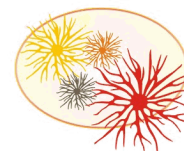




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA  
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS

## **Estudo da participação do receptor P2X7 no desempenho cognitivo de roedores: abordagens farmacológicas e genéticas**

Renan Costa Campos

Orientação: Profª Dra. Daniela Martí Barros

Co-orientação: Profª Dra. Fernanda Bueno Morrone

Dissertação defendida no âmbito do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia Animal Comparada.

Rio Grande, Março de 2013

*Estamos en plena cultura del envase. El contrato de matrimonio importa más que el amor, el funeral más que el muerto, la ropa más que el cuerpo y la misa más que Dios.*

Eduardo Galeano

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Dani B que me acompanha há mais ou menos cinco anos, pacientemente, atenciosa e preocupada com o desenvolvimento dos alunos, não só como estudantes que fazem ciência, mas também como pessoas. Agradeço-te por apostar em mim.

À minha co-orientadora Fernanda, pela contribuição na construção deste trabalho.

Aos meus pais e à minha irmã, que são responsáveis por muito do que aprendi e do que sou e, acima de tudo, por serem meus amigos.

Aos colegas de LabNeuro e do ICB e amigos, Gisele, Gustavo, André, Marcio Geihs, Ana Lupe, Felipe, Carol Peixoto, Carol Reyes, Polese, Sara, Juliana Buonocore, Ane, Adriano. Todos muito solícitos, inclusive em momentos de difícil solução. Sempre fizeram agradáveis e divertidos o ambiente de trabalho e as aulas e, certamente, atenuaram o esforço desta etapa.

À Lidiane, que tanto me ajudou e de cuja companhia e conversa vou sentir falta; e à Karina, que sem hesitar me acolheu em seu lar, ainda que ela não lá estivesse. Vocês são MASSA!

Ao Monster, inestimável amigo de longa data, que admiro e com quem bastante tenho aprendido e sei que posso contar. Pela presteza com que ele e a Carol Reyes se dispuseram a me ajudar em um momento em que o tempourgia. Conta comigo, Monstrinho.

Ao ICB, à FURG e ao programa de Pós-Graduação FAC, onde todo esse processo se consolidou, e ao Capes e CNPq, pelo apoio.

No fim de pelo menos dois anos de convivência essas são as pessoas com quem convivi e, não apenas pelo intercâmbio de conhecimento científico, mas também por aquilo que vivemos, lhes ou grato.

Beijo no coração, galera!

## Lista de Abreviaturas

- ABC – *ATP-binding cassette* (transportadores)
- ADO – Adenosina
- ADP – Adenosina difosfato
- AMP – Adenosina monofosfato
- AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
- ATP – Adenosina trifosfato
- CA1 – *Cornu ammonis 1*
- CaMK – Proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina
- CPFm – Córtex pré-frontal medial
- CREB – Elemento de ligação responsivo a AMP cíclico
- E-NTPDase – Ecnucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- E-NPP – Ectonucleotídeo pifosfatase/fosfodiesterase
- ERK – Proteína quinase regulada por sinalização extracelular
- EsC – Estímulo condicionado
- Esl – Estímulo incondicionado
- GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico
- IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$
- KO – Nocaute (*knock out*)
- LAM – Labirinto aquático de Morris
- NCA – Núcleo central da amígdala
- NBA – Núcleo basal da amígdala
- NLA – Núcleo lateral da amígdala
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- MCD – Memória de curta duração
- MLD – Memória de longa duração
- PLD – Potencialização de longa duração
- P2X7R – Receptor P2X7
- PKC – Proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$
- PKA – Proteína quinase dependente de AMP cíclico
- Pró-IL-1 $\beta$  – Pró-interleucina 1 $\beta$
- RC – Resposta condicionada
- SNC – Sistema nervoso central

## Resumo

CAMPOS, Renan Costa. **Estudo da participação do receptor P2X7 no desempenho cognitivo de roedores: abordagens farmacológicas e genéticas**. 2013. 46p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

A memória é um fenômeno decorrente de um conjunto de processos fisiológicos denominado plasticidade. Várias formas de plasticidade são necessárias no processo de formação da memória e também são responsáveis pelo gerenciamento do comportamento. O fenômeno eletrofisiológico chamado potencialização de longa duração (PLD), cuja ocorrência no hipocampo merece destaque, foi proposto como sendo o mecanismo de plasticidade constitutivo das bases da consolidação da memória nesta região encefálica. A importância da plasticidade na região CA1 do hipocampo se manifesta em diversas formas de aprendizado, como espacial e condicionamento clássico. Os eventos bioquímicos que culminam na plasticidade e formação da memória sofrem influência de diversos sistemas de neurotransmissores e evidências indicam também a participação do sistema purinérgico, provavelmente através dos receptores ionotrópicos P2X. Receptores purinérgicos do subtipo P2X7 (P2X7R), largamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), além de possuírem várias características que os distinguem de outros subtipos de receptores P2X, estão envolvidos na regulação da liberação de neurotransmissores cruciais para a promoção da PLD na região hipocampal e formação da memória. Assim, este trabalho objetivou avaliar a participação dos P2X7R em camundongos geneticamente modificados (KO), que não expressam o receptor P2X7, e ratos através da exposição destes a diferentes tarefas comportamentais, bem como avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre possíveis déficits mnemônicos resultantes da supressão gênica sobre o receptor P2X7. Os resultados sugerem que os P2X7R participam tanto da memória aversiva como da memória espacial: o bloqueio farmacológico com o antagonista específico de P2X7R A-740003 em diferentes janelas temporais causou prejuízos mnemônicos em ratos submetidos à tarefa do medo condicionado contextual (MCC), enquanto a deleção do P2X7R causou déficits mnemônicos a camundongos nas tarefas do labirinto aquático de Morris e no MCC, indicando prejuízos nas memórias espacial e aversiva, respectivamente. Experimentos com enriquecimento ambiental sugerem que esta forma de estimulação contribui na reversão dos déficits mnemônicos causado pela ausência do P2X7R. Por fim, nenhuma alteração na memória de habituação foi observada em animais com deleção gênica para o P2X7R.

## Abstract

CAMPOS, Renan Costa. **Estudo da participação do receptor P2X7 no desempenho cognitivo de roedores: abordagens farmacológicas e genéticas**. 2013. 46p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

Memory is a phenomenon ensued by a set of physiological processes known as plasticity. Several forms of plasticity are necessary in the process of memory formation and are also responsible for the management of the behavior. The electrophysiological phenomenon called long-term potentiation (LTP), whose occurrence in the hippocampus is generally highlighted, was proposed to be the underlying plastic mechanism involved in the basis of memory consolidation in this brain region. The importance of plasticity in the CA1 region of the hippocampus is observed in several sorts of cognition, such as spatial learning and classic conditioning. The biochemical events that culminate in plasticity and memory formation are subject to the influence of several neurotransmission system and evidences suggest also the participation of the purinergic system in this process, likely through P2X receptors. Purinergic P2X7 ionotropic receptors (P2X7R), widely distributed through the central nervous system, possess a number of distinctive characteristics when compared to other P2X receptors and are involved in the regulation of the release of neurotransmitters that are crucial in the promotion of hippocampal LTP and memory formation. So, this work aimed to evaluate the participation of the P2X7R in genetically modified (KO) mice with suppressed expression of the P2X7R and rats through different behavioral paradigms, as well as to evaluate the effect of environmental enrichment on potential mnemonic deficits resulting from genetic suppression on the P2X7R. The results suggest that P2X7R participate on both aversive and spatial memory: pharmacological blockage with specific P2X7R antagonist A-740003 in different time-frames elicited mnemonic impairments in rats submitted to the contextual fear conditioning (CFC) task, and the deletion of P2X7R hampered both spatial and aversive memory of mice subjected to the Morris water maze and CFC paradigms, respectively. Experiments using mice subjected to environmental enrichment suggest that this form of stimulation reverses mnemonic impairments ascribed to the absence of P2X7R. Finally, no alterations were observed in the habituation memory of P2X7R KO mice.

## Lista de Figuras

### *Introdução*

**Figura A.** Diagrama de uma secção através do hipocampo de um roedor onde são observadas as principais regiões, vias excitatórias e conexões sinápticas.....pág. 10

**Figura B.** Modelo de indução de PLD.....pág. 11

**Figura C.** Mecanismos de liberação, degradação e recepção do ATP.....pág. 15

### *Manuscrito*

**Figura 1.** Atividade locomotora de camundongos na tarefa de habituação.....pág. 34

**Figura 2.** Testes de aquisição no labirinto aquático de Morris.....pág. 35

**Figura 3.** Testes no último dia do labirinto aquático de Morris.....pág. 36

**Figura 4.** Medo condicionado contextual com camundongos.....pág. 37

**Figura 5.** Medo condicionado contextual com camundongos submetidos a enriquecimento ambiental.....pág. 38

**Figura 6.** Medo condicionado contextual com ratos.....pág. 39

**Figura 7.** Teste *Hot Plate*.....pág. 40

## Sumário

|         |   |    |
|---------|---|----|
| I.      | Introdução .....  | 1  |
| I.i.    | Aprendizado, Memória e Plasticidade Neuronal .....                            | 1  |
| I.ii.   | Sistema purinérgico e memória .....   | 5  |
| I.ii.i  | Adenosina e receptores P1 .....   | 7  |
| I.ii.ii | ATP e receptores P2 .....   | 8  |
| I.iii.  | Receptores P2X7.....  | 10 |
| II.     | Objetivos.....  | 12 |
| II.i.   | Objetivo geral.....   | 12 |
| II.ii.  | Objetivos específicos .....   | 12 |
| III.    | Manuscrito .....  | 14 |
|         | Abstract .....  | 15 |
|         | 1. Introduction .....   | 16 |
|         | 2. Methods .....  | 17 |
| 2.1.    | Animals .....   | 17 |
| 2.2.    | Environmental enrichment (EE) .....   | 18 |
| 2.3.    | Stereotaxic Surgery .....   | 18 |
| 2.4.    | Drugs and infusion procedures .....   | 19 |
| 2.5.    | Behavioral analyses .....   | 19 |
| 2.5.1.  | Habituation .....   | 19 |
| 2.5.2.  | Spatial memory in the Morris Water Maze (MWM) .....                           | 19 |
| 2.5.3.  | Contextual Fear Conditioning (CFC).....                                       | 20 |
| 2.5.4.  | Hot Plate test for nociception .....  | 20 |
| 2.6.    | Statistical Analyses .....  | 21 |
| 3.      | Results .....   | 21 |
| 3.1.    | P2X7 purinergic receptor does not alter habituation memory.....               | 21 |
| 3.2.    | P2X7KO mice show hindered spatial memory on Morris water maze (MWM).....      | 21 |
| 3.3.    | P2X7 receptor participates on Aversive Memory .....                           | 22 |
| 3.3.1   | P2X7R KO mice .....   | 22 |
| 3.3.2.  | Exposure to enriched environment reverses mnemonic deficit on P2X7 mice ..... | 22 |
| 3.3.3.  | Wistar Rats .....   | 23 |
| 3.5.    | P2X7 exerts no influence on Pain Sensitivity task.....                        | 23 |
| 4.      | Discussion .....  | 24 |



|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 5. Acknowledgements.....      | 27 |
| 6. Figure Captions.....       | 27 |
| 7. References.....            | 29 |
| 8. Figures.....               | 33 |
| IV. Considerações Finais..... | 40 |
| V. Referências.....           | 41 |

