



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química

**Ano 2010**

**Diana Vanessa Arcanjo  
Pinho**

**Modulação Purinérgica da Transmissão  
Noradrenérgica no Córtex Cerebral**



Universidade de Aveiro Departamento de Química

Ano 2010

**Diana Vanessa Arcanjo  
Pinho**

**Modulação Purinérgica da Transmissão  
Noradrenérgica no Córtex Cerebral**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica ramo Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria da Glória Correia da Silva Queiroz, Professora Associada da Faculdade de Farmácia do Porto e sob a co-orientação do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais e família por tornarem esta caminhada bem mais fácil.

Aos meus avós, que jamais serão esquecidos.

**O júri**

Presidente

**Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**

Professor Associado do Departamento de Química  
Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Manuela Sofia Rodrigues Morato**

Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia  
Universidade do Porto

**Prof. Doutora Maria da Glória Correia da Silva Queiroz**

Professora Associada da Faculdade de Farmácia  
Universidade do Porto

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**

Professor Auxiliar do Departamento de Química  
Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, Professora Doutora Maria da Glória Correia da Silva Queiroz e Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues pela oportunidade de realização deste trabalho e pelas portas que me abriram no mundo da investigação, destaco também toda a disponibilidade demonstrada pela minha orientadora e tolerância perante os meus erros, assim como a preciosa ajuda para a elaboração desta tese.

Ao Professor Doutor Carlos Pascoal de Neto agradeço os seus conselhos e incentivo para este trabalho.

Ao Professor Doutor Francisco Manuel Lemos Amado agradeço a sua disponibilidade.

A minha gratidão também as técnicas Céu e Mónica do Laboratório de Farmacologia da FFUP, que me ajudaram sempre que precisei e pela sua boa disposição o que tornou os dias alegres.

Agradeço também à Dra. Clara Quintas do Laboratório de Farmacologia da FFUP, por todo apoio, ajuda incondicional e paciência que teve para comigo ao longo deste ano.

À Renata que me acompanhou no Laboratório ao longo deste ano, pela sua amizade um muito obrigado.

Aos meus pais e família, porque sem eles tudo teria sido mais difícil. Em particular, agradeço profundamente aos meus pais pela confiança depositada em mim, pelo seu apoio incondicional e por me ajudarem a não desistir dos meus objectivos.

Para finalizar, agradeço incomensuravelmente ao Nuno por toda a sua paciência e compreensão para comigo, pela sua confiança e carinho demonstrado ajudando nos momentos mais difíceis e por tudo o que nunca caberia em todas as folhas de papel do Universo, um muitíssimo obrigado.

**Palavras-chave** transmissão noradrenérgica; noradrenalina; ATP; receptores P2Y; adenosina; receptores P1

**Resumo** No córtex cerebral de rato, a libertação de noradrenalina (NA) pode ser desencadeada por activação de neurónios que se projectam a partir do *locus coeruleus* ou então por activação local dos receptores NMDA do glutamato. Ambos os processos são regulados por nucleótidos como o ATP, através da activação de receptores P2Y, embora os subtipos de receptores P2Y envolvidos ainda não tenham sido identificados. O ATP desempenha igualmente um papel importante na captação de NA pelos astrócitos e na comunicação neurónio-astrócito em sinapses noradrenérgicas e uma desregulação na transmissão noradrenérgica pode contribuir para várias patologias como as perturbações do humor (depressão, doença bipolar, mania, ansiedade) e as doenças neurodegenerativas. O objectivo deste estudo consistiu na caracterização dos receptores P2Y envolvidos na regulação da transmissão noradrenérgica no córtex cerebral de Rato, através do estudo do efeito de vários agonistas purinérgicos e da sua interacção com antagonistas selectivos, na modulação da libertação de NA induzida por estimulação eléctrica (100 pulsos a 5 Hz) em fatias de córtex, e na captação de NA em culturas primárias de astrócitos. Os nucleótidos ATP, ADP, ADP $\beta$ S, UTP, UDP inibiram a libertação de NA até 58% com a seguinte ordem de potência: ADP  $\geq$  ATP > ADP $\beta$ S > UTP  $\geq$  UDP. O efeito inibitório do ADP (0,3 mM) e do ADP $\beta$ S (0,3 mM) foram ambos bloqueados pelos antagonistas selectivos dos receptores A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub>, DPCPX (0,1  $\mu$ M) e MRS 2500 (1  $\mu$ M), respectivamente. Os efeitos inibitórios do UTP (1 mM) e UDP (1 mM) foram ambos antagonizados pelo MRS 2578 (1  $\mu$ M) que é um antagonista selectivo para os receptores P2Y<sub>6</sub>. Ao contrário do ADP (0,3 mM), o efeito do ADP $\beta$ S (0,3 mM) não foi modificado pela desaminase da adenosina (ADA, 2U/ml), excluindo um papel da adenosina nos efeitos antagonizados pelo DPCPX (0,1  $\mu$ M). No entanto o efeito do ADP $\beta$ S foi abolido pela combinação de DPCPX (0,1  $\mu$ M) e MRS 2500 (1  $\mu$ M), sugerindo parte do efeito inibitório deste agonista na libertação de NA poderá ser mediada por heterodímeros A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub>. Nas culturas de astrócitos, os agonistas ADP $\beta$ S (0,1 mM), UDP (1 mM) e CGS 21680 (0,1  $\mu$ M) aumentaram captação de NA até 117 %. O efeito do ADP $\beta$ S (0,1 mM) foi antagonizado pelo MRS 2500 (0,1  $\mu$ M) e pelo antagonista selectivo dos receptores P2Y<sub>12</sub> AR-C66096 (10  $\mu$ M). O efeito do UDP (1 mM) foi atenuado pelo MRS2578 (1  $\mu$ M) e o efeito facilitatório do CGS 21680 (0,1  $\mu$ M) na captação de NA foi atenuado pelo antagonista selectivo dos receptores A<sub>2A</sub> SCH58261 (30 nM). Em conclusão, os nucleótidos inibem a libertação de NA por activação de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, A<sub>1</sub> e possivelmente heterodímeros A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub>. Também aumentam a captação de NA pelos astrócitos através da activação de receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>6</sub> e A<sub>2A</sub>, em ambos os casos conduzindo a uma inibição da transmissão noradrenérgica no córtex cerebral.

**Keywords** noradrenergic transmission; noradrenaline; ATP; P2Y receptors; adenosine; P1 receptors

**Abstract** In the rat cerebral cortex, release of noradrenaline (NE) can be triggered by activation of neurons projecting from *locus coeruleus* and by locally released glutamate through activation of NMDA receptors. Both mechanisms are regulated by nucleotides such as ATP, which acts through activation of P2Y receptors; however the subtypes involved have not yet been identified. ATP plays an equally important role in the uptake of NE by astrocytes and in the neuron-astrocyte communication at noradrenergic synapses, with a deregulation of noradrenergic transmission being associated to the pathogenesis of several mood disorders and neurodegenerative diseases. The aim of this thesis was to identify, in the rat brain cortex, the P2Y receptors involved in the regulation of noradrenergic transmission by testing the effect of several purinergic agonists and its interaction with selective antagonists in NE release, evoked by electrical field stimulation (100 pulses at 5 Hz) of cortical brain slices, and in NE uptake by primary cultures of cortical astrocytes.

The nucleotides ATP, ADP, ADP $\beta$ S, UTP and UDP caused an inhibition of NE release up to 58% with the following order of potency: ADP $\geq$ ATP > ADP $\beta$ S > UTP  $\geq$  UDP. The inhibitory effect of ADP (0,3 mM) and ADP $\beta$ S (0,3 mM) were both attenuated by the selective antagonists of A<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors, DPCPX (0,1  $\mu$ M) and MRS 2500 (1  $\mu$ M), respectively. The inhibitory effects of UTP (1 mM) and UDP (1 mM) were antagonized by MRS 2578 (1  $\mu$ M) which is a selective P2Y<sub>6</sub> receptor antagonist. Unlike the effect of ADP (0,3 mM), the effect of ADP $\beta$ S (0,3 mM) was not changed by the adenosine deaminase, excluding the participation of adenosine on the effects antagonized by DPCPX (0,1  $\mu$ M). However, the effect of ADP $\beta$ S was abolished by DPCPX (0,1  $\mu$ M) in combination with MRS 2500 (1  $\mu$ M), suggesting that a component of the inhibitory effect of this agonist in the NA release could be mediated by A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub> heterodimers.

In primary astrocyte cultures, the agonists ADP $\beta$ S (0,1 mM), UDP (1 mM) and CGS 21680 (0,1  $\mu$ M) all increased NE uptake up to 117 %. The effect of ADP $\beta$ S (0,1 mM) was almost abolished by MRS 2500 (0.1  $\mu$ M) and was also attenuated by the P2Y<sub>12</sub> antagonist AR-C66096 (10  $\mu$ M) whereas the effect of UDP (1 mM) was attenuated by MRS 2578 (1  $\mu$ M) and the facilitatory effect of CGS 21680 (0,1  $\mu$ M) on NE uptake was reduced by the selective antagonist of A<sub>2A</sub> receptors SCH 58261 (30 nM).

In conclusion, the nucleotides tested inhibited NE release evoked by electrical stimulation through activation of P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, A<sub>1</sub> receptors and eventually A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub> heterodimers. Additionally, they increased NA uptake by astrocytes upon activation of P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>6</sub> e A<sub>2A</sub> receptors, in both cases leading to an inhibition of the noradrenergic transmission in the rat brain cortex.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
	<b>Página</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1. Transmissão Noradrenérgica no SNC</b>	<b>2</b>
1.1 Síntese, armazenamento e metabolismo de noradrenalina	<b>3</b>
1.2 Vias neuronais noradrenérgicas	<b>5</b>
1.3 Receptores adrenérgicos	<b>5</b>
1.3.1 Receptores $\alpha$ -adrenérgicos	<b>6</b>
1.3.2 Receptores $\beta$ -adrenérgicos	<b>6</b>
1.4 Funções do sistema noradrenérgico no SNC	<b>7</b>
<b>2. Papel dos Nucleótidos na Comunicação Celular</b>	<b>8</b>
2.1 Purinas e neuromodulação: perspectiva histórica	<b>8</b>
2.2 O ATP como neurotransmissor e co-transmissor	<b>9</b>
2.3 Mecanismos de libertação de ATP	<b>10</b>
2.4 Receptores purinérgicos	<b>11</b>
2.4.1 Receptores da Adenosina	<b>11</b>
2.4.2 Receptores P2X	<b>12</b>
2.4.3 Receptores P2Y	<b>13</b>
2.5 Metabolismo do ATP e outros nucleótidos	<b>14</b>
2.6 Papel do ATP na comunicação neurónio-astrócito	<b>15</b>
<b>3. Modulação Purinérgica da Libertação de Noradrenalina no SNC</b>	<b>17</b>

---



	<b>Página</b>
<b>OBJECTIVOS DO TRABALHO</b>	<b>19</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>21</b>
1. Condições experimentais	22
2. Ensaio de libertação de NA	22
3. Avaliação do efeito dos fármacos na libertação de NA	25
4. Preparação de culturas primárias de astrócitos	25
5. Ensaio de captação de [ <sup>3</sup> H]-NA em culturas de astrócitos	26
6. Análise estatística dos resultados	27
7. Fármacos utilizados	28
<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
1. Efeito da estimulação eléctrica na libertação de NA	30
2. Caracterização de libertação de NA induzida por EE: influência dos receptores do glutamato	32
3. Efeito dos nucleótidos na libertação de NA: influência dos receptores A <sub>1</sub>	34
4. Caracterização farmacológica dos receptores P2Y envolvidos na inibição da libertação de NA	37
5. Contribuição dos heterodímeros A <sub>1</sub> /P2Y <sub>1</sub> na modulação da libertação de NA	42
6. Captação astrogliar de NA: influência dos receptores purinérgicos	44
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>61</b>

---

## ABREVIATURAS

[<sup>3</sup>H]-NA = levo-[2,5,6-<sup>3</sup>H]-noradrenalina

AC = adenilciclase

ADA = desaminase da adenosina

ADP = Adenosina-5'-difosfato

AMP = Adenosina-5'-monofosfato

AMPc = Adenosina-5'-monofosfato ciclico

ATP = Adenosina-5'-trifosfato

COMT = Catecol-*O*-metiltransferase

DAG= diacilglicerol

Ecto-5'-NT= Ecto-5'-nucleotidase

E-NPPs = Ecto-nucleótido-5'- pirofosfatases

E-NTPDases = Ecto-nucleótido-5'- trifosfato difosfohidrolases

GFAP = Glial fibrillary acidic protein = proteína fibrilar acidica dos astrócitos

IP<sub>3</sub> = inositol-(1,4,5)-trifosfato

L-DOPA= L-dihidroxifenilalanina

LC= *locus coeruleus*

LPT = “long-term potentiation” ou potenciação de longa duração

MAO = Monoamino oxidase

NA = Noradrenalina

NET= Transportador neuronal de monoaminas

NMDA = *N*-metil-*D*-aspartato

NTVL= núcleo tegmental ventral lateral

PA = fosfatase alcalina

PKA = cinase da proteína A

PKC= cinase da proteína C

SNC = Sistema Nervoso Central

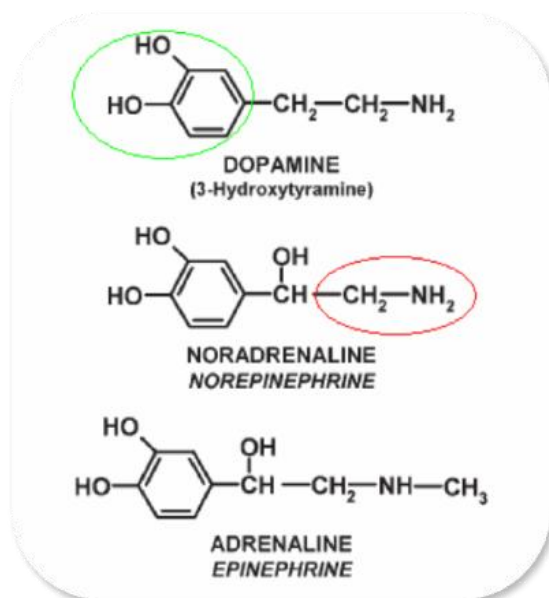
SNP = Sistema Nervoso Periférico

SNS = Sistema Nervoso Simpático

# INTRODUÇÃO

## 1. Transmissão Noradrenérgica no Sistema Nervoso Central

O conceito de “amina biogénica” foi aplicado durante décadas para definir um conjunto de neurotransmissores que incluía a família das catecolaminas que incluem: a dopamina, a noradrenalina e a adrenalina (Fig. 1). Estes neurotransmissores exercem um papel extremamente importante na fisiologia do sistema nervoso [1,2] e na fisiopatologia de diversas doenças [3,4].

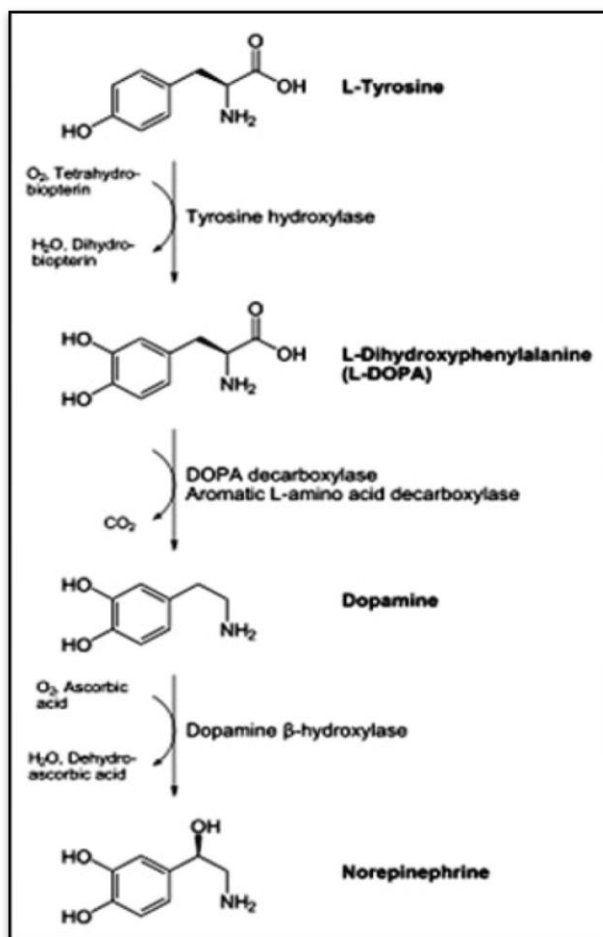


**Fig.1** As principais catecolaminas existentes no organismo humano são constituídas por um anel benzóico 3,4-dihidroxiado (*grupo catecol*; assinalado a verde) e a uma cadeia lateral constituída por um *grupo amina* (assinalado vermelho) [2].

A noradrenalina exerce um papel de grande importância no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). No SNP é responsável pela transmissão das mensagens do sistema nervoso simpático (SNS) que controla todos os órgãos do corpo, especialmente a resposta de “luta ou fuga” em situações de stress [2]. No SNC, a noradrenalina é importante na regulação do comportamento, humor, memória, atenção, cognição, regulação do sono e dos estados de alerta [5,6]. A desregulação de alguns circuitos neuronais noradrenérgicos está na base de várias desordens afectivas [7,8].

## 1.1 Síntese, armazenamento e metabolismo de noradrenalina

A síntese de noradrenalina no SNC ocorre em terminais nervosos de neurónios que se localizam no tronco cerebral [9]. Uma vez sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas, que a libertam quando o potencial de acção atinge os terminais neuronais, ocorrendo fusão das vesículas com a membrana através de um processo designado por exocitose. A biossíntese da noradrenalina (NA) envolve várias etapas enzimáticas (Fig.2).

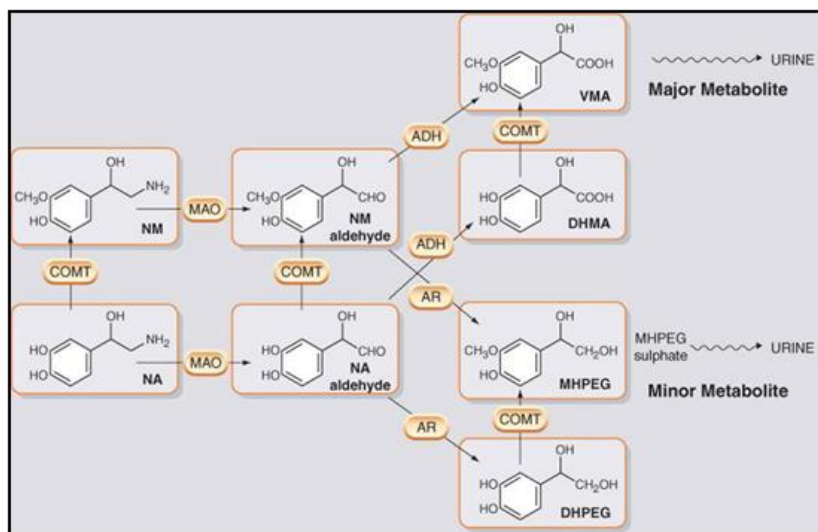


**Fig.2.** Biossíntese da noradrenalina nos neurónios [10]. Na 1ª etapa da síntese de NA, o seu precursor, a tirosina é convertido e em L-dihydroxifenilalanina (L-DOPA) por acção da tirosina hidroxilase, sendo esta a etapa limitante na síntese de NA. A tirosina hidroxilase é uma enzima que requer ferro, oxigénio molecular e tetraidrobiopterina como cofactores. Na 2ª etapa, a L-DOPA sofre descarboxilação por acção da DOPA descarboxilase obtendo-se dopamina e  $CO_2$ . A etapa final consiste captação da dopamina para dentro de vesículas sendo convertida em NA, por acção da enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase. Esta etapa final de síntese da NA ocorre nas vesículas sinápticas onde esta enzima se localiza. [11]

Grande parte da NA que se encontra nos terminais nervosos está armazenada em vesículas e apenas uma pequena fracção localiza-se no citoplasma com concentrações aproximadas de 0.3-1 M. Em algumas vesículas sinápticas verifica-se o armazenamento de NA com o ATP ou neuropeptídeo Y que podem actuar como co-transmissores. Estas vesículas de armazenamento contêm ainda uma proteína designada por cromogranina [10].

Após a sua libertação para a fenda sináptica, os efeitos da NA como neurotransmissor terminam com a sua remoção da fenda por processos de difusão ou por recaptação para dentro dos terminais nervosos ou das células da vizinhança onde pode sofrer degradação enzimática. Os processos de recaptação são classificados em tipo 1 e 2. A recaptação do tipo 1 promove a entrada de NA para o neurónio e é responsável pela remoção de cerca de 75% da NA libertada. Neste mecanismo está associado o transportador de NA (NET), este transportador tem elevada afinidade para a NA. Este mecanismo actua em colaboração com o transportador vesicular de monoaminas no reaproveitamento da NA recaptada pelos neurónios [10].

