] cloreto de colina (solução de etanol, 80.6 Ci mM) foi adquirido à Perkin Elmer (Boston, USA) e o soro de albumina, Triton X-100 à Merck (Darmstadt, Alemanha).

2-Cl-IBMECA, ZM 241385 e MRS 1191 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). O MRS 1191 foi mantido no escuro, prevenindo assim a sua fotodecomposição. O DPCPX foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) + 1% NaOH 1M (v/v⁻¹), e armazenado com uma concentração de 5 mM. Os restantes fármacos foram preparados em água destilada. As soluções foram congeladas em alíquotas, a -20°C e nunca foram sujeitas a mais de um ciclo de congelação/ descongelação antes de serem usadas. Diariamente foram preparadas diluições destas soluções em Tyrode 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 das soluções utilizadas não variou significativamente pela adição dos fármacos na concentração máxima utilizada aplicada às preparações.

5. Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como médias \pm erros padrão da média (s.e.m.), correspondendo a um número n indicativo do número de animais usados para cada série de experiências. A significância estatística dos resultados experimentais foi avaliada pela análise da variância (ANOVA) seguida do teste t modificado por Dunnett; $P < 0,05$ representa diferenças significativas. Utilizou-se ainda o método dos mínimos quadrados para a determinação das rectas de regressão linear.

CAPÍTULO III - Resultados

1. Os receptores A_1 da adenosina estão localizados predominantemente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A_{2A} se encontram nos terminais nervosos colinérgicos

Em estudos anteriores, demonstrámos que a adenosina tem um papel duplo na libertação de ACh dos neurónios motores mioentéricos através da activação de receptores facilitatórios A_{2A} e inibitórios A_1 (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a). Através de estudos funcionais, colocou-se a hipótese dos receptores inibitórios A_1 estarem localizados numa região distante da junção mioneural e dos receptores facilitatórios A_{2A} estarem localizados nos terminais nervosos colinérgicos. Neste trabalho, foram realizadas experiências de imunolocalização usando anticorpos primários contra estes receptores (figura XIV).

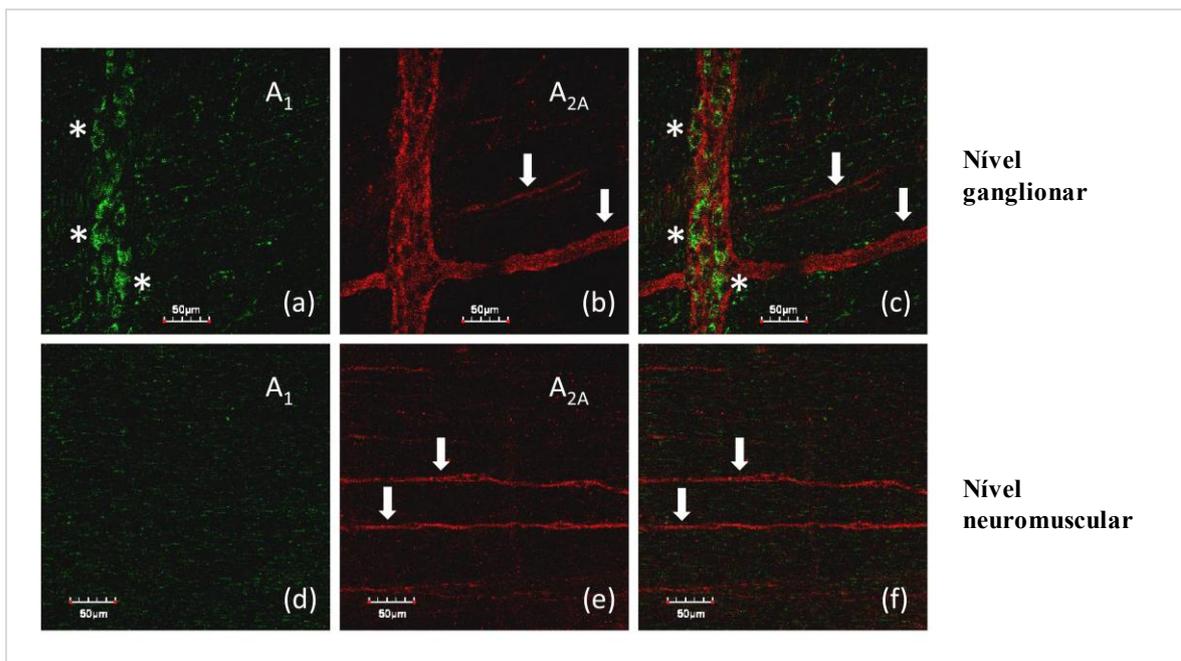


Figura XIV- Marcação dupla dos receptores A_1 e A_{2A} da adenosina. Imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de rato. A imunoreactividade para os receptores A_1 (verde) está presente nos corpos celulares (a) dos neurónios ganglionares mioentéricos (asteriscos), mas está ausente nas varicosidades nervosas (d) a nível neuromuscular. A imunoreactividade para os receptores A_{2A} da adenosina (vermelho) está presente nos feixes nervosos (b) e nos terminais dos axónios (e) dos neurónios mioentéricos (setas). As imagens (c) e (f) correspondem à projecção das imagens de marcação dupla para os receptores A_1 (verde) e A_{2A} (vermelho) captadas a nível ganglionar e a nível neuromuscular, respectivamente; a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. Escala = 50 μ M.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

A imunoreactividade para os receptores A_1 encontra-se localizada predominantemente nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos do íleo de rato (figura XIVa e XIVd). Este resultado contrasta com a localização da imunoreactividade para os receptores A_{2A} , que é mais evidente nas fibras nervosas mioentéricas (figura XIVb e XIVE). Ao efectuar um protocolo de marcação dupla, torna-se evidente a falta de co-localização entre os dois marcadores fluorescentes (figura XIVc e XIVf). Estas experiências confirmam as suspeitas de localização avançadas a partir dos ensaios funcionais, indicando claramente que os receptores A_1 e A_{2A} ocupam locais distintos ao longo dos neurónios mioentéricos do íleo de rato. A imunoreactividade contra o receptor A_{2A} co-localiza com o transportador vesicular da ACh (VACHT) (figura XVa-f), mas está ausente das células que exibem o marcador de células gliais, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (figura XVg-i). A localização dos receptores A_{2A} nos terminais nervosos colinérgicos confirma o papel importante destes receptores no controlo da libertação de ACh (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a; 2004b).

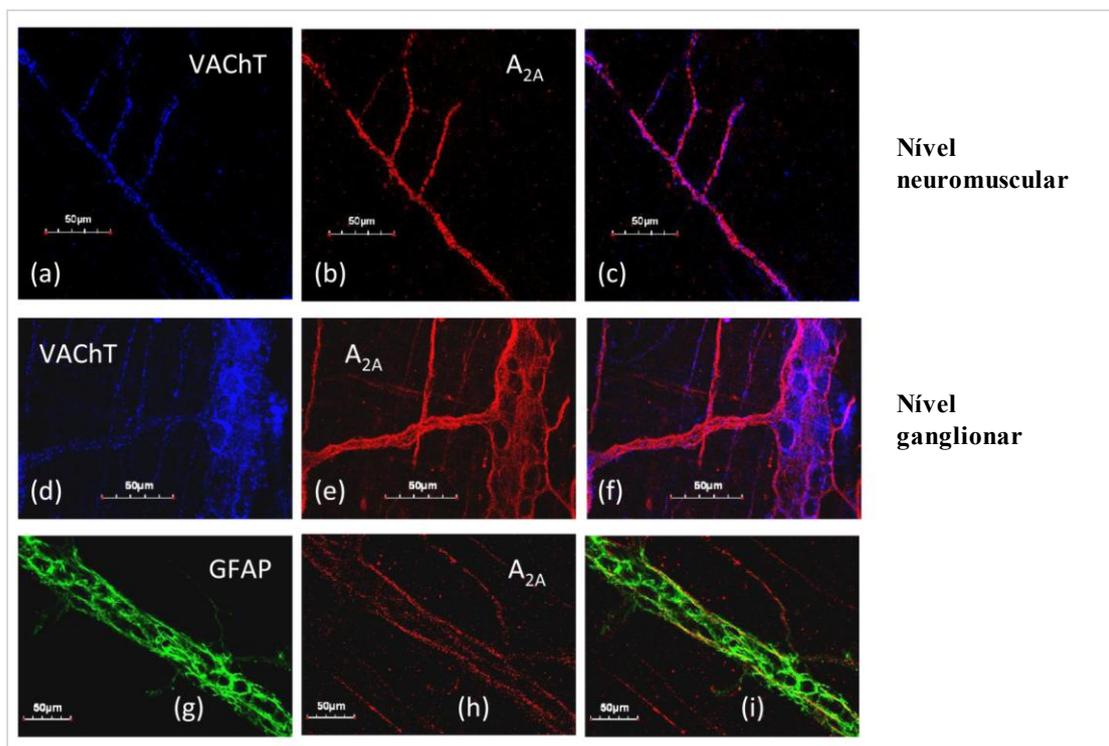


Figura XV- Localização da imunoreactividade para os receptores A_{2A} da adenosina em imagens de microscopia confocal obtidas de preparações de PM-ML de íleo de rato. A imunoreactividade para os receptores A_{2A} da adenosina (vermelho) co-localiza com o transportador vesicular para a ACh (VACHT, azul) expresso nas varicosidades nervosas mioentéricas (a-c) e nos feixes axonais (d-f), mas encontra-se ausente nas células que exibem o marcador de células gliais, GFAP (g-i). As imagens (c) e (f) correspondem à

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

projecção das imagens de marcação dupla para os receptores da adenosina A_{2A} (vermelho) e para o VAcHT (azul), captadas a nível neuromuscular e a nível ganglionar, respectivamente; a marcação magenta denota a existência de co-localização. A imagem (i) corresponde à projecção de imagens de marcação dupla para o GFAP (verde) e para os receptores da adenosina A_{2A} (vermelho), captadas a nível ganglionar mioentérico; a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. Escala = 50 μ M.