## I. Introdução

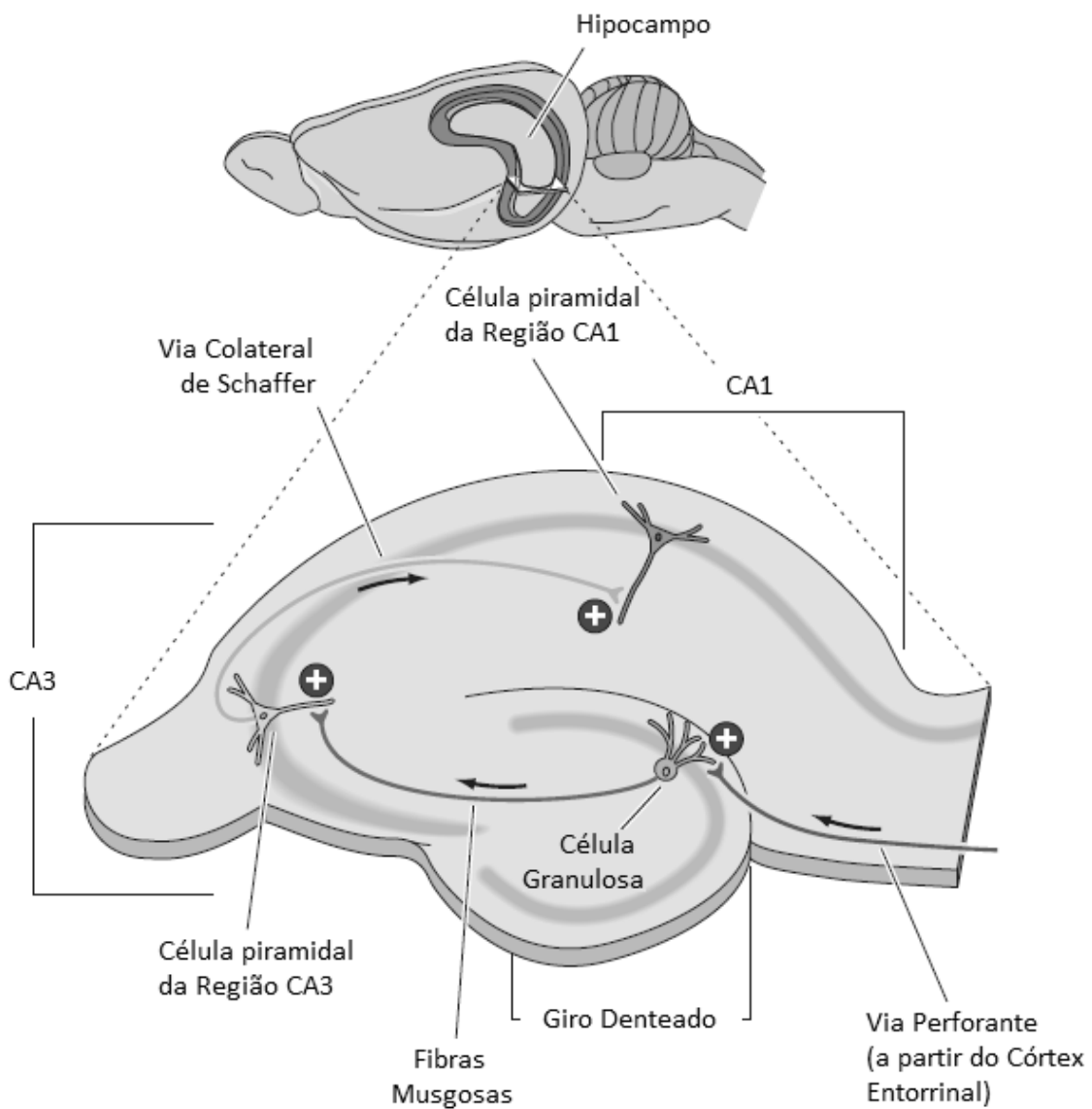
### *I.i. Aprendizado, Memória e Plasticidade Neuronal*

A memória é caracterizada pela habilidade de adquirir, conservar e evocar informações, sendo uma função que depende da capacidade das células nervosas de alterar sua resposta a determinados estímulos. Esta capacidade é decorrente de um conjunto de processos fisiológicos denominado plasticidade (Izquierdo, 2011). A plasticidade no sistema nervoso é essencial para a aquisição de novas informações e pode acontecer em várias escalas, desde a síntese de proteínas e inserção de receptores à membrana sináptica até a sincronização total das atividades neuronais no cérebro. Estas várias formas de plasticidade se refletem na atividade de populações neuronais e, além de serem necessárias no processo de formação da memória (Lamprecht e LeDoux, 2004), são também responsáveis pelo gerenciamento do comportamento (Maren e Quirk, 2004; McGaugh e Roozendaal, 2009; Pape e Pare, 2010).

Às mudanças temporárias e reversíveis na transmissão sináptica convencionou-se chamar memória de curta duração (MCD), consistindo em modificações independentes de síntese protéica. Entretanto, para que o aprendizado se consolide, as mudanças fisiológicas que ocorrem na transmissão sináptica precisam se estabilizar e, para que isto ocorra, outro tipo de modificação, mais consistente, é necessária. O que se definiu como memória de longa duração (MLD) consiste na criação de traços estáveis e persistentes que requerem a expressão de genes e a resultante síntese de proteínas (Kandel, 2001). Ainda assim, mudanças moleculares são transitórias e, *per se*, não sustentam as bases da MLD. Logo, acredita-se que mudanças estruturais na morfologia sináptica, acontecendo como consequência ou paralelamente à síntese de proteínas, sejam também necessárias, configurando o fenômeno de plasticidade sináptica (Lamprecht e LeDoux, 2004). Essa plasticidade sináptica atividade-dependente é induzida em sinapses apropriadas durante a formação da memória, sendo não apenas necessária mas também suficiente para que ocorra o armazenamento de informações (Dudai, 2002).

Em 1973 descobriu-se que a estimulação em alta frequência na região entre a via perforante e as células granulares do giro denteado hipocampal produzia um aumento estável e duradouro das respostas sinápticas e este fenômeno eletrofisiológico passou a ser chamado potencialização de longa duração (PLD) (Lømo, 2003) (Fig. A). A sequência de eventos moleculares envolvidos na PLD podem produzir aumento ou modificações de espinhas dendríticas – projeções protoplásmicas que compõem os principais locais da transmissão

sináptica excitatória do encéfalo dos vertebrados –, dando origem a novas sinapses ou fortalecendo as já existentes. Este fenômeno, cuja ocorrência em uma região denominada *Cornu Ammons 1* (CA1) na porção dorsal do hipocampo merece destaque, foi proposto como sendo o mecanismo constitutivo das bases da consolidação da memória nesta região (Whitlock e Heynen, 2006).



**Figura A.** Diagrama de uma secção através do hipocampo de um roedor onde são observadas as principais regiões, vias excitatórias e conexões sinápticas. Adaptado de Purves, et al. (2004)

Na PLD o neurotransmissor glutamato se liga a dois diferentes subtipos de receptores que geralmente estão co-localizados em espinhas dendríticas. O primeiro a ser acionado é o receptor ionotrópico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), cujo canal é permeável a cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e produz um influxo inicial de íons que

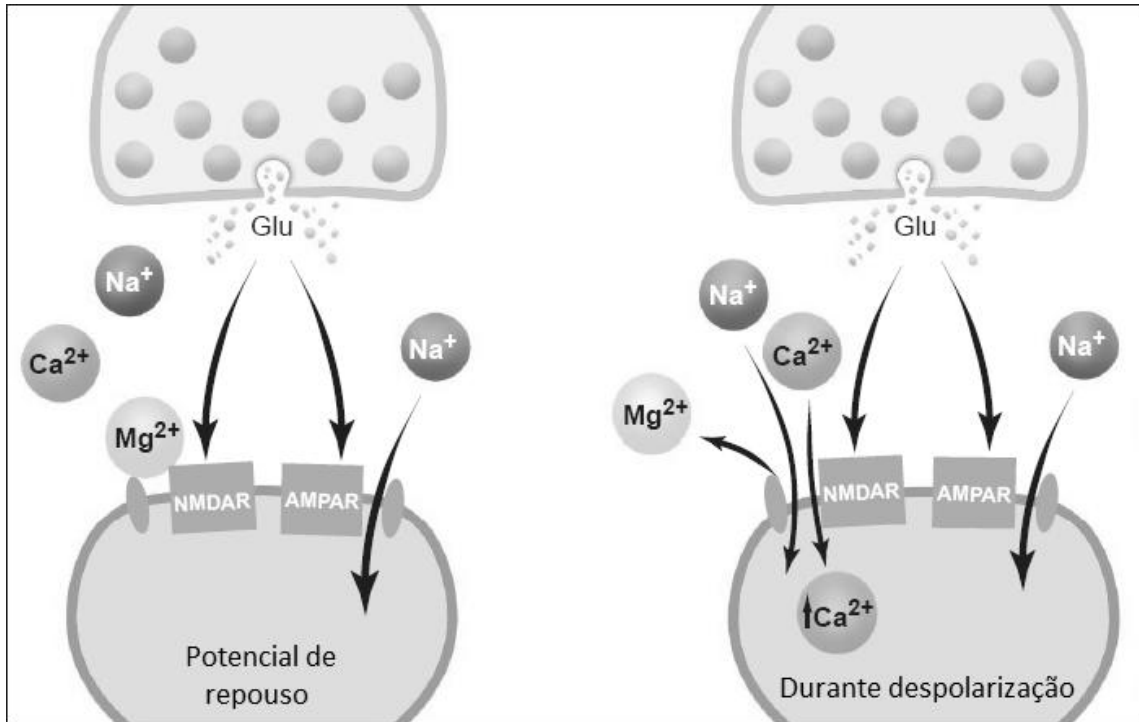
despolariza a membrana do neurônio pós-sináptico. Em seguida, a prévia despolarização da membrana em que está inserido faz com que seja extruído o íon  $Mg^{2+}$  que obstrui o canal do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), possibilitando, assim, o influxo de  $Ca^{2+}$  e de  $Na^+$  na espinha dendrítica. Este influxo de  $Ca^{2+}$  é o gatilho que dispara a fase inicial da PLD (Minichiello, 2009; Morgado-Bernal, 2011) (Fig. B).

