

REGULAÇÃO PURINÉRGICA DA CONTRACTILIDADE MUSCULAR

J.A. Ribeiro

Laboratório de Farmacologia, Instituto Gulbenkian de Ciência, 2781 Oeiras.

SUMÁRIO

Em condições em que o conteúdo quântico inicial é baixo, ou normal, a adenosina endógena extracelular inibe a transmissão neuromuscular, e desta forma regula indirectamente a contractilidade muscular. Este nucleósido é inactivado ao nível da junção neuromuscular por um sistema de recaptação sensível ao dipiridamol. Os nucleótidos da adenosina, em particular o ATP, após hidrólise pela ecto-5'-nucleotidase, contribuem para a produção de adenosina endógena que modula a transmissão neuromuscular. O reconhecimento da existência de uma "nova" substância endógena como agente neuromodulador, e a intervenção sobre este neuromodulador, poderá contribuir para compreender a fisiopatologia de situações que ocorrem a nível da junção neuromuscular, nomeadamente síndromas miasténicos e miastenia gravis.

INTRODUÇÃO

As purinas (e.g. ATP) são libertadas das terminações nervosas motoras após estimulação nervosa (1) e/ou pós-sinápticamente em resultado da contracção muscular (2). O ATP, aplicado do lado externo da membrana das fibras musculares esqueléticas, é desprovido de qualquer acção directa na contractilidade. No entanto, uma acção indirecta na contracção pode ser detectada após a sua aplicação a preparações de músculo esquelético inervado de mamífero (diafragma de rato) ou de anfíbio (costureiro de rã). Nestes casos, o ATP, em concentrações semelhantes às calculadas como sendo libertadas, reduz a transmissão neuromuscular (3). Esta acção está aparentemente confinada às terminações nervosas motoras, dado que a amplitude média dos potenciais miniatura de placa motora não é afectada por este nucleótido (4).

A redução da libertação de neurotransmissores pelo ATP e, em particular pelo seu metabolito, a adenosina, tem sido estudada utilizando uma grande variedade de sinapses (para revisões ver 5-7), e parece estar relacionada com a redução causada por estas substâncias na

Palavras-chave: Purinas, transmissão neuromuscular, contractilidade muscular, miastenia gravis, síndromas miasténicos.

concentração de cálcio intracelular necessário para activar o processo de libertação dos neurotransmissores (8-12).

Acções pré-sinápticas da adenosina (4,13) parecem envolver receptores da adenosina específicos, sensíveis às xantinas e localizados extracelularmente (14), os quais, em consequência de não seguirem o perfil característico dos subtipos A1 e A2 dos receptores da adenosina, poderão pertencer a um terceiro subtipo já proposto com a designação de A3 (15).

Por outro lado, a adenosina poderá ser um factor de agravamento das situações de alteração da transmissão neuromuscular que se assemelham quer a síndromas miasténicos quer à miastenia gravis, uma vez que a adenosina aplicada exogenamente possui um efeito inibitório pronunciado na transmissão neuromuscular quando a depressão inicial pelo magnésio (bloqueio pré-sináptico) ou pela tubocurarina (bloqueio pós-sináptico) é aproximadamente 30% (16,17). É sabido que na placa motora de miasténicos o número de canais abertos pela acetilcolina está reduzido em cerca de 30% e que o número de receptores colinérgicos pós-juncionais está igualmente reduzido na mesma proporção (18).

O envolvimento da adenosina endógena na transmissão neuromuscular poderia ser claramente definido se fosse possível estabelecer as seguintes evidências experimentais: a) que a adenosina desaminase, enzima que degrada a adenosina em inosina (19) tem um efeito excitatório na transmissão neuromuscular; b) que as metilxantinas, antagonistas do receptor da adenosina na junção neuromuscular (14), podem facilitar a transmissão neuromuscular; c) que o dipiridamol, um bloqueador da recaptção de adenosina (e.g. 20), tem uma acção inibitória, na transmissão neuromuscular e é capaz de potenciar acção inibitória da adenosina exógena. Assim, nas secções seguintes far-se-á uma descrição, ainda que resumida, das evidências experimentais que permitem concluir sobre o papel neuromodulador das purinas na transmissão neuromuscular e indirectamente na contractilidade muscular. Dado que ocorre libertação de ATP a nível da placa motora (1,2) e que o ATP pode ser hidrolisado em adenosina no espaço pericelular através de ecto-ATPases (21, 22), seguida da acção da ecto-5'-nucleotidase (23), é também de interesse saber em que medida o efeito neuromodulador do ATP depende da sua hidrólise em adenosina.