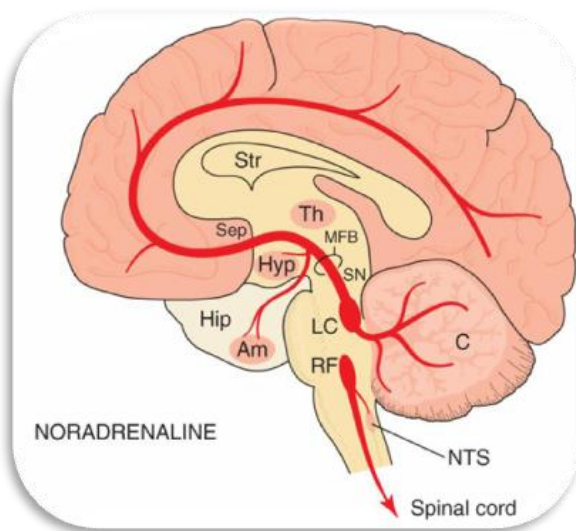
O sistema de recaptação do tipo 2 opera noutras células da vizinhança como os astrócitos ou outras células gliais presentes no SNC, sendo responsável por remover cerca de 25% da NA libertada para a fenda sináptica. Estudos recentes indicaram que os astrócitos, para além de expressarem o transportador do tipo 2 expressam também o transportador do tipo 1 [12]. A NA após recaptação para o terminal nervoso pode entrar para vesículas sendo reaproveitada, ou pode ser degradada pela enzima monoaminoxidase (MAO; Fig 3) que se encontra ligada à membrana externa das mitocôndrias [10].



**Fig.3** Principais vias de metabolização da NA. A MAO oxida a NA resultando na formação de um aldeído que é convertido em ácidos carboxílicos por acção da aldeído redutase (AR) e da aldeído desidrogenase (ADH). A catecol-*O*-metil-transferase (COMT) também participa no metabolismo da NA. Esta enzima tem uma localização citoplasmática e a sua acção consiste na metilação de um dos grupos hidroxilo do núcleo catecol, com produção de um derivado metoxi [10,13].

## 1.2 Vias neuronais noradrenérgicas

Os neurónios noradrenérgicos centrais têm o seu corpo celular localizado no tronco cerebral em dois núcleos: o principal que é o *locus coeruleus* (LC) e o núcleo tegmental ventral lateral (NTVL) [9]. O LC contém cerca de metade do total de neurónios noradrenérgicos existentes no tronco cerebral, os restantes encontram-se no NTVL distribuídos difusamente. A partir do LC e do NTVL os neurónios noradrenérgicos projectam-se de uma forma difusa para várias regiões. Os neurónios do NTVL, possuem axónios com densas arborizações terminais e projectam-se para a medula espinal, tálamo, tronco cerebral, córtex cerebral e córtex cerebelar. Os neurónios do LC também se projectam para diferentes áreas do SNC (Fig. 4).



**Fig.4** Vias noradrenérgicas com origem no LC e respectivas projecções no SNC. Estes neurónios possuem: ramificações axonais descendentes para a medula espinal e tronco cerebral; ramificações ascendentes para o diencéfalo, cerebelo, núcleo amigdalóide, hipocampo e córtex cerebral [9,14].

## 1.3 Receptores adrenérgicos

É através da activação de receptores de membrana designados de receptores noradrenérgicos que a NA exerce as suas funções. Existem dois subtipos de receptores  $\alpha$  ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), e três subtipos de receptores  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ). Todos os receptores adrenérgicos são tipo metabotrópico encontrando-se acoplados a uma proteína G [10].

### 1.3.1 Receptores $\alpha$ -adrenérgicos

Os receptores do subtipo  $\alpha_1$  podem ser encontrados em vários órgãos à periferia que contêm músculo liso onde causam contração muscular, excepto no músculo liso intestinal onde causam relaxamento e o fígado onde potenciam a glicogenólise [10,13]. No cérebro podem ser encontrados no cerebelo, no LC, córtex cerebral e hipocampo [9]. Conhecem-se 3 subtipos de receptores  $\alpha_2$ :  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$  [15]. A maior relevância dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos reside no facto de se encontrarem expressos nos terminais nervosos adrenérgicos onde desempenham um papel regulador da libertação de NA, sendo por isso designados de autorreceptores  $\alpha_2$  [16]. Os três subtipos de receptores  $\alpha_2$  são responsáveis por mediar um feedback negativo em neurónios do SNS enquanto no SNC apenas os subtipos  $\alpha_{2A}$  e  $\alpha_{2C}$  estão envolvidos [17]. Os receptores  $\alpha_2$  são também encontrados em terminais nervosos não-adrenérgicos regulando a libertação de outros neurotransmissores [18] ou a acção de outros mensageiros que também participam na modulação da libertação de neurotransmissores, sendo neste caso designados de heterorreceptores [19].

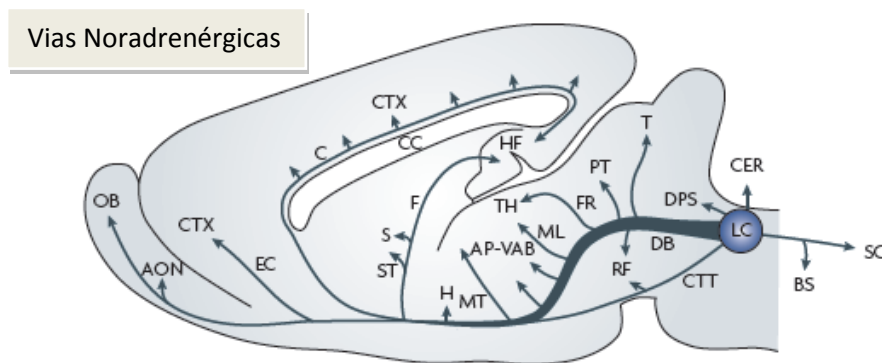
### 1.3.2 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Foram identificados 3 subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Os receptores do subtipo  $\beta_1$  encontram-se localizados no coração onde medeiam o aumento da frequência e força cardíacas; os receptores do subtipo  $\beta_2$  encontram-se no músculo liso dos vasos sanguíneos, onde causam relaxamento do muscular que resulta em vasodilatação e no músculo liso dos brônquios onde causam broncodilatação. Podem também ser expressos no músculo liso de vários outros órgãos do SNP onde causam relaxamento muscular [10,13]. Estão ainda presentes nos terminais de neurónios adrenérgicos, conduzindo ao aumento da libertação de NA [20]. No SNC ambos os subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  estão presentes no córtex cerebral e no cerebelo [13]. Os receptores do tipo  $\beta_3$  encontram-se fundamentalmente no músculo-esquelético e tecido adiposo [10,13].



## 1.4 Funções do sistema noradrenérgico no SNC

A NA é libertada no neocórtex após activação de neurónios que têm o seu corpo celular localizado no LC em resposta a diversos estímulos que podem ser acontecimentos novos ou a estímulos indutores de stress. A presença em particular de projecções de neurónios noradrenérgicos do LC na região cortical (Fig.5) coloca o sistema noradrenérgico central numa posição privilegiada para induzir modificações plásticas a curto e longo prazo que ocorrem durante a aprendizagem, atenção, e funções integrativas do neocórtex [1,5,21].

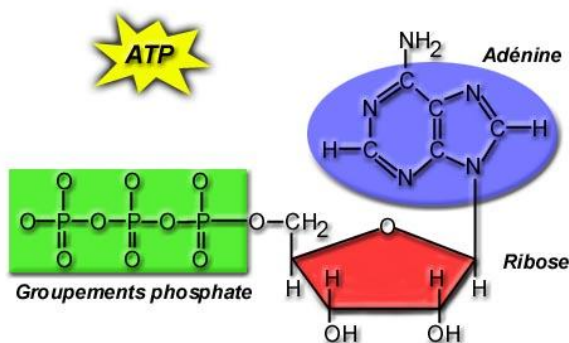


**Fig. 5.** Anatomia das projecções dos núcleos noradrenérgicos incluindo o LC, que contém 1,500 neurónios que se projectam principalmente para o córtex cerebral incluindo a região frontal e todas as regiões sensoriais [6].

Vários processos cognitivos, incluindo a atenção, memória e humor estão associados à transmissão noradrenérgica cortical [21] e os receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  e  $\beta$  são importantes na consolidação da memória a longo prazo [22]. As vias noradrenérgicas centrais influenciam processos que condicionam a sobrevivência e plasticidade neuronal através de: i) produção de neurotrofinas endógenas; ii) regulação dos processos de utilização de energia e iii) exercendo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-nociceptivos [4,6]. A NA desempenha um papel crítico em várias patologias como as perturbações de humor e doenças neurodegenerativas [4,23] sendo de extrema importância aprofundar o conhecimento sobre o modo de funcionamento dos circuitos noradrenérgicos cerebrais e dos mecanismos que regulam transmissão noradrenérgica.

## 2. Papel dos Nucleótidos na Comunicação Celular

O ATP (adenosina-5'-trifosfato; Fig.6) é um nucleótido multifuncional descoberto em 1929 [24]. Pertence à família das purinas e foi identificado como a principal fonte de transferência de energia para as células [25], sendo também utilizado como cofactor enzimático e como unidade estrutural na síntese de ácidos nucleicos.



**Fig. 6** Estrutura química do ATP. Consiste numa base purínica, a adenina, que se encontra ligada ao carbono 1 de uma pentose, a ribose, à qual se ligam a três grupos fosfato no carbono 5 [26]

Para além da sua importância no metabolismo celular, o ATP também actua como mensageiro extracelular, como neurotransmissor e/ou neuromodulador estando envolvido na comunicação neuronal e neurónio-astrocítico [27,28, 29].

### 2.1 Purinas e neuromodulação: perspectiva histórica

As purinas, como o ATP e a adenosina, são moléculas ubiqüitárias que desempenham um papel importante no metabolismo celular e adicionalmente funcionam como mensageiros extracelulares envolvidos na comunicação celular. O efeito da adenosina na libertação de neurotransmissores foi descrito pela primeira vez em 1972 [30] num estudo efectuado na preparação do nervo frénico-diafragma de rato, onde os autores observaram que a adenosina reduzia os potenciais da placa motora e a frequência com que se observavam, um efeito interpretado resultante de uma diminuição da libertação do neurotransmissor acetilcolina.

No mesmo tecido, o ATP e o ADP também causaram uma diminuição da libertação de acetilcolina, sugerindo que estes compostos actuavam por um mecanismo semelhante [31].

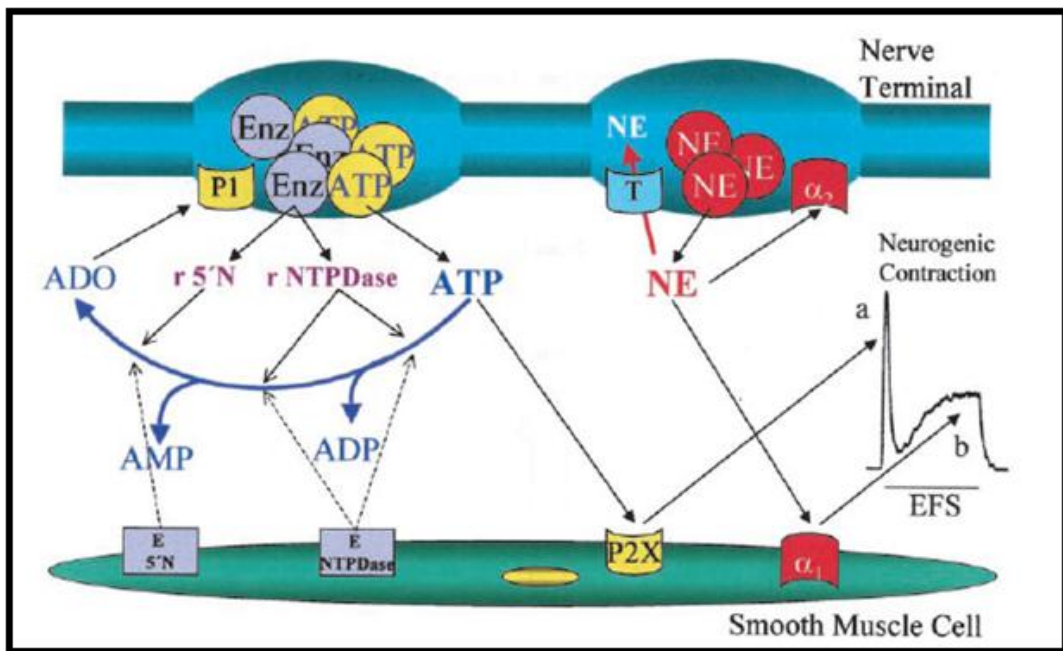
O papel da adenosina como neuromodulador inibitório da libertação de neurotransmissores foi confirmado em muitas outras sinapses no SNP e SNC, sendo esse papel extensível a vários neurotransmissores [29]. No final dos anos 80 do século XX, a adenosina foi finalmente aceite como sendo um neuromodulador inibitório da libertação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, actuando através da activação de receptores  $A_1$ . Subsequentemente, a detecção de efeitos facilitadores da adenosina mediados por receptores  $A_2$  [29] e de efeitos dos nucleótidos mediados por receptores P2 [29,32] veio acrescentar relevância à comunicação purinérgica, nomeadamente ao nível do sistema nervoso, através da descoberta de novos receptores e mecanismos envolvidos nas acções de diversos nucleótidos.

## **2.2 O ATP como neurotransmissor e co-transmissor**

A primeira sugestão de que o ATP poderia actuar como mensageiro extracelular foi proposta na sequência da observação de que a estimulação antidrómica dos neurónios sensitivos induzia a libertação de ATP [33]. A observação de que os neurónios do sistema nervoso autónomo libertavam ATP e de que o ATP facilitava a excitabilidade cortical, efeito este que não era mediado por outras purinas levantou a hipótese de que este nucleótido poderia actuar como neurotransmissor e/ou co-transmissor [34,35].

Após o trabalho persistente de Geoffrey Burnstock e colaboradores nas três décadas seguintes esta proposta inicial foi finalmente confirmada. Vários estudos permitiram concluir que, cada neurónio poderia comunicar recorrendo a vários neurotransmissores dando origem ao conceito de co-transmissão [27].

Este conceito foi em grande parte suportado por estudos efectuados em tecidos inervados por neurónios do SNS [36] como o canal deferente onde foi inequivocamente demonstrada a existência de co-transmissão entre NA e o ATP (Fig. 7) tendo este conceito sido posteriormente verificado em neurónios do SNC [37].



**Fig. 7** Representação esquemática da co-transmissão entre a NA e o ATP no canal deferente de Cobaio [36].

### 2.3 Mecanismos de libertação de ATP

O ATP é uma molécula altamente polarizada e não atravessa a membrana celular livremente. Nos neurónios o ATP é armazenado em vesículas sinápticas dos terminais nervosos sendo libertado para fenda sináptica por exocitose das vesículas, um processo que é dependente do  $Ca^{2+}$  e regulado por proteínas sinápticas [38,39].

Estudos recentes demonstraram que no SNC as células gliais também libertam ATP e outros nucleótidos em resposta a diversos estímulos e por vários mecanismos que incluem: exocitose de vesículas; canais de cloro, canais regulados pelo volume, transportadores do tipo “ATP binding cassette proteins”; hemicanais formados de conexinas ou panexinas, receptores P2X<sub>7</sub> ou dano da membrana celular [40,41].

O ATP libertado em caso de lesão parece desempenhar um papel importante no início da resposta inflamatória e na delimitação da área lesionada desencadeando e/ou potenciando o processo de astrogliose reactiva [42,43].

## 2.4 Receptores purinérgicos

Os efeitos do ATP e de outros nucleótidos e nucleósidos são mediados por um conjunto de receptores inicialmente designados de purinérgicos e foram divididos em duas classes: os receptores P1 que eram activados pela adenosina e bloqueados pelas metilxantinas e os receptores P2 nos quais os ATP e outros nucleótidos eram mais potentes e os efeitos não eram antagonizados pelas metilxantinas [44].

Os receptores P2 foram posteriormente subdivididos em 2 grupos, P2X e P2Y, de acordo com os perfis farmacológicos, de distribuição e função [45]. Estudos sobre os mecanismos de transdução acoplados aos diferentes tipos de receptores indicaram que, os receptores P2X eram canais catiónicos enquanto os receptores P2Y e os receptores da adenosina se encontravam acoplados a proteínas G. Logo após a identificação dos receptores P2 ficou também claro que, alguns desses receptores eram activados por nucleótidos pirimidínicos como o UTP [46].

### 2.4.1 Receptores da Adenosina

Em virtude dos progressos da biologia molecular na clonagem de receptores e também na descoberta de novos fármacos a classificação dos receptores purinérgicos sofreu alterações consideráveis e os receptores P1 correspondem actualmente à família dos receptores da adenosina dos quais se conhecem 4 subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> [47]. Todos estes receptores são do tipo metabotrópico e diferem na sua farmacologia e mecanismos de sinalização intracelular (ANEXO - Tabela 1) [48,49].

Os receptores A<sub>1</sub> quando localizados nos terminais nervosos inibem a libertação de neurotransmissores, enquanto os receptores pré-sinápticos A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> facilitam e os receptores A<sub>3</sub> não parecem afectar a libertação de neurotransmissores [29]. Os receptores A<sub>1</sub> exercem o seu efeito diminuindo a entrada de Ca<sup>2+</sup> através de canais dependentes da voltagem do tipo N presentes nos neurónios ou diminuindo a afinidade do aparelho excitatório para o Ca<sup>2+</sup> [47].

Os receptores  $A_2$  estão acoplados à enzima adenilciclase (AC) através de uma proteína  $G_s$  conduzindo a um aumento dos níveis de adenosina 5'-monofosfato cíclico (AMPC) que activa a cinase da proteína A (PKA), no entanto em algumas sinapses pode ocorrer activação da cinase da proteína C (PKC). A PKA e a PKC podem aumentar directamente as correntes de  $Ca^{2+}$  ou actuar nas proteínas que regulam a exocitose aumentando a probabilidade da ocorrência de fusão das vesículas e aumento da libertação do neurotransmissor [47]. Também podem actuar indirectamente impedindo a inibição dos canais de  $Ca^{2+}$  [29].

Diferentes tipos de receptores da adenosina podem estar presentes no mesmo terminal nervoso. O efeito que prevalece pode ser determinado pela interacção funcional, na biofase do receptor, entre a libertação de adenosina, a sua captação e metabolismo. A modulação da transmissão sináptica pela adenosina excede o simples controlo directo da libertação do neurotransmissor, podendo exercer efeitos permissivos a respostas mediadas por outros moduladores, regular a velocidade de dessensibilização de outros receptores ou prevenir uma excessiva influência de receptores inibitórios [29,50]. Paralelamente, os receptores da adenosina exercem múltiplas funções reguladoras no funcionamento do SNC [51]

### **2.4.2 Receptores P2X**

Os receptores P2X são canais iónicos permeáveis ao  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  dos quais se conhecem 7 subunidades P2X1-7, que se podem associar em oligómeros ou hetero-oligómeros de três ou cinco unidades formando canais iónicos funcionais [52,53].

A farmacologia dos receptores P2X é complexa devido ao facto de várias subunidades P2X poderem associar-se para formar canais iónicos com uma farmacologia diferente das subunidades individuais. Na Tabela 2 do ANEXO, encontra-se indicada a farmacologia dos receptores P2X. Os receptores P2X, estão presentes nos corpos celulares e dendrites de neurónios ou nas células musculares e quando activados desencadeiam potenciais de acção e respostas excitatórias rápidas, no entanto, podem também estar presentes nos terminais nervosos e mediar um aumento da libertação de neurotransmissores [54].

### 2.4.3 Receptores P2Y

Até ao momento, em mamíferos, foram identificados a nível molecular e com base na sua farmacologia oito subtipos: P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub>. Os números que faltam na sequência representam receptores que, foram clonados a partir de vertebrados não mamíferos ou receptores em que a resposta funcional aos nucleótidos não foi demonstrada [55]. Os receptores P2Y são activados por nucleótidos de adenina e uridina: ATP, ADP, UDP e UTP, sendo classificados de acordo com a sua sensibilidade relativas a estes compostos em 4 grupos: i) os subtipos P2Y<sub>1,12,13</sub> são selectivos para as purinas; ii) os subtipos P2Y<sub>2,4,11</sub> que podem ser activados por nucleótidos de purinas e pirimidinas; iii) o receptor P2Y<sub>6</sub> que é selectivo para as pirimidinas; iv) o receptor P2Y<sub>14</sub> que é selectivo para os nucleótidos açucarados como UDP-glucose ou UDP-galactose [55].

Os subtipos P2Y<sub>1,6,12,13</sub> são preferencialmente activados por nucleósidos difosfatados, o ADP é selectivo para os receptores P2Y<sub>1,12,13</sub> e o UDP é selectivo para os P2Y<sub>6</sub>. Os subtipos P2Y<sub>2,4,11</sub> são preferencialmente activados por nucleótidos trifosfatados [56].