A partir deste gatilho se inicia um processo de sinalização intracelular em que várias proteínas quinases – dentre elas a proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMK), proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$  (PKC), proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), proteína quinase regulada por sinalização extracelular (ERK), dentre outras – podem ser ativadas sob a influência do considerável influxo de  $Ca^{2+}$  e por outros sinais intracelulares originados na membrana pós sináptica, servindo como reguladores positivos na plasticidade sináptica (na forma da PLD) através da ativação do fator de transcrição chamado elemento de ligação responsivo a AMP cíclico (CREB). Este elemento, por sua vez, regula a transcrição de proteínas necessárias para a estabilização das mudanças sinápticas formadas durante o aprendizado e a memória (Alberini, 2009; Lee e Silva, 2009). Além disso, o influxo de  $Ca^{2+}$  é imprescindível no processo de recrutamento de receptores AMPA adicionais à membrana de botões pós-sinápticos. Essa inserção contribui para o incremento da função sináptica e é essencial para a manutenção da PLD e possivelmente para a consolidação da memória (Lamprecht e LeDoux, 2004; Opazo e Choquet, 2011).

Ainda, a PLD é associativa, o que significa que a forte ativação de um grupo de sinapses pode facilitar a indução da PLD em um conjunto independente de sinapses ativas adjacentes na mesma célula, se ambas as sinapses forem ativadas dentro de uma janela temporal determinada. Assim, quando gerada em um grupo de sinapses por ativação repetitiva, a PLD na região CA1 do hipocampo proporciona um aumento da robustez exclusivamente nas sinapses ativadas, o que confere uma grande especificidade e aumenta largamente a capacidade de armazenamento de cada neurônio no processo de aprendizagem e memória (Malenka, 1999; Bermúdez-Rattoni, 2007).

A importância da plasticidade na região CA1 do hipocampo se manifesta em diversas formas de aprendizado. Por exemplo, a deficiência na formação da PLD na região CA1 do hipocampo coincide com prejuízos no aprendizado espacial, como verificado na tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM), em que camundongos deficientes na expressão da enzima CaMKII, assim como camundongos com uma limitação na expressão do CREB apresentaram déficits tanto na formação da PLD como na performance do LAM (D'Hooge e Deyn, 2001). Esta

tarefa se tornou uma das ferramentas mais largamente utilizadas em laboratório na avaliação da memória espacial de modelos animais. Os animais submetidos a ela aprendem a encontrar uma plataforma de escape, ligeiramente submersa, para que sejam resgatados de um tanque circular preenchido com água turva (Morris, 1984).



**Figura B.** Modelo de indução de PLD. Durante a transmissão sináptica normal, o glutamato (Glu) é liberado do terminal pré-sináptico, agindo em receptores AMPA e NMDA. Os íons  $\text{Na}^+$  fluem inicialmente através dos receptores AMPA. A despolarização do terminal pós-sináptico expulsa o íon  $\text{Mg}^{2+}$  que bloqueia os receptores NMDA, permitindo o influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para a espinha dendrítica através deste receptor. O resultante aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na espinha dendrítica é crucial para o disparo da PLD. Adaptado de Malenka, 1999.

Outro importante tipo de aprendizado é a simples associação entre um estímulo e uma resposta, como o condicionamento clássico ou Pavloviano (Izquierdo, 2011). Nesta forma de aprendizado, um estímulo neutro, como um tom acústico (estímulo condicionado, EsC), é pareado com um estímulo incondicionado (Esl) aversivo, como um choque elétrico nas patas. Após algumas poucas sessões, o EsC passa a evocar uma resposta de medo (resposta condicionada, RC) aprendida, como o comportamento de imobilidade temporária do animal quando exposto ao EsC (LeDoux, Romanski e Xagoraris, 1990; Davis, 1997). O condicionamento Pavloviano é particularmente útil para análise eletrofisiológica por ser rapidamente adquirido e formar memórias de longa duração. Além disso, os princípios comportamentais e circuitos neurais que compõem esta forma de aprendizado são bem caracterizados, permitindo uma análise da relação entre atividade neuronal e comportamento aprendido (Maren e Quirk, 2004).

Uma rede de estruturas, que inclui diversos núcleos da amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm), está envolvida na regulação da expressão do medo condicionado (Sierra-Mercado, Padilla-Coreano e Quirk, 2011). O núcleo lateral da amígdala (NLA) recebe informações sensoriais e é o local onde ocorre plasticidade relacionando EsC/EsI durante o medo condicionado. O NLA envia eferências para o núcleo central da amígdala (NCA), o qual controla a expressão da resposta fisiológica do medo, a RC, através de projeções para o tronco encefálico e hipotálamo (Phelps e LeDoux, 2005). O hipocampo, região que possui projeções que atingem o núcleo basal da amígdala (NBA), é responsável pelo controle da informação contextual durante o condicionamento, podendo conduzir a expressão do medo através do NCA.

Os eventos bioquímicos que se sucedem em todos os estágios da formação da memória acontecem sob a influência de diversos sistemas de neurotransmissores e das cascatas bioquímicas decorrentes das ligações destes com seus respectivos receptores, além de outros fatores, como ansiedade e estresse (Izquierdo e Medina, 1997). Assim, na busca da melhor compreensão dos eventos subjacentes a estes processos moleculares, é pertinente a consideração da influência exercida pelo sistema purinérgico, já que uma porção considerável de evidências sustenta o envolvimento da adenosina, ATP e seus receptores nos mecanismos de plasticidade e formação da memória (Burnstock *et al.*, 2011).

#### *1.ii. Sistema purinérgico e memória*

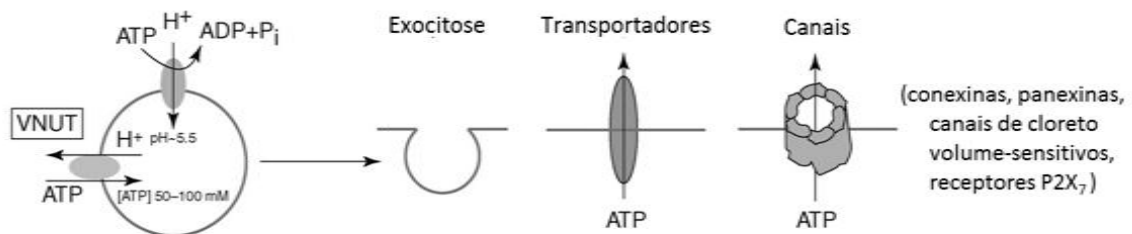
Os primeiros relatos da sinalização purinérgica datam de 1929, quando pesquisadores injetaram intravenosamente extratos de tecidos cardíacos em animais intactos e observaram a diminuição dos batimentos cardíacos; logo identificaram o agente biológico como um composto nucleosídeo (Drury e Szent-Györgyi, 1929). Pesquisas realizadas nas décadas mais recentes levaram à descoberta de muitos efeitos da sinalização através de nucleotídeos e nucleosídeos purínicos – adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) da adenosina – destacando-se o surgimento do conceito de neurotransmissão purinérgica em 1972 (Burnstock, 1972, 2007). Logo a presença do ATP foi identificada em terminações nervosas simpáticas e parassimpáticas (Burnstock, 1976), sendo atualmente reconhecida a ação deste mediador na transmissão ou co-transmissão da maior parte dos nervos, tanto no sistema nervoso periférico como no SNC (Burnstock, 2010).

Após a liberação, o ATP e outros nucleotídeos sofrem rápida degradação enzimática através da ação de ectonucleotidasas, cujas ações são funcionalmente importantes pelo fato

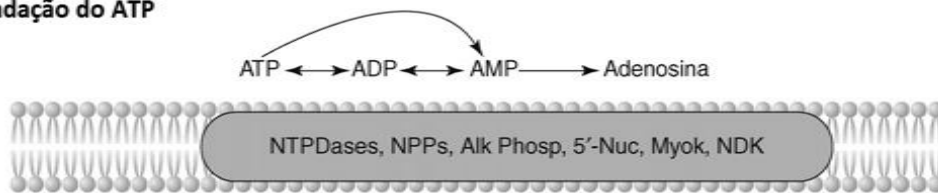
dos metabólitos do ATP agirem como ligantes fisiológicos para outros receptores purinérgicos. Além disso, todas as famílias de ectonucleotidases identificadas até o momento são expressas no cérebro (Abbracchio *et al.*, 2009). Estas incluem E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases), fosfatases alcalinas e ecto-5'-nucleotidase. E-NTPDases e E-NPPs hidrolizam ATP e ADP a AMP, que é hidrolisado a adenosina pela ecto-5'-nucleotidase. Fosfatases alcalinas também hidrolisam nucleosídeo tri-, di- e monofosfatos enquanto a presença de ectoenzimas conversoras de nucleotídeos, tais como nucleosídeo difosfoquinase ou mioquinase também foi descrita (Zimmermann, 2001; Abbracchio *et al.*, 2009) (Fig. C).

Implícita no conceito de neurotransmissão purinérgica, está a existência de moléculas receptoras, presentes na membrana de diversos tipos celulares e mediando a ação do ATP extracelular. Os receptores purinérgicos foram definidos pela primeira vez em 1976 (Burnstock, 1976) e, dois anos depois, foi proposta a base para a distinção de dois tipos de receptores, identificados como P1 e P2 (para adenosina e ATP/ADP, respectivamente) (Burnstock, 2007) (Fig. C).