ENVOLVIMENTO DA ADENOSINA ENDÓGENA NA TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

A adenosina desaminase aumenta a amplitude e o conteúdo quântico dos potenciais de placa motora (e. p. ps). O efeito excitatório desta enzima na transmissão neuromuscular, observado quer em condições de conteúdo quântico baixo (preparações paralisadas a nível pré-juncional com magnésio) (24) quer em condições de conteúdo quântico elevado (preparações paralisadas a nível pós-juncional com tubocurarina) (25), parece ser uma consequência da sua capacidade de inactivar a adenosina endógena existente na junção neuromuscular. A evidência experimental que apoia esta ideia é: a) a acção da adenosina desaminase na amplitude dos e.p.ps é prevenida pelo inibidor da sua actividade enzimática, eritro-hidroxi-nonil-adenina (EHNA); b) a inosina, produto da desaminação da adenosina, é virtualmente inactiva na transmissão neuromuscular; c) a adenosina desaminase previne totalmente o efeito inibitório da adenosina na transmissão neuromuscular, não afectando contudo o efeito inibitório da 2-cloroadenosina, análogo da adenosina resistente à desaminação (24, 25).

Comparando o efeito excitatório da adenosina desaminase com o efeito inibitório da adenosina na amplitude dos e.p.ps, pode-se estimar que a concentração de adenosina endógena junto das terminações nervosas motoras é aproximadamente 12 μ M (25). Assumindo que a fenda

sináptica tem cerca de 450 μm^3 de volume (26), a quantidade de adenosina presente será aproximadamente $5,4 \times 10^{-18}$ moles. De interesse notar que a quantidade de ATP libertada por impulso nervoso, conjuntamente com a acetilcolina na junção neuromuscular, é da mesma ordem de grandeza (aproximadamente $3,7 \times 10^{-18}$ moles) (1).

Outro aspecto que evidencia a presença de adenosina endógena extra celular na placa motora é a observação de que os antagonistas do receptor da adenosina, 8-fenilteofilina (8-PT) e teofilina (14), facilitam a transmissão neuromuscular (25). Embora alguns autores tenham interpretado a acção excitatória da teofilina na transmissão neuromuscular em termos da sua capacidade em inibir as fosfodiesterases (27,28; ver porém 13), o aumento na amplitude dos e.p.ps causado por concentrações micromolar de 8-PT e teofilina parece estar relacionado com o seu comportamento como antagonistas do receptor da adenosina e não com a inibição das fosfodiesterases, já que: a) as concentrações de 8-PT e teofilina que facilitam a transmissão neuromuscular (25) são inferiores às necessárias para inibir as fosfodiesterases (29); b) a 8-PT é menos potente que a teofilina como inibidor das fosfodiesterases (29), é mais potente que a teofilina como antagonista do receptor da adenosina na junção neuromuscular (14) e é mais potente que a teofilina como facilitador da transmissão neuromuscular (25); c) a isobutimetilxantina, um potente inibidor das fosfodiesterases (29, 30) que não se comporta como antagonista do receptor da adenosina na junção neuromuscular de rã (14) não facilita, pelo contrário, inibe a transmissão neuromuscular (25).

INACTIVAÇÃO DA ADENOSINA NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

Dois mecanismos de inactivação da adenosina têm sido propostos: a inactivação enzimática por desaminação em inosina e a recaptação pelas células através de um processo de difusão facilitada (e.g. 20). O primeiro ocorre principalmente no citoplasma, enquanto a adenosina presente no espaço pericelular e em grande parte inactivada por recaptação (19). O inibidor da adenosina deaminase, EHNA, não afecta consideravelmente a transmissão neuromuscular, enquanto o bloqueador da recaptação de adenosina, dipiridamol, inibe a amplitude dos e.p.ps (25). Numa concentração virtualmente desprovida de efeito na amplitude dos e.p.ps, o dipiridamol potencia a acção inibitória da adenosina na transmissão neuromuscular, mas não afecta a acção inibitória da 2-cloroadenosina (25), um análogo da adenosina dificilmente captado pelas células (e.g. 31). Estes resultados sugerem que a inactivação da adenosina na junção neuromuscular se processa por recaptação.

CONTRIBUIÇÃO DO ATP PARA OS NÍVEIS DE ADENOSINA ENDOGENA EXTRACELULAR QUE MODULA A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR

O α , β -metileno ATP, um análogo do ATP que não é susceptível de ser metabolizado em adenosina (32) e inactivo na transmissão neuromuscular, enquanto que o β , γ -metileno ATP, que é metabolizado em adenosina, imita a acção inibitória deste nucleósido na transmissão neuromuscular (25). Estes factos, tomados em conjunto com a observação de que a adenosina é equipotente com o ATP a inibir a transmissão neuromuscular (4), sugerem que o efeito inibitório do ATP na transmissão neuromuscular depende da sua hidrólise prévia em adenosina, sendo o ATP rapidamente metabolizado em adenosina no meio extracelular. A apoiar esta ideia estão também as observações de que o α , β -metileno ADP, um inibidor da 5'-nucleotidase (33) previne o efeito inibitório do ATP na transmissão neuromuscular e aumenta a amplitude dos e.p.ps (25).