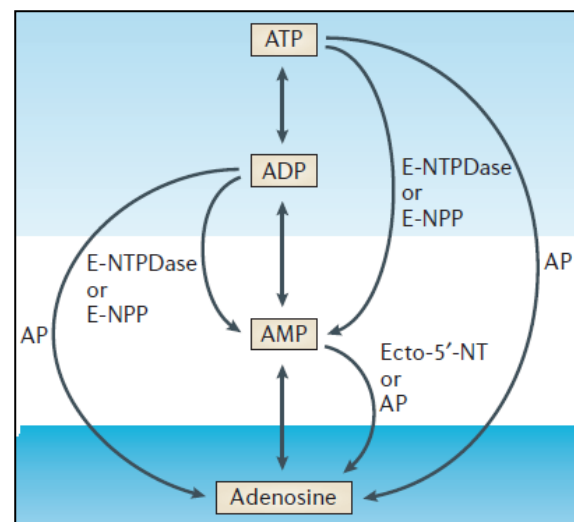
Os diferentes subtipos de receptores P2Y activam diferentes vias de sinalização intracelular: os subtipos P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> estão acoplados a proteínas G<sub>q/11</sub> que estimulam a fosfolipase C (PLC) resultando na formação de inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> induz a libertação de Ca<sup>2+</sup> para o citoplasma e o DAG activa a PKC. Os receptores P2Y<sub>11</sub> podem activar a via da G<sub>q/11</sub>-PLC e a via da G<sub>s</sub>-AC. Os receptores P2Y<sub>12,13,14</sub> estão acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> que inibem a actividade da adenilciclase, causando uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular [57]. Na Tabela 3 do ANEXO, encontra-se um resumo dos principais agonistas, antagonistas e vias de sinalização intracelular dos diferentes subtipos de receptores P2Y [56,57].

Os receptores P2Y neuronais estão envolvidos na regulação da libertação de neurotransmissores, no entanto os subtipos envolvidos na maioria das sinapses ainda não foram identificados [29,32]. Uma das razões desse desconhecimento reside na instabilidade dos agonistas P2Y, originando adenosina que activa receptores P1. Novos fármacos inibidores do metabolismo e antagonistas selectivos para os diferentes subtipos P2Y têm sido desenvolvidos no sentido de impedir a interferência da adenosina (através de inibidores enzimáticos) e de distinguir os subtipos de receptores P2Y com antagonistas selectivos [58].

## 2.5 Metabolismo do ATP e outros nucleótidos

O ATP e outros nucleótidos têm uma duração de acção limitada pela presença no meio extracelular de enzimas capazes de os metabolizar em segundos ou minutos sendo estas enzimas globalmente designadas por ecto-nucleotidasas. O ATP é convertido em ADP e AMP por acção de um conjunto de enzimas localizadas na superfície das células, que fazem parte da família da ecto-nucleósido 5'-trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e incluem a NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 e NTPDase8 [59]. A outra família de enzimas envolvida no metabolismo dos nucleótidos é a das pirofosfatases dos ecto-nucleótidos (E-NPPs), que inclui a fosfatase alcalina (PA) [60]. A ecto-5'-nucleotidase (Ecto-5'-NT) transforma o AMP em adenosina [61]. A adenosina é metabolizada por acção da desaminase da adenosina (ADA) [62,63] em inosina que não tem actividade nos receptores purinérgicos. As acções catabólicas destas enzimas [64,65] estão ilustradas na Fig. 8.

**Fig. 8** O ATP pode ser metabolizado por várias ecto-nucleotidasas que incluem as E-NTPDases que o transformam em ADP e/ou AMP ou as E-NPPs que também o podem converter directamente em adenosina. A PA converte todos os nucleótidos em adenosina enquanto a Ecto-5'-NT actua apenas no AMP convertendo-o em adenosina [18,65].



As NTPDases1, 2, e 3 são as principais isoformas expressas nos neurónios; metabolizam os nucleósidos trifosfatados ATP ou UTP e os nucleósidos difosfatados ADP ou UDP, embora com diferentes cinéticas e preferências de substrato: a NTPDase1 hidrolisa os nucleósidos trifosfatados ATP e UTP com grande eficiência, conduzindo à formação de AMP e UMP, respectivamente. A NTPDase2 hidrolisa o ATP ou UTP rapidamente e o ADP ou UDP mais lentamente, conduzindo à acumulação de ADP ou UDP [65].



A NTPDase3 hidrolisa preferencialmente os nucleósidos trifosfatados mas com menor eficiência do que a NTPDase1, permitindo alguma acumulação de ATP, UTP, ADP ou UDP [59]. A degradação dos nucleótidos termina com a hidrólise de AMP em adenosina pela 5'-NT ou PA [60]. A adenosina formada pode actuar em receptores da adenosina, sendo depois captada para dentro das células por duas famílias de transportadores de nucleósidos: os concentrativos [66] e os equilibrativos [66,67].

As diferentes enzimas presentes desempenham um papel determinante nos metabolitos que se formam e consequentemente nos subtipos de receptores purinérgicos que podem ser activados [65]. Por exemplo, no hipocampo o ATP endógeno é rapidamente convertido em adenosina [68], sendo os efeitos dos nucleótidos essencialmente mediados por receptores A<sub>1</sub> da adenosina [69], enquanto no córtex cerebral a hidrólise do ATP ocorre mais lentamente [70] permitindo a activação de receptores P2 [71].

## **2.6 Papel do ATP na comunicação neurónio-astrocítico**

No SNC os neurónios existem aos milhares de milhões mas compreendem apenas cerca de 5 a 10 % do total de células, sendo suplantados em número 5-10 vezes por células da neuroglia. Estas células, foram descritas pela primeira vez em 1846 por Rudolf Virchow, mas só no início do século XX as principais populações de células gliais foram identificadas como: astrócitos, oligodendrócitos e células da micróglia [72].

Os astrócitos foram durante muito tempo considerados meras células de suporte e nutrição dos neurónios. Actualmente é-lhes reconhecido um papel importante na modulação da comunicação neuronal como, a regulação de fluxos iónicos e a remoção de neurotransmissores da fenda sináptica através de transportadores específicos. Este mecanismo permite-lhes controlar a transmissão sináptica e reciclar os substratos necessários para a síntese de neurotransmissores, como é o caso do glutamato e do GABA [72]. Adicionalmente, desempenham um papel importante na manutenção da homeostasia cerebral que inclui o desempenho de funções reguladoras da transmissão e eficiência sinápticas e o auxílio aos neurónios no desempenho de funções integrativas e cognitivas [73,74, 75].

Os astrócitos libertam gliotransmissores como o ATP [76,77] e o glutamato [78], factores de crescimento e citocinas [79,80]. Paralelamente, respondem ao glutamato de origem neuronal e ao ATP através de alterações nos seus níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, podendo gerar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  que se propagam por redes extensas de astrócitos [81,82,83] o que lhes permite participar activamente na regulação do fluxo de informação através das redes neuronais no cérebro [84,85].

O ATP é um importante mediador da comunicação neurónio-astrócito [86]. O ATP libertado dos astrócitos em resposta à activação de receptores do glutamato [77] tem efeitos moduladores da actividade sináptica actuando em receptores P2, ou após metabolismo gerando adenosina que activa receptores inibitórios  $A_1$  [87,88]. Os astrócitos também libertam ATP em resposta à noradrenalina, que causa um aumento da eficácia da transmissão glutamatérgica [89]. A plasticidade sináptica consiste em alterações na força sináptica que se pensa ser a base dos mecanismos de aprendizagem e formação de memórias sendo considerada uma característica particular dos neurónios. Estudos recentes indicam que, os astrócitos também possuem as características necessárias para participar e modular várias formas de plasticidade sináptica [85,90]. Os astrócitos envolvem fisicamente as sinapses, expressam receptores para a maioria dos neurotransmissores e libertam diversas substâncias neuroactivas que modulam a actividade neuronal e a plasticidade sináptica de diferentes formas [90]: i) cobertura e controlo da transmissão sináptica, inclui a regulação da remoção do neurotransmissor; ii) libertação de mensageiros envolvidos na plasticidade sináptica, como o glutamato, e consequente activação de receptores neuronais prolongando a duração da transmissão; iii) regulação da homeostasia do cálcio iv) libertação de D-serina que é um co-agonista dos receptores NMDA que são importantes nos fenómenos de “long-term potentiation” (LTP) ao manterem as sinapses activas mais tempo, permitindo a sua reestruturação de forma a aumentar a eficiência sináptica e v) estimula a LTP libertando citocinas como o  $\text{TNF}\alpha$  [79].

Um grande progresso foi obtido nos últimos 15 anos, no sentido de compreender qual a contribuição dos astrócitos na transmissão e plasticidade sinápticas. No entanto muito ainda está por fazer no sentido de esclarecer os mecanismos detalhados que estão envolvidos no modo de funcionamento das redes celulares e identificar qual a participação activa dos astrócitos e de outras células gliais nesse processo.

### 3. Modulação Purinérgica da Liberação de Noradrenalina no SNC

Nos neurónios do LC o ATP é co-transmissor com a noradrenalina, estes neurónios possuem receptores sensíveis ao ATP que quando activados facilitam a indução espontânea dos potenciais de acção [91]. Estudos recentes sugerem que, os neurónios dos LC expressam receptores P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> [92].

Os receptores P2Y parecem desempenhar um papel importante na modulação pré-sináptica da libertação de vários neurotransmissores cerebrais, incluindo a NA [29,32]. No córtex cerebral a libertação de NA poder ser modulada pela activação de receptores P2Y localizados nos terminais dos neurónios do LC [71]. A libertação cortical de NA pode também ser desencadeada pela activação de receptores glutamato activados pelo *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) [93]. O receptor P2Y<sub>1</sub> foi identificado como responsável pela modulação dos receptores do NMDA corticais [94], no entanto, os subtipos de receptores P2Y envolvidos na libertação de NA induzida pela estimulação dos neurónios do LC não foram ainda identificados [29,32].

Uma das dificuldades na identificação dos receptores P2Y envolvidos nesses efeitos reside na rápida metabolização dos nucleótidos endógenos ATP e ADP por acção de ectonucleotidases [64,65] com formação de adenosina e activação de receptores A<sub>1</sub> que também inibem a libertação de NA. Este problema, pode no entanto ser ultrapassado recorrendo a agonistas metabolicamente mais estáveis e procedendo simultaneamente ao bloqueio dos receptores A<sub>1</sub> com antagonistas selectivos.

Adicionalmente, os receptores A<sub>1</sub> podem interagir fisicamente e funcionalmente com receptores P2Y formando heterodímeros [95]. É o caso dos receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> que podem formar heterodímeros P2Y<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> que foram já identificados no córtex [96] ou eventualmente os receptores P2Y<sub>2</sub>/A<sub>1</sub> [97]. Estes heterodímeros apresentam uma farmacologia diferente dos receptores individuais o que torna mais difícil a sua caracterização.

Uma outra dificuldade residia na falta de antagonistas selectivos para os diferentes subtipos de receptores P2Y, que entretanto foram sendo desenvolvidos, facilitando a caracterização farmacológica dos receptores P2Y [58].

Estudos efectuados na última década têm mudado a nossa percepção sobre o papel que as células gliais, em particular os astrócitos, desempenhavam no SNC, sendo actualmente considerados parceiros dinâmicos no metabolismo cerebral e na comunicação neuronal [42,74,75,90]. Esta descoberta coincide com um crescendo de evidências que suportam a participação das células gliais na fisiopatologia das perturbações de humor [98,99,100].

A densidade das células gliais em regiões cerebrais límbico-frontais é menor em indivíduos que sofriam de depressão major e doença bipolar [99,100]. Verificou-se também um decréscimo, dependente da idade, na densidade e imunoreactividade da “glial fibrillary acidic protein” (GFAP) que é um marcador dos astrócitos, no córtex pré-frontal de jovens em estados depressivos [101]. Reduções na densidade, estrutura e função dos oligodendrócitos foram também detectadas no córtex pré-frontal e amígdala [102] e podem ser relevantes na destruição da substância branca envolvida nos circuitos neuronais que regulam as perturbações de humor. Factores como o stress, excesso de glicocorticóides, alteração na expressão de genes e/ou de factores neurotróficos ou alterações nos transportadores gliais podem também contribuir para a fisiopatologia da depressão [98].

O ATP e outros nucleótidos podem ser libertados dos astrócitos em resposta a vários estímulos, incluindo neurotransmissores como o glutamato [77] ou a NA [89], tendo como consequência uma alteração na transmissão sináptica [88,89]. Estes estudos sugerem que os astrócitos, através da libertação de ATP e consequente activação de receptores P2, podem participar na modulação da libertação de NA. Adicionalmente, os astrócitos expressam transportadores de NA semelhantes aos transportadores neuronais [12] podendo regular a transmissão noradrenérgica através da remoção de NA da fenda sináptica. Estudos efectuados no hipocampo mostraram que, os receptores P2X regulam os transportadores causando a sua inversão [103]. Além disso, vários fármacos psicoactivos exercem os seus efeitos através do bloqueio dos transportadores de NA, como a cocaína, as anfetaminas e os antidepressores [104]. Uma melhor compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na regulação da expressão e da actividade dos transportadores de NA expressos nos astrócitos é de extrema importância, porque a sua desregulação pode estar relacionada com a patogénese das perturbações de humor.

## **OBJECTIVOS DO TRABALHO**

O objectivo deste estudo é investigar o papel modulador das purinas na transmissão noradrenérgica no córtex de cérebro de rato, de forma a identificar os subtipos de receptores P2Y envolvidos na sua regulação. Foram efectuados dois tipos de experiências que têm objectivos diferentes: a) avaliar os efeitos de vários nucleótidos na libertação de NA; b) avaliar os efeitos dos mesmos nucleótidos na captação de NA pelas células gliais.

Os modelos experimentais usados para este tipo de estudo consistiram de fatias de cérebro do rato e culturas primárias de astrócitos. As fatias foram usadas com o objectivo de avaliar os efeitos de vários fármacos que actuam em receptores P2Y sobre a libertação de NA induzida por estimulação eléctrica [105]. Nestas experiências, numa primeira fase foi avaliado o efeito de vários nucleótidos que actuam como agonistas dos receptores P2Y na libertação de NA. Numa segunda fase a caracterização dos subtipos de receptores P2Y envolvidos na libertação de NA, estudou-se o efeito dos agonistas na presença de antagonistas selectivos para os diferentes subtipos de receptores.

Os estudos de captação de noradrenalina pelos astrócitos em particular, permitirá esclarecer o papel destas células na regulação da transmissão sináptica de noradrenalina e o papel dos receptores P2Y nesse processo. Os astrócitos expressam o mesmo tipo de transportador de noradrenalina [12], têm uma localização privilegiada ao nível das sinapses e vários estudos sugerem que estas células desempenham um papel fundamental na regulação da eficiência sináptica [90].

O conhecimento dos mecanismos subjacentes à regulação da libertação de noradrenalina em sinapses corticais e os mecanismos envolvidos na sua remoção da fenda sináptica pelos astrócitos, que constitui um mecanismo até data pouco explorado, poderá evidenciar novos alvos de intervenção farmacológica em várias patologias associadas a uma desregulação da transmissão noradrenérgica [4,6,23,98].

# MÉTODOS

## 1. Condições Experimentais

A manipulação e utilização dos animais foram efectuadas de acordo com as directrizes da Comunidade Europeia (86/609/EEC). Para a obtenção de fatias de cérebro foram utilizados ratos Wistar machos (Charles River, Barcelona, Espanha) com peso entre 200-250 g e mantidos a temperatura constante 21°C e ciclos regulares de luz (06.30-19.30h) e escuridão (19.30-06.30h), com comida e água *ad libitum*. Para a preparação de culturas celulares primárias de astrócitos foram utilizados ratos Wistar com idades entre 0 e 2 dias (P0-P2).

Os animais foram decapitados e o cérebro rapidamente removido e colocado em tampão gelado previamente oxigenado com carbogénio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). As fatias de cérebro de rato foram obtidas a partir de cortes efectuados na região do córtex occipital-parietal. As fatias superficiais foram rejeitadas e as seguintes foram cortadas com uma espessura de 400 µm com um vibrátomo (Leica VT1000S, Nussloch, Alemanha; ANEXO). De seguida as fatias foram incubadas a 37 °C em solução tampão de Krebs-Hensleit oxigenado com a seguinte composição (mM): NaCl 118; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25; glicose 11; ácido ascórbico 0.3 e EDTA dissódico 0,03 a pH 7,4.

## 2. Ensaio de Libertação de NA

Os estudos de libertação foram utilizados para avaliar os efeitos pré-juncionais dos receptores purinérgicos sobre a libertação de NA. Neste tipo de experiências recorreu-se à utilização de [<sup>3</sup>H]-noradrenalina ([<sup>3</sup>H]-NA) exógena que é incorporada pelas fatias sendo a quantidade de trítio libertado nas diferentes condições experimentais testadas usado como indicador da libertação neuronal de NA.

Esta metodologia foi já validada [105] como sendo mais sensível e de execução mais fácil em comparação com o método de extracção e doseamento de NA endógena por HPLC com detecção electroquímica [106].



Após obtenção de fatias de córtex com 400  $\mu\text{m}$  de espessura, estas foram incubadas com tampão oxigenado durante 45 minutos para recuperação. De seguida as fatias foram colocadas num frasco contendo 2 ml de tampão oxigenado contendo 0.1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-NA e incubadas a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. No final do período de incubação as fatias foram transferidas para as câmaras de perfusão (ANEXO)

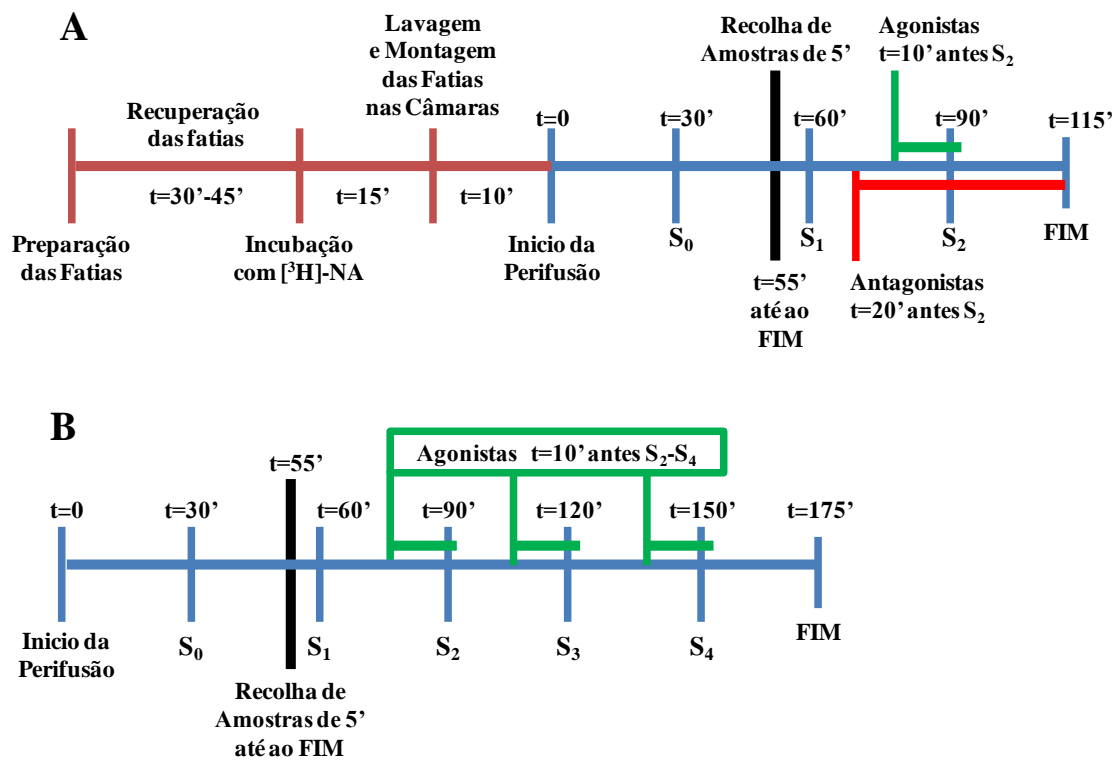
Cada fatia foi colocada numa câmara de perfusão sobre um filtro de polipropileno e posicionada entre 2 eléctrodos de platina, para evitar o seu deslocamento durante a experiência e o contacto directo com os eléctrodos estimuladores. As fatias foram de seguida perfundidas a um fluxo constante de 0,6 ml/min com tampão aquecido a 37  $^{\circ}\text{C}$  e oxigenado com uma mistura de 5%  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$ . Em algumas experiências o tampão utilizado não continha  $\text{Mg}^{2+}$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$ , que foram substituídos por uma concentrações equimolares de NaCl.

As fatias foram sujeitas a estimulação eléctrica com recurso a um estimulador (Hugo Sach Elektronik, Type 215, Hugstetten, Alemanha, ANEXO), operando em modo de corrente constante com uma intensidade de 50 mA. Foram aplicados 3 ou 5 períodos de estimulação eléctrica, cada período constituído por 100 pulsos, com 1 ms de duração cada, aplicados a uma frequência de 5 Hz. O primeiro período de estimulação ( $S_0$ ) foi aplicado ao  $t=30$  min, sendo  $t=0$  considerado o início da perfusão. A [ $^3\text{H}$ ]-NA libertada durante  $S_0$  não foi quantificada. Na maioria das experiências foram aplicados mais 2 períodos de estimulação:  $S_1$  ao  $t=60$  min e  $S_2$  ao  $t=90$  min. Em algumas experiências foram aplicados mais 4 períodos de estimulação em adição a  $S_0$ :  $S_1$  ao  $t=60$  min,  $S_2$  ao  $t=90$  min,  $S_3$  ao  $t=120$  e  $S_4$  ao  $t=150$  min da perfusão. O líquido de perfusão foi recolhido a intervalos de 5 min a partir de  $t=55$  min até  $t=115$  min, nas experiências com 3 períodos de estimulação ou até  $t=175$  min nas experiências com 5 períodos de estimulação.