2. Os receptores A_{2B} são desprovidos de qualquer efeito na libertação de ACh dos neurónios mioentéricos e possuem um padrão de distribuição semelhante ao marcador de células gliais GFAP

Os estudos de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal realizados em secções transversais do íleo de rato mostram que a reactividade contra os receptores A_{2B} está localizada predominantemente no plexo mioentérico e submucoso. O padrão de distribuição da imunoreactividade A_{2B} é semelhante à marcação obtida para as células da glia marcadas com GFAP (proteína glial fibrilar ácida) (figura XVI).

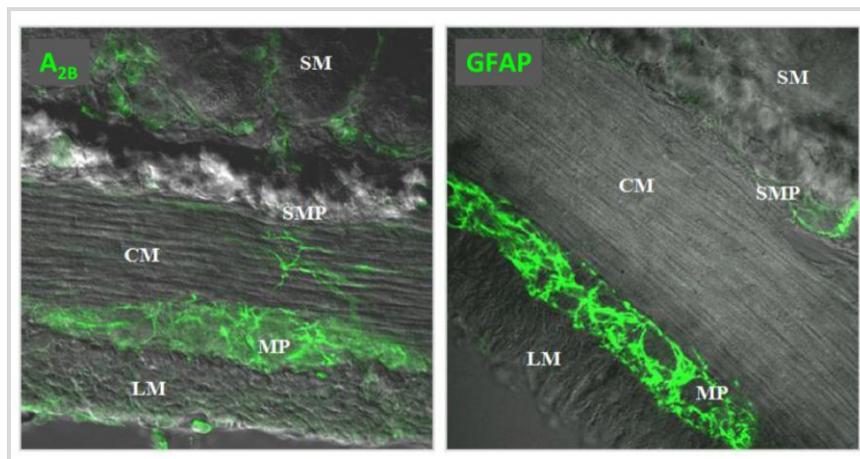


Figura XVI- Imunoreactividade contra os receptores A_{2B} e para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em imagens de microscopia confocal obtidas a partir de secções transversais de íleo de rato. Os receptores de adenosina A_{2B} apresentam um padrão de distribuição semelhante ao marcador de células da glia (GFAP) (LM: Músculo longitudinal, PM: Plexo mioentérico; MC: Músculo circular; SMP: Plexo submucoso; SM: submucosa).

Em preparações de PM-ML, a maior parte das células que exibem imunoreactividade contra os receptores A_{2B} são também positivas para o anticorpo contra o GFAP (Figura XVIIa-c). O mesmo não se pode afirmar para o marcador neuronal, PGP 9.5

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

(figura XVII d-f), nem para a vimentina, este último identifica células de origem mesenquimatosa (*i.e.* miofibroblastos, células intersticiais de Cajal) (figura XVII g-i).

O padrão de distribuição de marcação fluorescente contra os receptores A_{2B} e contra o GFAP em preparações de PM-ML de íleo de rato é muito semelhante ao observado no jejuno humano, onde os receptores A_{2B} da adenosina se encontram localizados predominantemente em células mioentéricas imunopositivas para o marcador glial, S-100 (Christofi *et al.*, 2001; revisto em Christofi, 2008). Estes mesmos autores, mostraram que existe um subconjunto de neurónios VIPérgicos que também expressam imunoreactividade para os receptores A_{2B} da adenosina.

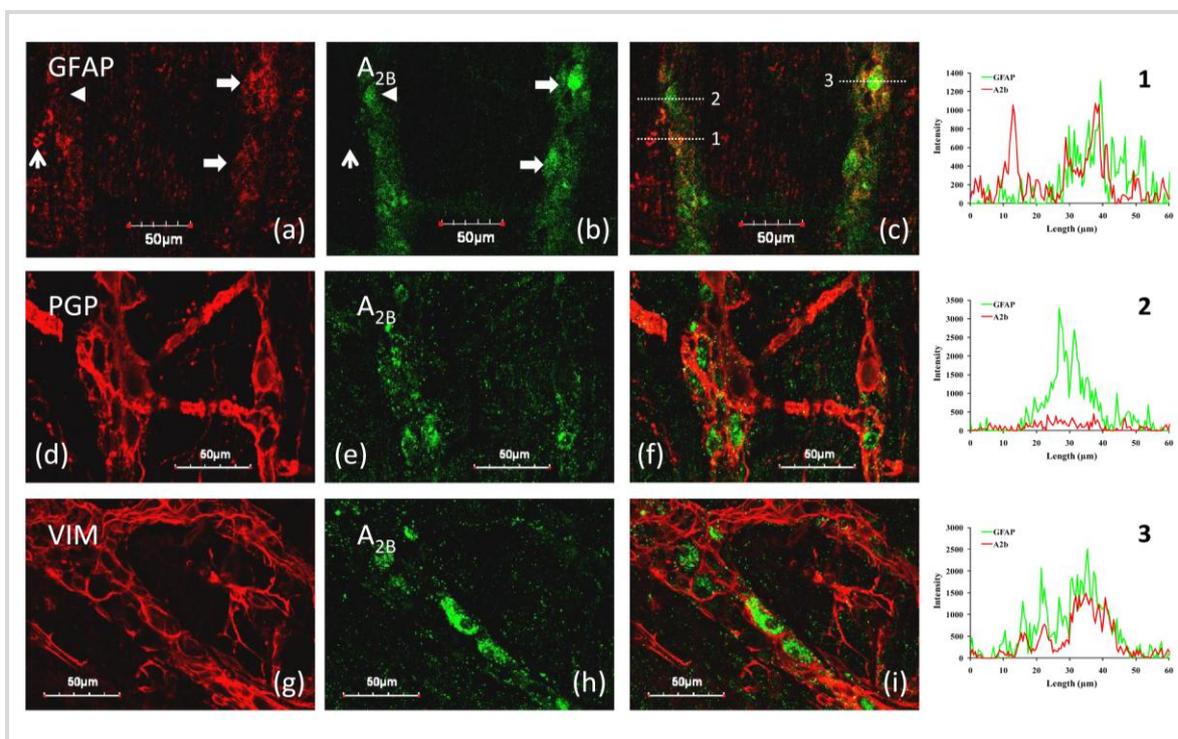


Figura XVII- Localização da imunoreactividade para os receptores A_{2B} da adenosina em imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML de íleo de rato. A imunoreactividade para os receptores A_{2B} (verde) está presente em alguns, mas não em todos, os corpos celulares positivos para o marcador de células gliais, o GFAP (vermelho, a-c); Os gráficos de intensidade de fluorescência de três regiões de interesse (1, 2 e 3) delineadas a partir da imagem (c) evidenciam claramente a co-localização dos receptores A_{2B} (verde) em algumas células positivas para o GFAP (vermelho). As células positivas para o marcador neuronal (PGP 9.5) (d-f) e para a vimentina (VIM) (g-i), que identifica células de origem mesenquimatosa (*i.e.* células intersticiais de Cajal), mostram claramente a falta de co-localização entre estes marcadores e a imunoreactividade para os receptores A_{2B} . As imagens (c), (f) e (i) correspondem à projecção das imagens de marcação dupla para os receptores A_{2B} (verde) com o GFAP, PGP 9.5 ou para a VIM (vermelho), respectivamente; a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. Escala = 50 μ M.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

Para a caracterização funcional dos receptores A_{2B} no PM-ML, testou-se um agonista não selectivo dos receptores de adenosina, a NECA (0,03-0,3 μM), habitualmente usado na caracterização dos receptores A_{2B} da adenosina. A NECA diminuiu a libertação de ACh- ^3H a partir dos neurónios motores colinérgicos estimulados electricamente de forma dependente da concentração (figura XVIII).

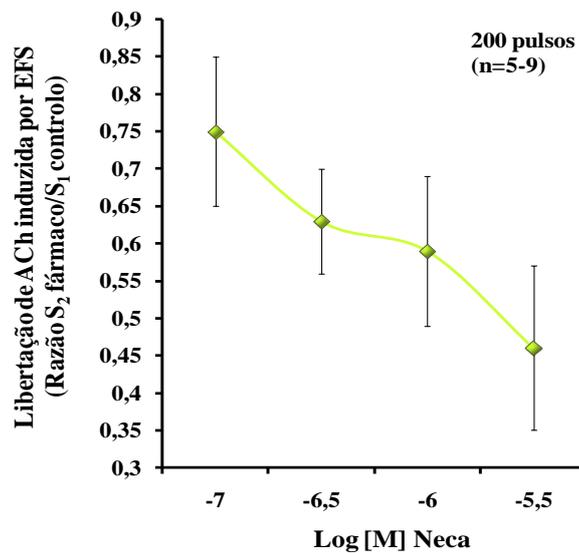


Figura XVIII- Libertação de ACh- ^3H a partir das terminações nervosas do plexo mioentérico do íleo de rato estimuladas electricamente: Efeito do agonista dos receptores de adenosina, NECA (0,03-0,3 μM). As ordenadas representam os níveis de trítio libertados expressos em razões S_2/S_1 , isto é, a razão entre a libertação de ACh- ^3H induzida pelo segundo período de estimulação (na presença da NECA) e a libertação de ACh- ^3H durante o primeiro período de estimulação (na ausência do fármaco a testar). Os valores são médias \pm erro-padrão de 5 a 9 experiências individuais. Valores de $*P < 0.05$ (ANOVA seguida do teste de t modificado por Dunnett) representam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo ($0,80 \pm 0,03$, $n=11$).

Ainda no sentido de caracterizar estes receptores, testou-se um antagonista selectivo para os mesmos receptores, o PSB 603 (10 nM). Este antagonista não foi capaz de prevenir a inibição da libertação de ACh- ^3H induzida pela NECA (0,3 μM) (figura XIX).