Se o ATP é hidrolisado em adenosina na junção neuromuscular, é provável que o ATP libertado ao nível da fenda sináptica quer pré-sinápticamente (1) quer pós-sinápticamente em consequência da contracção muscular (2) contribua para os níveis de adenosina endógena que modulam a transmissão neuromuscular.

O aumento causado pelo α , β -metileno ADP na amplitude de e.p.ps de preparações curarizadas é cerca de 49% do aumento causado pela adenosina desaminase nas mesmas condições experimentais (25). Se o efeito excitatório do α , β -metileno ADP na transmissão neuromuscular resulta da sua propriedade inibitória da 5'-nucleotidase, pode-se estimar que os nucleótidos da adenosina presentes endogenamente na fenda sináptica contribuem pelo menos com 40% a 50% para os níveis de adenosina endógena que modula a transmissão neuromuscular (25). Este valor poderá ser subestimado se nem toda a actividade ecto-5'-nucleotidásica estiver inibida pelo α , β -metileno ADP (cf. 34, 35).

CONCLUSÕES

Em conclusão, o facto de a adenosina desaminase e os antagonistas do receptor da adenosina na junção neuromuscular terem um efeito excitatório, e de o bloqueador da recaptação da adenosina, dipiridamol, ter um efeito inibitório na transmissão neuromuscular, sugerem que ao nível da junção neuromuscular existe endogenamente adenosina em quantidades suficientes para inibir tonicamente a transmissão neuromuscular e que a adenosina endógena é inactivada por recaptação. Os resultados obtidos com o α , β -metileno ADP indicam que o ATP pode contribuir com pelo menos 40% a 50% para a reserva de adenosina endógena que modula a transmissão neuromuscular. Pode, portanto, deduzir-se que outra substância além da acetilcolina, a adenosina, existe endogenamente ao nível da junção neuromuscular participando nos processos de transmissão que aí decorrem, com a seguinte sequência funcional: libertação de ATP para a fenda sináptica; sua metabolização em adenosina, que inibe tonicamente a transmissão neuromuscular, constituindo este processo um mecanismo de regulação da contractilidade muscular. Em condições em que a transmissão neuromuscular esteja parcialmente inibida quer pré-juncionalmente, no caso de síndromas miasténicos, quer pós-juncionalmente, no caso da miastenia gravis, a modulação causada pela adenosina poderá constituir um factor de agravamento de tais situações.

SUMMARY

In conditions in which the initial quantal content is assumed to be low or normal, endogenous adenosine inhibits neuromuscular transmission and in this way regulates indirectly muscle contractility. This nucleoside is inactivated at the neuromuscular junction through a dipyridamole-sensitive uptake process. Released adenine nucleotides, in particular ATP, after being hydrolysed by ecto-5'-nucleotidase, might contribute to the pool of endogenous adenosine which modulates neuromuscular transmission. The finding that another endogenous agent, besides acetylcholine, is involved in neuromuscular transmission, together with the possibility of interfering with the levels of this neuromodulator, might contribute to understand the physiopathology of some neuromuscular dysfunctions, namely myasthenic syndromes and myasthenia gravis.