No final da perfusão, as fatias de córtex foram recolhidas, pesadas e procedeu-se à extracção da [ $^3\text{H}$ ]-NA presente por incubação com NaOH 0,2 M durante a noite. A quantificação do trítio libertado e recolhido nas amostras e do trítio extraído das fatias no final da perfusão foi efectuada por espectrometria de cintilação líquida (Beckman LS 6500, Fullerton, USA, ANEXO), após adição de um cocktail de cintilação a cada amostra (Optiphase Iphase 3, Perkin-Elmer, USA) para aumentar a eficiência da contagem.

Algumas experiências foram efectuadas com tampão sem  $Mg^{2+}$  que esteve ausente desde o início da perfusão até ao final. Nas experiências em que se estudou a influência da omissão de  $Ca^{2+}$  as fatias foram perfundidas com tampão sem  $Ca^{2+}$  durante 20 min antes de  $S_2$  até ao final da experiência; o mesmo protocolo foi aplicado quando se investigou a influência do  $Mg^{2+}$  em experiências em que o tampão de perfusão continha 0 M de  $Mg^{2+}$ .

Os agonistas dos receptores purinérgicos testados foram adicionados 10 min antes de  $S_2$ ,  $S_3$  e  $S_4$  em concentrações crescentes e mantidos até ao final do respectivo período de estimulação. Os antagonistas, a tetrodotoxina (TTX) e a desaminase da adenosina (ADA), quando presentes, foram adicionados ao tampão de perfusão 20 min antes de  $S_2$  e mantidos até ao final da experiência (Fig. 9).



**Fig. 9** Esquema representativo dos protocolos usados nas experiências de perfusão em que se avaliou o efeito de vários fármacos sobre a libertação de NA induzida por EE (100 p/5 Hz). (A) Esquema representativo de uma experiência desde o início da preparação das fatias até ao final da perfusão em que foram aplicados 3 períodos de estimulação ( $S_0$ - $S_2$ ). (B) Esquema simplificado, omitiu-se a fase de preparação das fatias, das experiências em que foram aplicados 5 períodos de estimulação ( $S_0$ - $S_4$ ).

### 3. Avaliação do efeito dos fármacos na libertação de NA

A libertação de NA foi avaliada através da quantificação da fracção de trítio libertado em função do conteúdo presente no tecido no início do respectivo período de colheita, sendo expresso em fracção de libertação/min;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$  ( $b_n$ ) correspondem à fracção de trítio libertado nos 5 min antes da aplicação dos respectivos períodos de estimulação,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  e  $S_4$  ( $S_n$ ). O efeito dos fármacos na libertação basal de trítio foi avaliado com base na razão  $b_n/b_1$ .

A libertação de trítio induzida por estimulação eléctrica, foi calculada pela diferença entre a libertação total observada durante os 10 min seguintes à aplicação do respectivo período de estimulação (incluindo o período em que o tecido estava a ser estimulado), subtraída da libertação basal estimada no mesmo período de tempo, sendo o resultado expresso em percentagem do trítio total presente no início do respectivo período de estimulação. O efeito dos fármacos na libertação trítio induzido por estimulação eléctrica, foi calculado com base na razão  $S_n/S_1$  e encontra-se expresso em % de variação (aumento ou diminuição) em relação ao respectivo controlo (solvente).

### 4. Preparação de culturas primárias de astrócitos

Culturas primárias de astrócitos foram preparadas a partir dos hemisférios cerebrais de ratos Wistar recém-nascidos (P0-P2) como descrito previamente [77]. Os hemisférios cerebrais foram colocados em tampão Dulbecco sem  $Ca^{2+}$  e sem  $Mg^{2+}$  a 4 °C e as meninges e vasos sanguíneos foram removidos. Após duas lavagens com tampão gelado, os hemisférios cerebrais foram cortados em pequenos pedaços em meio de cultura: Dulbecco's modified Eagle medium contendo 3,7 g/l  $NaHCO_3$ , 1,0 g/l D-glucose e glutamina estável, suplementado com 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina.

O tecido obtido foi triturado em 10 ml de meio de cultura e a suspensão obtida foi passada através de um filtro de nylon de 40 µm e posteriormente centrifugada a 200 x g durante 5 min.

O processo foi repetido por mais 2x e o sedimento obtido foi suspenso em meio de cultura enriquecido com 10% de soro bovino fetal a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/ml. A suspensão celular obtida foi distribuída por placas de 24 poços (0,5 ml/poço). As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera húmida de 95% ar e 5% CO<sub>2</sub>, e o meio de cultura foi renovado um dia após a preparação e posteriormente 2x por semana.

Para obter culturas puras de astrócitos após atingirem a confluência, as culturas foram sujeitas 2 períodos de agitação a 200 rpm durante a noite, a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar, sendo o meio de cultura renovado do no dia seguinte. Este procedimento destinase a remover as células da micróglia que geralmente aparecem no nas culturas de astrócitos e constituem os principais contaminantes destas culturas [107]. Cerca 97% das células presentes nestas culturas eram astrócitos [108]. Culturas confluentes com 17-20 dias foram usadas nas experiências de captação de noradrenalina.

## 5. Ensaios de captação de [<sup>3</sup>H]-NA em culturas de astrócitos

A captação [<sup>3</sup>H]-NA foi determinada de acordo com estudos anteriores [109,110], com pequenas modificações. Utilizaram-se culturas primárias de astrócitos com 17-20 dias que cresceram em placas de 24 poços como descrito na Secção 4 dos Métodos.

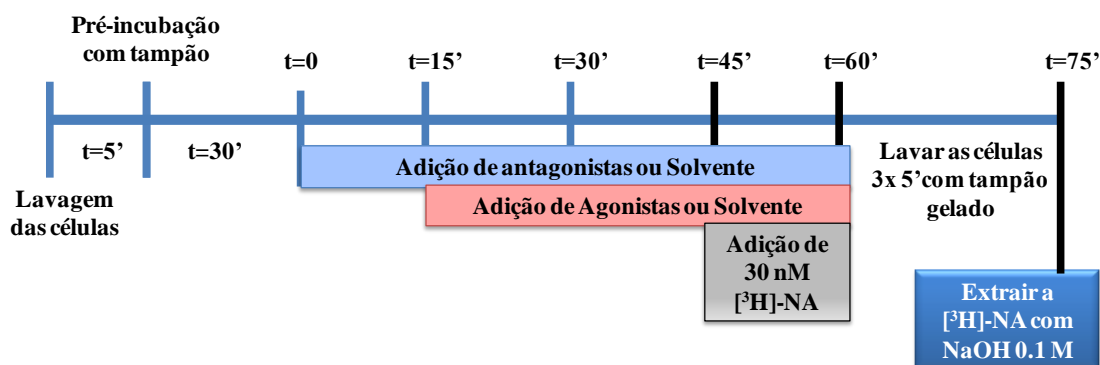
Após aspiração do meio de cultura as células foram lavadas 2x com tampão de captação com a seguinte composição (mM): 135 NaCl; 5 KCl; 1,8 CaCl<sub>2</sub>; 0,8 MgSO<sub>4</sub>; 10 glicose; 10 HEPES; 1 piruvato de sódio; 1 de ácido ascórbico; 0,1 pargilina (inibidor da MAO) e 0,1 mM tropolona (inibidor da COMT), ajustado a pH 7.4.

As células foram de seguida pré-incubadas com tampão durante 30 min a 37°C em atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>, 95% ar. No final do período de pré-incubação o tampão foi renovado, sendo substituído por 200 µL de tampão contendo os fármacos ou solvente, perfazendo um volume final de 250 µL/poço. O período de incubação foi de 30 min para os antagonistas e de 15 min para os agonistas, a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, 95% ar. No final do período de incubação com os fármacos foi adicionado ao meio [<sup>3</sup>H]-NA na concentração final de 30 nM e os astrócitos foram incubados durante mais 15 min nas mesmas condições.

No final, o tampão de incubação foi aspirado e as células foram lavadas 3x com tampão gelado (Fig.10).

A extracção da [<sup>3</sup>H]-NA captada pelas células foi efectuada com NaOH 0.1 M durante 24 h e a incorporação de trítio determinada por cintilometria líquida (Beckman LS 6500, Fullerton, USA, ANEXO) após adição de um cocktail de cintilação a cada amostra de extracto (Optiphase Iphase 3, Perkin-Elmer, USA) para aumentar a eficiência da contagem.

O efeito dos fármacos na captação de NA foi determinado através da quantificação do trítio total incorporado subtraído da captação de trítio observada em células tratadas na mesma experiência com 0,3 mM de desipramina. Os resultados obtidos foram normalizados pelo conteúdo de proteínas usando o método de Bradford. A quantidade de NA captada foi expressa em pmol por mg proteína (pmol/mg) e o efeito dos fármacos na captação de NA encontra-se expresso em % do controlo (solvente).



**Fig. 10** Representação esquemática do protocolo usado para avaliar o efeito de agonistas e antagonistas purinérgicos na captação de NA em culturas primárias de astrócitos.

## 6. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos pelas médias aritméticas e erros padrão da média (SEM) de *n* experiências. A análise estatística do efeito dos fármacos foi efectuada, usando os testes de *t*-student ou ANOVA com correcção pelo teste de Dunnett, no caso de comparações múltiplas com o mesmo controlo. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando *P* < 0,05.

## 7. Fármacos utilizados

Neste trabalho foram usados os seguintes fármacos: levo-[2,5,6-<sup>3</sup>H]-NA (actividade específica 56.6 Ci/mmol) foi adquirida à Garal (Lisboa, Portugal); adenosina-5'-difosfato (ADP), adenosina 5'-*O*-(3-tio)-difosfato (ADPβS), adenosina-5'-trifosfato (ATP), α,β-metilenoadenosina 5'-difosfato (AOPCP), penicilina, estreptomicina, uridina-5'-difosfato (UDP), uridina-5'-trifosfato (UTP), adenosina desaminase tipo VI (ADA; EC 3.5.4.4), desipramina (DMI), *N*<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina (CPA), azul de cibacron Blue F3GA (RB2), tetrodotoxina (TTX), pargilina, tropolona, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 2-*p*-(2-carboxietil)fenetilamino-5'-*N*-etilcarboxamidoadenosina (CGS 21680), dizolcipina (MK 801), 2-(2-Furanil)-7-(2-feniletíl)-7H-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pirimidin-5-amina (SCH 58261), ioimbina e quinurenato foram adquiridas à Sigma-Aldrich (Sintra, Portugal).

Os compostos: 1,4-di[3-(isotiocianatofenil)tioreido]butano (MRS 2578), 2-[(2-cloro-5-nitrofenil)azo]-5-hidroxi-6-metil-3-[(fosfonooxi)metil]-4-piridinecarboxaldeído(MRS2211), (1R,2S,4S,5S)-4-[2-iodo-6-(metilamino)-9H-purin-9-il]-2-(fosfonooxi) biciclo[3.1.0]hexano-1-metanol (MRS 2500) e 2-(propiltio)adenosina-5'-*O*-(β,γ-difluorometileno)trifosfato (AR-C66096) foram adquiridos à Tocris (Bristol, UK).

Foram preparadas soluções stock dos fármacos dissolvidos com água destilada ou DMSO e armazenadas a -20 °C. As soluções dos fármacos testados foram preparadas imediatamente antes de serem utilizadas por diluição de alíquotas das soluções stock em tampão.

## RESULTADOS

## 1. Efeito da estimulação eléctrica na libertação de NA

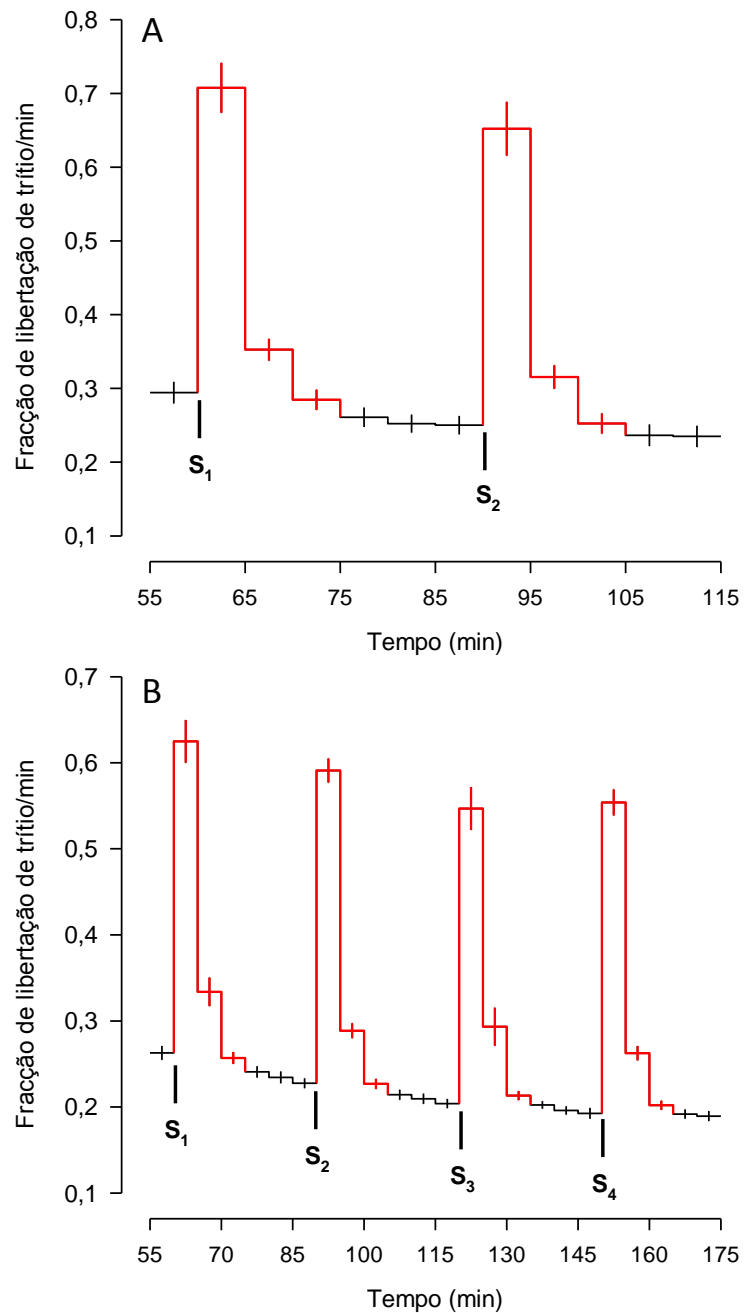
Em fatias da região occipito-parietal do córtex de cérebro de rato, a fracção de libertação basal imediatamente antes de  $S_1$  ( $b_1$ ) foi de  $0,277 \pm 0,008$  %, correspondendo a  $21,61 \pm 0,92$  Bq/min ( $n=85$ ) sendo a razão  $b_2/b_1$  de  $0,84 \pm 0,01$  ( $n=85$ ).

A estimulação eléctrica (EE) com trens de 100 pulsos aplicados a uma frequência de 5 Hz (100 p/5 Hz) causou um aumento da libertação de trítio (Fig.11). A libertação de trítio induzida por  $S_1$  foi de  $1,438 \pm 0,088$  % ( $n=85$ ) do conteúdo de trítio presente no tecido desde o início da colheita das amostras, correspondendo a  $104,7 \pm 4,8$  Bq ( $n=85$ ). Na ausência de fármacos adicionados após  $S_1$  a libertação de trítio induzida por  $S_2$  foi semelhante,  $S_2/S_1 = 0,98 \pm 0,01$  ( $n=85$ ). Nenhum dos fármacos ou solvente, adicionados após  $S_1$  modificaram a libertação basal de trítio.

A libertação de trítio induzida por 100 p/ 5Hz aumentou  $298 \pm 27$  % ( $n=4$ ;  $P < 0.05$ ), quando o antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adenérgicos, ioimbina ( $1 \mu\text{M}$ ) foi adicionado ao 20 min antes de  $S_2$ , indicando que os parâmetros EE usados nestas experiências geram condições para que os autorreceptores  $\alpha_2$  estejam operacionais.

Nas experiências em que foram aplicados 5 períodos de EE ( $S_0$ - $S_4$ ), com o objectivo de testar o efeito de concentrações crescentes dos agonistas, a libertação basal trítio antes de  $S_1$  ( $b_1$ ) foi de  $0,292 \pm 0,006$  % correspondendo a  $20,55 \pm 0,93$  Bq/min ( $n=20$ ) e permaneceu relativamente constante durante a perfusão:  $b_2/b_1=0,84 \pm 0,01$ ,  $b_3/b_1= 0,78 \pm 0,01$  e  $b_4/b_1= 0,72 \pm 0,01$  ( $n=20$ ). A EE com trens de 100 p/5 Hz causou um aumento da libertação de trítio (Fig.11B). A libertação de trítio induzida por  $S_1$  foi de  $2,107 \pm 0,063$  % do conteúdo de trítio presente no tecido desde o início da colheita das amostras ( $148,9 \pm 8,5$  Bq;  $n=20$ ) sendo semelhante à libertação induzida durante os períodos de estimulação que se sucederam:  $S_2/S_1 = 0,98 \pm 0,01$ ;  $S_3/S_1 = 0,94 \pm 0,01$  e  $S_4/S_1 = 0,97 \pm 0,01$  ( $n=20$ ). Nenhum dos fármacos ou solvente, adicionados após  $S_1$  modificaram a libertação basal de trítio.





**Fig.11** Fracção de libertação de trítio de fatias de córtex de cérebro de rato incubadas com 0,1  $\mu$ M de [ $^3$ H]-NA e perfundidas a 0,6 ml/min. Foram aplicados (A) 3 períodos de estimulação ( $S_0$ - $S_2$ ) ou (B) 5 períodos de estimulação constituídos por trens de 100 pulsos a 5 Hz (50 mA, 1 ms duração de pulso). A quantificação do trítio libertado foi efectuada a partir de  $t=55$  min. Abcissas, tempo de perfusão. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  SEM de 20 experiências.

## 2. Caracterização de libertação de NA induzida por EE: influência dos receptores do glutamato

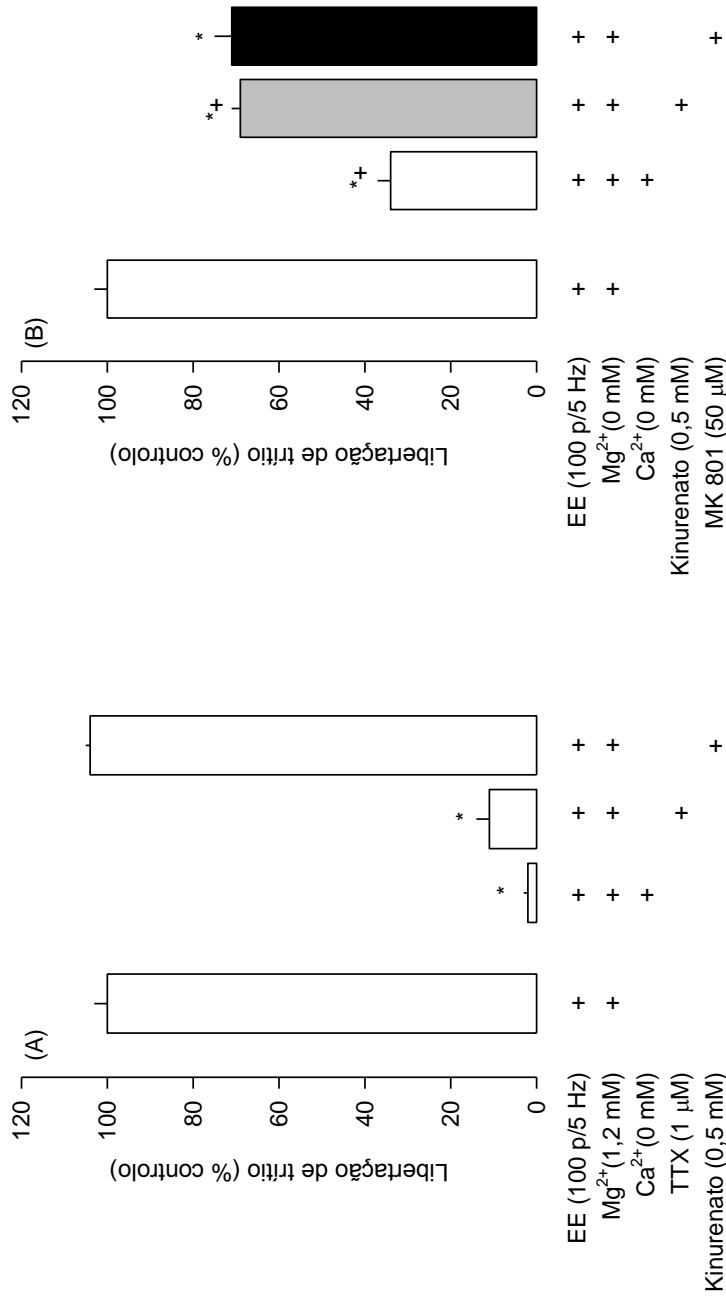
Em vários estudos foi demonstrado que a libertação de NA de fatias de córtex pode ser induzida por EE e por activação de receptores ionotrópicos do glutamato, particularmente receptores do NMDA [111,112]. A contribuição dos receptores do NMDA para a libertação de trítio induzida pela EE com 100 p/5 Hz foi por isso investigada. Estes parâmetros de EE foram seleccionados, tendo como referência estudos prévios que indicavam que estas condições favoreciam a libertação de glutamato [113,114].