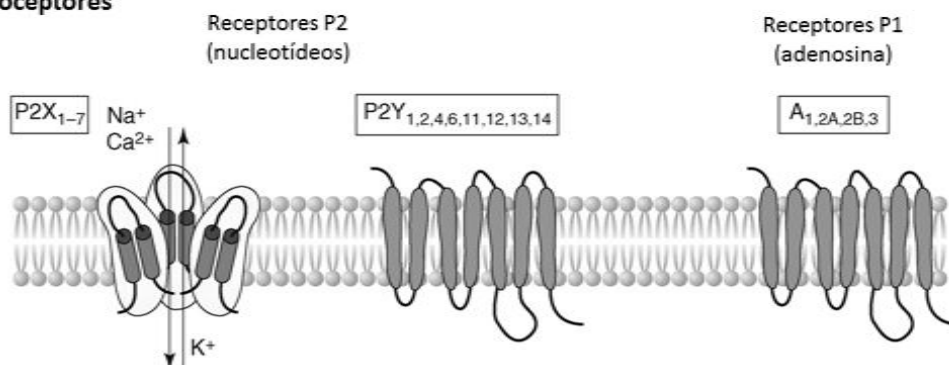
#### Liberação de ATP



#### Degradação do ATP



#### Purinoceptores



**Figura C.** Mecanismos de liberação, degradação e recepção do ATP. *Alk Phos*, fosfatase alcalina; *Myok*, mioquinase (adenilado quinase); *NDK*, nucleosídeo difosfato quinase; *NPPS*, nucleotídeo pirofosfatase e/ou fosfodiesterases; *5'-Nuc*, 5'-nucleotidase; *VNUT*, transportador vesicular de nucleotídeos. Adaptado de Abbracchio, 2009.

### *1.ii.i Adenosina e receptores P1*

A adenosina (ADO) é um metabólito constitutivo de todas as células, estando envolvida em importantes vias de sinalização tais como síntese de bases nucleotídicas purínicas, respostas citoprotetoras e modulação do estado metabólico celular (Cunha, 2001; Housley, Bringmann e Reichenbach, 2009). Este nucleosídeo não é considerado um neurotransmissor clássico, por não ser armazenada em grânulos sinápticos neuronais ou liberada *in quanta*, mas como um neuromodulador, ganhando acesso ao espaço extracelular parte pela quebra de nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e parte pela translocação a partir do citoplasma de células por proteínas transportadoras de nucleosídeos (Siegel, Albers e Brady, 2006). A depuração da ADO é mediada principalmente pela enzima adenosina quinase, nos astrócitos, fosforilando a adenosina a AMP e controlando as ações homeostáticas da adenosina (Diógenes *et al.*, 2012).

A ADO desempenha um papel dual no espaço extracelular do sistema nervoso. Por um lado, a adenosina desempenha a mencionada função na neuromodulação, controlando o fluxo de informações através de circuitos neuronais. Por outro lado, a ADO desempenha também uma função mais ampla, em todas as células eucarióticas, agindo na modulação homeostática. Levando-se em consideração que no tecido encefálico a adenosina cumpre estas duas funções, ambas são, geralmente, de difícil dissociação (Cunha, 2001; Gomes *et al.*, 2011).

Receptores de adenosina são proteínas de membrana pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G e, até o presente, quatro tipos de receptores P1 foram clonados: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub> (Fredholm *et al.*, 2000). Entretanto, a observação de que camundongos geneticamente modificados, com silenciamento da expressão gênica (do inglês *knock out* – KO) para receptores de adenosina são viáveis indica a redundância desta porção do sistema purinérgico em condições fisiológicas normais (Eltzschig, Sitkovsky e Robson, 2012).

O subtipo de receptor de adenosina mais largamente distribuído no encéfalo é o A<sub>1</sub>, sendo sua principal atuação a modulação da liberação de neurotransmissores excitatórios (Burnstock, Fredholm e Verkhatsky, 2011; Gomes *et al.*, 2011). Ativação de receptores A<sub>1</sub> (com alta densidade no hipocampo de várias espécies de mamíferos, incluindo humanos) inibe tonicamente a transmissão sináptica tanto a partir de terminais pré- como pós-sinápticos (Fredholm *et al.*, 2005), normalmente induzindo sedação e efeitos ansiolíticos e tendendo a prejudicar funções de aprendizado e memória (Zarrindast e Shafaghi, 1994; Pereira *et al.*, 2005). Assim, o efeito inibitório da adenosina endógena na PLD tem relação com a ativação de receptores NMDA. Esta ligação é compreensível, considerando-se que a adenosina é liberada sob estimulação de alta frequência e é capaz de inibir as respostas mediadas pelos receptores



NMDA, cuja atuação é determinante na indução da PLD na região CA1 (Mendonça e Ribeiro, 2001).

Além disso, a cafeína, um dos psicoativos mais largamente consumidos, exerce efeitos no SNC através do antagonismo de receptores de adenosina (Fredholm *et al.*, 2000) e consumidores relatam uma melhora no desempenho intelectual após o consumo de cafeína, particularmente quando em estado fatigado. Os efeitos cognitivos da cafeína na maior parte devem-se à sua habilidade de antagonizar receptores  $A_1$  no hipocampo e córtex, áreas cerebrais particularmente envolvidas com a cognição (Ribeiro, Sebastião e Mendonça, de, 2002). Assim, a utilização de antagonistas dos receptores  $A_1$  tem sido proposta no tratamento de distúrbios mnemônicos (Ribeiro e Sebastião, 2010). Por fim, os efeitos da ativação dos receptores de adenosina em diferentes estágios da memória – aquisição, consolidação, retenção e evocação – dependem fortemente do período da administração, da concentração e das características do composto administrados no animal (Burnstock *et al.*, 2011).

#### *1.ii.ii ATP e receptores P2*

O citoplasma da maior parte dos neurônios contém por volta de 2-5 mM ATP e até recentemente admitia-se que a única fonte de ATP extracelular agindo em receptores purinérgicos fosse proveniente de células com danos ou em processo de morte. Atualmente a liberação de ATP a partir de células saudáveis é reconhecida como um mecanismo fisiológico. Esta liberação ocorre tanto a partir de neurônios periféricos como centrais, onde o ATP é encontrado em concentrações mais altas (até 100 mM) enquanto armazenado em vesículas sinápticas que contêm, além do ATP, outros nucleotídeos em menor concentração, como ADP e AMP (Burnstock, 2007).

O ATP está provavelmente presente em todas as vesículas sinápticas e/ou secretórias, embora em diferentes concentrações, e seu acúmulo em vesículas provavelmente seja mediado por transportadores vesiculares de nucleotídeos dependentes de  $Cl^-$  (Sawada *et al.*, 2008). Na célula, o ATP pode ser co-armazenado e co-liberado com outros neurotransmissores, como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), noradrenalina e glutamato (Abbracchio *et al.*, 2009). Igualmente, o ATP pode ser armazenado sozinho em vesículas, compondo os únicos transmissores presentes no terminal sináptico, como na habênula medial (Robertson e Edwards, 1998), ou pode compartilhar o terminal pré-sináptico com vesículas de glutamato (Pankratov *et al.*, 2007). De qualquer forma, a única região onde se encontra transmissão mediada puramente pelo ATP é a habênula medial (Robertson e Edwards, 1998; Burnstock, Fredholm e Verkhratsky, 2011).

No hipocampo, a liberação de ATP foi detectada nas fibras colaterais de Schäffer em resposta a estimulação elétrica (Pankratov *et al.*, 1998), fenômeno observado também em outras regiões, como habênula medial (Sperlágh *et al.*, 1998) e hipotálamo (Sperlágh, Sershen e Lajtha, 1998). Ainda no hipocampo, foi reportada a cooperação entre o ATP extracelular e receptores NMDA na formação da PLD na região CA1, corroborando com a hipótese da co-transmissão do ATP com o glutamato nesta estrutura (Fujii, Kato e Kuroda, 2002). Por fim, além de ser liberado por exocitose, o ATP pode ser liberado no SNC por vias alternativas, como junções comunicantes, transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), canais de cloreto volume-sensitivos ou através do poro formado pelo receptor P2X7 (Pankratov *et al.*, 2006) (Fig. C).

Assim, foi estabelecido que o ATP ativa receptores de membrana ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y, sendo ambos largamente distribuídos no SNC, influenciando tanto células neuronais como células gliais (Jarvis e Khakh, 2009).

Até o presente, a família de receptores P2Y é composta por 10 subtipos já clonados e funcionalmente definidos. Oito destes (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 e 14) estão presentes em tecidos humanos e, destes, P2Y1, 6, 11, 12, 13 e 14 ocorrem no SNC (Illes e Ribeiro, 2004a). Estes receptores podem ser ativados não somente pelo ATP, mas também por outros nucleotídeos de ocorrência natural, como ADP, uridina trifosfato e uridina difosfato (Sak e Webb, 2002). A família dos receptores P2Y é composta por receptores metabotrópicos e está envolvida na neuromodulação, sendo estes receptores responsáveis pela mediação de mudanças lentas na transmissão sináptica e excitabilidade neuronal através do seu acoplamento a proteínas G triméricas (Hussl and Boehm, 2006).

Nos neurônios, os sete subtipos de receptores P2X (P2X1 – P2X7) identificados (Li *et al.*, 2008) medeiam respostas sinápticas rápidas através da ligação com o ATP (Illes e Ribeiro, 2004b). As subunidades destes receptores, que se agrupam em trímeros ou hexâmeros, possuem dois domínios transmembrana, uma longa alça extracelular contendo o sítio de ligação ao ATP e caudas terminais C e N intracelulares (Illes e Ribeiro, 2004a). Além disso, receptores P2X são permeáveis tanto a cátions monovalentes, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , quanto a cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$  (Burnashev, 1998; Rubio e Soto, 2001), enquanto os receptores P2X expressos no cérebro se destacam pela alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{+2}$  (Egan e Khakh, 2004). Ainda, ao contrário dos receptores NMDA, que para permitirem o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  necessitam de uma prévia despolarização da membrana para que o íon  $\text{Mg}^{+2}$  que os obstrui seja extraído, assim desbloqueando seu canal, o influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através de receptores P2X pode acontecer mesmo durante o potencial de repouso do neurônio, o que constitui uma fonte adicional para

a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  que poderia modular o desempenho das células pós-sinápticas (Edwards and Gibb, 1993).

Os receptores P2X possuem uma combinação única de propriedades funcionais que os tornam importantes na regulação da plasticidade sináptica, como a co-liberação do ATP com outros neurotransmissores, a alta permeabilidade destes receptores ao  $\text{Ca}^{+2}$ , mesmo sob potenciais de repouso, e a capacidade de interagir com outros receptores para modular/disparar a liberação de outros neurotransmissores e gliotransmissores (Pankratov *et al.*, 2009).