Implicações funcionais

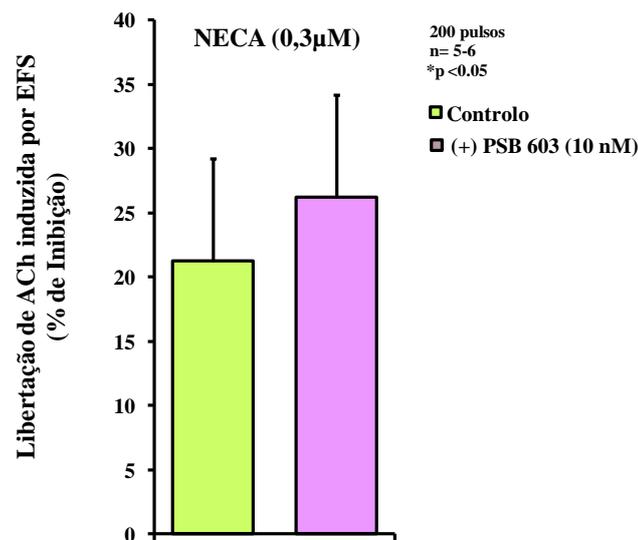


Figura XIX- Caracterização farmacológica da actividade dos receptores A_{2B} em PM-ML do íleo de rato. A NECA (0,3 μ M) foi aplicada 8 minutos antes do S_2 . O antagonista selectivo dos receptores A_{2B} , PSB 603 (10 nM) foi adicionado ao meio de incubação no início do período de libertação (tempo 0) e esteve presente ao longo da experiência, durante S_1 e S_2 . As ordenadas representam os níveis de trítio libertados expressos em razões S_2/S_1 , isto é, a razão entre a libertação de ACh- 3H induzida pelo segundo período de estimulação (na presença do fármaco a testar) e a libertação de ACh- 3H durante o primeiro período de estimulação (na ausência do fármaco a testar). A média das razões S_2/S_1 na presença de PSB 603 (10 nM) não foi significativamente diferente do valor controlo ($0,80 \pm 0,03$, $n=11$). Os valores são médias \pm erro-padrão da média de 5 a 6 experiências individuais.

3. A activação dos receptores A_3 da adenosina localizados nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos facilita a libertação de ACh

No sentido de caracterizar os receptores A_3 da adenosina no PM-ML do íleo de rato, testou-se um agonista selectivo para estes receptores, a 2-Cl-IBMECA (1-10 nM). Este agonista aumentou a libertação de ACh- 3H induzida por estimulação eléctrica de campo de um modo dependente da concentração (figura XX).

O bloqueio selectivo dos receptores A_3 com MRS 1191 (10 nM) preveniu o efeito facilitatório da 2-Cl-IBMECA (3 nM) na libertação de ACh- 3H . Para avaliar se o efeito facilitatório produzido pela 2-Cl-IBMECA na libertação de ACh- 3H estava de alguma maneira relacionado com o efeito excitatório verificado para os receptores A_{2A} da adenosina, realizaram-se experiências na presença do antagonista selectivo dos receptores A_{2A} da adenosina, ZM 241385 (50 nM). Este composto preveniu o efeito facilitatório da 2-

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

Cl-IBMECA (3 nM) sobre a libertação de ACh- ^3H induzida por estimulação eléctrica à semelhança do que foi observado com o antagonista A_3 , MRS 1191 (10 nM) (figura XX).

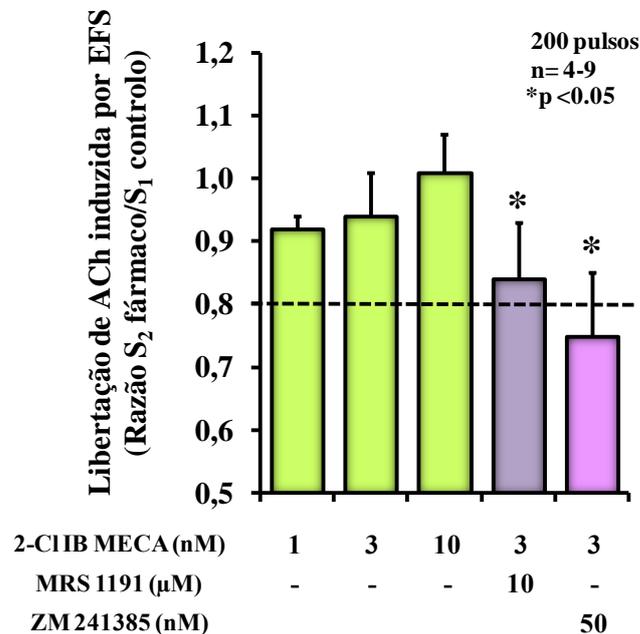


Figura XX- Caracterização farmacológica da actividade dos receptores A_3 no PM-ML de íleo de rato. O agonista dos receptores de adenosina A_3 , 2-Cl-IBMECA, foi testado numa gama de concentrações crescentes (1-10 nM) sobre a libertação de ACh induzida por estimulação eléctrica de campo (EFS). As ordenadas representam os níveis de trítio libertados expressos em razões S_2/S_1 , isto é, a razão entre a libertação de ACh- ^3H induzida pelo segundo período de estimulação (na presença da 2-Cl-IBMECA) e a libertação de ACh- ^3H durante o primeiro período de estimulação (na ausência do fármaco a testar). O agonista dos receptores A_3 , 2-Cl-IBMECA foi aplicado 8 minutos antes do S_2 . O antagonista selectivo dos receptores A_3 , MRS 1191 (10 μM), e o antagonista selectivo dos receptores A_{2A} , ZM 241385 (50 nM), foram adicionados ao meio de incubação no início do período de libertação (tempo 0) e estiveram presentes ao longo de toda a experiência (S_1 e S_2). As médias das razões S_2/S_1 na presença dos antagonistas A_{2A} e A_3 não foram significativamente diferentes do controlo. Os valores apresentados representam médias \pm erro-padrão de 4 a 9 experiências individuais. Valores de *P<0.05 (ANOVA seguida do teste de t modificado por Dunnett) representam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o efeito da 2-Cl-IBMECA (3 nM).

Neste contexto, testou-se o efeito facilitatório da 2-Cl-IBMECA (3 nM) na presença do agonista selectivo dos receptores A_{2A} , CGS 21680 C (3 nM). Nestas condições, a 2-Cl-IBMECA (3 nM) foi capaz de facilitar a libertação de ACh- ^3H a partir de neurónios mioentéricos estimulados electricamente mesmo quando os receptores A_{2A} foram estimulados com CGS 21680 C (3 nM, aplicado em S_1 e S_2). Estes resultados sugerem que

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

a activação dos receptores A_{2A} e A_3 da adenosina exercem efeitos aditivos, provavelmente através de vias intracelulares independentes, no sentido de aumentarem a libertação de ACh dos neurónios mioentéricos (figura XXI).

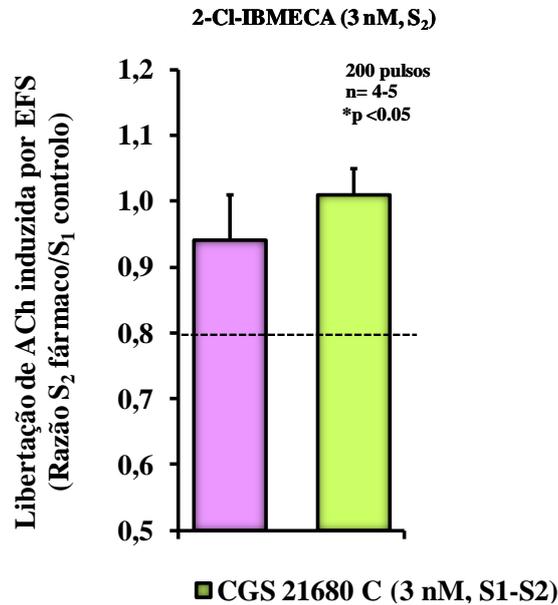


Figura XXI- Os receptores facilitatórios A_{2A} e A_3 exercem efeitos aditivos sobre a libertação de ACh- $[^3H]$ induzida por estimulação eléctrica de campo do PM-ML do íleo de rato. O agonista selectivo dos receptores A_{2A} , CGS 21680 C (3 nM), foi adicionado ao meio de incubação no início da experiência (tempo 0) e esteve presente ao longo da mesma, durante S_1 e S_2 . O agonista dos receptores A_3 , 2-Cl-IBMECA (3 nM) foi adicionado ao meio de incubação 8 min antes de S_2 . A média da razão S_2/S_1 na presença do agonista A_{2A} não foi significativamente diferente do controlo. Os valores representados correspondem às médias \pm erro-padrão da média de 4 a 5 experiências individuais. Valores de $*P < 0.05$ (ANOVA seguida do teste de t modificado por Dunnett) representam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o efeito da 2-Cl-IBMECA (3 nM).

Os estudos de imunolocalização realizados no PM-ML do íleo de rato mostraram que os receptores A_3 da adenosina estão predominantemente localizados nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos. A imunoreactividade contra o receptor A_3 não co-localiza com o marcador neuronal, PGP 9.5 (figura XXII f-h). Deste modo, é notória a existência de diferenças significativas na localização dos receptores A_3 em comparação com os receptores facilitatórios A_{2A} (figura XIV e XV). Os receptores A_3 encontram-se distribuídos principalmente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares (figura XXII b), alguns dos quais são também reactivos contra o anticorpo para os

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

receptores A_1 (figura XXIIc-e), enquanto os receptores A_{2A} encontram-se localizados nas fibras nervosas colinérgicas que reagem positivamente contra o VAcHT (figura XVa-f).