A libertação de trítio induzida por estimulação eléctrica foi atenuada na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença da TTX (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador dos canais de  $\text{Na}^+$  dependentes da voltagem que são responsáveis pela condução dos potenciais de acção, indicando que nestas condições experimentais a libertação de NA é dependente de um processo excitatório (Fig. 12A). No entanto, o antagonista dos receptores do ionotrópicos do glutamato kinuretrato (0,5 mM) [115] não modificou a libertação de trítio induzida por 100 p/5Hz (Fig. 12A).

Uma das características funcionais do receptor NMDA é o facto de ser bloqueado por concentrações fisiológicas de  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo esse bloqueio dependente do potencial de membrana [116]. Os resultados anteriores sugerem que as condições de EE usadas são insuficientes para desbloquear o efeito antagonista do  $\text{Mg}^{2+}$  nos receptores NMDA. No sentido de esclarecer, se os receptores NMDA não contribuem para a libertação de trítio devido ao bloqueio efectuado pelo  $\text{Mg}^{2+}$  e de clarificar o contributo destes receptores na modulação da libertação de NA, efectuaram-se experiências em que o  $\text{Mg}^{2+}$  presente no tampão de perfusão foi substituído por uma concentração equimolar de NaCl.

Nestas condições experimentais a fracção de libertação basal de trítio não foi afectada pela ausência de  $\text{Mg}^{2+}$  e permaneceu constante durante todo o período de perfusão com valores de  $b_2/b_1$  próximo da unidade. A libertação de trítio induzida por estimulação eléctrica aumentou na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $S_1 = 2,992 \pm 0,421$  % (n=12;  $P < 0.05$ ).

Na ausência de  $\text{Mg}^{2+}$  a libertação de trítio induzida por 100 p/5 Hz foi atenuada na ausência de cálcio, na presença do kinurenato (0,5 mM) e do antagonista selectivo dos receptores do NMDA, MK 801 (50  $\mu\text{M}$ ; Fig. 12B) [117].



**Fig. 12** Caracterização da liberação trítio de fatias de córtex cerebral de rato induzida por 100 p/5 Hz ( $S_0-S_2$ ) em meio com e sem  $Mg^{2+}$ . (A) Efeito da omissão de  $Ca^{2+}$ , da TTX e do kinurenato. (B) Influência dos receptores do NMDA: efeito da omissão de  $Ca^{2+}$  e dos antagonistas kinurenato e MK 801. Nas experiências sem  $Mg^{2+}$ , este não esteve ausente do tampão de perfusão desde o início da experiência. A TTX, o kinurenato e o MK 801 foram adicionados ao meio de perfusão 20 min antes de  $S_2$  e mantidos até ao final da perfusão. Nas experiências em que se avaliou o efeito do  $Ca^{2+}$ , as fatias foram perfundidas com um tampão sem  $Ca^{2+}$  20 min antes de  $S_2$  até ao final da perfusão. Os resultados estão expressos em % de controlo (solvente) como média  $\pm$  SEM de 4-6 experiências. \* $P < 0,05$ , significativamente diferente do controlo (solvente);  $^+P < 0,05$ , significativamente diferente do efeito observado em experiências com  $Mg^{2+}$  presente desde o início da perfusão.

### 3. Efeito dos nucleótidos na libertação de NA: influência dos receptores A<sub>1</sub>

O ATP e outros nucleótidos regulam a libertação de noradrenalina em vários tecidos e regiões cerebrais [29,32]. Estudos anteriores indicaram que os receptores P2Y causam uma inibição da libertação de NA no córtex cerebral de rato, no entanto até à data, os subtipos de receptores P2Y envolvidos nesse efeito ainda não foram identificados [71].

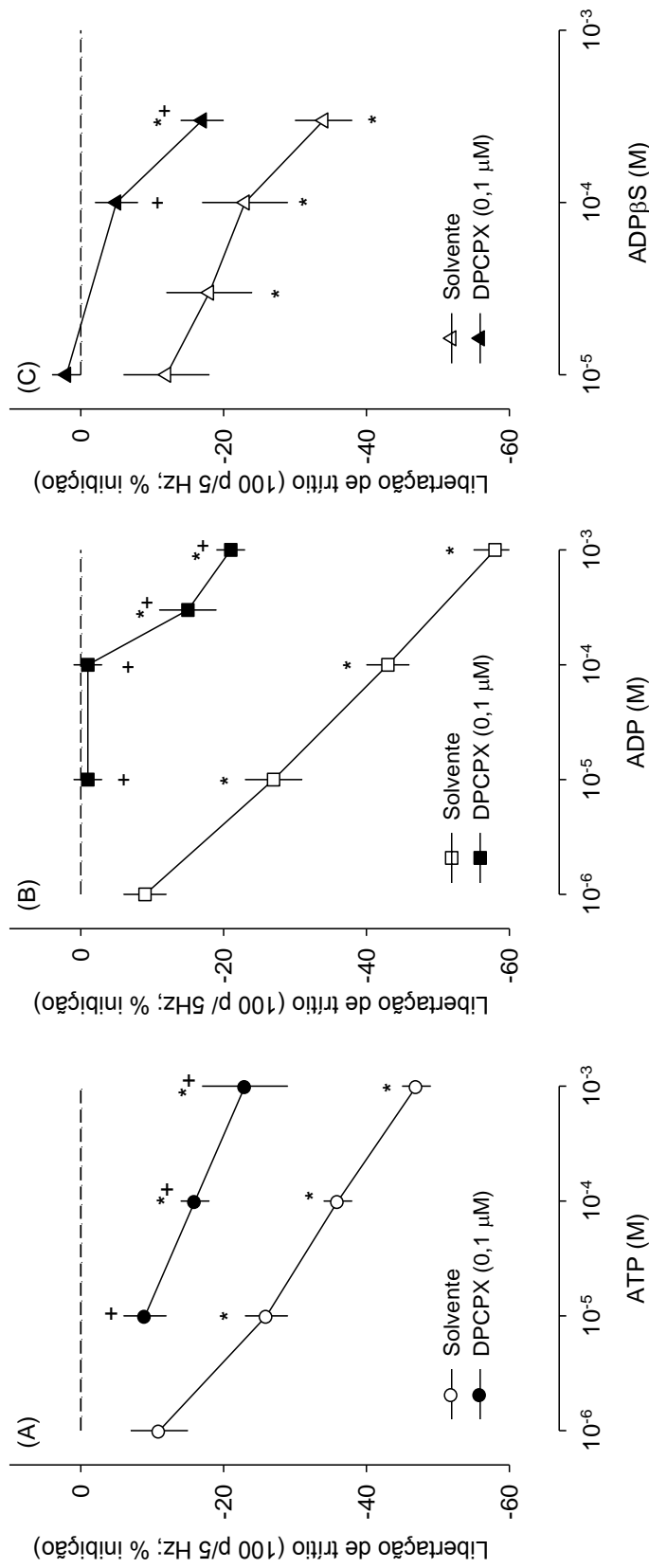
No presente trabalho um dos objectivos consistiu na identificação dos subtipos de receptores P2Y envolvidos na inibição da libertação de NA no córtex cerebral de rato. Numa primeira abordagem testou-se a influência de vários nucleótidos, que activam diferentes subtipos de receptores P2Y, na libertação de NA induzida por EE (100 p/5 Hz). Os nucleótidos testados foram: ATP, ADP, ADPβS, UTP e UDP.

O ATP é um agonista endógeno mas não é selectivo, o ADP e o ADPβS têm maior afinidade para os subtipos P2Y<sub>1,12,13</sub> mas o ADPβS tem a vantagem de ser metabolicamente mais estável do que o ADP [118]. O UTP activa os receptores pirimidínicos que incluem os subtipos P2Y<sub>2,4,6</sub> e o UDP é selectivo para os receptores P2Y<sub>6</sub> [119].

Todos os nucleótidos testados inibiram de uma forma dependente da concentração a libertação de trítio induzida por EE. Para os nucleótidos purínicos a ordem de potência foi: ADP ≥ ATP > ADPβS (Fig. 13) e para os nucleótidos pirimidínicos foi: UTP ≥ UDP (Fig. 14).

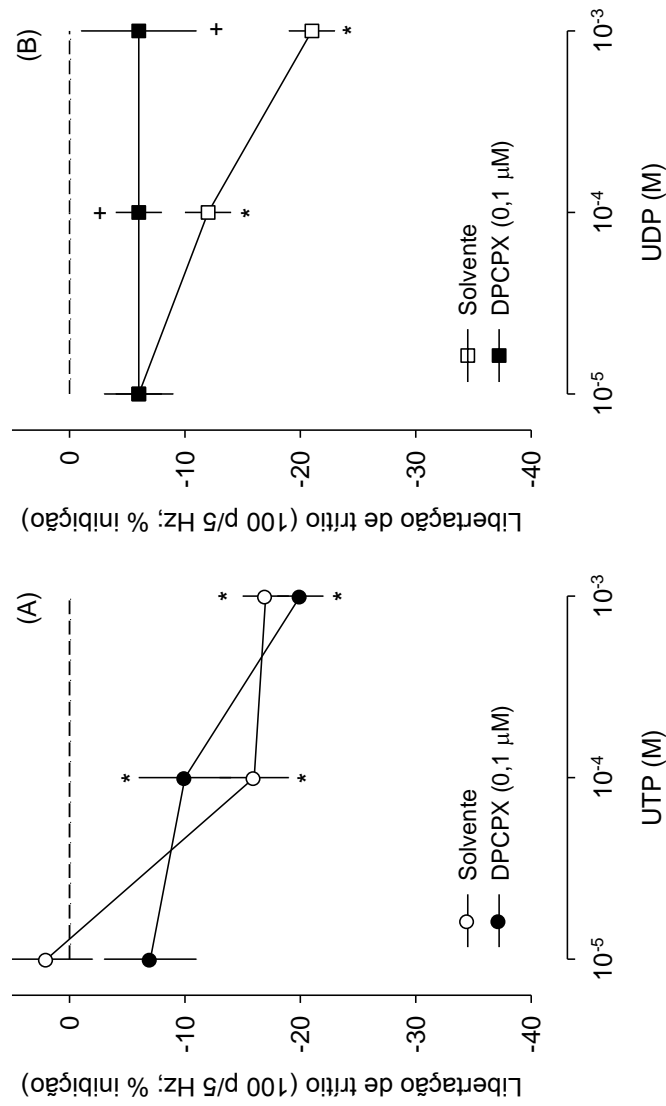
A maioria dos nucleótidos testados é metabolicamente instável, sendo rapidamente degradados por ecto-nucleotidases dando origem a metabolitos activos, como é o caso da adenosina que no SNC exerce efeitos inibitórios sobre a libertação de diversos neurotransmissores [29,51], tornando incontornável o estudo da influência do antagonista selectivo dos receptores A<sub>1</sub>, DPCPX [120] nos efeitos inibitórios dos nucleótidos.

Nestas condições, os efeitos do ATP e ADP foram atenuados, mas não abolidos, na presença de DPCPX (0,1 μM; Fig. 13) indicando que parte do efeito inibitório mediado por estes agonistas resulta do facto de serem rapidamente metabolizados [64] gerando adenosina que activa os receptores A<sub>1</sub> e a restante parte do efeito poderá ser mediada por receptores P2Y.



**Fig.13** Efeito de vários nucleótidos purínicos na liberação de trítio induzida por 100 p/5 Hz ( $S_0-S_4$ ). Efeito dos compostos endógenos (A) ATP e (B) ADP e do análogo metabolicamente estável (C) ADPβS; na ausência e na presença do antagonista selectivo dos receptores  $A_1$ , DPCPX (0,1 μM). O DPCPX quando presente foi adicionado ao meio de perfusão desde o início da experiência e mantido até ao final. Os agonistas foram adicionados ao meio de perfusão 10 min antes de  $S_2-S_4$  em concentrações crescentes e mantidos até ao final do respectivo período de estimulação. Os resultados estão expressos em % de inibição em relação ao controlo como média ± SEM de 4-8 experiências.

\* $P < 0.05$ , significativamente diferente do controlo (solvente); \* $P < 0.05$ , significativamente diferente do efeito observado na ausência de DPCPX.



**Fig.14** Efeito dos vários nucleotídeos pirimidínicos na liberação de trítio induzida por 100 p/5 Hz ( $S_0-S_4$ ). Efeito do nucleotídeos endógenos (A) UTP e (B) UDP na ausência e na presença do antagonista selectivo dos receptores de adenosina  $A_1$  DPCPX (0,1  $\mu$ M). O DPCPX quando presente foi adicionado ao meio de perfusão desde o início da experiência e mantido até ao final. Os agonistas foram adicionados ao meio de perfusão 10 min antes de  $S_2-S_4$  em concentrações crescentes e mantidos até ao final do respectivo período de estimulação. Os resultados estão expressos em % de inibição em relação ao controlo como média  $\pm$  SEM de 5-6 experiências. \* $P < 0.05$ , significativamente diferente do controlo (solvente);  $^+ P < 0.05$ , significativamente diferente do efeito observado na ausência de DPCPX.

O efeito do ADP $\beta$ S, apesar da estabilidade metabólica deste composto, também foi atenuado pelo bloqueio dos receptores A<sub>1</sub>. Este resultado poderá ser simplesmente explicado por uma possível contaminação do ADP $\beta$ S comercial com ADP que poderá originar alguma adenosina activando os receptores A<sub>1</sub>. Uma outra explicação possível tem a ver com estudos recentes sugerindo que os receptores A<sub>1</sub> podem formar heterodímeros com receptores P2Y<sub>1</sub> que são receptores sensíveis ao bloqueio efectuado pelo DPCPX [97].

No caso dos agonistas pirimidínicos, UTP e UDP, o efeito do UTP não foi modificado pelo bloqueio dos receptores A<sub>1</sub>, excluindo a participação da adenosina nos efeitos deste agonista. No entanto, o efeito inibitório do UDP foi completamente abolido na presença de DPCPX. É pouco provável que exista contaminação do composto comercial com adenosina, assim como é pouco provável que o metabolismo do UDP dê origem à formação de adenosina. A explicação mais plausível para este resultado é o efeito do UDP ser um efeito indirecto que conduz à libertação de adenosina, sendo esta responsável pelo efeito inibitório do UDP observado na ausência de DPCPX. Esta explicação é a apenas uma hipótese que será explorada em experiências futuras.

#### **4. Caracterização farmacológica dos receptores P2Y envolvidos na inibição da libertação de NA**

Uma vez identificados os nucleótidos que exercem efeitos inibitórios na libertação de NA independentes da activação de receptores A<sub>1</sub>, procedeu-se à caracterização farmacológica dos receptores P2Y envolvidos nesses efeitos, recorrendo a antagonistas selectivos recentemente desenvolvidos para diferentes subtipos de receptores P2Y [58], (ANEXO - Tabela 3).

Os resultados da caracterização farmacológica dos receptores envolvidos nos efeitos do UTP e UDP encontram-se representados na Fig. 15. O efeito inibitório do UDP (1 mM) na libertação de trítio induzido por EE foi abolido pelo DPCPX (0,1  $\mu$ M; ver Fig. 14) e também pelo MRS 2578 (1  $\mu$ M) que é um antagonista selectivo dos receptores P2Y<sub>6</sub> [122].

Este resultado vem suportar a hipótese de se tratar de um efeito indirecto do UDP na libertação de NA, envolvendo a activação de receptores P2Y<sub>6</sub> e subsequentemente receptores A<sub>1</sub> da adenosina.

O efeito inibitório do UTP (1 mM) foi parcialmente atenuado pelo MRS 2578 (1 µM) sugerindo que parte do efeito inibitório mediado por este agonista envolve a activação de receptores P2Y<sub>6</sub>, no entanto outros receptores, nomeadamente os subtipos P2Y<sub>2,4</sub> poderão estar também envolvidos. Essa possibilidade não foi de momento explorada porque não existem comercializados antagonistas selectivos para esses subtipos de receptores P2Y o que dificulta a identificação dos seus efeitos fisiológicos e neuromoduladores. Quando testado isoladamente o MRS 2578 (1 µM) não modificou a libertação basal de trítio nem a libertação induzida por EE indicando a ausência de qualquer efeito tónico sobre a libertação de NA mediado pelos receptores P2Y<sub>6</sub>.

Os resultados da caracterização farmacológica dos receptores envolvidos nos efeitos do ADP (0,3 mM) e ADPβS (0,3 mM) encontram-se representados na Fig. 16.

O efeito inibitório do ADP foi atenuado pela ADA e DPCPX, mas não foi modificado pelo inibidor da 5'-NT AOPCP (Fig. 16) confirmando que parte dos efeitos inibitórios do ADP na libertação de trítio induzido por EE são mediados pela adenosina, via activação de receptores A<sub>1</sub>. A ausência de efeito do AOPCP sugere que a 5'-NT não participa no metabolismo do ADP, podendo envolver a participação de outras enzimas envolvidas como a fosfatase alcalina [60]. Os resultados também indicam que o efeito do ADP (0,3 mM) foi atenuado pelo MRS 2500 (1 µM) que é um antagonista selectivo dos receptores P2Y<sub>1</sub> [123]. Quando testado na presença dos dois antagonistas DPCPX (0,1 µM) e MRS 2500 (1 µM), o efeito do ADP foi abolido (Fig. 16). Este conjunto de resultados indica que os receptores A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub> estão envolvidos no efeito inibitório do ADP. Quando testados isoladamente, nem o DPCPX (0,1 µM) nem o MRS 2500 (1 µM) modificaram a libertação de trítio induzido por EE, indicando uma ausência de efeitos tónicos mediados por estes receptores.

O efeito inibitório do ADPβS (0,3 mM), ao contrário do efeito do ADP (0,3 mM), não foi modificado pela ADA (2 U/ml), excluindo a participação da adenosina (Fig. 17). O ADPβS tem grande afinidade para os receptores P2Y<sub>1,12,13</sub>, pelo que foi testada a sua interacção com antagonistas selectivos para cada um dos subtipos de receptores P2Y mencionados.

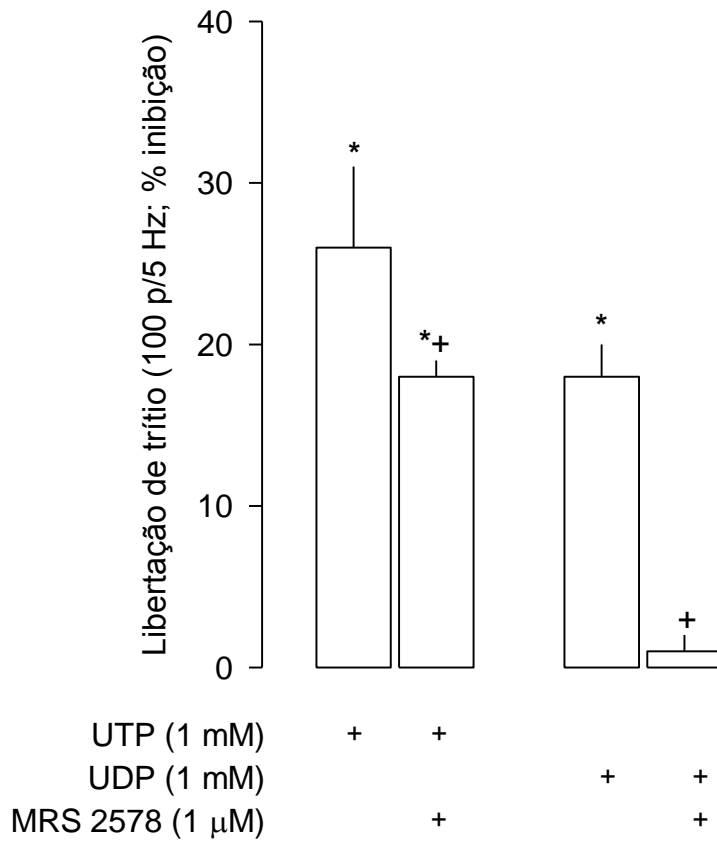


O MRS 2500 que é selectivo para os receptores P2Y<sub>1</sub>, o AR-C66096 que é selectivo para os receptores P2Y<sub>12</sub> [124] e o MRS 2211 que é selectivo para os receptores P2Y<sub>13</sub> [125] foram testados com o objectivo de identificar qual ou quais destes subtipos de receptores P2Y medeiam o efeito inibitório do ADPβS na libertação de trítio induzida por EE. Nenhum dos antagonistas, quando testados isoladamente, modificaram a libertação de trítio induzida por EE.