Evidências indicando o papel dos receptores P2X neuronais na regulação da plasticidade sináptica são abundantes (Pankratov *et al.*, 2009). Enquanto até o fim da década de 1990 acreditava-se que a transmissão sináptica excitatória na formação hipocampal era mediada somente por receptores de aminoácidos excitatórios, experimentos de Pankratov (*et al.*, 1998), indicaram a presença de um componente não glutamatérgico nas correntes excitatórias pós-sinápticas de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo. A partir daí, sugere-se que o componente envolvido neste tipo de transmissão seja o ATP, através de receptores P2X, sendo este responsável por 20-25% das conexões excitatórias que chegam à região CA1. Essa liberação de ATP em neurônios do hipocampo está implicada também na PLD (Fields e Burnstock, 2006). Esse aumento da LTP em neurônios centrais se dá provavelmente através da ativação de receptores P2X (Sim *et al.*, 2006).

### *1.iii. Receptores P2X7*

Desde o momento em que foi isolado, a partir de mastócitos de ratos, o receptor P2X7 (P2X7R) tem sido considerado como sendo a realização molecular de um receptor de ATP passível de tornar a célula permeável a íons (Cockroft e Gomperts, 1979). Posteriormente, este receptor de ATP foi classificado como receptor P2Z e identificado em células do sistema imunológico (Gordon, 1986). Receptores P2X7 são largamente distribuídos no SNC, predominantemente localizados nas células imunes e na glia, onde medeiam liberação de citocinas pró-inflamatórias, proliferação celular e apoptose, e nos terminais pré-sinápticos de neurônios (Deuchars *et al.*, 2001; Burnstock, 2007).

Quanto à sua estrutura, estes receptores possuem estrutura similar à dos outros membros da família dos receptores P2X, exceto quanto à sua porção C-terminal intracelular, que é significativamente mais longa neste subtipo, sendo ainda crucial na indução do poro não seletivo (Ralevic e Burnstock, 1998). Além disso, admite-se que este subtipo de receptor possui várias características que o distinguem de outros membros da família dos receptores P2X.

Experimentos de co-imunoprecipitação indicam que este receptor possui uma única subunidade que não se heteropolimeriza com outras subunidades P2X (Kim *et al.*, 2001). Sua ativação requer concentrações de ATP que são  $\pm$  10-100 vezes maiores do que as necessárias para ativar os outros receptores P2X, sendo sua ativação plena atingida em concentrações de mM de ATP (Kim *et al.*, 2001; Verkhatsky *et al.*, 2009). Entretanto, a afinidade com o agonista e uma resposta máxima também podem ser moduladas de 5 a 100 vezes por alterações nos cátions mono e divalentes externos (Kim *et al.*, 2001).

Ademais, quando exposto a concentrações elevadas de ATP, ou quando estimulado por um longo período, a ativação do receptor P2X7 não somente abre um canal iônico "típico" seletivo a cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ , mas também leva à abertura gradual de um poro maior que permite a passagem não só de cátions, mas também de moléculas com peso molecular de até 900 Da (White e Burnstock, 2006; Yan *et al.*, 2008). Controvérsias permeiam a formação do poro: enquanto há relatos de que o próprio canal do receptor se dilata, permitindo a passagem de moléculas maiores (Yan *et al.*, 2008), alguns estudos reportam que uma ou várias proteínas formam este poro, sugerindo-se a panexina como provável candidata (Locovei *et al.*, 2007; Skaper, Debetto e Giusti, 2010). De qualquer forma, postula-se que a formação do poro está diretamente envolvida no processamento e liberação de IL-1 $\beta$  a partir de células previamente estimuladas com LPS (ver adiante) (Pelegri e Surprenant, 2006). Por outro lado, não há dúvidas de que sua ativação abala severamente a homeostase iônica citoplasmática. Pelo fato do receptor P2X7 não sofrer dessensibilização, o poro permanece aberto enquanto o receptor está ligado ao ATP e, caso a estimulação seja prolongada (15 a 30 minutos na maioria das células), a célula sofre danos irreversíveis e freqüentemente é levada à morte (North, 2002). Como consequência, esse excesso de estimulação pode provocar disfunções celulares e neurodegeneração (Skaper, Debetto e Giusti, 2009).

Além dessas características, os P2X7R estão envolvidos na regulação da liberação de glutamato e GABA na região hipocampal, sendo a ativação dos respectivos receptores de suma importância na promoção da PLD e formação da memória (Izquierdo e Medina, 1997; Sperlágh *et al.*, 2002). Ainda, Papp e colaboradores (2007) relataram que a ativação desses receptores aumenta a ação da enzima p38 MAPK no hipocampo de ratos, sendo esta enzima ativada durante diferentes tipos de aprendizado, possivelmente contribuindo em eventos transcripcionais que levam à consolidação da memória. Além disso, P2X7R podem diretamente ativar a PI3-cinase, um mediador chave na inserção dos receptores AMPA, essenciais no processo de manutenção da PLD (Bains e Oliet, 2007).

Uma ferramenta muito útil na investigação do papel de determinada proteína é composta por animais geneticamente modificados. Estudos comportamentais conduzidos com animais nocautes (KO) que não expressam o receptor P2X7 têm sido utilizados no estudo do papel deste receptor na depressão e ansiedade (Basso *et al.*, 2009) assim como no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos específicos para este tipo de receptor (Skaper, Debetto e Giusti, 2010).

Com vistas no que foi descrito e estando esses receptores relacionados com a atividade de neurotransmissores e com a ativação de vias importantes na formação da memória, torna-se importante aprofundar o conhecimento do papel do subtipo de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X7 na memória.

## **II. Objetivos**

### *II.i. Objetivo geral*

Avaliar a participação dos receptores purinérgicos ionotrópicos P2X7 em camundongos geneticamente modificados e ratos através da exposição destes a diferentes tarefas comportamentais, assim como avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre possíveis déficits mnemônicos resultantes de intervenções genéticas sobre o receptor P2X7.

### *II.ii. Objetivos específicos*

- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na aquisição da memória na tarefa do medo condicionado, utilizando um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R;
- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na consolidação da memória na tarefa do medo condicionado, utilizando um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R;
- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na evocação da memória na tarefa do medo condicionado, utilizando um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R;
- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na memória de habituação, utilizando um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R;
- Avaliar o efeito dos P2X7R na memória espacial através da tarefa do labirinto aquático de Morris, utilizando um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R.

- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na aquisição da memória na tarefa do medo condicionado, através da administração de um antagonista deste receptor na região CA1 do hipocampo;
- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na consolidação da memória na tarefa do medo condicionado, através da administração de um antagonista deste receptor na região CA1 do hipocampo;
- Avaliar o envolvimento dos P2X7R na evocação da memória na tarefa do medo condicionado, através da administração de um antagonista deste receptor na região CA1 do hipocampo
- Avaliar o efeito do enriquecimento ambiental sobre possíveis prejuízos mnemônicos causados por manipulações genéticas sobre o receptor P2X7 nas memórias de curto e longo prazo em um modelo animal com deleção gênica para o P2X7R.

### III. Manuscrito

#### **Pharmacological and Genetic manipulations on P2X7 receptor hinder spatial and aversive memories: reversion in enriched environment**

Campos, R. C.<sup>1</sup>; Parfitt, G. M.<sup>1</sup>; Coutinho-Silva, R.<sup>2</sup>; Morrone, F. B.<sup>3</sup>; Barros, D. M.<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Neurociências – Universidade Federal do Rio Grande (FURG);

<sup>2</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ);

<sup>3</sup> Instituto de Farmacologia e Toxicologia– Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre (PUC-RS);

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas; Laboratório de Neurociências – Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Rio Grande/RS 96203-900 – Brasil

\*Correspondence to:

Dr. Daniela Martí Barros  
Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Rio Grande  
Av. Itália, Km 8 – Campus Carreiros  
Rio Grande – RS – Brazil  
Cx. Postal 474, CEP 96201-900  
Phone: +55 53 3293.5170  
E-mail: [barrosdm@yahoo.com.br](mailto:barrosdm@yahoo.com.br)

Revista *Neuropharmacology*

(Fator de Impacto – 4.814)

## **Abstract**

Innovative studies carried out 50-30 years ago demonstrated that ATP plays a role in cell signaling. It was soon proposed that ATP activates ionotropic P2X, exerting influence on neurons as well as on glial cells. Also, ATP release has been implicated in hippocampal long term potentiation (LTP), whose molecular mechanisms in the hippocampal CA1 region are much alike those involved in the consolidation of long-term memory (LTM). Evidences show the presence of moderate-high expression of the P2X7 purinergic receptor (P2X7R) in presynaptic terminals in the central nervous system, mainly in hippocampal neurons, contributing to the modulation of neurotransmission in this region. This study aimed to investigate the participation of the P2X7R in genetically modified (KO) mice with suppressed expression of the P2X7R and rats through different behavioral paradigms, as well as to evaluate the effect of environmental enrichment on potential mnemonic deficits resulting from genetic suppression on the P2X7R. The results suggest that P2X7R participate on both aversive and spatial memory: pharmacological blockage with specific P2X7R antagonist A-740003 in different time-frames elicited mnemonic impairments in rats submitted to the contextual fear conditioning (CFC) task, and the deletion of P2X7R hampered both spatial and aversive memory of mice subjected to the Morris water maze and CFC paradigms, respectively. Experiments using mice subjected to environmental enrichment suggest that this form of stimulation reverses mnemonic impairments ascribed to the absence of P2X7R. Finally, no alterations were observed in the habituation memory of P2X7R KO mice.

*Keywords: Aversive Memory; Spatial Memory; Fear Conditioning; Purinergic System; P2X7*



## 1. Introduction

Innovative studies carried out 50-30 years ago demonstrated that ATP plays a role in cell signaling. It was soon proposed that ATP activates ionotropic P2X and metabotropic P2Y membrane receptors (Jarvis & Khakh, 2009). Both types of receptors are distributed throughout the central nervous system and exert influence on neurons as well as on glial cells. On neurons, the seven P2X receptor subtypes identified (P2X1 – P2X7) (Li et al., 2008) mediate fast synaptic responses to the ligand ATP (Illes & Ribeiro, 2004).

The P2X7 receptor (P2X7R) subtype has several characteristics that distinguish it from the other members of the P2X family. The primary intracellular signal triggered by P2X7R stimulation consists of a fast influx of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  and efflux of  $\text{K}^+$  (Bianco et al., 2009) and co-immunoprecipitation experiments suggest that this subtype does not associate with other P2X subunits (Kim et al., 2001). Its activation demands concentrations of ATP that are 10-100 times higher than the necessary for other P2X subunits, and its full activation is reached when it is exposed to concentrations in the range of mM of ATP (Verkhatsky et al., 2009; Kim et al., 2001). Also, when exposed to ATP either for a prolonged period or in high concentrations, the P2X7R may have its ionic channel converted into a large transmembrane non selective pore, which allows the passage of molecules as large as 900 Da (Yan et al., 2008; White & Burnstock, 2006).