BIBLIOGRAFIA

1. SILINSKY, E.M. On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol. Lond.* 247:145-163, 1975.
2. FORRESTER, T. An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising muscle. *J. Physiol. Lond.* 224:611-628, 1972.
3. RIBEIRO, J.A. and WALKER, J. Action of adenosine triphosphate on endplate potentials recorded from muscle fibres of the rat-diaphragm and frog sartorius. *Br. J. Pharmacol.* 49:724-725, 1973.
4. RIBEIRO, J.A. and WALKER, J. The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *Br. J. Pharmacol.* 54:213-218, 1975.
5. RIBEIRO, J.A. ATP; related nucleotides and adenosine on neuromuscular transmission. *Life Sci.* 22:1373-1380, 1978.
6. PHILLIS, J.W. and WU, P.H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* 16:187-239, 1981.
7. STONE, T.W. Physiological roles for adenosine and adenosine 5'-triphosphate in the nervous system. *Neuroscience* 6: 523-555, 1981.
8. RIBEIRO, J.A., SÁ-ALMEIDA, A.M. and NAMORADO, J.M. Adenosine and adenosine triphosphate decrease ^{45}Ca uptake by synaptosomes stimulated by potassium. *Biochem. Pharmacol.* 28:1297-1300, 1979.
9. WU, P.H., PHILLIS, J.W. and THIERRY, D.L. Adenosine receptor agonists inhibit K^+ -evoked Ca^{2+} uptake by rat brain cortical synaptosomes. *J. Neurochem.* 39:700-708, 1982.
10. SILINSKY, E.M. On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of acetylcholine from motor nerve terminals. *J. Physiol. Lond.* 346:243-256, 1984.
11. DOLPHIN, A. C., FORDA, S. R. and SCOTT, R. H. Calcium dependent currents in cultured dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J. Physiol. Lond.* 373:47-61, 1986.
12. MacDONALD, R.L., SKERRITT, J.H. and WERZ, M.A. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J. Physiol. Lond.* 370: 75-90, 1986.
13. GINSBORG, B.L. and HIRST, G.D.S. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J. Physiol. Lond.* 224:629-645, 1972.
14. RIBEIRO, J.A. and SEBASTIÃO, A.M. On the type of receptor involved in the inhibitory action of adenosine at the neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 84:911-918, 1985.
15. RIBEIRO, J.A. and SEBASTIÃO, A.M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A_3) adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* 26:179-209, 1986.
16. RIBEIRO, J.A. The modulation of transmission by purinergic substances at the neuromuscular junction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 377:874-876, 1981.
17. RIBEIRO, J.A. The decrease of neuromuscular transmission by adenosine depends on previous neuromuscular depression. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 255:59-67, 1982.
18. CULL-CANDY, S.G., MILEDI, R. and TRAUTMAN, A. End-plate currents and acetylcholine noise at the normal and myasthenic human endplates. *J. Physiol. Lond.* 287:247-265, 1979.

19. ARCH, J.R.S. and NEWSHOLME, E.A. The control of metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays in Biochem.* 14:82-123, 1978.
20. WU, P.H. and PHILLIS, J.W. Uptake by central nervous tissues as a mechanism for the regulation of extracellular adenosine concentrations. *Neurochem. Int.* 6:613-632, 1984.
21. NAGY, A., SHUSTER, T.A. and ROSENBERG, M.D. Adenosine triphosphatase activity at the external surface of chicken brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 40:226-234, 1983.
22. KELLER, F. and ZIMMERMANN, H. Ecto-adenosine triphosphatase activity at the cholinergic nerve endings of the Torpedo electric organ. *Life Sci.*33:2635-2641, 1983.
23. KREUTZBERG, G.W., HEYMANN, D. and REDDINGTON, M. In *Cellular Biology of Ectoenzymes*, G. W. Kreutzberg, M. Reddington and H. Zimmermann (editors), Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 147-164.
24. SEBASTIÃO, A.M. and RIBEIRO, J.A. Enhancement of transmission at the frog neuromuscular junction by adenosine deaminase: evidence for an inhibitory role of endogenous adenosine on neuromuscular transmission. *Neurosci. Letts* 62, 267-270, 1985.
25. RIBEIRO, J.A. and SEBASTIÃO, A.M. On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* 384:0-00, 1987 (in the press).
26. SALPETER, M. M. and ELD EFRAWI, M.E. Sizes of end-plate compartments, densities of acetylcholine receptor and other quantitative aspects of neuromuscular transmission. *J. Histochem. Cytochem.* 21:769-778, 1973.
27. GOLDBERG, A.L. and SINGER, J.J. Evidence for a role of cyclic AMP in neuromuscular transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64: 134-141, 1969.
28. WILSON, D.F. The effects of dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-mono phosphate, theophylline and aminophylline on neuromuscular transmission in the rat. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 188:447-452, 1974.
29. SMELLIE, F.W., DAVIS, C.W., DALY, J.W. and WELLS, J.N. Alkylxanthines: inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sci.* 24:2475-2482, 1979.
30. WU, P.H., PHILLIS, J.W. and NYE, M.J. Alkylxanthines as adenosine receptor antagonists and membrane phosphodiesterase inhibitors in the central nervous tissue. *Life Sci.* 31:2857-2867, 1982.
31. DALY, J.W. In *Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives*, J.W. Daly, Y. Kuroda, J.W. Phillis, H. Shimizu and M. Ui (editors), Raven Press, New York, 1983, pp. 275-279.
32. YOUNT, R.G. ATP analogs. *Adv. Enzymol.* 43:1-56, 1975.
33. BURGER, R.M. and LOWENSTEIN, J.M. Preparation and properties of 5'-nucleotidase from smooth muscle of small intestine. *J. Biol. Chem.* 245:6274-6280, 1970.
34. FREDHOLM, B.B., JONZON, B. LINDGREN, E. and LINDSTROM, K. Adenosine receptors mediating cyclic AMP production in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 39:165-175, 1982.
35. MacDONALD, W.F. and WHITE, T.D. Nature of extrasynaptosomal accumulation of endogenous adenosine evoked by potassium and veratridine. *J. Neurochem.* 45:791-797, 1985.