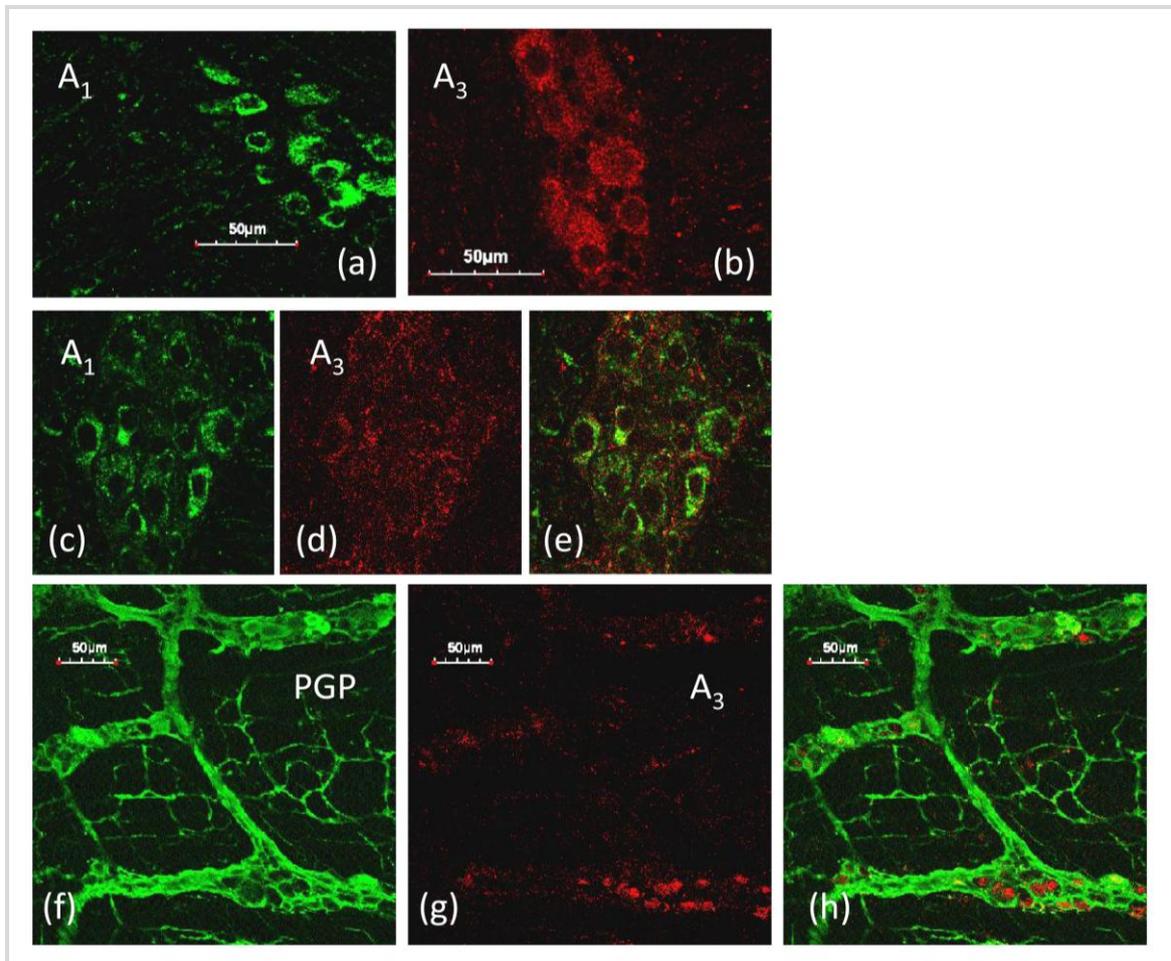


Figura XXII- Localização da imunoreactividade para os receptores A_3 da adenosina em imagens de microscopia confocal obtidas a partir de preparações de PM-ML do íleo de rato. A imunoreactividade para os receptores A_1 (verde) e para os receptores A_3 está co-localizada nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos (c-e). Células positivas para o marcador neuronal (PGP 9.5, verde) não possuem imunoreactividade contra os receptores A_3 (vermelho) (f-h). As imagens (e) e (h) correspondem à projecção das imagens de marcação dupla para os receptores de adenosina A_3 (vermelho) com os receptores A_1 (verde) e com o PGP 9.5 (verde); a existência de co-localização deveria aparecer a amarelo. Escala = 50 μ M.

A localização diferencial dos receptores excitatórios A_3 e A_{2A} ao longo dos neurónios mioentéricos pode explicar os efeitos aditivos da 2-Cl-IBMECA e do CGS 215680 C. Dados obtidos previamente pelo nosso grupo, mostraram que os receptores nicotínicos são expressos nos terminais nervosos colinérgicos para além dos descritos na

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

região somatodendrítica, embora apenas os primeiros possam ser regulados pela activação dos receptores A_{2A} presentes nas terminações nervosas motoras (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a) (figura XXIII). Considerando este facto, testou-se o efeito dos dois agonistas para os receptores A_3 e A_{2A} da adenosina, respectivamente 2-Cl-IBMECA e CGS 21680 C, sobre a libertação de ACh-[3H] induzida pela despolarização directa dos terminais nervosos com o agonista nicotínico (nAChR), DMPP (30 μM), na presença de tetrodotoxina (1 μM), uma toxina que bloqueia o influxo de sódio (Na^+) bloqueando assim a condução axonal.

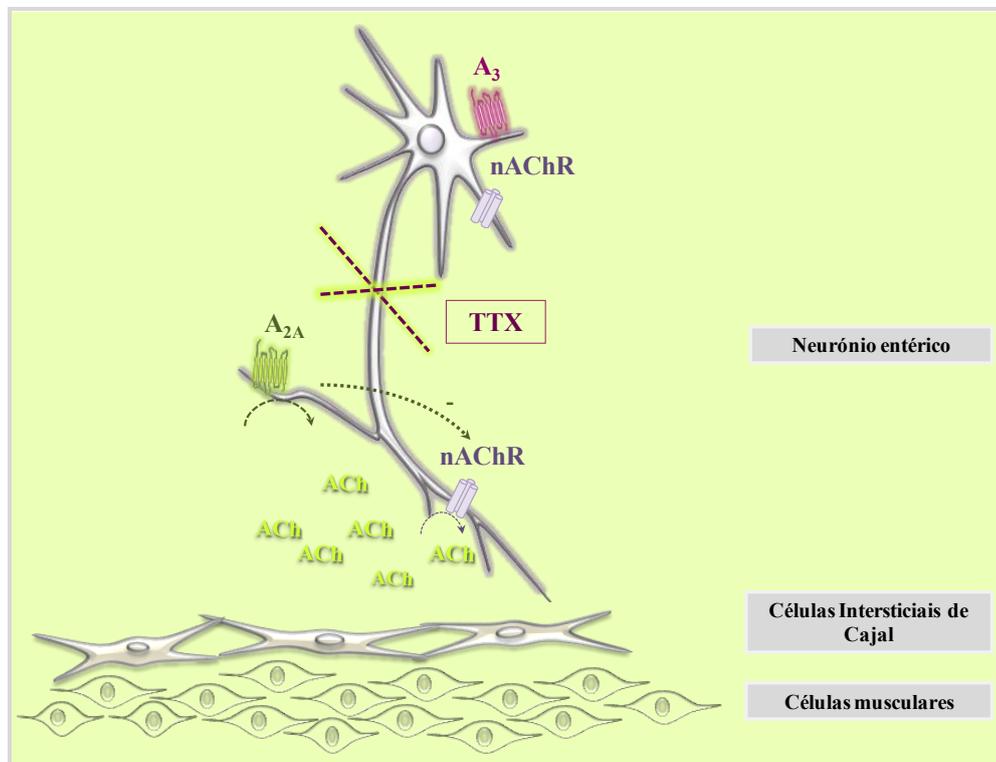


Figura XXIII- Representação esquemática do plano experimental usado para isolar as duas componentes do neurónio entérico: o corpo celular, onde provavelmente se encontram distribuídos os receptores da adenosina facilitatórios A_3 , e o terminal nervoso, onde se encontram distribuídos os receptores da adenosina facilitatórios A_{2A} . Os receptores nicotínicos da acetilcolina encontram-se localizados nestes dois componentes. No entanto, apenas os receptores nicotínicos pré-juncionais são passíveis de repressão mediada pela activação de receptores A_{2A} . As experiências foram realizadas na presença de tetrodotoxina (TTX, 1 μM), para bloquear a geração de potenciais de acção e a condução axonal, isolando o componente pré-juncional.

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

Nestas condições experimentais, utilizadas para isolar a componente nicotínica pré-juncional da libertação de ACh, o agonista dos receptores A_{2A} , CGS 21680 C (3 nM), reduziu significativamente a libertação de ACh- 3H induzida pela aplicação de DMPP (30 μM), enquanto o agonista dos receptores A_3 , 2-Cl-IBMECA (3 nM), não alterou significativamente ($P > 0.05$) os níveis de libertação relativamente à aplicação isolada de DMPP (30 μM) (figura XXIV).