Experiments developed by Pankratov and colleagues (1998) indicated the presence of non glutamatergic currents on post-synaptic excitatory currents in pyramidal neurons of the hippocampal CA1 region. It has been suggested that depending on the membrane voltage, 20-25% of the excitatory input to CA1 neurons can be of purinergic origin. Thus, besides the fact that the activation of P2 receptors can stimulate or inhibit glutamate release from rat hippocampal neurons, ATP release has been implicated in hippocampal long term potentiation (LTP) (Fields & Burnstock, 2006), whose molecular mechanisms in the hippocampal CA1 region are much alike those involved in the consolidation of long-term memory (LTM) (Izquierdo et al., 2006).

Besides being reported to be expressed on microglia and astrocytes, evidences show also the presence of moderate-high expression of P2X7 in presynaptic terminals in the central nervous system (Deuchars et al., 2001), mainly in hippocampal neurons (Able et al., 2011; Kukley et al., 2004). More specifically, P2X7R are abundantly found on presynaptic terminals of mossy fiber synapses in the rat hippocampus, and further investigation ascribed the inhibition of neurotransmission at mossy-fiber-CA3 synapses through a p38MAPK signaling to the P2X7 activation in presynaptic terminals (Armstrong et al., 2002). Being abundant in the terminals of

mossy fiber synapses (Maruyama et al., 2000), p38MAPK is recognized as a key player in the regulation of synaptic plasticity (Thomas & Huganir, 2004).

The standard definition of an enriched environment (EE) is "a combination of complex inanimate and social stimulation", in which the interaction of different stimuli and voluntary exercise elicits various plastic responses in the adult brain (Van Praag et al., 2000). An important line of research deals with the potential therapeutic effects of EE in experimental models of nervous system injuries and disorders, given that the action of EE may be particularly efficacious in delaying the progression and/or in ameliorating the symptoms of those neurological disorders in which neuronal plasticity is compromised due to alterations in physiological processes (Baroncelli et al., 2010).

The present study was designed to investigate the role of P2X7 receptors in aversive, spatial and habituation memory, as well as the possibility of reversal of potential mnemonic deficits through environmental enrichment. Thus, mutant P2X7 receptor knockout (KO) mice and wild type (WT) mice were tested in well characterized behavioral paradigms such as contextual fear conditioning, Morris water maze and open field. We also tested male Wistar rats that received intrahippocampal infusions of a specific P2X7R antagonist in different time points in order to assess the participation of this receptor subtype in acquisition, consolidation and evocation of aversive memory.

## **2. Methods**

### *2.1. Animals*

Male Swiss, C57/BL6 and P2X7R knockout (P2X7R KO) mice (age 5 months; 25–30 g) were used throughout this study (n= 9-12 per group). Swiss and C57/BL6 mice were obtained from Universidade Federal de Pelotas (UFPEL; Pelotas, RS), and P2X7 receptor KO were donated by Dr. Robson Coutinho, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The P2X7 receptor KO mice were generated by the method developed by Dr. James Mobley (PGRD, Pfizer Inc, Groton, CT, USA). The P2X7 receptor-deficient mice used in the present study were C57/BL6 inbred. The animals were housed in groups of five per cage and maintained in controlled temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity (60-70%), under a 12 h light-dark cycle, with food and water *ad libitum*.

In a separate set of experiments, *Rattus norvegicus* of the Wistar strain were used for additional pharmacological experiments (n= 8-10). Male rats (age 2–3 months; weight 250–280

g) were obtained from the breeding colony of Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande, RS, Brazil). The animals were kept in groups of five in each cage, with a 12 h light/dark cycle, at a temperature of  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , with food and water *ad libitum*.

All the experimental procedures were carried out in accordance with the Guidelines for the Use and Care with Laboratorial Animals from National Institute of Health and ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animal, and were approved by the Local Animal Ethics Committee (0131/12 PUC-RS) (P069/2011 FURG). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the experiment.

## 2.2. Environmental enrichment (EE)

Two separate groups of mice (P2X7R KO and WT) were housed in groups of nine in  $47 \times 37 \times 21$  cm cages, each containing one 30-cm hollow plastic J-shaped tunnel; one 13-cm-diameter metallic running wheel; short, hollow plastic tubes for burrowing and two 5cm plastic toys. Two other groups (P2X7R KO or WT) of mice were housed in groups of nine in similar-sized cages without these added spatial components (non-enriched environment, NE). Mice were housed for 6 consecutive weeks (Sztainberg, 2010) before behavioral experimentation in the contextual fear conditioning paradigm (see 2.3.3.). Both enriched and nonenriched groups of mice received identical types of food and water *ad libitum*, and they were kept on a 12-h light/dark cycle.

## 2.3. Stereotaxic Surgery

After a week of acclimation, rats were submitted to stereotaxic surgery for the implant of cannulae on the CA1 region of the hippocampus, under Ketamin (62.5 mg/kg) and Xilazin (13 mg/kg) anesthesia. The guide cannulae were fixed with acrylic resin at 1 mm above of CA1 region of dorsal hippocampus, according to the following coordinates: 4.3 anterior, 3.0 lateral, 1.8 ventral, according to the atlas by Paxinos and Watson (2007). At the end of the surgery, to prevent infections, the animals were treated with an antibiotic association (Pentabiótico®, Brazil).

#### *2.4. Drugs and infusion procedures*

For experimental procedures, rats were distributed randomly in groups according to the treatments. The animals were randomly divided in 5 groups and each subject was treated with a single bilateral hippocampal infusion of either A-740003 (1, 10 or 100  $\mu$ M), a specific P2X7 antagonist, or DMSO (vehicle group) on the CA1 region. The control groups were treated with saline solution. In all groups 1  $\mu$ L/cannulae was infused according to the treatment. For the infusion procedure, an infusion cannula was fitted through the guide cannulae and the infusions were performed with Hamilton microsyringe coupled to the cannulae with a polyethylene tube. At the time of administration, infusion cannula protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at the hippocampus CA1 area. All the treatments were performed either at 30 min pre- or 0 min post training, or 30 min prior to the contextual fear conditioning test session in order to evaluate the effect of the specific P2X7 antagonist A-740003 upon acquisition, consolidation and retrieval of memory (see details in the behavioral analysis 2.3.3). All drugs were obtained from Sigma Chemical Co, USA.

#### *2.5. Behavioral analyses*

##### *2.5.1. Habituation*

In order to control for possible interference of the P2X7 receptor on habituation memory and general locomotor activity, mice were submitted to the open field task using a box with 50 x 40 cm linoleum floor divided into 12 equal rectangles with the black lines, surrounded by 60 cm-high walls. The front wall was made of glass and the other walls were made of plywood. On the first session, animals were gently placed on the rear left rectangle and left to explore the field freely for 5 min to be then returned to their homecage. The second session was carried out 24 h later, with a procedure similar to the first session (Barros et al., 2001). Line crossings and rearings were counted in both sessions (Vianna et al., 2001).

##### *2.5.2. Spatial memory in the Morris Water Maze (MWM)*

A water-maze similar to that described by Morris (1984) was used. The large circular pool (160 cm in diameter and 70 cm in depth) was half-filled with milky water that was maintained at  $22\pm 1^\circ\text{C}$  (room temperature). The escape platform (10 cm in diameter), made of Polyvinyl Chloride (PVC), was submerged 0.5 cm below the surface of the water and was not visible for the mouse when placed in one of the four quadrants during the acquisition trials. Spatial memory acquisition trials were performed in a procedure consisting in the placement of each subject in the pool facing the side-wall. The animals were then allowed to swim until the escape platform was reached or for a maximum of 120 s. Spatial cues were placed on the walls

outside the pool. During the 5 days of acquisition trials in the spatial-memory procedure, the hidden platform remained in the same location and each animal was given four trials a day using different starting positions according to a semi-random pattern. If the subject found the platform within the period of 120 s, it spent 10 s on the platform after which it was removed from the pool for 50 s before the next trial was started. If the platform was not found within 120 s, the mouse was placed on the platform where it remained for 10 s and was removed from the pool for 50 s before the next trial was started. During the probe trial (day 6), the platform was removed from the pool and, for 90 s, the time spent by the mouse in the quadrant where the platform was located during the acquisition trials was evaluated. Data were recorded by imaging analyses system (EthoVision®, NOLDUS).

### *2.5.3. Contextual Fear Conditioning (CFC)*

Mice were manipulated for three days and then submitted to the fear conditioning task. Behavioral training was performed in a fear conditioning chamber (25 x 25 x 25 cm). The box had aluminum sidewalls, a Plexiglas front wall and the floor consisted of 16 stainless steel rods spaced 1 cm apart. The animals were transported to chambers in groups of ten in their homecages. Chambers were cleaned with a 70% ethanol solution following each individual behavioral testing session. Mice were transported to the conditioning context and individually placed into the experimental chamber. Following a 180 s of habituation to the context, animals were fear conditioned using three, 0.7 mA, 1 s footshocks separated by a 10 s interval. Following the final shock, the animals remained in the chambers until the completion of a 5 minutes session before being transported back to their homecages. Mice were then brought back to the context for a 5 min exposure session to test for contextual fear memory either 90 min or 24 hours later, in which the time spent in freezing behavior was assessed to evaluate short-term and long-term memory, respectively (adapted from Bekinschtein, 2007).

After recovering from surgery, the rats were manipulated for three days and then submitted to the same paradigm. Memory acquisition, consolidation and evocation were tested 24 hours post-training.

### *2.5.4. Hot Plate test for nociception*

In order to test for possible differences in nociception between the groups of mice used, which could influence pain-related responses during fear conditioning, the response to an acute thermal stimulus was measured using hot plate test (Karlsson et al., 2005). The animals were individually placed on a (20x20x0.5 cm) metal surface maintained at 55 °C and

surrounded by a transparent plastic barrier. The latency to the first paw lick, jump or hindpaw shake was manually accessed. A maximum response latency of 30 s was used to prevent the risk of tissue damage to the paws and group differences were analyzed using Student T test.