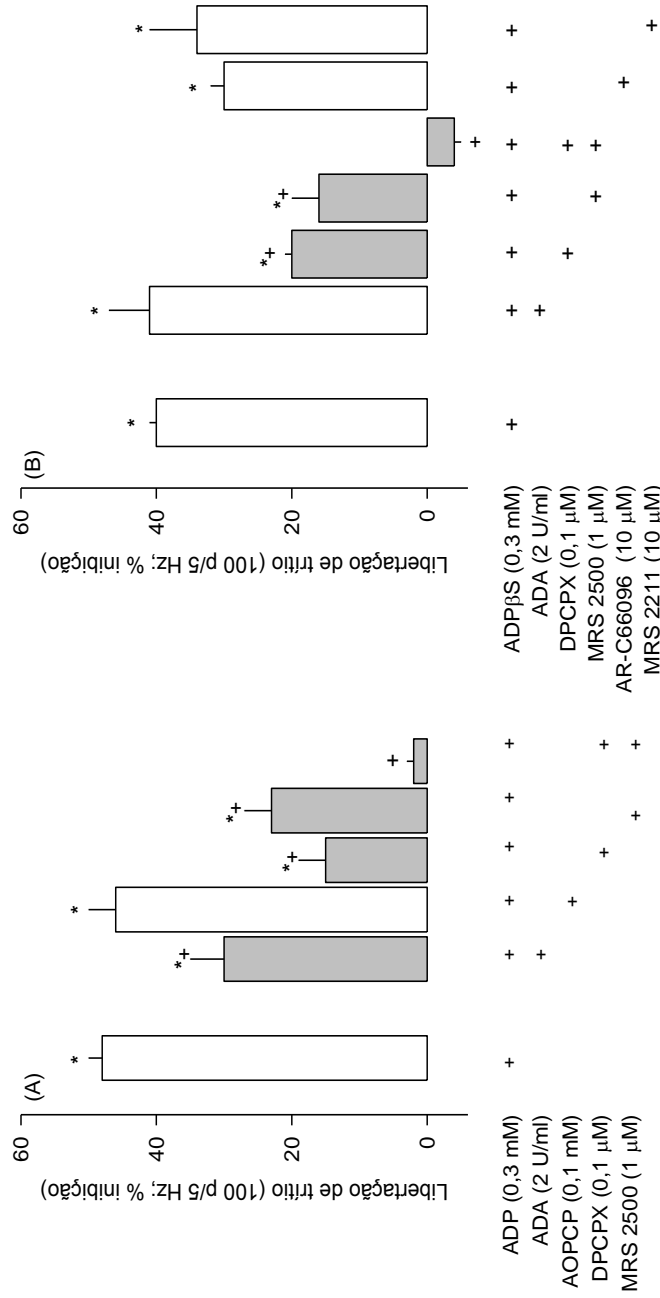
O efeito do ADPβS (0,3 mM) não foi modificado pelos antagonistas AR-C66096 (10 μM) e MRS 2211 (10 μM), sendo atenuado pelo MRS 2500 (1 μM) e pelo DPCPX (0,1 μM) e abolido quando estes MRS 2500 (1 μM) e DPCPX (0,1 μM) foram testados em simultâneo, indicando o envolvimento de receptores A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub>.

No entanto o efeito do ADPβS (0,3 mM) difere do efeito do ADP (0,3 mM) pelo facto de não ter sido modificado pela ADA o que indica que a adenosina não desempenha qualquer papel no efeito do ADPβS. Perante esta observação é possível sugerir que o efeito inibitório do ADPβS (0,3 mM) poderá ser parcialmente mediado por um tipo de receptor diferente que combina propriedades farmacológicas dos receptores A<sub>1</sub> e dos receptores P2Y<sub>1</sub>.

Os resultados obtidos com este conjunto de experiências permitem afirmar que todos os nucleótidos testados, ATP, ADP, ADPβS, UTP e UDP, causaram uma inibição da libertação de trítio induzida pela EE de fatias do córtex de rato. O efeito inibitório observado resulta da activação de diferentes subtipos de receptores purinérgicos, tendo sido identificada a participação de receptores A<sub>1</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>1</sub> e possivelmente um heterodímero A<sub>1</sub>/ P2Y<sub>1</sub>.



**Fig. 15** Caracterização farmacológica do receptor P2 envolvido nos efeitos do UTP e UDP na libertação de trítio induzida por 100 p/5 Hz (S<sub>0</sub>-S<sub>2</sub>). Interação dos nucleótidos com o antagonista selectivo dos receptores P2Y<sub>6</sub> MRS 2578. Os agonistas foram adicionados ao meio 10 min antes de S<sub>2</sub> e mantidos até ao final do período de estimulação. O MRS 2578 foi adicionado ao meio de perfusão 20 min antes de S<sub>2</sub> e mantido até ao final da experiência. Os resultados estão expressos em % de inibição como média ± SEM de 6 experiências. \**P* <0.05, significativamente diferente do controlo (solvente); <sup>†</sup>*P* <0.05, significativamente diferente do efeito do nucleótido testado isoladamente.



**Fig.16** Caracterização farmacológica do receptor P2 envolvido nos efeitos do ADP (A) e ADPβS (B) na liberação de trítio induzida por 100 p/5 Hz (S<sub>0</sub>-S<sub>2</sub>). Influência do inibidor da 5<sup>2</sup>-NT, AOPCP e da ADA; interação com os antagonistas selectivos para os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub>, MRS2500, AR-C66096 e MRS 2211, respectivamente. Os agonistas foram adicionados ao meio de perfusão 10 min antes de S<sub>2</sub> até ao final da estimulação. Os antagonistas e inibidores enzimáticos foram adicionados ao meio de perfusão 20 min antes de S<sub>2</sub> e mantidos até ao final da experiência. Os resultados estão expressos em % de inibição como média ± SEM de 6 experiências. \*P < 0,05, significativamente diferente do controlo (solvente); \*\*P < 0,05, significativamente diferente do efeito do agonista testado isoladamente.

## 5. Contribuição dos heterodímeros $A_1/P2Y_1$ na modulação da libertação de NA

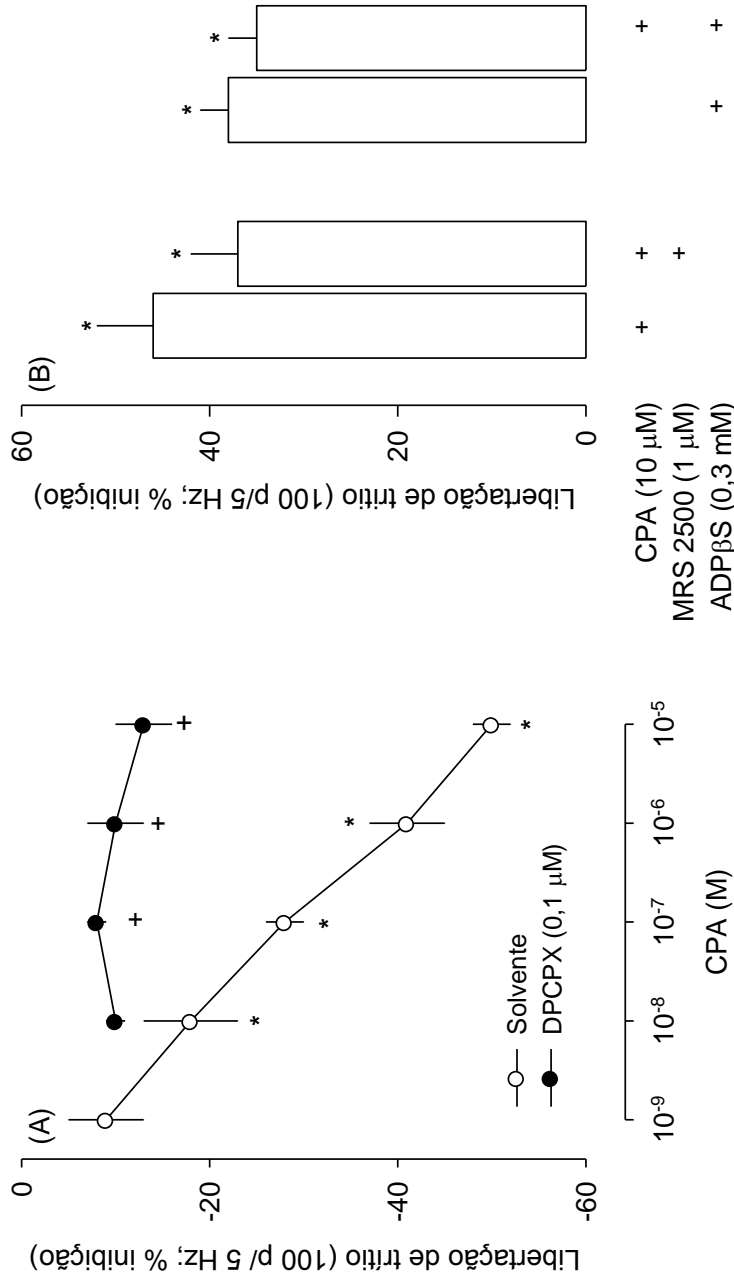
Os resultados obtidos das experiências anteriores deram a indicação de uma forte participação dos receptores  $A_1$  na inibição da libertação de trítio induzida por EE (100 p/5 Hz), em consequência do metabolismo dos nucleótidos testados. No sentido de confirmar essa participação dos receptores  $A_1$  directamente, testou-se o efeito do agonista selectivo para estes receptores, a CPA [126], na ausência e na presença de DPCPX.

A CPA (0.001-10  $\mu$ M) causou uma inibição na libertação de trítio induzido por EE de forma dependente da concentração (Fig. 17A), sendo este efeito antagonizado por 0,1  $\mu$ M DPCPX.

Tendo em conta a possibilidade dos receptores  $A_1$  poderem associar-se a receptores  $P2Y_1$  para formar heterodímeros  $A_1/P2Y_1$  com uma farmacologia mista: são activados por agonistas  $A_1$  e  $P2Y_1$  e o efeito que medeiam é bloqueado por antagonistas  $A_1$  mas não por antagonista  $P2Y_1$ , foram efectuados algumas experiências no sentido de confirmar estas indicações da literatura [96,97].

O efeito da CPA (10  $\mu$ M) não foi modificado pelo MRS 2500 (1  $\mu$ M; Fig. 17B) à semelhança do que tinha sido observado com o MRS 2179 [96] que também é um antagonista selectivo para os receptores  $P2Y_1$  [127]. A CPA (10  $\mu$ M) e o ADP $\beta$ S (0,3 mM) causaram uma inibição da libertação de trítio induzido por EE da mesma magnitude, mas quando combinados, o efeito máximo obtido por ambos foi semelhante ao efeito que cada agonista exerceu individualmente (Fig. 17B). Estes resultados indicam que os dois agonistas, parecem competir para o mesmo local de acção o que poderá impedir a ocorrência de efeitos aditivos.

A ausência de efeitos aditivos entre os dois agonistas poderá dever-se à existência de um heterodímeros  $A_1/P2Y_1$  [96,97] ou poderá também sugerir que os receptores  $A_1$  e  $P2Y_1$  partilham o mesmo mecanismo de sinalização intracelular o que terá impedido o desenvolvimento do efeito máximo de ambos os receptores quando activados. Este mecanismo é muito comum entre receptores inibitórios [128] e poderá ser relevante neste contexto uma vez que os  $\alpha_2$ -autorreceptores se encontram activos.



**Fig. 17** (A) Caracterização farmacológica do receptor envolvido no efeito da CPA e (B) contribuição dos heterodímeros A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub> na modulação da liberação de trítio induzida por 100 p/5 Hz (S<sub>0</sub>-S<sub>2</sub>). Efeito do agonista selectivo dos receptores A<sub>1</sub> da adenosina CPA, na ausência e na presença dos antagonistas selectivos dos receptores A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub>, DPCPX e MRS 2500, respectivamente. Interação dos efeitos da CPA e do ADPβS. Os agonistas foram adicionados ao meio 10 min antes de S<sub>2</sub> e mantidos até ao final do período de estimulação. Os antagonistas foram adicionados ao meio de perfusão 20 min antes de S<sub>2</sub> e mantidos até ao final da experiência. Os resultados estão expressos em % de inibição como média ± SEM de 6 experiências. \*P < 0.05, significativamente diferente do controlo (solvente); +P < 0.05, significativamente diferente do efeito do agonista testado isoladamente.

## 6. Captação astrogliar de NA: influência dos receptores purinérgicos

Os astrócitos desempenham um papel importante na regulação da concentração sináptica de neurotransmissores [42,74]. Expressam transportadores para NA similares aos encontrados nos neurónios, ajudando a terminar a sua acção [12] pelo que a regulação destes transportadores irá ter um impacto relevante na regulação da transmissão noradrenérgica.

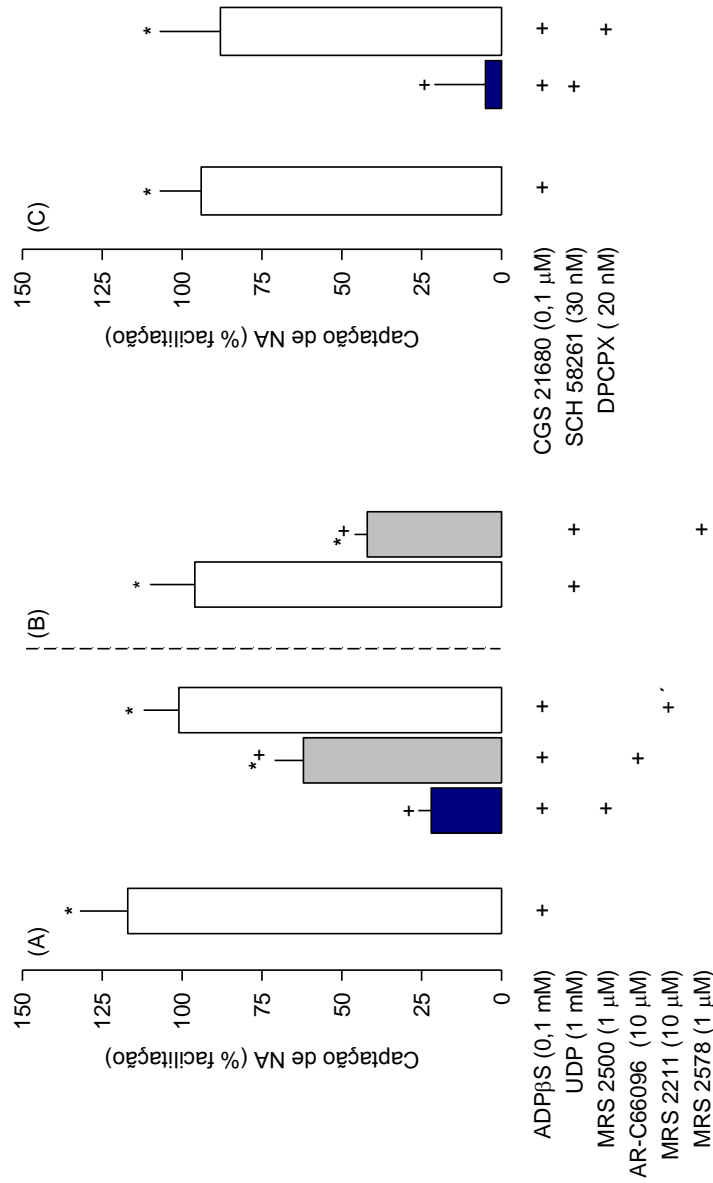
Pouco se sabe sobre a regulação do transportador de NA nos astrócitos, especialmente no que se refere ao papel dos receptores purinérgicos considerando o facto de o ATP ser um co-transmissor com a NA nos neurónios do LC que se projectam para o córtex cerebral [37] e os astrócitos expressarem a maioria dos receptores purinérgicos clonados [41].

Neste contexto foram testados vários antagonistas P2 e dos receptores da adenosina para avaliar o seu efeito na captação de NA e conseqüentemente a sua influência na transmissão noradrenérgica, usando como modelo culturas primárias de astrócitos obtidos a partir do córtex cerebral.

Em condições basais a captação de NA pelos astrócitos foi de  $14,1 \pm 1,1$  pmol/mg proteína. Vários agonistas dos receptores purinérgicos foram testados, mas nem todos causaram um efeito significativo na captação de NA pelos astrócitos. Por exemplo, a CPA e o UTP não causaram qualquer efeito enquanto o ATP (1 mM) causou um aumento de  $74 \pm 25$  % ( $n=6$ ;  $P < 0.05$ ). Foram seleccionados para um estudo mais detalhado os agonistas que causaram efeitos de maior magnitude e reprodutibilidade.

O ADP $\beta$ S (0,1 mM) que actua preferencialmente nos receptores P2Y<sub>1,12,13</sub> causou um aumento da captação de NA, que não foi modificado pelo antagonista MRS 2211 (10  $\mu$ M), sendo atenuado na presença dos antagonistas MRS 2500 (1  $\mu$ M) e AR-C66096 (10  $\mu$ M; Fig.18A). Estes resultados sugerem que os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> estão envolvidos na remoção da NA da fenda sináptica, aumentando a sua captação pelos astrócitos.

O UDP (1 mM; Fig. 18B) e o CGS21680 (0,1  $\mu$ M; Fig. 18C) também aumentaram a captação de NA pelos astrócitos. O efeito do UDP (1 mM) foi atenuado pelo MRS 2578 (1  $\mu$ M). O efeito do agonista selectivo dos receptores A<sub>2A</sub> CGS 21680 [129] não foi modificado pelo DPCPX (20 nM), sendo abolido pelo SCH 58261 (30 nM; Fig. 18C), um antagonista selectivo para os receptores A<sub>2A</sub> [130].



**Fig.18** Influência de agonistas dos receptores purinérgicos na captação de [<sup>3</sup>H]-NA em culturas primárias de astrócitos de córtex de rato. (A) Efeito do ADPβS e interação com os antagonistas selectivos dos receptores P2Y<sub>1,12,13</sub> MRS 2500, AR-C66096 e MRS 2211, respectivamente (B) Efeito do UDP e interação com o antagonista selectivo P2Y<sub>6</sub> MRS 2578. (C) Efeito do CGS21680 e interação com o antagonista selectivo para os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub>, DPCPX e SCH 58261, respectivamente. Os agonistas foram adicionados ao meio 15 min antes e os antagonistas 30 min antes da incubação com 30 nM [<sup>3</sup>H]-NA durante 15 min. Os resultados estão expressos em % de facilitação da captação como média ± SEM de 5 experiências. \**P* <0,05, significativamente diferente do controlo; +*P* <0,05, significativamente diferente do efeito do agonista testado isoladamente.

# DISCUSSÃO



A investigação dos últimos anos sobre o sistema noradrenérgico cerebral tem revelado que existem diferenças significativas no funcionamento deste sistema entre indivíduos, que a NA desempenha um papel crítico no comportamento [1,2,5,6] e mais importante do que os aspectos genéticos, verifica-se que um tónus noradrenérgico elevado predispõe os indivíduos para vários tipos de doenças, desde as perturbações do humor [8] e doenças neurodegenerativas [4] ao excesso de peso corporal, hipertensão, diabetes ou asma [9]. Estes resultados tornam imperativo um aumento do conhecimento do modo de funcionamento das redes neuronais noradrenérgicas cerebrais e dos mecanismos que regulam a transmissão noradrenérgica, especialmente no SNC.

A libertação de NA no córtex cerebral é principalmente desencadeada pela activação de neurónios que se projectam a partir do LC, o principal núcleo do tronco cerebral que liberta noradrenalina no cérebro [131]. Estes neurónios estão expressam receptores P2X e P2Y que quando activados aumentam a descarga espontânea de potenciais de acção [91,131] que conduzem à libertação de NA. Adicionalmente, o glutamato libertado no córtex cerebral, também induz a libertação de NA através da activação de receptores NMDA [93,112], ambos os processos sendo regulados pela activação de receptores P2.

A família de receptores P2 inclui os receptores ionotrópicos P2X que estão envolvidos em acções excitatórias a nível pós-sináptico e quando presentes nos terminais nervosos aumentam a libertação de neurotransmissores [19,32,54] e os receptores metabotrópicos P2Y dos quais se conhecem 8 subtipos P2Y<sub>1,2,4,6,11,12,13,14</sub> [55] que na maioria dos casos, no que diz respeito à transmissão sináptica, estão envolvidos na inibição da libertação de neurotransmissores [29,32]. Estes receptores têm como ligandos endógenos os nucleótidos purínicos, ATP e ADP, os nucleótidos pirimidínicos UTP e UDP [56].

O receptor P2Y<sub>1</sub> foi identificado como um dos subtipos de receptores P2Y responsáveis pela modulação dos receptores NMDA corticais [94] e poderá estar envolvido, pelos menos indirectamente [111], na modulação da libertação de NA. No entanto os receptores P2Y envolvidos na modulação da libertação de NA no córtex cerebral induzida por estimulação dos neurónios do LC ainda não foram identificados [71].