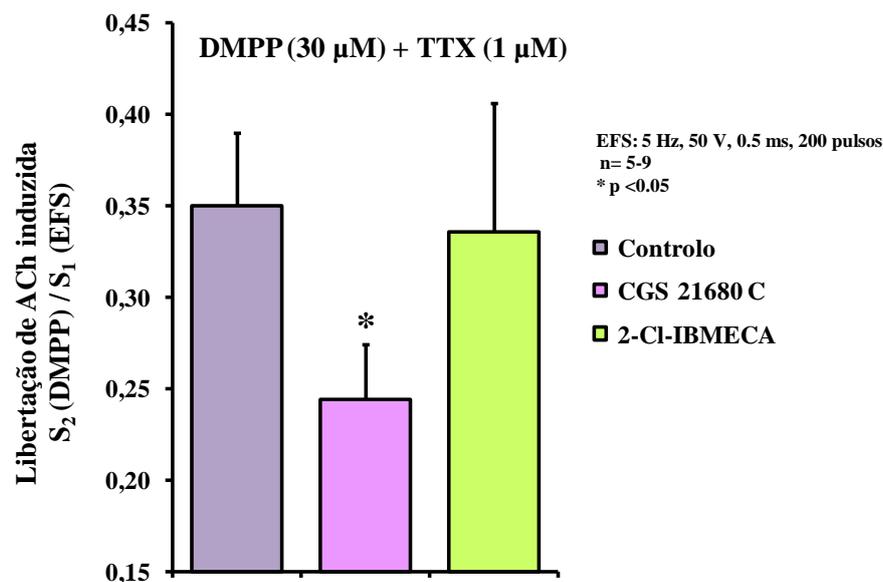


Figura XXIV- A activação dos receptores da adenosina A_{2A} , mas não dos receptores A_3 , modula negativamente a libertação de ACh- 3H induzida pela activação dos receptores nicotínicos dos neurónios mioentéricos. As ordenadas correspondem aos níveis de trítio expressos pelas razões S_2/S_1 , i.e, a razão entre a libertação de ACh- 3H induzida pela aplicação de um agonista nicotínico 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP, 30 μM) (durante 3 minutos), na presença de um bloqueador do potencial de acção, tetrodotoxina (TTX, 1 μM), e a libertação de ACh- 3H induzida por estimulação eléctrica de campo (EFS, 200 pulsos a 0,5 ms de duração, com uma frequência de 5 Hz), no plexo mioentérico (S_1). Ambos os agonistas dos receptores A_{2A} e A_3 , CGS 21680 C (3 nM) e 2-Cl-IBMECA (3 nM), respectivamente, foram aplicados 8 minutos precedentes ao S_2 . Os valores representados correspondem às médias \pm erro-padrão da média de 5 a 9 experiências individuais. Valores de * $P < 0.05$ (ANOVA seguida do teste de t modificado por Dunnett) representam diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o controlo (0.35 \pm 0.04, $n=9$).

4. A modulação da libertação de ACh pela adenosina endógena é balanceada através da activação tónica dos receptores extrajuncionais inibitórios A_1 e facilitatórios A_3 e dos receptores juncionais facilitatórios A_{2A} .

Para estudar a actividade tónica dos receptores da adenosina na libertação de ACh- $[^3H]$ dos neurónios motores mioentéricos, comparou-se os efeitos resultantes do bloqueio dos receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 da adenosina com DPCPX, ZM 241385, PSB 603 e MRS 1191, respectivamente (Figura XXV).

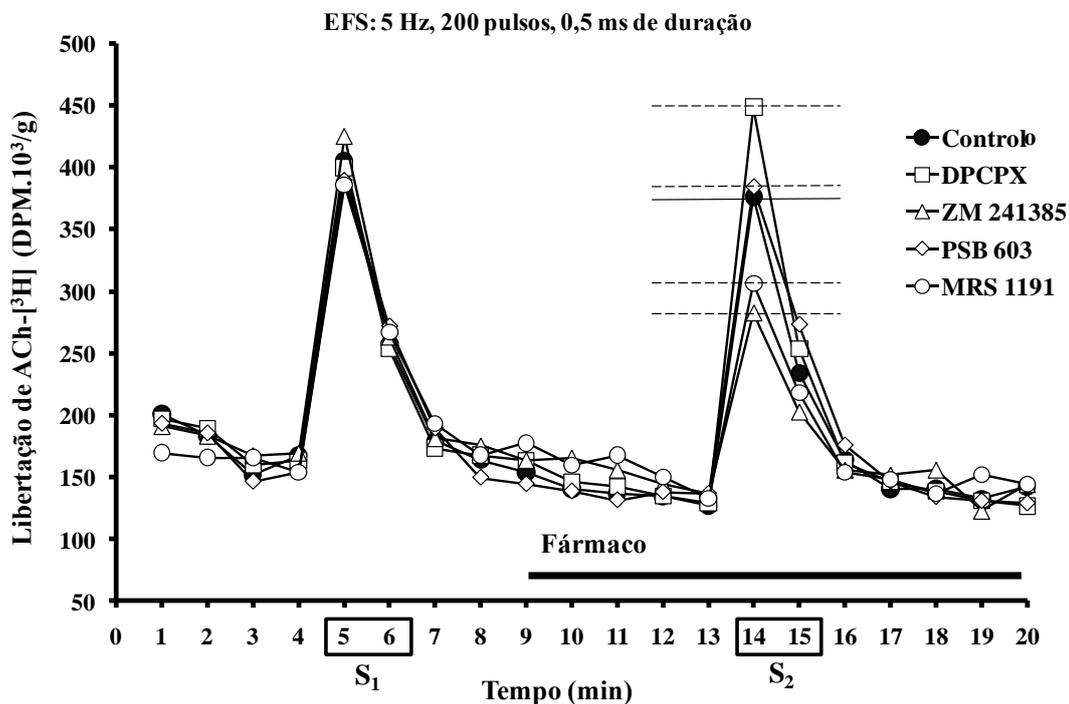


Figura XXV- Gráfico de efluxo de trítio ao longo do tempo no PM-ML do íleo de rato, obtido a partir de experiências tipo de libertação de ACh- $[^3H]$. Efeito dos antagonistas selectivos dos receptores da adenosina na libertação de ACh- $[^3H]$ dos neurónios mioentéricos. Os níveis de trítio (nas ordenadas) são expressos em desintegrações por minuto (dpm) por grama de peso seco do tecido. As abcissas indicam os tempos utilizados na colheita das amostras. Após o período de marcação e lavagem (tempo 0), a libertação de ACh- $[^3H]$ foi induzida duas vezes por estimulação eléctrica de campo (EFS, 5 Hz, 200 pulsos, 0.5 ms, 50 Volts), aos 4 minutos (S_1) e aos 13 minutos (S_2). Os antagonistas dos receptores de adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 : DPCPX (10 nM), ZM 241385 (50 nM), PSB 603 (10 nM) e o MRS 1191 (10 μ M) respectivamente, foram adicionados ao meio de incubação 8 minutos antes de S_2 . Nenhum destes fármacos modificou a libertação espontânea de ACh- $[^3H]$.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

O antagonista do receptor A_1 , DPCPX (10 nM), aumentou a libertação de ACh- ^3H em $17\pm 4\%$ ($n=4$), enquanto que o ZM 241385 (50 nM) e o MRS 1191 (10 μM) inibiram significativamente a libertação da ACh de $37\pm 10\%$ ($n=6$) e $28\pm 8\%$ ($n=10$), respectivamente. Os efeitos inibitórios do ZM 241385 (50 nM) e do MRS 1191 μM) não foram significativamente diferentes da inibição provocada pela desaminase da adenosina (ADA, 0,5 U/ml), a enzima responsável pela conversão da adenosina no seu metabolito inactivo, a inosina (Duarte-Araújo *et al.*, 2004).

O antagonista dos receptores A_{2B} , PSB 603 (10 nM), não conseguiu modificar significativamente os níveis de trítio libertados ($5\pm 8\%$, $n=12$).

As concentrações escolhidas para os antagonistas usados encontram-se no intervalo de concentrações capazes de bloquear selectivamente os vários subtipos de receptores da adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Estes resultados demonstram que a adenosina endógena tem um efeito predominantemente facilitatório actuando através da activação dos receptores A_3 e A_{2A} , que se encontram localizados respectivamente nos corpos celulares e nas varicosidades axonais dos neurónios mioentéricos colinérgicos.

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

CAPÍTULO IV - Discussão

Neste estudo foram demonstradas evidências de que existe uma distribuição heterogénea dos diversos subtipos de receptores da adenosina no plexo mioentérico do íleo de rato. Um artigo anteriormente publicado pelo nosso grupo demonstrou que a adenosina tem um papel duplo na libertação de acetilcolina dos neurónios motores mioentéricos através da activação de receptores de elevada afinidade para a adenosina, facilitatórios A_{2A} e inibitórios A_1 , localizados a nível pré-juncional e extra-juncional, respectivamente (Duarte-Araújo *et al.*, 2004). Através de estudos de microscopia confocal, resolvemos confirmar esta hipótese relacionada com a localização diferencial dos receptores de elevada afinidade para a adenosina ao longo dos neurónios colinérgicos mioentéricos. Os resultados mostraram que a imunoreactividade contra os receptores A_1 e A_{2A} está localizada em diferentes sub-regiões dos neurónios mioentéricos do íleo de rato. Os receptores A_1 encontram-se predominantemente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A_{2A} estão localizados nas fibras nervosas e nos terminais nervosos colinérgicos. No que respeita à distribuição dos receptores com baixa afinidade para a adenosina no íleo de rato, os resultados mostraram que os corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos também expressam receptores facilitatórios do subtipo A_3 , a par dos receptores de subtipo A_1 referidos anteriormente. Ensaios de imunolocalização mostram que a reactividade contra os receptores A_{2B} exhibe um padrão semelhante ao do marcador de células gliais, GFAP, indicando que estes receptores podem ser predominantemente expressos nas células da glia entérica no íleo de rato, aliás, tal como foi observado no jejuno humano (Christofi *et al.*, 2001; revisto em Christofi, 2008).

O potencial terapêutico dos compostos relacionados com a adenosina no controlo da motilidade intestinal fez com que investigássemos o papel neuromodulador dos receptores com baixa afinidade para a adenosina, A_{2B} e A_3 , na libertação de acetilcolina a partir dos neurónios mioentéricos. Os dados obtidos são potencialmente relevantes tendo em conta as descobertas sobre a geografia dos receptores da adenosina no plexo mioentérico, assim como, devido ao interesse crescente sobre o envolvimento da adenosina endógena nas doenças intestinais, como por exemplo a doença inflamatória intestinal (IBDs), a isquémia intestinal, ou o íleo pós-operatório (Antonioli *et al.*, 2008).