## 2.6. Statistical Analyses

In this study, parametric statistics were used to analyze the results from the habituation paradigm and statistical differences were tested through analysis of variance ANOVA test followed by Newman-Keuls post-test. For the water maze task, results were analyzed through parametric statistics, where statistical differences were tested through Student T test or two way ANOVA test followed by Bonferroni post-test. Finally, for the contextual fear conditioning results, either Student T tests or analysis of variance ANOVA test followed by Newman-Keuls post-test were employed. In all comparisons  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. P2X7 purinergic receptor does not alter habituation memory

The animals were tested in an Open Field (OF) apparatus for the habituation task. First we analyzed their performance on the second session, which took place 24 h after their first exposure to the apparatus and compared the number of line crossings within the same group. As shown on Figure 1, the WT group displayed less line crossings on the second day, when compared with the first session ( $p < 0.01$ ), suggesting that the WT group was successful in the habituation task. Also, the P2X7 receptor KO mice (P2X7KO) group displayed significant difference when the first and the second days were compared ( $p < 0.01$ ). In order to evaluate the locomotor activity comparing the performances of both groups in the first session, we noticed that there has been a significant difference between them, in which P2X7KO mice displayed less locomotor activity ( $p < 0.05$ ). This difference, however, did not compromise the results obtained in the other tasks performed, as it will be further discussed.

### 3.2. P2X7KO mice show hindered spatial memory on Morris water maze (MWM)

In order to access the influence of the P2X7 receptor on spatial memory, the animals were subjected to the Morris Water Maze task. The WT group gradually decreased the total

time lapse spent on acquisition trials, being it significant from the 3<sup>rd</sup> day on (day 3  $p < 0.05$ ; day 4  $p < 0.01$ ; day 5  $p < 0.001$ , versus WT day 1), while the KO group exhibited a significant difference only on the 4<sup>th</sup> day ( $p < 0.001$ , versus KO day 1), and no differences were observed on the last day of trials ( $p > 0.05$ , versus KO day 1) (Fig. 2A).

Notably, when total distance was accessed, the KO group swam for a shorter distance from the 3<sup>rd</sup> day of trials on (day 3  $p < 0.001$ ; day 4  $p < 0.001$ ; day 5  $p < 0.001$ , versus KO day 1), while the WT group swam significantly less on the fourth and fifth days (day 4  $p < 0.01$ ; day 5  $p < 0.01$ , versus WT day 1) (Fig. 2B). Regarding velocity, we observed a significant difference in the KO group during the last day of trials (day 5  $p < 0.01$ , versus KO day 1) (Fig. 2C).

Next, we compared the performances of the groups on the 6<sup>th</sup> day of experiment, when the test session took place. It is important to notice that the platform was removed from the pool during the probe trial. The first parameter analyzed was the lapse of time spent to reach the platform zone, in which the KO group was significantly superior ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). Furthermore, the number of entries in the SW Quadrant (where the platform was placed during acquisition trials) was significantly superior within the WT group ( $p < 0.05$ ) (Fig 3B), whereas the lapse of time spent in the same quadrant did not show significant difference (Fig xC). Finally, as for the total distance the animals have swum, KO mice swam less in relation to the WT group, showing a significant difference between the groups ( $p < 0.01$ ).

### 3.3. P2X7 receptor participates on aversive memory

#### 3.3.1 P2X7R KO mice show impaired contextual fear conditioning performance

We next performed the Contextual Fear Conditioning task, in P2X7R KO mice, in which tests were carried out 90 min or 24 h after training in order to access short- and long-term memories, and 7 days after training, when long term memory was once again accessed. As shown in Fig. 4A, the time spent in freezing was significantly shorter in the KO group when the subjects were tested 90 minutes after training session ( $p < 0.001$ ). Similar results were obtained in the following tests, carried out 24 h ( $p < 0.001$ ) and 7 days ( $p < 0.001$ ) after training session (Fig 4B, C).

#### 3.3.2. Exposure to enriched environment reverses mnemonic deficit on P2X7 mice

Mice housed in environmentally enriched cages were compared with mice housed in similar-sized cages without the spatial component. The groups were submitted to the fear conditioning paradigm in order to have their short- and long-term memory tested 90 min and 24h after training, respectively. First, mice that were kept in cages without the enrichment

component (NE) were submitted to the fear conditioning task and tested 90 min after training. As described in the previous experiment (see 3.3.1.), a significant difference was found when both WT and KO non-enriched groups were compared ( $p < 0.01$ ) (Fig. 5A). Interestingly, when comparing the performance of both groups (WT and KO) that were previously housed in EE, no difference was found as they were tested 90 min after training. Furthermore, a significant difference was found when both KO groups (EE *versus* NE) were compared ( $p < 0.05$ ) (Fig. 5A). Regarding the groups tested 24h after training, a significant difference was found again between NE groups (WT *versus* KO;  $p < 0.001$ ), as seen on figure 5B. Also, a significant difference was observed in the comparison between both WT groups (NE *versus* EE;  $p < 0.05$ ). Finally, a significant difference was found between both KO groups (NE *versus* EE), when tested 24h after training ( $p < 0.001$ ) (Fig 5B).

### 3.3.3. Specific antagonist A-740003 hinders aversive memory in Wistar Rats

As for the CFC task carried out with rats, the administration of the selective P2X7 receptor antagonist A-740003 in three different doses (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M) resulted in significant differences in all the time points of injection (Fig 6). Regarding animals infused 30 min before the training, significant difference was only observed in the group injected with the dose of 10  $\mu$ M, as compared with the vehicle and control groups ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6A). Additionally, when we compared the animals subjected to infusion 0 min after the training, differences were found in all doses when the treated groups were compared with the vehicle and control groups ( $p < 0.001$ ). Interestingly, the group infused with the lowest dose of A-740003 showed also a significant difference when compared with the groups infused with both higher doses ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6B). Finally, comparisons were made among the animals infused 30 min prior to the test session, which occurred 24h after training. Differences were found in the group infused with the highest dose of the antagonist (100  $\mu$ M), when compared with the vehicle and control groups ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6C).

### 3.5. P2X7 exerts no influence on Pain Sensitivity task

In order to evaluate the influence of P2X7R on pain sensitivity among the groups of mice, we performed the Hot Plate test. There was no significant difference between the groups regarding their response latency ( $p = 0.176$ ) (Fig. 7). This data excludes the possibility of pain sensitivity exerting any influence whatsoever in the aversive memory task.



#### 4. Discussion

This study brings new evidence on the participation of P2X7 purinergic receptor in memory of rodents, by demonstrating that: 1) P2X7R KO mice display abnormal spatial memory while training in the MWM task; 2) P2X7R KO mice show a defective formation of aversive memory when submitted to the fear conditioning paradigm; 3) the P2X7R antagonist A-740003 administered into the CA1 hippocampal region of rats, in different time points, hinders the acquisition, consolidation and retrieval of long-term memory; 4) Housing in enriched environment succeeded to reverse mnemonic deficits elicited by the lack of P2X7R in the fear conditioning paradigm and 5) KO mice display unharmed habituation memory, despite showing less locomotor activity in the habituation task.

Regarding spatial memory, the data obtained in this study corroborate with an elegant set of experiments developed by Labrousse et al. (2009), where WT mice showed significant spatial recognition in a different behavioral paradigm, whereas P2X7R KO mice did not. Our data shows that P2X7R KO mice displayed an impaired performance on the acquisition trials, as observed on the total time lapse of the trials. In our work, the lapse taken by the WT group decreased over the trials, whereas the KO group seemed to have consolidated the spatial memory from the third day, as the mice took less time to accomplish the task. However, as the memory was retrieved on the fourth day, the lack of the receptor seemed to have rendered an impaired reconsolidation of the memory, so that the mice could not repeat the performance on the last day of trials.

Also, the diminished average total distance swum in the probe trials (Fig. 3D) might be related to the results obtained in the habituation task, in which the animals displayed less line crossings already in the first session of the paradigm. Regarding this aspect, our data concur with results obtained by Boucher et al. (2011), who observed a decreased locomotor activity of P2X7KO mice when compared to WT mice in the light-dark emergence test. Even though Basso et al. (2009) reported no differences between P2X7KO and WT mice tested in activity chambers for a longer period of time, as suggested by Boucher, the decreased travelled activity observed in the P2X7KO mice could be credited to decreased exploratory behaviour and both WT and P2X7KO mice would habituate to exploration if tested for longer (Boucher, 2011; Basso, 2009).

As for the fear conditioning task, our results showed that the P2X7RKO group displayed impairments already on the test session carried out 90 m after training, thus reflecting impairments already in the short-term memory, and again on both subsequent test sessions

that access long-term memory. Similar results were obtained from the same task in which rats subjected to intra-hippocampal infusions with the selective P2X7R antagonist A-740003. Pharmacological experiments provide higher temporal specificity, as one can be aware of the onset of the receptor blocking, starting at the infusion. Animals that underwent infusion before training showed impairment on LTM after the administration of the intermediate dose, conveying that the blockage of the P2X7R already in the acquisition hinders memory formation. Also, the inhibition of this receptor immediately after training showed the importance of this receptor during the consolidation phase, as the animals displayed deficits on LTM following the administration of all doses of the P2X7R antagonist, as observed in the test session. Finally, memory retrieval is also likely to be influenced by the P2X7 receptor, as the administration of the P2X7R receptor at the highest dose also influenced the mnemonic performance of the subjects.

Our results suggest that both the absence and the blockage of P2X7R in different time-frames elicits impairments on hippocampal-dependent memory formation and probably the downstream events stemming from it that are specifically involved in aversive as well as spatial learning. This possibility is supported by similar results obtained by Labrousse et al. (2009) regarding spatial learning deficits in P2X7KO mice and possibly by the effects elicited by ATP through presynaptic P2X7R in the modulation of hippocampal synaptic transmission (Armstrong et al., 2002; Sperlágh et al., 2002), underlined by the high expression of P2X7 both by presynaptic terminals of mossy fibers targeting CA3 pyramidal neurons (Armstrong, 2002).

As for the experiments with EE, the results obtained solely from mice housed in NE corroborate initial results from the same paradigm when mice were tested 90 min or 24 h after training, indicating mnemonic deficits both on short-term and long term aversive memory (see 3.3.1.). As for animals tested 90 min after training (Fig. 5A), further comparisons showed not only that no significant difference was found between both groups submitted to EE, but also that when both P2X7KO groups were compared (P2X7KO EE *versus* P2X7KO NE), P2X7KO EE mice displayed significant STM improvement. Furthermore, similar effect by environmental enrichment was observed when groups were tested 24 h after training. Besides no difference between both EE groups (WT *versus* P2X7KO) being found, the P2X7KO EE group displayed a significantly better performance when compared to the P2X7KO NE. Interestingly, a significant improvement in LTM was observed also in the comparison between both WT groups (WT NE *versus* WT EE). These data imply that environmental enrichment had a compensatory effect

over the absence of P2X7R in KO mice, mitigating mnemonic deficits observed both in STM and LTM performances of mice submitted to the CFC paradigm.