Adicionalmente, o ATP e outros nucleótidos são libertados das células gliais em resposta à estimulação por neurotransmissores [77,89] e desempenham um papel importante na comunicação neuronal [27,28,41] e neurónio-astrocítico [86,87,88], aumentando a eficiência sináptica [89,90] e regulando a concentração sináptica de neurotransmissores [74] incluindo a NA [12].

O objectivo desta tese consistiu na identificação dos receptores purinérgicos envolvidos na regulação da transmissão noradrenérgica no córtex cerebral de rato. Efectuaram-se estudos em que se testou o efeito de vários agonistas P2Y e a sua interacção com antagonistas selectivos: i) na libertação de NA de fatias de córtex induzida por estimulação eléctrica (EE), que consistiu na aplicação de trens de 100 pulsos a 5 Hz; ii) na captação de NA em culturas primárias de astrócitos preparadas a partir do córtex cerebral.

A libertação de trítio induzida por estimulação eléctrica EE (100 p/5 Hz) das fatias de córtex pré-incubadas com [<sup>3</sup>H]-NA foi usada como indicador da libertação neuronal de NA induzida por potenciais de acção, funcionando como indicador da libertação de NA endógena [189]. Os resultados obtidos comprovam que a libertação de trítio é dependente da exocitose de vesículas como indica a sua dependência em relação ao Ca<sup>2+</sup> e a sensibilidade ao bloqueio efectuado pelo TTX que é um inibidor dos canais de Na<sup>+</sup> dependentes da voltagem envolvidos na propagação de potenciais de acção. Por essa razão, alterações na libertação de trítio induzida por EE por acção dos agonistas purinérgicos, ou outros fármacos testados, indicam alterações na libertação de NA. Os resultados obtidos no presente estudo conformam também que a libertação de trítio induzida por EE está sujeita a um feedback negativo mediado por receptores  $\alpha_2$ -autorreceptores localizados nos terminais nervosos noradrenérgicos [16].

As condições de EE usadas foram seleccionadas considerando estudos anteriores que indicavam que estes parâmetros de estimulação (100 p/5 Hz) eram os mais adequados para induzir a libertação de glutamato [113,114].

Vários estudos demonstraram que o glutamato estimula a libertação de NA em fatias de córtex [93,111,112] e de hipocampo [132,133] através da activação de receptores NMDA, sugerindo tratar-se de um processo comum a várias regiões cerebrais que recebem terminações nervosas noradrenérgicas provenientes do LC. Segundo essa lógica quisemos comprovar se o mesmo se verificava nas condições experimentais usadas no presente estudo.

A EE com 100 p/5 Hz induziu a libertação de NA de uma forma independente da activação de receptores NMDA, como comprovam as experiências em que o antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato, kinurenato [115] não modificou a libertação de NA. No entanto, estas experiências foram efectuadas na presença de concentrações fisiológicas de  $Mg^{2+}$ , que inibe os receptores NMDA de uma forma dependente do potencial de membrana [116]. Em experiências sem  $Mg^{2+}$  no tampão de perfusão, a libertação de NA foi igualmente dependente do  $Ca^{2+}$ , mas foi parcialmente atenuada pelo kinurenato e pelo antagonista selectivo dos receptores NMDA MK 801 [117], sugerindo que apenas na ausência de  $Mg^{2+}$  existem condições para que o padrão de EE usado permita que o glutamato possa contribuir para a libertação de NA.

Curiosamente e comparando os resultados da omissão de  $Ca^{2+}$  nas duas condições estudadas (com e sem  $Mg^{2+}$ ) verificou-se que na ausência de  $Mg^{2+}$  o efeito da omissão de  $Ca^{2+}$  foi menor do que nas experiências com  $Mg^{2+}$ , enquanto a libertação induzida por EE foi superior na ausência de  $Mg^{2+}$  (Secção 1 dos Resultados). Estes resultados podem em parte ser explicados pela existência de uma interacção entre os dois iões na manutenção do potencial de membrana. Ao remover o  $Mg^{2+}$  poderá ter ocorrido uma alteração do potencial da membrana, tornando-se instável e favorecendo o prolongamento da despolarização, que terá conduzido a uma maior libertação de NA e a uma diminuição do efeito da omissão de  $Ca^{2+}$  no meio.

Em conjunto estes resultados permitem concluir que as condições de estimulação usadas neste estudo 100 p/5 Hz, na presença de 1,2  $Mg^{2+}$ , não são geram despolarizações suficientemente intensas para prevenir o bloqueio dos receptores NMDA pelo  $Mg^{2+}$  e por essa razão o glutamato não contribui significativamente para a libertação de NA induzida por estes parâmetros de estimulação em condições fisiológicas. Em estudos anteriores efectuados em fatias de córtex, o NMDA induziu a libertação de NA, sendo o efeito inibido na presença de  $Mg^{2+}$  ou TTX e após remoção de  $Ca^{2+}$  do meio [112].

Tendo como objectivo identificar os receptores P2Y que estão envolvidos na regulação da libertação de NA no córtex de rato, numa primeira abordagem, testou-se o efeito de vários nucleótidos que activam diferentes receptores P2Y. O nucleótidos testados foram: ATP, ADP, ADP $\beta$ S, UTP e UDP. O ATP é um agonista endógeno mas não é selectivo, o ADP e o ADP $\beta$ S têm maior afinidade para os subtipos P2Y<sub>1,12,13</sub>, no entanto o ADP $\beta$ S tem a vantagem de ser metabolicamente mais estável que o ADP [118].

O UTP activa os receptores pirimidínicos que incluem os subtipos P2Y<sub>2,4,6</sub> e o UDP é selectivo para os receptores P2Y<sub>6</sub> [119]. Uma vez que a maioria dos nucleótidos testados são metabolicamente instáveis podendo ser rapidamente metabolizados dando origem a adenosina, as experiências foram conduzidas na ausência e na presença de DPCPX (0,1 µM) para prevenir a contribuição dos receptores A<sub>1</sub> que causam inibição da libertação de neurotransmissores [29].

Todos os nucleótidos testados causaram uma inibição da libertação de NA induzida por EE (100 p/5 Hz) sendo o efeito dependente da concentração, com seguinte ordem de potência: ADP ≥ ATP > ADPβS > UTP ≥ UDP. Na presença de DPCPX que é um antagonista selectivo para os receptores A<sub>1</sub> da adenosina [120] o efeito de todos os nucleótidos testados foi atenuado à excepção do efeito do UTP. Curiosamente e inesperadamente o efeito do UDP foi abolido pelo DPCPX, sendo pouco provável o metabolismo deste nucleótido originar adenosina.

Para identificar os diferentes receptores P2Y envolvidos nos efeitos dos nucleótidos testados procedeu-se à caracterização farmacológica através de estudos de interacção com antagonistas selectivos para os diferentes subtipos de receptores P2Y [Tabela 3 do ANEXO] e em alguns casos estudou-se a influência de enzimas que interferem com o metabolismo destes compostos como o AOPCP que é um inibidor da 5'-NT que converte o AMP em adenosina [61] e a ADA que metaboliza a adenosina transformando-a em inosina que é inactiva nos receptores purinérgicos [62,63].

Os nucleótidos pirimidínicos, o UTP e UDP, apresentam selectividades diferentes: o UTP activa receptores P2Y<sub>2,4</sub> e em tem baixa afinidade para os receptores P2Y<sub>6</sub>; enquanto o UDP é selectivo para os receptores P2Y<sub>6</sub>. Infelizmente não existem antagonistas selectivos disponíveis no mercado para distinguir os efeitos mediados pelos receptores P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> mas existe o MRS 2578 que é um antagonista selectivo para os receptores P2Y<sub>6</sub> [122]. Este antagonista bloqueou parte do efeito do UTP, sugerindo que o efeito inibitório que medeia é parcialmente resultante da activação de receptores P2Y<sub>6</sub> o que pode ser explicado pela baixa afinidade do UTP para este receptor ou pelo facto do UTP ser parcialmente metabolizado por E-NTPDases [65] dando origem a UDP que é o agonista natural destes receptores. Adicionalmente, parte do efeito inibitório do UTP pode ser mediado por receptores P2Y<sub>2</sub> e/ou P2Y<sub>4</sub>. Por exemplo, na medial habenula de rato o UTP causou uma inibição da libertação de glutamato por activação de receptores P2Y<sub>2</sub> [134].

O efeito do UDP é mais complexo e difícil de explicar uma vez que foi abolido pelo DPCPX e também pelo MRS 2578, sugerindo que ambos os receptores estão envolvidos no efeito inibitório do UDP na libertação de NA induzida por EE. Este estudo, mostra pela primeira vez, uma participação dos receptores P2Y<sub>6</sub> na modulação da libertação de NA. Desconhece-se qual a expressão de receptores P2Y<sub>6</sub> nos neurónios do LC, mas verifica-se uma elevada expressão destes receptores do córtex cerebral de rato ao nível das células gliais: astrócitos e células da micróglia, que quando activadas, medeiam efeitos relevantes no contexto da resposta inflamatória do SNC [121,135] e podem eventualmente modificar a resposta neuronal através da libertação de mensageiros [136]. Uma vez que o UDP não activa receptores A<sub>1</sub> e é pouco provável que do seu metabolismo resulte a formação de adenosina é plausível colocar a hipótese de que os efeitos inibitórios do UDP são indirectos, possivelmente mediados pela adenosina que se liberta em consequência da activação de receptores P2Y<sub>6</sub> presentes nas células gliais, constituindo um novo mecanismo de comunicação neurónio-glia que merece ser explorado em futuras experiências.

O efeito inibitório do ADP na libertação de NA foi atenuado pela ADA e DPCPX indicando que resulta em parte do seu metabolismo em adenosina e consequente activação dos receptores A<sub>1</sub>. A ausência de influência do AOPCP nos efeitos do ADP sugere que a 5'-NT não está envolvida no seu metabolismo, no entanto outras enzimas como a fosfatase alcalina podem cumprir o mesmo efeito [60]. O efeito inibitório do ADP foi também parcialmente bloqueado pelo antagonista selectivo dos receptores P2Y<sub>1</sub> MRS 2500 [123], sendo abolido pela combinação de MRS 2500 com DPCPX. Estes resultados sugerem que ambos os receptores P2Y<sub>1</sub> e A<sub>1</sub> são responsáveis pela totalidade do efeito inibitório do ADP na libertação de NA. À semelhança do ADP, o efeito inibitório do ADPβS na libertação de NA induzida por EE é também mediado por receptores A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub>, tendo sido atenuado pelos antagonistas DPCPX e MRS 2500 e abolido pela sua combinação de ambos. Apesar de ter igualmente afinidade para os receptores P2Y<sub>12</sub> e P2Y<sub>13</sub> os antagonistas selectivos destes receptores, AR-C66096 [124] e MRS 2211 [125] não modificaram o efeito do ADPβS.

Curiosamente, nas experiências com a ADA, esta enzima não modificou o efeito inibitório do ADPβS, o que é suportado pelo facto deste composto ser mais estável à degradação pelas ecto-nucleotidases [118], no entanto este resultado entra em conflito com a atenuação causada pelo DPCPX o que sugere que embora os receptores A<sub>1</sub> possam estar envolvidos, essa participação não resulta da formação e activação pela adenosina.

Estudos anteriores demonstraram que os subtipos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e/ou P2Y<sub>13</sub> modulam a libertação de NA em fatias de hipocampo [92] e na medula espinal [137] por mecanismos indirectos. Enquanto nos terminais simpáticos periféricos os receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub> são os principais subtipos envolvidos na modulação da libertação de NA [138,139,140].

Os resultados obtidos com nucleótidos purínicos sugerem que no córtex cerebral o receptor P2Y<sub>1</sub> constitui o principal subtipo P2Y envolvido na inibição da libertação de NA, sendo responsável uma parte substancial dos efeitos mediados pelo ADP e ADPβS. O receptor A<sub>1</sub> parece desempenhar igualmente um papel importante na modulação da libertação de NA em fatias de córtex como demonstram as experiências em que se testou o efeito da CPA que é um agonista selectivo dos receptores A<sub>1</sub> [126]. O envolvimento dos receptores A<sub>1</sub> nos efeitos dos nucleótidos pode ser uma consequência do metabolismo destes compostos com formação de adenosina, como é o caso do ADP. No entanto existe a possibilidade dos nucleótidos poderem interagir com os receptores A<sub>1</sub> independentemente da formação de adenosina, como parece ser o caso do ADPβS. Os receptores A<sub>1</sub> podem combinar-se com alguns subtipos de receptores P2Y, como por exemplo os receptores P2Y<sub>1</sub> e formar heterodímeros que apresentam uma farmacologia mista A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub> [96]. A existência deste tipo de heterodímeros foi demonstrada no córtex e noutras regiões cerebrais [95,96,97]. Estes receptores são activados por agonistas A<sub>1</sub> e P2Y<sub>1</sub> e bloqueados por antagonistas A<sub>1</sub> sendo resistentes ao bloqueio dos antagonistas P2Y [96]. Os resultados obtidos com o ADPβS parecem enquadrar-se parcialmente neste tipo de padrão farmacológico, o seu efeito foi parcialmente bloqueado pelo DPCPX embora a ADA não tenha exercido qualquer efeito. Esta possibilidade pode ainda ser suportada pelo facto do efeito da CPA não ser antagonizado pelo MRS 2500 e quando CPA (10 μM) foi testada em conjunto com ADPβS (0,3 mM) (concentrações que exercem um efeito próximo do máximo) não apresentaram efeitos aditivos, causando apenas uma inibição da libertação de NA de magnitude semelhante à registada para cada agonista individualmente.

Estes resultados sugerem uma competição dos agonistas para o mesmo receptor, neste caso um eventual heterodímero A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub>, ou para receptores diferentes que utilizam a mesma via de sinalização intracelular, como se tem verificado em interacções envolvendo receptores pré-sinápticos inibitórios [128].

Para além de regular a transmissão sináptica através da activação de receptores P2 localizados nos terminais nervosos que modificam a quantidade de neurotransmissor libertado para a fenda sináptica, o ATP e outros nucleótidos podem regular a transmissão sináptica por outros mecanismos. De acordo com o novo conceito de sinapse, as sinapses são tripartidas, os astrócitos são incluídos, constituindo elementos activos e parceiros dinâmicos no metabolismo cerebral e comunicação neuronal [42,74,75,90]. Os astrócitos podem participar na regulação da transmissão sináptica através de vários mecanismos que incluem: libertação de gliotransmissores como por exemplo o glutamato e o ATP [77,78], regulação da concentração de  $Ca^{2+}$  extracelular e de outros iões que participam nos potenciais de acção, regulação da concentração sináptica de neurotransmissores através da sua captação por mecanismos de transporte específicos [42,74] ou na regulação da eficiência sináptica através da libertação de factores de crescimento e citocinas [90].

A descoberta da importância dos astrócitos na homeostasia cerebral a vários níveis incluindo a de integração e regulação da eficiência sinápticas coincide com um crescendo de evidências que suportam a participação das células gliais na fisiopatologia das perturbações de humor [98,99,100]. Factores como o stress, excesso de glicocorticóides, alteração na expressão de genes e/ou de factores neurotróficos ou alterações nos transportadores gliais podem contribuir para a fisiopatologia da depressão [98].

Os astrócitos podem desempenhar um papel importante na regulação da transmissão noradrenérgica, não apenas através da libertação de ATP [77] que activa receptores presentes nos terminais nervosos regulando a libertação de NA, mas também através da remoção de NA da fenda sináptica por transportadores específicos semelhantes aos expressos pelos neurónios [12]. No hipocampo os transportadores neuronais são regulados por receptores P2X que desencadeiam a libertação de NA por inversão do transportador [103] desempenhando um papel regulador da transmissão noradrenérgica.

Essa possibilidade, no entanto, nunca foi explorada relativamente aos transportadores dos astrócitos. Adicionalmente, estes transportadores estão sujeitos a processos de regulação que são ainda desconhecidos. Por exemplo, recentemente foi demonstrado que uma exposição celular prolongada a corticoesteróides conduz a um aumento da expressão e função dos transportadores de NA [141].

Tendo por base esta informação estudou-se a influência de vários agonistas purinérgicos na captação de NA em culturas primárias de astrócitos obtidas de hemisférios cerebrais de rato. Dos vários agonistas testados o ADP $\beta$ S, UDP e o CGS 21680 foram os compostos que apresentaram efeitos mais significativos e reprodutíveis na captação astrogliar de NA. Todos eles aumentaram a captação de NA através da activação de diferentes receptores purinérgicos. O ADP $\beta$ S aumentou a captação de NA via activação de receptores P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub>; o seu efeito foi fortemente atenuado pelo antagonista MRS 2500 e parcialmente atenuado pelo AR-C66096. O efeito do UDP foi antagonizado pelo MRS 2578, e o efeito do CGS 21680 não foi modificado pelo DPCPX sendo abolido pelo antagonista selectivo dos receptores A<sub>2A</sub> SCH 58261 [130]. A CPA não exerceu qualquer efeito na captação de NA e o ATP causou um aumento significativo da captação de NA, mas inferior ao observado para os outros agonistas testados.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que no córtex de rato os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2/4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, A<sub>1</sub> e possivelmente heterodímeros A<sub>1</sub>/P2Y<sub>1</sub> estão envolvidos na inibição da libertação de NA. Adicionalmente, os receptores purinérgicos também afectam a transmissão noradrenérgica regulando a captação de NA pelos astrócitos. Os receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>6</sub>, e os receptores A<sub>2A</sub> da adenosina quando activados induziram um aumento da captação de NA contribuindo para terminar a acção deste neurotransmissor na fenda sináptica. Por mecanismos diferentes; diminuição da libertação ou aumento da captação de NA;, todos os receptores purinérgicos identificados contribuíram para uma redução da transmissão noradrenérgica.



**ANEXO**

**FARMACOLOGIA DOS RECEPTORES DA ADENOSINA**

**Tabela 1.** Receptores da adenosina: farmacologia e mecanismos de transdução [47].

Receptores	Agonistas Selectivos	Antagonistas Selectivos	Mecanismos de Transdução
A <sub>1</sub>	CPA	DPCPX	G <sub>i/o</sub> ; ↓AMPc
A <sub>2A</sub>	CGS 21680	ZM 241385 SCH 58261	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>s</sub> ; G <sub>olf</sub> ↑AMPc; ↑ PLC; ↑ PKC
A <sub>2B</sub>	(*)	Enprofylline MRS 1754	G <sub>s</sub> ; ↑AMPc; ↑ PKA
A <sub>3</sub>	AB-MECA CI-IB-MECA	MRE-3008-F20 VUF5574	G <sub>i/o</sub> ; G <sub>q/11</sub> ↓ AMPc; ↑ PLC; ↑ PKC
(*) NECA, apesar de não ser selectivo permanece agonista mais potente dos receptores A <sub>2B</sub> até ao momento [48,49].			

**FARMACOLOGIA DOS RECEPTORES P2X**

**Tabela 2.** Resumo da farmacologia dos receptores P2X [52].

	NC-IUPHAR subunit nomenclature						
	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
<b>Pharmacology</b>							
Agonist EC <sub>50</sub> values (μM) <sup>a</sup>							
ATP	0.07	1.2	0.5	10	10	12	100
2meSATP	0.07	1.2	0.3	10	10	9	100
αβ-meATP	0.3	>300	0.8	>300	>300	>100	> 300
BzATP	0.003	0.75	0.08	7	>500	-	20
Antagonist IC <sub>50</sub> values (μM) <sup>a</sup>							
Suramin	1	10	3	>500	4	>100	500
PPADS	1	1	1	>500	3	>100	50
TNP-ATP	0.006	1	0.001	15	-	-	> 30
IP <sub>2</sub> I	0.003	>300	2.8	Potentialiation	-	-	-
KN-62	-	-	-	-	-	-	0.3
A-317491	> 10	>100	0.10	>100	-	>100	> 100
RD-3	> 100	>100	0.10	>100	>100	-	> 100
A-740003	> 100	>100	>100	>100	-	>100	0.05
A-438079	>100	>100	>100	>100	-	>100	0.06
A-804598	>100	>100	>100	>100	-	>100	0.01
MRS2179	80	>100	>100	-	-	-	> 100
NF279	9	30	50	>100	-	-	20
NP449	0.7	>100	>100	>100	-	-	> 100
GSK314181A	>10	>10	>10	>10	-	-	0.10
AZ11645373	>10	>10	>10	>10	>10	-	0.10
Modulator EC <sub>50</sub> values (μM) <sup>a</sup>							
Ivermectin	-	>30	>30	0.25	-	-	> 30
Cibacron Blue	IC <sub>50</sub> (μM) = 0.7	-	Potentialiation	Potentialiation and block	-	-	-
Zn <sup>2+</sup>	-	Increase EC <sub>50</sub> = 7 μM	-	Increase 2 μM	-	-	-
H <sup>+</sup>	Decrease pK <sub>a</sub> 6.3	Increase pK <sub>a</sub> 7.3	Decrease pK <sub>a</sub> 6.0	Decrease pK <sub>a</sub> 6.8	-	-	Decrease pK <sub>a</sub> 6.1
Ca <sup>2+</sup>	No effect >100 mM	Block IC <sub>50</sub> = 87 mM	Block IC <sub>50</sub> = 15 mM	-	Decrease 7 mM	-	Decrease 3 mM

**FARMACOLOGIA DOS RECEPTORES P2Y**

**Tabela 3.** Receptores P2Y: farmacologia e mecanismos de transdução [56,57,58].

<b>Receptores</b>	<b>Agonista (humano)</b>	<b>Agonistas Ordem de Potencia</b>	<b>Antagonistas</b>	<b>Mecanismos de Transdução</b>
<b>P2Y<sub>1</sub></b>	ADP	2-MeSADP=ADPβS > 2-MeSATP=ADP > ATP	MRS 2179 MRS 2500 MRS 2279	G <sub>q/11</sub> ; ↑ PLC
<b>P2Y<sub>2</sub></b>	ATP=UTP	UTP=ATP> INS37217> Ap4A> ATPγS	RB2 AR-C 126313	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>i</sub> ; ↑ PLC
<b>P2Y<sub>4</sub></b>	UTP	UTP> UTPγS	RB2, PPADS	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>i</sub> ; ↑ PLC
<b>P2Y<sub>6</sub></b>	UDP	UDP>> UTP >2-MeSADP	MRS 2578 MRS 2567	G <sub>q/11</sub> ; ↑ PLC
<b>P2Y<sub>11</sub></b>	ATP	ARC67085 ≥ ATPγS	RB2 NF340	G <sub>q/11</sub> ; G <sub>s</sub> ↑AMPc; ↑ PLC
<b>P2Y<sub>12</sub></b>	ADP	2-MeSADP> ADP	AR-C66096 MRS 2395	G <sub>i/o</sub> ; ↓AMPc
<b>P2Y<sub>13</sub></b>	ADP	2-MeSADP ≥ADP > ADPβS	MRS 2211 ARC 67085	G <sub>i/o</sub> ; ↓AMPc
<b>P2Y<sub>14</sub></b>	UDP- glucose	UDP-glucose> UDP-galactose	-----	G <sub>i/o</sub> ; ↓AMPc

## EQUIPAMENTO USADO NAS EXPERIÊNCIAS DE PERIFUSÃO

**EQUIPAMENTO 1.** Vibrátomo da Leica VT1000S usado para fazer as fatias de córtex de cérebro. Na foto inferior pode visualizar-se o cérebro preparado para ser cortado em fatias.