Dos vários subtipos de receptores da adenosina identificados no plexo mioentérico, parece haver um (o receptor de baixa afinidade A_{2B}) que não interfere directamente com a neurotransmissão colinérgica. Tanto quanto se sabe pela literatura, não existe informação

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

sobre a localização destes receptores no intestino delgado de rato. Contudo, no jejuno humano, a presença de receptores A_{2B} encontra-se descrita nos neurónios do plexo mioentérico, na submucosa e nas células gliais, sendo que a marcação na glia foi muito mais intensa do que a marcação nos neurónios; estes receptores são praticamente inexistentes nas camadas de músculo circular e longitudinal (Antonioli *et al.*, 2008; Cristofi *et al.*, 2001). Estes dados estão de acordo com as nossas observações, já que o padrão de expressão dos receptores A_{2B} em secções transversais do íleo de rato é semelhante à distribuição do marcador de células da glia, GFAP. Para além disso, os estudos farmacológicos não revelaram mudanças significativas na libertação de ACh pela manipulação da activação dos receptores A_{2B} com o PSB 603. Isto é, este antagonista selectivo dos receptores A_{2B} não foi capaz de reverter a inibição da libertação de ACh causada pelo agonista não selectivo dos receptores A_2 , NECA. Embora as respostas obtidas com a NECA não sejam específicas, a utilização de concentrações de ordem micromolar (1-10 μM) sugerem a activação de receptores do subtipo A_{2B} , já que os restantes receptores da adenosina, A_1 , A_{2A} e A_3 , são activados por concentrações de NECA na gama nanomolar baixa (Feoktistov and Biaggioni, 1997; Beukers *et al.*, 2006). O PSB 603 foi desenvolvido para antagonizar selectivamente receptores do subtipo A_{2B} , apresentando um valor de K_i de 0,553 nM em humanos. Este fármaco não apresenta afinidade para os receptores A_1 , A_{2A} e A_3 mesmo quando usado em concentrações próximas de 10 μM (Feoktistov *et al.*, 1997; Borrmann *et al.*, 2009). Mediante estas características farmacológicas, pode concluir-se que o efeito da NECA (usada na concentração de 0,3 μM) resulta da activação de receptores inibitórios A_1 da adenosina. Por conseguinte é razoável supor que nesta preparação os receptores A_{2B} não participam directamente na modulação da actividade colinérgica. Considerando que esta é a primeira vez que os receptores A_{2B} são identificados em células gliais no íleo de rato, e sabendo que a deficiência destas células não-neuronais tem sido correlacionada com alguns distúrbios na motilidade (Gulbransen and Sharkey, 2009), deveremos ser cautelosos na extrapolação fisiopatológica destes resultados, acreditando que esta informação possa de alguma maneira contribuir no futuro para clarificar mecanismos de sinalização entre os neurónios e a glia mioentérica.

Estritamente com base em resultados neuroquímicos, foi colocada a hipótese da coexistência de receptores da adenosina extra-juncionais inibitórios do subtipo A_1 e juncionais facilitatórios do subtipo A_{2A} em neurónios colinérgicos no plexo mioentérico de íleo de rato (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a). Usando experiências de imunofluorescência aplicada à microscopia confocal, confirmámos que os receptores A_1 estão localizados nos

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A_{2A} estão localizados nos terminais nervosos colinérgicos. Apesar de ter sido descrito que os agonistas dos receptores A_1 são capazes de causar relaxamento do músculo liso do íleo de rato contraído pelo carbacol (Nicholls *et al.*, 1997), o nosso grupo não observou qualquer modificação das contracções de PM-ML de íleo de rato induzidas pela oxotremorina aumentando a concentração de adenosina endógena através do bloqueio do transportador de nucleósidos com dipiridamole (Vieira *et al.*, 2009). Neste trabalho, mostrou-se que o bloqueio dos receptores A_1 com DPCPX facilitou (~17%) a libertação de ACh-[3 H] a partir dos neurónios mioentéricos estimulados electricamente, enquanto o bloqueio dos receptores A_{2A} com ZM 241385 causou uma inibição (~37%) da libertação do neurotransmissor que não foi significativamente diferente da inibição causada pela desaminase de adenosina (ADA), a enzima que inactiva a adenosina em inosina. Estes dados sugerem que a adenosina endógena tem um efeito tónico facilitatório predominante mediado pelos receptores A_{2A} pré-juncionais. A discrepância relativa às acções da adenosina endógena comparativamente com a aplicação exógena do nucleósido deriva dos mecanismos de inactivação da adenosina operados pela desaminação e pela captação celular no PM-ML que restringe as suas acções à região neuro-effectora perto dos locais de produção / libertação (Correia-de-Sá *et al.*, 2006). Consequentemente, o bloqueio da excessiva actividade desaminativa da adenosina junto dos terminais nervosos colinérgicos é necessário para permitir que a adenosina aplicada exogenamente atinja os receptores facilitatórios A_{2A} na sinapse neuro-effectora em concentrações suficientemente elevadas que permitam superar a inibição da libertação do neurotransmissor pelos receptores A_1 mioentéricos (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a). De acordo com estas considerações, a localização celular dos receptores de elevada afinidade para a adenosina, A_1 e A_{2A} , e as modificações na dinâmica entre a actividade/expressão das ecto-enzimas e as vias de inactivação do nucleósido, são alvos importantes no controlo da libertação de ACh-[3 H] no plexo mioentérico do íleo de rato. Contudo, permanece uma questão por responder acerca da actividade tónica da adenosina endógena nos receptores de baixa afinidade A_3 (e A_{2B}) (figura XXV).

Sabe-se da existência de mRNA codificante para os receptores A_3 no cólon, no cego, no íleo e no jejuno humano (Christoffi *et al.*, 2001). No entanto, este receptor está localizado predominantemente em neurónios submucosos (a maior parte positivos para a substância P, e uma pequena minoria positivos para os neurónios VIPérgicos). Estudos de imunohistoquímica em intestino delgado identificaram também a presença de receptores

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

A₃ no músculo longitudinal e nos dois plexos nervosos entéricos (mioentérico e submucoso) (Christofi *et al.*, 2001; Antonioli *et al.*, 2008; Bozarov *et al.*, 2009). No que respeita ao tracto gastrointestinal dos roedores, onde os agonistas dos receptores A₃ têm sido referenciados como possuindo uma influência benéfica em situações de inflamação experimental do cólon (Guzman *et al.*, 2006), a maioria dos dados visando este receptor são baseados em estudos de biologia molecular desenhados para identificar mRNA, sem se considerar a sua localização celular. Os resultados provenientes desses estudos mostram que os receptores A₃ são expressos em todas as camadas (mucosa, plexo submucoso, músculo circular, plexo mioentérico e músculo longitudinal) do intestino grosso e delgado (Dixon *et al.*, 1996; Antonioli *et al.*, 2008). Usando preparações de PM-ML de íleo de rato observadas por microscopia confocal, mostrámos neste trabalho que os receptores A₃ da adenosina estão localizados principalmente nos corpos celulares dos neurónios mioentéricos. Curiosamente, a activação dos receptores A₃ aumenta a libertação de ACh-[³H] dos terminais nervosos mioentéricos estimulados electricamente, atingindo níveis de libertação próximos dos causados pela activação de receptores A_{2A}. Isto foi verificado através da incubação com 2-Cl-IBMECA (1-10 nM), um agonista dos receptores A₃ ($K_i \sim 0,33$ nM) que exhibe uma selectividade de 2500- e 1400-vezes superior para o receptor A₃ do rato comparativamente com os receptores A₁ e A_{2A} (Jacobson, 1998; Yaar *et al.*, 2005). O efeito facilitatório da 2-Cl-IBMECA foi prevenido pelo MRS 1191, um antagonista selectivo A₃. Através de estudos funcionais e de ligação específica (*binding*) sabe-se que este antagonista é 28 vezes mais selectivo para os receptores A₃ do que para os receptores A₁ (Jacobson *et al.*, 1997). Apesar da activação dos receptores A₃ causar, classicamente, a inibição da adenilciclase mediante a interacção com proteínas G_i, vários estudos sugerem que estes receptores também podem ser acoplados às proteínas G_{q/11}. Na realidade, os receptores A₃ têm um perfil característico de mensageiros secundários que pode conduzir à estimulação da fosfolipase C e D (Jacobson, 1998; Yaar *et al.*, 2005; Kolachala *et al.*, 2008), e por consequência aumentar a libertação do neurotransmissor. A facilitação da libertação de ACh-[³H] mediada pelos receptores A₃ pode resultar de uma dessensibilização dos receptores inibitórios A₁ co-localizados nos neurónios mioentéricos devido ao desacoplamento das subunidades G_{iα3} e β por um mecanismo envolvendo a fosforilação do terminal carboxílico pelas cinases acopladas à proteína G (Klinger *et al.*, 2002; Yaar *et al.*, 2005; Laudadio and Psarropoulou, 2004).

