

Agradecimentos

Ao Doutor Rodrigo Cunha, pela orientação e pela oportunidade de completar mais um importante ciclo.

À minha família (pais, mano, avô), pela paciência, compreensão e acima de tudo pela força.

À minha namorada pela companhia, pelo encorajamento e pelas críticas que tanto ajudaram.

Aos amigos da Irmandade do Bôda (a todos!) e do LEF (sim, amigos do LEF!).

À minha avó, que de certeza me ajudou a ser o que sou hoje.

Index

Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Abbreviations.....	vi
Introduction.....	1
Goals.....	12
Materials and Methods.....	14
Results.....	19
1. Control of [³H] dopamine uptake by A_{2A} receptors.....	20
1.1. Effect of an A_{2A} receptor agonist in dopamine uptake.....	20
1.2. Pharmacological characterization of CGS21680-induced facilitation of dopamine uptake	21
2. Immunocytochemistry studies.....	22
2.1. Purity of the nerve terminals from the striatum and pre-frontal cortex.....	22
2.2. Localization of A_{2A} receptors in striatal and pre-frontal cortical nerve terminals.....	27
2.3. Localization of dopamine transporter DAT in striatal and pre-frontal cortical nerve terminals.....	29

2.4. Co-localization between DAT and A_{2A} receptors in pre-frontal cortical and striatal nerve terminals.....	31
Discussion.....	35
Conclusion.....	39
References.....	42

Resumo

A adenosina, um metabolito do ATP, é um modulador endógeno que regula muitas funções do sistema nervoso central e cujos efeitos são mediados pela ligação a quatro receptores acoplados a proteínas G distintos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 . Um dos objectivos deste estudo foi investigar a participação dos receptores excitatórios A_{2A} no controlo da captação de dopamina em terminais nervosos do córtex pré-frontal e estriado, usando um agonista dos receptores A_{2A} , o CGS21680 (30nM). Os resultados obtidos mostram que o CGS21680 aumentou a captação de dopamina tanto no estriado como no córtex pré-frontal. Este aumento é mais evidente no estriado, possivelmente devido à maior densidade de receptores A_{2A} de adenosina presentes nesta área do cérebro. O antagonista dos receptores A_{2A} , SCH58621 (50nM), preveniu o efeito facilitatório do CGS21680 na captação de dopamina. Em suma, estes resultados mostram que a captação de dopamina em sinaptossomas estriatais é facilitada pelos receptores A_{2A} de adenosina.

Também foram efectuados estudos de imunocitoquímica, de maneira a documentar a localização dos receptores A_{2A} em terminais dopaminérgicos. Terminais nervosos purificados de receptores A_{2A} e do transportador de dopamina DAT mostram uma co-localização significativa, em terminais nervosos purificados do estriado.

Estudos futuros serão, ainda, necessários para avaliar a contribuição desta modulação para funções dependentes de dopamina controladas pelos receptores A_{2A} , como locomoção, recompensa/viciação e memória executiva.

Abstract

Adenosine, a metabolite of ATP, is an endogenous modulator which regulates many central nervous system (CNS) functions and which effects are mediated by the binding to four distinct G protein-coupled receptors: A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ adenosine receptor subtypes. One of the objectives of this study was to investigate the participation of excitatory A_{2A} receptors in the control of dopamine uptake in nerve terminals of the pre-frontal cortex and striatum, using an A_{2A} receptor agonist, CGS21680 (30 nM). Results showed that CGS21680 enhanced dopamine uptake both in the striatum and pre-frontal cortex. This increase is more evident in the striatum, possibly due to the greater density of A_{2A} receptors present in this area of the brain. The A_{2A} receptor antagonist, SCH58261 (50 nM), prevented the facilitatory effect of CGS21680 on dopamine uptake. Altogether these results show that dopamine uptake in striatal synaptosomes is facilitated by the A_{2A} adenosine receptors.

Immunocytochemistry studies were also conducted, in order to document the co-localization of A_{2A} receptors in dopaminergic terminals. Purified nerve terminals of A_{2A} receptors and dopamine transporter DAT show a significant co-localization in purified nerve terminals of the rat striatum.

Further studies will be required to evaluate the contribution of this modulation for dopamine-dependent function controlled by A_{2A} receptors, such as locomotion, rewarding/addiction and executive memory.

Abbreviations

[³H]Dopamine – Tritium radiolabelled dopamine

AMPA – α -amino-2, 3-dihydro-5-methyl-3-oxo-isoxazolepropanoic acid

ATP – Adenosine triphosphate

BSA – Bovine Serum Albumin

cAMP – cyclic Adenosine monophosphate

CCPA - 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine

CGS21680 - 2-*p*-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine

COMT – Catechol-O-methyl transferase

DARPP-32 - dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32000 kDa

DPCPX - 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

DPM – desintegrations per minute

FRET – Fluorescence resonance energy transfer

GBR12783 - 1-[2-(Diphenylmethoxy)ethyl]-4-(3-phenylpropyl)piperazine

dihydrochloride

GPCRs – G-protein coupled receptors

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPC – Hippocampus

KW6002 - (E)-1,3-diethyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methyl-3,7-dihydro-1H-purine-

2,6-dione

NAcc – Nucleus accumbens

NMDA – N-methyl-D-aspartate

PFC – Pre-frontal cortex

PKC – Protein kinase C

PSD-95 – Postsynaptic density protein 95 kDa

SCH58261 - 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine

ST - Striatum

SNAP-25 – Synaptosome-associated protein of 25 kDa

VMAT – Vesicular monoamine transporter

VTA – Ventral tegmental area