**EQUIPAMENTO 2.** Sistema de perfusão associado a equipamento de estimulação eléctrica. Inclui 8 câmaras, um banho termostático, uma bomba peristáltica e um sistema constituído por frascos de recolha para cada câmara. Cada câmara contém um filtro de polipropileno colocado entre 2 eléctrodos de platina posicionados para que a voltagem seja de  $18 \text{ V.cm}^{-1}$ . Os eléctrodos, encontram-se ligados a uma ponte que faz a ligação a um osciloscópio e a um estimulador eléctrico.



**EQUIPAMENTO 3.** Contador de radiações  $\beta$  marca Beckman LS 6500.



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* **57**:1377-1384.
2. Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* **89**:535-606.
3. Fitzgerald PJ (2009) Is elevated noradrenaline an aetiological factor in a number of diseases? *Autonomic & Autacoid Pharmacology* **29**:143-156.
4. Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Brain Res Rev* **45**:38-78.
5. Ramos BP, Arnsten AF (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther* **113**:523-536.
6. Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* **10**:211-223.
7. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I (2001) Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* **58**:545-553.
8. Ressler KJ, Nemeroff CB (1999) Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry* **46**:1219-1233.
9. Role LW e Kelly JP (1991) The brain-stem; cranial nerves nuclei and the monoaminergic system. In: *Principles of Neuronal Science 3ª Ed.* Eds. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Elsevier. pp. 696-698.
10. Fillenz M (1992) Transmission: Noradrenaline. In: *Autonomic Neuroeffector Mechanisms.* Eds. Burnstock G e Hoyle HVC. Harwood Academic Publishers GmbH. Vol. 1, pp. 323-346.
11. <http://www.worldofmolecules.com/drugs/adrenaline.htm> (08-12-2010).
12. Inazu M, Takeda H, Matsumiya T (2003) Functional expression of the norepinephrine transporter in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* **84**:136-44.
13. Rang HP, Dale MM, Ritter M, Flower R (2007) Transmissão noradrenérgica. In: *Rang & Dale Farmacologia 6ª Ed.* Churchill Livingstone Elsevier. pp 168-175.
14. Rang HP, Dale MM, Ritter M, Flower R (2007) Outros transmissores e moduladores In: *Rang & Dale Farmacologia 6ª Ed.* Churchill Livingstone Elsevier. Londres. pp 492-493.
15. Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, Hein L (2007)  $\alpha_2$ -Adrenoceptor subtypes-unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int* **51**:277-81
16. Starke K (2001) Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *J Neurochem* **78**:685-693.



17. Trendelenburg AU, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K (2003) All three  $\alpha_2$ -adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 368:504-12
18. Bücheler MM, Hadamek K, Hein L (2002) Two  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes,  $\alpha_{2A}$  and  $\alpha_{2C}$ , inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* 109:819-826.
19. Kubista H, Boehm S (2006) Molecular mechanisms underlying the modulation of exocytotic noradrenaline release via presynaptic receptors. *Pharmacol Ther* 112:213-242.
20. Langer SZ (2008) Presynaptic autoreceptors. *Neurochem Int* 52:26-30.
21. Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Rev* 42:33-84.
22. Gibbs ME, Hutchinson DS, Summers RJ (2010) Noradrenaline release in the locus coeruleus modulates memory formation and consolidation; roles for  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors. *Neuroscience* 170:1209-1222.
23. Wiste AK, Arango V, Ellis SP, Mann JJ, Underwood MD (2008) Norepinephrine and serotonin imbalance in the locus coeruleus in bipolar disorder. *Bipolar Disorder* 10:349-59.
24. Lohmann (1929) Über die pyrophosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 17:624-625.
25. Lipman F (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv Enzymol* 1:99-162.
26. <http://www.ustboniface.mb.ca/cusb/abernier/biologie/Module1/metabolisme1.htm> (08-12-2010).
27. Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.
28. Fields ED, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
29. Gonçalves J, Queiroz G (2008) Presynaptic Adenosine and P2Y receptors. In: Südhof T, Starke, K (Ed.) *Handb Exp Pharmacol* Vol. 184, Springer, Heidelberg, pp. 339-372.
30. Ginsborg BL, Hirst GD (1972) The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol* 224:629-645.
31. Ribeiro JA, Walker J (1975) The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 54:213-218.
32. Sperlágh B, Heinrich A, Csölle C (2007) P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal* 3:269-284.
33. Holton FA, Holton P (1953) The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol* 119: 50P-51P.

34. Burnstock G (1976) Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* **1**:239-248.
35. Burnstock G (1995) Noradrenaline and ATP: cotransmitters and neuromodulators. *J Physiol Pharmacol* **46**:365-384.
36. Westfall DP, Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST (2002) ATP as a cotransmitter in sympathetic nerves and its inactivation by releasable enzymes. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:439-444.
37. Burnstock G (2004) Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* **4**:47-52.
38. Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North A (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Eur J Physiol* **452**:589-597.
39. Sperlágh B, Vizi ES (2001) Regulation of purine release. *Purinergic and Pyrimidinergic Signalling* (eds) Springer-Verlag Berlin **151**:179-208.
40. Bodin P, Burnstock G (2001) Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res* **26**:959-969.
41. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* **32**:19-29.
42. Barres BA (2008) The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* **60**:430-440.
43. Neary JT, Zimmermann H (2009) Trophic functions of nucleotides in the central nervous system. *Trends Neurosci* **32**:189-198.
44. Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L, Straub RW (eds) *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. Raven Press, New York, pp 107-118.
45. Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P<sub>2</sub>-purinoceptor? *Gen Pharmacol* **16**:433-440.
46. von Kügelgen I, Häussinger D, Starke K (1987) Evidence for a vasoconstriction-mediating receptor for UTP, distinct from the P<sub>2</sub> purinoceptor, in rabbit ear artery. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **336**:556-560.
47. 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.
48. Brackett LE, Daly JW (1994) Functional characterization of the A<sub>2B</sub> adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem Pharmacol* **47**:801-814.
49. Feoktistov I, Biaggioni I (1997) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors. *Pharmacol Rev* **49**:381-402.

50. Sebastião AM, Ribeiro JA (2000) Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci* **21**:341-346.
51. Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Senningssson P, Vougeois JM (2005) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**:191-270.
52. Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**:208-215.
53. Torres GE, Egan TM and Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. *J Biol Chem* **274**:6653-6659.
54. Schicker KW, Dorostkar MM, Boehm S (2008) Modulation of transmitter release via presynaptic ligand-gated ion channels. *Curr Mol Pharmacol* **1**:106-29.
55. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **58**:281-341.
56. von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* **110**:415-432.
57. Hussl S, Boehm S (2006) Functions of neuronal P2Y receptors. *Eur J Physiol* **452**:538-551.
58. Jacobson KA, Costanzi S, Joshi BV, Besada P, Shin DH, Ko H, Ivanov AA, Mamedova L (2006) Agonists and antagonists for P2 receptors. *Novartis Found Symp* **276**:58-68.
59. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* **2**:409-430.
60. Ohkubo S, Kimura J, Matsuoka I (2000) Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist sensitive ATP response. *Br J Pharmacol* **131**:1667-1672.
61. Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* **285**:345-365.
62. Franco R, Canela EI, Bozal J (1986) Enzymes of the purine metabolism in rat brain microsomes. *Neurochem Res* **11**:407-422.
63. 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* **126-127**:211-224.
64. Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmied Arch of Pharmacol* **362**:299-309.

65. Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* **276**:113-128.
66. Gray JH, Owen RP, Giacomini KM (2004) The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch* **447**:728-734.
67. Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD (1999) Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* **5**:216–224.
68. Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**:7673-7682.
69. Cunha RA, Sebastião AM, Ribeiro JA (1998) Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channelling to adenosine A<sub>1</sub> receptors. *J Neurosci* **18**:1987-1995.
70. Kukulski F, Sevigny J, Komoszynski M (2004) Comparative hydrolysis of extracellular adenine nucleotides and adenosine in synaptic membranes from porcine brain cortex, hippocampus, cerebellum and medulla oblongata. *Brain Res* **1030**:49–56.
71. von Kügelgen I, Kurz K, Starke K (1994) Evidence for P2-purinoceptor-mediated inhibition of noradrenaline release in rat brain cortex. *Br J Pharmacol* **113**:815-822.
72. Kettenmann H, Verkhratsky A (2008) Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci* **31**:653-659.
73. Fellin, T, Carmignoto G (2004) Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* **559**: 3-15.
74. Allen NJ, Barres BA (2009) Glia-more than just brain glue. *Nat Neurosci* **457**:675-677.
75. Perea G, Araque A (2010) Glia modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev* **63**:93-102.
76. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2003) Storage and release of ATP from Astrocytes in culture. *J Biol Chem* **278**:1354-1362.
77. Queiroz G, Meyer DK, Meyer A, Starke K, von Kügelgen I (1999) A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience* **91**:1171-1181.
78. Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* **52**:142-154.
79. Kucher BM, Neary JT (2005), Bi-functional effects of ATP/P2 receptor activation on tumor necrosis factor-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated astrocytes. *J Neurochem* **92**:525-535.

80. Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009), P2Y<sub>1</sub> receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures. *Glia* **57**:244-257.
81. Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* **19**:520-528.
82. Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* **16**:5073-5081.
83. Schipke CG, Kettnmann H (2004) Astrocyte responses to neuronal activity. *Glia* **47**:226–232
84. Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* **310**:113-6.
85. Haydon PG (2001) Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**:185-193.
86. Fields RD, Stevens B (2000) ATP in signalling between neurons and glia. *Trends in Neurosci* **23**:625-633.
87. Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* **1**:683-92.
88. Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* **40**:971-982
89. Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci* **8**:1078-1086.
90. Achour SB, Pascual O (2010) Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem Int* **57**:440–445.
91. Fröhlich R, Boehm S, Illes (1996) Pharmacological characterization of P2 purinoceptor types in rat locus coeruleus neurons. *Eur J Pharmacol* **315**:255-261.
92. Csölle C, Heinrich A, Kittel A, Sperlágh B (2008) P2Y receptor mediated inhibitory modulation of noradrenaline release in response to electrical field stimulation and ischemic conditions in superfused rat hippocampus slices. *J Neurochem* **106**:347-360.
93. Fink K, Göthert M, Molderings G, Schlicker E (1989) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated stimulation of noradrenaline release, but not release of other neurotransmitters, in the rat brain cortex: receptor location, characterization and desensitization. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **339**:514-521.

94. Luthardt J, Borvendeg SJ, Sperlagh B, Poelchen W, Wirkner K, Illes P (2003) P2Y<sub>1</sub> receptor activation inhibits NMDA receptor-channels in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal and parietal cortex. *Neurochem Int* **42**:161–172.
95. Tonazzini I, Trincavelli ML, Storm-Mathisen J, Martini C, Bergersen LH (2007) Co-localization and functional cross-talk between A<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> purine receptors in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **26**:890-902.
96. Yoshioka K, Hosoda R, Kuroda Y, Nakata H (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A<sub>1</sub> receptors with P2Y<sub>1</sub> receptors in rat brains. *FEBS Lett* **531**:299-303.
97. Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K (2005) Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* **25**:233-238.
98. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ (2007) Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **6**:219-233.
99. Cotter D, Mackay D, Landau S, Kerwin R, Everall I (2001) Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* **58**:545-553.
100. Ongur D, Drevets WC, Price JL (1998) Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:12390-12395.
101. Si X, Miguel-Hidalgo JJ, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Rajkowska G (2004) Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology* **29**:2088-2096.
102. Aston C, Jiang, L, Sokolov BP (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol Psychiatry* **10**:309-322.
103. Papp L, Balázsa T, Köfalvi A, Erdélyi F, Szabó G, Vizi ES, Sperlág B (2004) P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* **310**:973-980.
104. Axelrod J, Whitby LG, Hertting G (1961) Effect of psychotropic drugs on the uptake of <sup>3</sup>H-norepinephrine by tissues. *Science* **133**:383-384.
105. Starke K, Göthert M, Kilbinger H (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* **69**:864-989.
106. Gonçalves J, Queiroz G (1996) Purinoceptor modulation of noradrenaline release in rat tail artery: tonic modulation mediated by inhibitory P2Y- and facilitatory A<sub>2A</sub>-purinoceptors. *Br J Pharmacol* **117**:156-160.

107. Saura J (2007) Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation* **4**:1-11.
108. Queiroz G, Quintas C, Pestana D, Fraga S, Gonçalves J (2008) Influence of microglia on nucleotide induced astroglia proliferation. *Purinergic Signalling* **4**:S83.
109. Bönisch H (1984) The transport of (+)-amphetamine by the neuronal noradrenaline carrier. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **27**:267-272.
110. Zhu MY, Ordway GA (1997) Down-regulation of norepinephrine transporters on PC12 cells by transporter inhibitors. *J Neurochem* **68**:134-141.
111. Fink K, Bonisch H, Gothert M (1990) Presynaptic NMDA receptors stimulate noradrenaline release in the cerebral cortex. *Eur J Pharmacol* **185**:115-7
112. Fink K, Schultheiss R, Gothert M (1992) Stimulation of noradrenaline release in human cerebral cortex mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. *Br J Pharmacol* **106**:67-72.
113. Di Iorio P, Battaglia G, Ciccarelli R, Ballerini P, Giuliani P, Poli A, Nicoletti F, Caciagli F (1996) Interaction between A<sub>1</sub> adenosine and class II metabotropic glutamate receptors in the Regulation of purine and glutamate release from rat hippocampal slices. *J Neurochem* **67**:302-309.
114. Savage DD, Galindo R, Queen SA, Linda L, Paxton LL, Allan AM (2001) Characterization of electrically evoked [<sup>3</sup>H]-D-aspartate release from hippocampal slices. *Neurochem Int* **38**:255-3267.
115. Stone and Burton (1988) NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* **30**:333-368.
116. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**:462-465.
117. Wong EH, Kemp JA, Priestley T, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL(1986) The anticonvulsant MK 801 is a potent NMDA antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:7104-7108.
118. Gendaszewska-Darmach E, Maszewska M, Zaklos M, Koziolkiewicz M (2003) Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures. *Acta Biochim Pol* **50**:973-984.
119. Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM (1996) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y<sub>6</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **222**:303-308.

120. Lohse MJ, Klotz KN, Lindenborn-Fotinos J, Reddington M, Schwabe U, Olsson RA (1987) 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)-a selective high affinity antagonist radioligand for A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* **336**:204-210.
121. Di Virgilio F, Ceruti S, Bramanti P, Abbracchio MP (2009) Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci* **32**:79-87.
122. Mamedova LK, Joshi BV, Gao ZG, von Kügelgen I, Jacobson KA (2004) Diisothiocyanate derivatives as potent, insurmountable antagonists of P2Y<sub>6</sub> nucleotide receptors. *Biochem Pharmacol* **67**:1763-1770.
123. Hechler B, Nonne C, EJ, Cattaneo M, Cazenave J-P, Lanza F, Jacobson KA, Gachet C (2006) MRS2500 [2-Iodo-N<sup>6</sup>-methyl-(N)-methanocarba-2-deoxyadenosine-3,5-bisphosphate], a potent, selective, and stable antagonist of the platelet P2Y<sub>1</sub> receptor with strong antithrombotic activity in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:556-563.
124. Ingall AH, Dixon J, Bailey A, Coombs ME, Cox D, McNally JI, Hunt SF, Kindon ND, Teobald BJ, Willis PA, Humphries RG, Leff P, Clegg JA, Smith JA, Tomlinson W (1999) Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem* **42**:213-220.
125. Kim YC, Lee JS, Sak K, Marteau F, Mamedova L, Boeynaems JM, Jacobson KA (2005) Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y<sub>13</sub> receptor. *Biochem Pharmacol* **70**:266-274.
126. Coffin VL, Spealman RD (1987) Behavioral and cardiovascular effects of analogs of adenosine in Cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **241**:76-83.
127. Boyer JL, Mohanram A, Camaioni E, Jacobson KA, Harden TK (1998) Competitive and selective antagonism of P2Y<sub>1</sub> receptors by N<sup>6</sup>-methyl 2'-deoxyadenosine 3',5'-bisphosphate. *Br J Pharmacol* **124**:1-3.
128. Schlicker E, Göthert M (1998) Interactions between the presynaptic α<sub>2</sub>-autoreceptor and presynaptic inhibitory heteroreceptors on noradrenergic neurones. *Brain Res Bull* **47**:129-132
129. Phillis JW (1990) The selective adenosine A<sub>2</sub> receptor agonist, CGS 21680, is a potent depressant of cerebral cortical neuronal activity. *Brain Res* **509**:328-330.
130. Zocchi C, Ongini E, Ferrara S, Baraldi PG, Dionisotti S (1996) Binding of the radioligand [<sup>3</sup>H]-SCH 58261, a new non-xanthine A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist, to rat striatal membranes. *Br J Pharmacol* **117**:1381-1386.
131. Kittner H, Krügel U, Poelchen W, Sieler D, Reinhardt R, von Kügelgen I, Illes P (1999) P2 receptor-mediated activation of noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat brain. *Prog Brain Res* **120**:223-235.



132. Jones SM, Snell LD, Johnson KM (1987) Phencyclidine selectively Inhibits N-Methyl-D-Aspartate-Induced hippocampal [<sup>3</sup>H]-norepinephrine release. *J Pharmacol Exp Ther* **240**:492-497.
133. Lallies M, Middlemiss DN, Ransom R (1988) Stereoselective antagonism of NMDA-stimulated noradrenaline release from rat hippocampal slices by MK-801. *Neurosci Lett* **91**:339-342.
134. Price GD, Robertson SJ, Edwards FA (2003) Long-term potentiation of glutamatergic synaptic transmission induced by activation of presynaptic P2Y receptors in the rat medial habenula nucleus. *Eur J Neurosci* **17**:844-850.
135. Bianco F, Fumagalli M, Pravettoni E, D'Ambrosi N, Volonté C, Matteoli M, Abbracchio MP, Verderio C (2005) Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain Res Brain Res Rev* **48**:144-156.
136. Carnevale D, De Simone R, Minghetti L (2007) Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS & Neurological Disorders – Drug Targets* **6**:388-397.
137. Heinrich A, Kittel A, Csolle C, Sylvester Vizi E, Sperlagh B (2008) Modulation of neurotransmitter release by P2X and P2Y receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology* **54**:375-386.
138. Lechner SG, Dorostkar MM, Mayer M, Edelbauer H, Pankevych H, Boehm S (2004) Autoinhibition of transmitter release from PC12 cells and sympathetic neurons through a P2Y receptor-mediated inhibition of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Eur J Neurosci* **20**:2917–2922.
139. Queiroz G, Talaia C, Goncalves J (2003) ATP modulates noradrenaline release by activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:809-15
140. Quintas C, Fraga S, Gonçalves J, Queiroz G (2009) The P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors mediate autoinhibition of transmitter release in sympathetic innervated tissues. *Neurochem Int* **55**:505-513.
141. Sun Z, Fan Y, Zha Q, Zhu MY (2010) Corticosterone up-regulates expression and function of norepinephrine transporter in SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem* **113**:105-116.