Curiosamente, o efeito facilitatório do agonista dos receptores A₃, 2-Cl-IBMECA, foi também prevenido pelo ZM 241385 (50 nM), o qual possui uma maior afinidade para

Implicações funcionais

os receptores A_{2A} ($K_i \sim 50$ nM) do que para os receptores A_3 ($K_i > 10$ μ M). A activação marginal dos receptores A_{2A} pela 2-Cl-IBMECA (3 nM) é pouco provável devido ao elevado grau de selectividade (1400 vezes) deste agonista para os receptores A_3 *versus* A_{2A} . A interacção directa entre estes dois receptores também é pouco provável, já que os receptores A_3 e A_{2A} não estão co-localizados no plexo mioentérico. Recorde-se que as experiências de imunolocalização realizadas demonstraram que os receptores A_3 estão localizados predominantemente nos corpos celulares dos neurónios ganglionares mioentéricos, enquanto os receptores A_{2A} estão localizados maioritariamente nos terminais nervosos colinérgicos. Assim, surgiu a hipótese de que a localização diferencial dos receptores excitatórios A_3 e A_{2A} ao longo dos neurónios mioentéricos servia para explicar porque razão o aumento da libertação de ACh-[3 H] por estimulação dos receptores facilitatórios A_3 (com 2-Cl-IBMECA) nos corpos celulares nervosos era prevenido pelo bloqueio dos receptores A_{2A} pré-juncionais com o ZM 241385. Esta hipótese foi testada recorrendo ao conhecimento prévio de que a auto-facilitação da libertação de ACh-[3 H] induzida pelos receptores nicotínicos resultante da despolarização dos terminais nervosos mioentéricos (na presença da tetrodotoxina para o bloqueio do potencial de acção nervoso) podia ser influenciada pela activação dos receptores A_{2A} pré-juncionais (Duarte-Araújo *et al.*, 2004b). Como era esperado, o agonista dos receptores A_{2A} , CGS 21680 C, reduziu a auto-facilitação nicotínica, enquanto o agonista dos receptores A_3 não teve qualquer influência na libertação do neurotransmissor induzida por activação dos auto-receptores nicotínicos com DMPP (figura XXIV). Estes resultados sugerem que a adenosina actuando nos receptores pré-juncionais A_{2A} controla mais eficientemente o circuito local modulando a libertação do transmissor a nível neuromuscular, enquanto os receptores A_3 podem contribuir para reforçar os estímulos necessários à geração do potencial de acção no corpo celular dos neurónios mioentéricos.

O balanço entre os receptores de elevada afinidade inibitórios A_1 e excitatórios A_{2A} parece ser importante para regular a motilidade intestinal, tal como foi observado em animais *in vivo* e em modelos *in vitro*. Por exemplo, a administração do antagonista dos receptores A_1 , DPCPX, promove a expulsão fecal (Tomaru *et al.*, 1994) e reverte a ileíte pós-operatória (Kadowaki *et al.*, 2003) em ratas. Os nossos resultados mostram que a adenosina endógena facilita a libertação de ACh através da activação de receptores pré-juncionais do subtipo A_{2A} no plexo mioentérico do íleo de rato (Duarte-Araújo *et al.*, 2004a). Assim, as melhorias na motilidade entérica resultantes do bloqueio dos receptores inibitórios A_1 podem ser interpretadas mediante a ocorrência de um desequilíbrio entre a

Implicações funcionais

activação A_1 e A_{2A} , que favorece a activação dos receptores excitatórios A_{2A} (Tomaru *et al.*, 1995). Nos processos de inflamação intestinal, ocorre uma interacção dinâmica entre a actividade das células inflamatórias/imunitárias e o sistema nervoso entérico (Sharkey and Mawe, 2002). Existem evidências que sugerem que de entre os mediadores que regulam estas interacções celulares, a adenosina pode desempenhar um papel importante (Christofi *et al.*, 2001). Curiosamente, a adenosina está implicada na modulação de respostas imunitárias, adaptativas e inatas através da activação dos receptores A_{2A} (Thiel *et al.*, 2003). Nesse sentido, os agonistas dos receptores A_{2A} estão actualmente sob investigação como novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças inflamatórias, tal como a inflamação intestinal (Odashima *et al.*, 2005). Por exemplo, observou-se um aumento da expressão e da actividade dos receptores A_{2A} na presença de inflamação intestinal (Antonioli *et al.*, 2006). Para além disso, foi demonstrado que a inflamação intestinal crónica promove um aumento da contractilidade entérica, que pode ser parcialmente devida a uma perda da neuromodulação colinérgica pelos receptores inibitórios A_1 (De Man *et al.*, 2003), mas também devido à activação dos receptores de baixa afinidade A_3 pela acumulação da adenosina endógena (Guzman *et al.*, 2006). A dessensibilização dos receptores de elevada afinidade (A_1) nos nervos entéricos pode ocorrer durante situações de inflamação intestinal, porque são libertadas das células inflamatórias purinas, como a adenosina e o ATP, em quantidades elevadas (Marquardt *et al.*, 1984). Estas células encontram-se localizadas nas proximidades dos gânglios mioentéricos em várias espécies, inclusivamente no homem (Bogers *et al.*, 2000; Stead *et al.*, 1989). É, ainda, importante referir que no cólon inflamado existe um aumento da expressão do marcador membranar das células imunitárias, o CD73, que exhibe actividade ecto-5'-nucleotidásica, a enzima que converte AMP em adenosina (Antonioli *et al.*, 2011).

Conclusão

Em conclusão, o envolvimento dos receptores da adenosina em doenças entéricas associadas à motilidade e a processos inflamatórios torna estes receptores alvos farmacológicos atractivos, cuja manipulação pode ser muito relevante particularmente quando os níveis do nucleósido se encontrem elevados. Tendo em consideração a afinidade da adenosina para os diversos receptores P1, a sua função e a sua localização celular, é possível prever que em condições fisiológicas o nucleósido activa preferencialmente receptores de elevada afinidade, tais como o receptor A_1 , que se encontra localizado nos corpos celulares neuronais impedindo a libertação de acetilcolina dos terminais nervosos, e o receptor pré-juncional facilitatório A_{2A} , que desempenha um papel fundamental na sustentação da neurotransmissão colinérgica e, conseqüentemente, na motilidade gastrointestinal. Respostas entéricas inapropriadas podem dever-se ao envolvimento dos receptores de baixa afinidade para a adenosina, A_3 , que favorecem a excitação neuronal mioentérica, sendo por isso causadoras de desconforto abdominal. Portanto, o interesse crescente nos fármacos anti-inflamatórios com vista ao tratamento de doenças de motilidade intestinal, por estimulação directa dos subtipos dos receptores de adenosina (em particular os receptores A_{2A} e A_3) ou através do aumento das concentrações locais de adenosina, deve ser tido em consideração, assim como, o papel excitatório destes receptores na neurotransmissão colinérgica, que pode representar resultados promissores no controlo da inflamação induzida experimentalmente (Antonioli *et al.*, 2008; Selmecky *et al.*, 2007).

Referências Bibliográficas

- Abbracchio MP, Burnstock G (1998). Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *J. Pharmacol.*, **78**: 113-145.
- Akkari R, Burbiel JC, Hockemeyer J, Muller CE. (2006). Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs. *Curr Top Med Chem.* **6**: 1375-1399.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Blandizzi C, Tacca M. (2006). A_{2A} receptors mediate inhibitory effects of Adenosine on colonic motility in the presence of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* **12**: 117-122.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori, M, Del Tacca M, Blandizzi C. (2008). Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics.* **120**: 233–253.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Awwad O, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C. (2011). Differential recruitment of high affinity A₁ and A_{2A} adenosine receptors in the control of colonic neuromuscular function in experimental colitis. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 639-649.
- Bassoti G, Villannacci V, Antonelli E, Morelli A, Salerni B. (2007). Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Laboratory Investigation.* **87**: 628-632.
- Beukers MW, Meurs I, Ijzerman AP. (2006). Structure-affinity relationships of adenosine A_{2B} receptor ligands. *Med. Res. Rev.* **26**, 667-698.
- Bogers J, Moreels T, De Man JG, Vrolix G, Jacobs W, Pelkmans PA, Van Marck EA, (2000). *Schistosoma mansoni* infection causing diffuse enteric inflammation and damage of the enteric nervous system in the mouse small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* **12**, 431-440.
- Borrmann T, Hinz S, Bertarelli DC, Li W, Florin NC, Scheiff AB, Müller CE. (2009). 1-alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: development and characterization of adenosine A_{2B} receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. *Med Chem.* **52(13)**: 3994-4006.
- Bozarov A, Wang YZ, Yu JG, Wunderlich J, Hassanain HH, Alhaj M, Cooke HJ, Grants I, Ren T, Christofi FL. (2009). Activation of adenosine low affinity A₃ receptors inhibits the enteric short inter-plexus neural circuit triggered by histamine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **297**: G1147-G1162.
- Brehmer A, Croner R, Dimmler A, Papadopoulos T, Schrodler F & Neuhuber W. (2004). Immunohistochemical characterization of putative primary afferent (sensory) myenteric neurons in human small intestine. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* **112**: 49-59
- Burnstock G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.*, **24**: 509-581.
- Christofi FL, Zhang H, Yu JG, Guzman J, Xue J, Kim M, Wang Y-Z, Cooke, HJ. (2001). Differential Gene Expression of Adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ Receptors in the Human Enteric Nervous System. *The Journal of comparative Neurology.* **439**: 46-64.
- Christofi FL. (2008). Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal.* **4**, 213-236.
- Correia-de-Sá P, Adães S, Timóteo MA, Vieira C, Magalhães-Cardoso T, Nascimento C, Duarte-Araújo M. (2006). Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: On the role of secreted adenosine deaminase. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 126-127, 211-224.
- Costa M, Brookes SJH, Steele PA, Gibbins I, Burner E, Kandiah CJ. (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the Guinea-pig ileum. *Neuroscience.* **75**: 949-967.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

- Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. (2000). Anatomy and Physiology of the enteric nervous system. *Gut.*, (suppl IV). **47**: iv15-iv19.
- Collis MG, Hourani SMO. (1993). Adenosine receptors subtypes. *Elsevier Science Publishers*. **14**: 360-366.
- Cunha RA. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.*, **38**: 107-125.
- Daly JW, Butts-Lamb P And Padgett W. (1983). Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **3**: 69-80.
- Daval JL & Nicolas F. (1998). Non-selective effects of adenosine A₁ receptor ligands on energy metabolism and acromolecular biosynthesis in cultured central neurons. *Biochem. Pharmacol.*, **55**: 141-149.
- De Man JG, Seerden TC, de Winter BY, Van Marck EA, Herman AG, Pelkmans PA. (2003). Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 172–184.
- Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghi DJ, Richardson PJ, Freeman TC. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1461-1468.
- Dowdall MJ, Boyne AF and Whittaker VP (1974). Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. J.*, **140**: 1-12.
- Drury NA & Szent-Gyorgyi 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 MA & Correia-de-Sá P. (2004a). Adenosine activating A_{2A}-receptors coupled to adenylyl cyclase/cyclic AMP pathway downregulates nicotinic autoreceptor function at the rat myenteric nerve terminals. *Neurochemistry International*. **45**, 641-61
- Duarte-Araújo M, Nascimento C, Timóteo MA, Magalhães-Cardoso MT, Correia-de-Sá P. (2004b). Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A_{2A} and extrajunctional inhibitory A₁ receptors. *Br J Pharmacol*. **141**: 925-34.
- Feoktistov I, Biaggioni I. (1997). Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacological Reviews*. **49**: 381-402.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev.*, **53**: 527-552.
- Furness JB. (2006). The Enteric Nervous System. *Blackwell Publishing*.
- Gu JG, Foga IO, Parkinson FE, Geiger JD. (1995). Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L- [³H] adenosine from rat brain synaptosomal preparations. *Neurochem. J.*, **64**: 2150-2110.
- Gulbransen BD, Sharkey KA. (2009). Purinergic Neuron-to-Glia Signaling in the Enteric Nervous System. *Gastroenterology*. **136**: 1349-1358.
- Guzman J, Yu JG, Suntres Z, Bozarov A, Cooke H, Javed N, Auer H, Palatini J, Hassanain HH, Cardounel AJ, Javed A, Grants I, Wunderlich JE, Christofi FL. (2006). ADOA₃R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflamm Bowel Di.* **12(8)**: 766-89.
- Jacobson KA, Park KS, Jiang JL, Kim YC, Olah ME, Stiles GL, Ji XD. (1997). Pharmacological characterization of novel A₃ adenosine receptor-selective antagonists. *Neuropharmacology* **36**, 1157-1165.
- Jacobson KA. (1998). Adenosine A₃ receptors: novel ligands and paradoxical effects. *Trends Pharmacol. Sci.* **19**, 184-91.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

- Kadowaki M, Nagakura Y, Tokita K, Hanaoka K, Tomoi M. (2003). Adenosine A₁ receptor blockade reverses experimental postoperative ileus in rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* 458, 197-200.
- Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. (2002). Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell. Signal.* 14, 99-108.
- Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Obertone TS, Ziegler TR, Merlin D, Sitaraman SV. (2005). TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A_{2B}) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A_{2B}R overexpression in colitis. *Cell Mol Life Sci.* 62(22): 2647-57.
- Kolachala VL, Bajaj R, Chalasani M, Sitaraman SV. (2008). Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294(2): G401-10.
- Kulinski VI, Olkhovski IA, Kovalevski AN. (1987). Biochemicopharmacological mechanisms and the relation between anticalorigenic, hypothermic, and antihypoxic effects of adenosine. *Vopr. Med. Khim.*, 3: 216-221.
- Latini S, Pedata F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463-484.
- Laudadio MA, Psarropoulou C. (2004). The A₃ adenosine receptor agonist 2-Cl-IBMECA facilitates epileptiform discharges in the CA3 area of immature rat hippocampal slices. *Epilepsy Res.* 59, 83-94.
- Londos C, Cooper DM & Wolff J. (1980). Sub-classes of external adenosine receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 77: 2551-2554.
- Marquardt DL, Gruber HE, Wasserman SI. (1984). Adenosine release from stimulated mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6192-6196.
- Marsal J, Solsona C, Rabasseda X, Blasi J & Casanova A. (1987). Depolarization-induced release of ATP from cholinergic synaptosomes is not blocked by btulinium toxin type A. *Neurochem. Int.*, 10: 295-302.
- McIlwain H. (1979). Adenosine and its mononucleotides as regulatory and adaptative signals in the brain. In: Baer, H.P., Drummond, G.I. (Eds.), *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides.* Raven Press, New York, 361-376.
- Meghji P. (1991). Adenosine and its mononucleotides as regulatory and adaptative signals in the brain. In: Baer, H.P., Drummond, G. I. (Eds.), *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides.* Raven Press, New York, 361-376.
- Michael S, Warstat C, Michel F, Yan L, Müller CE, Nieber K. (2010). Adenosine A_{2A} agonist and A_{2B} antagonist mediate an inhibition of inflammation-induced contractile disturbance of a rat gastrointestinal preparation. *Purinergic Signal.* 6(1): 117-24.
- Nicholls J, Hourani SM. (1997). Characterization of adenosine receptors on rat ileum, ileal longitudinal muscle and muscularis mucosae. *Eur. J. Pharmacol.* 338, 143-150.
- Odashima M, Bamias G, Riviera-Neves J, Linden J, Nast CC, Moskaluk CA, Marini M, Sugawara K, Kozaiwa K, Otaka M, Watanabe S, Cominelli F. (2005). Activation of A_{2A} adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 129: 26-33.
- Paton WDM, Vizi ES. (1969). The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea pig-ileum longitudinal muscle strip. *Br J Pharmacol.* 35: 10-28.
- Purves D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A, O McNamara J, Williams S M. (2001). *Neuroscience.* Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Ramos-Vara JA. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology.* 42, 405-426.

Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:

Implicações funcionais

- Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Del Piero F, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K. (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest*, **20**: 393-413.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, Mendonça A. (2003). Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*, **68**: 377-392.
- Rühl A, Nasser Y, Sharkey KA. (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil*. **16**: 44-49.
- Sharkey KA, Mawe GM. (2002). Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. **2**, 669-677.
- Silinsky EM & Hubbard JI. (1973). Release of ATP from rat motor nerve terminals. *Nature, Lond*. **243**: 404-405.
- Selmeczy Z, Csóka B, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. 2007. The adenosine A_{2A} receptor agonist CGS 21680 fails to ameliorate the course of dextran sulphate-induced colitis in mice. *Inflamm. Res*. **56**, 204-209.
- Semwogerere D & Weeks ER. (2005). Confocal microscopy. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. *Taylor & Francis*, 1-10.
- White TD & Leslie RA. (1982). Depolarization-induced release of adenosine 50-triphosphate from isolated varicosities derived from the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *J. Neurosci.*, **2**: 206-215.
- Sharkey KA, Mawe GM. (2002). Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. **2**, 669-677.
- Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Biennenstock J. (1989). Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology*, **97**, 575-585.
- Thiel M, Caldwell CC, Sitkovsky MV. (2003). The critical role of adenosine A_{2A} receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*. **5**, 515-526.
- Tomaru A, Ina Y, Kishibayashi N, Karasawa A. (1995). Excitation and inhibition via adenosine receptors of the twitch response to electrical stimulation in isolated guinea pig ileum. *Jpn. J. Pharmacol*. **69**, 429-433.
- Tomaru A, Ishii A, Kishibayashi N, Shimada J, Susuki F, Karasawa A. (1994). Possible physiological role of endogenous adenosine in defecation in rats. *Eur. J. Pharmacol*. **264**, 91-94.
- Yaar R, Jones MR, Chen J-F, Ravid K. (2005). Animal Models for the Study of Adenosine Receptor function. *Journal of Cellular Physiology*. **202**: 9-20.
- Van Calker D, Muller M & Hamprecht B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.*, **33**: 999-1005.
- Vieira C, Duarte-Araújo M, Adães S, Magalhães-Cardoso T, Correia-de-Sá P. (2009). Muscarinic M(3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors. *Neurogastroenterol Motil*. **21(10)**: 1118-e95.
- Zimmerman H, Dowdall MJ & Lane DA. (1979). Purine salvage at the cholinergic nerve endings of the Torpedo electric organ: the central role of adenosine. *Neuroscience*, **4**: 979-993.
- Zimmerman H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**: 299-309.
- Zhong WQ, Todani T, Watanabe Y, Toki A. (1998). The effects of adenosine on the energy metabolism of the reperfused intestine in rats. *Jpn. J. Surg.*, **28**: 178±183.

Anexos

Alguns dos resultados contidos neste relatório foram alvo de publicações científicas e foram apresentados nas seguintes reuniões científicas:

1. Publicações científicas

- i. **Artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica.**

Localization and function of adenosine receptor subtypes at the longitudinal muscle – myenteric plexus of the rat ileum. C.Vieira, F. Ferreirinha, M. Duarte-Araújo & P. Correia-de-Sá. (Submetido à revista *Neurochemistry International*, Ref: NCI-D-11-00164).

- ii. **Resumos publicados em revistas**

Regional distribution of adenosine receptors at the longitudinal muscle-myenteric plexus of the rat ileum: functional implications. M. Duarte-Araújo, C. Vieira, F. Ferreirinha & P. Correia-de-Sá. *Purinergic Signalling*. 6 (Suppl 1): S1–S162. (2010).

2. Comunicações em Reuniões científicas

- iii. **Comunicações orais**

XLI Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXIX Reunião de Farmacologia Clínica e X Reunião de Toxicologia, Coimbra (2011). **“Functional implications of Tandem localization of excitatory A₃ and A_{2A} receptors on myenteric cholinergic neurons of sham and inflamed rat ileum.** C. Vieira, J. Oliveira, P. Marques, F. Ferreirinha, M. Duarte-Araújo, P. Correia-de-Sá.

**Distribuição dos receptores da adenosina no plexo mioentérico – músculo longitudinal de íleo de rato:
Implicações funcionais**

XL Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Farmacologia, XXVIII Reunião de Farmacologia Clínica e IX Reunião de Toxicologia, Porto (2009). **“Differential distribution and functional characterization of adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors in the rat myenteric plexus”**. C.Vieira, M. Duarte-Araújo, D. Fernandes, F. Ferreirinha & P. Correia-de-Sá.

iv. Comunicações em painel

Purines 2010, Tarragona-Barcelona (2010). **Regional distribution of adenosine receptors at the longitudinal muscle-myenteric plexus of the rat ileum: functional implications**. M. Duarte-Araújo, C. Vieira, F. Ferreirinha & Paulo Correia-de-Sá.