The mnemonic enhancement observed in WT group submitted to EE corroborates with the view that EE exerts profound effects on the central nervous system, leading to improvements in complex cognitive functions, particularly learning and memory (Baroncelli, et al., 2010; Duffy et al., 2001). It has been shown that EE also attenuates cognitive impairments elicited by a variety of experimental challenges, such as prenatal maternal seizure (Xie et al., 2012), chronic cerebral hypoperfusion (Sun et al., 2010), chronic stress (Hutchinson et al., 2012; Veena et al., 2009), ageing (Speisman et al., 2013) and beta amyloid pathology (Herring et al., 2011). In this case, EE seems to have counteracted the absence of the P2X7R on both short-term and long term aversive memory, as suggested by our results.

Regarding the pharmacological experiments, the P2X7R specific antagonist employed in this study A-740003 functions as a competitive antagonist of P2X7R and is reported to dose-dependently reduce neuropathic pain in rats submitted to several models of neuropathic pain (Honore et al., 2006). Interestingly, the effects obtained from the administration of the P2X7R specific antagonist A-740003 showed an inverted U shape dose-response profile when administered immediately after training. Conversely, this effect was not observed in the other two time-frames of administration performed in this study.

Additionally, bearing in mind the involvement of the P2X7R in chronic and neuropathic pain signaling (Sorge et al., 2012; Donnelly-Roberts et al., 2008), we considered that a possible difference in pain sensitivity between groups subjected to the fear conditioning task should be ruled out. Thus, our results corroborate with previous work in which the data obtained from the hot plate test suggests no differences between WT and KO groups regarding pain sensitivity (Chessell et al., 2005).

Also, our results imply that the ionotropic P2X7 receptor is not involved in the habituation memory, as both groups displayed similar results when subjected to the habituation task. Furthermore, the results obtained in the habituation task are not likely to having interfered in the results obtained from the fear conditioning paradigm, as the WT group displayed longer lapses in freezing behavior on the test session.

Finally, the data of the present study showed that both the absence and the blockage of the P2X7R in different time-frames elicit impairments on aversive memory. Furthermore, this deficit may be reversed by the stimuli provided by an enriched environment. Also, the

data conveys that the actions of P2X7 receptors in hippocampal CA1 are important at different time points during memory formation, as suggested by pharmacological blockage. Also, the absence of this receptor elicits impairments on spatial learning indicating that P2X7 purinergic receptors are implicated in the memory of rodent models.

## 5. Acknowledgements

We would like to thank the Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas — Fisiologia Animal Comparada, Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support grant. D. M. Barros and F. B. Morrone are research fellows from the Brazilian agency CNPq, and Renan Campos received a graduate fellowship by Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel).

## 6. Figure Captions

**Figure 1.** Locomotor activity of mice during Habituation task (n= 12). Bars represent number of line crossings during the first and second days of exposure to the OF apparatus. Oneway ANOVA, followed by Newman-Keuls post-test, showed that line crossings on day 1 (D1) is significantly different from exploration on day 2 (D2) in both groups (\*\*  $p < 0.01$ ). Comparison made between the performances of both groups on the first day showed a significant difference (\*  $p < 0.05$ , ANOVA followed by post test Newman-Keuls).

**Figure 2.** Acquisition trials in the Morris Water Maze (n= 12). Bars represent total time lapse of acquisition trials. WT group displayed significant difference from 3<sup>rd</sup> day on (day 3  $p < 0.05$ ; day 4  $p < 0.01$ ; day 5  $p < 0.001$ , versus WT day 1), while the KO group exhibited significant difference only on the 4<sup>th</sup> day ( $p < 0.001$ , versus KO day 1) returning to not being significantly different on the last day of trials ( $p > 0.05$ , versus WT day 1). All comparisons were made with Twoway ANOVA followed by Bonferroni post-test (**A**); Bars represent total distance traveled during acquisition trials. KO group swam for a shorter distance from the 3<sup>rd</sup> day of trials on (day 3  $p < 0.001$ ; day 4  $p < 0.001$ ; day 5  $p < 0.001$ , versus KO day 1), while the WT group swam significantly less on the fourth and fifth days (day 4  $p < 0.01$ ; day 5  $p < 0.01$ , versus WT day 1). All comparisons were made with Twoway ANOVA followed by Bonferroni post-test (**B**); Bars represent mean velocity during acquisition trials. The only significant difference was displayed

by the KO group during the last day of trials (day 5  $p < 0.01$ , twoway ANOVA followed by Bonferroni post-test) (C).

**Figure 3.** Probe trial in the Morris Water Maze (n= 12). Bars represent lapse covered until the first occurrence in the platform area. KO group displayed significantly superior lapse ( $p < 0.05$  Student T Test) (A); Bars represent number of entries in the SW quadrant (where the platform was placed during acquisition trials). WT group entered a number of times significantly superior when compared to the KO group ( $p < 0.05$  Student T Test) (B); Bars represent time spent in the SW quadrant. No significant difference was found ( $p > 0.05$  Student T Test) (C); Bars represent total distance traveled. A difference was found in which the KO group swam significantly less ( $p < 0.01$  Student T Test) (D).

**Figure 4.** Contextual fear conditioning paradigm with mice (n=9-11). Bars represent time spent in freezing behavior when mice were tested 90 min (A), as well as 24 h (B) and 7 days (C) after training in CF. In all cases, freezing behavior lasted significantly less in KO group ( $p < 0.001$  Student T Test).

**Figure 5.** Contextual fear conditioning paradigm with mice subjected to EE (n= 9). Bars represent time spent in freezing behavior when mice were tested 90 min (A), as well as 24 h (B). The first comparison between groups tested 90 min after training indicates a significant difference between WT and KO NE groups ( $p < 0.01$ ). Interestingly, no difference was found in the comparison between the performance of the groups WT EE and P2X7KO EE (WT and KO), also tested 90 min after training. Furthermore, a significant difference was found when both P2X7RKO groups (EE versus NE) were compared ( $p < 0.05$ ) (A). Concerning the groups tested 24h after training, a significant difference was found between non-enriched groups (WT NE versus KOP2X7 NE;  $p < 0.001$ ). Also, a significant difference was observed in the comparison between both WT groups (EE versus NE;  $p < 0.05$ ). Finally, a significant difference was found between both KO groups (EE versus NE), when tested 24h after training ( $p < 0.001$ ) (B). All comparisons were made through Analysis of variance Oneway ANOVA test followed by Newman-Keuls post-test.

**Figure 6.** Contextual fear conditioning paradigm with rats (n= 8-10). Bars represent time spent in freezing behavior when rats were tested 24 h after training session. The first infusion time took place 30 min before training in CFC and aimed to evaluate the acquisition of memory. The group infused with A-740003 10  $\mu$ M showed a significant difference, as compared to the group infused with vehicle (DMSO+H<sub>2</sub>O) (\*  $p < 0.05$ ) (A). Next, animals were infused 30 min after

training, in order to evaluate the beginning of the consolidation of memory. Groups infused with all doses of A-740003 (1, 10 and 100  $\mu$ M) showed significant difference as compared to the vehicle group (\*\* $p < 0.001$ ). Interestingly, the group infused with the lowest dose showed also a significant difference when compared with both higher doses (@  $p < 0.01$ ) (B). Finally, animals were infused 30 min before testing, in order to evaluate memory retrieval. The highest dose of A-740003 (100  $\mu$ M) showed significant difference as compared to the vehicle group (\*\*  $p < 0.01$ ) (C). In all cases Oneway ANOVA followed by Newman-Keuls post-test was used.

**Figure 7.** Hot plate (n= 10). Bars represent latency until response. There was no significant difference between the groups with regards to response latency ( $p = 0.176$  Student T Test).

## 7. References

- Able, S. L., Fish, R. L., Bye, H., Booth, L., Logan, Y. R., Nathaniel, C., Hayter, P., Katugampola, S. D. 2011. Receptor localization, native tissue binding and ex vivo occupancy for centrally penetrant P2X7 antagonists in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 162, 405–14.
- Armstrong, J. N., Brust, T. B., Lewis, R. G., & MacVicar, B. a. 2002. Activation of presynaptic P2X7-like receptors depresses mossy fiber-CA3 synaptic transmission through p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.*, 22, 5938–45.
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Sale, a, & Maffei, L. 2010. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ.*, 17, 1092–103.
- Barros, D. M., Mello e Souza, T., de David, T., Choi, H., Aguzzoli, A., Madche, C., Ardenghi, A., Medina, J. H., Izquierdo, I., 2001. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, h-noradrenergic, serotonergic- 1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav. Brain Res.* 124, 1–7.
- Basso, A. M., Bratcher, N. a, Harris, R. R., Jarvis, M. F., Decker, M. W., & Rueter, L. E. 2009. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav. Brain Res.*, 198, 83–90.
- Ben Menachem-Zidon, O., Avital, A., Ben-Menahem, Y., Goshen, I., Kreisel, T., Shmueli, E. M., ... Yirmiya, R. 2011. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain, Behav., Immun.*, 25, 1008–16.

- Bianco, F., Colombo, A., Saglietti, L., Lecca, D., Abbracchio, M. P., Matteoli, M., & Verderio, C. 2009. Different properties of P2X(7) receptor in hippocampal and cortical astrocytes. *Purinergic signalling*, *5*, 233–40.
- Boucher, A., Arnold, J. C., Hunt, G. E., Spiro, A., Spencer, J., Brown, C., ... Kassiou, M. 2011. Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience*, *189*, 170–7.
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., ... Buell, G. N. 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, *114*, 386–96.
- Deuchars, S. a, Atkinson, L., Brooke, R. E., Musa, H., Milligan, C. J., Batten, T. F., ... Deuchars, J. 2001. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.*, *21*, 7143–52.
- Donnelly-Roberts, D., McGaraughty, S., Shieh, C., Honore, P., & Jarvis, M. F. 2008. Painful purinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *324*, 409–415.
- Duffy, S. N., Craddock, K. J., Abel, T., & Nguyen, P. V. 2001. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem.*, *8*, 26–34.
- Fields, R. D., & Burnstock, G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, *7*, 423–36.
- Herring, A., Lewejohann, L., Panzer, A.-L., Donath, A., Kröll, O., Sachser, N., ... Keyvani, K. 2011. Preventive and therapeutic types of environmental enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol. Dis.*, *42*, 530–8.
- Honore, P., Donnelly-roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P., ... Jarvis, M. F. 2006. A-740003 [ N- ( 1- {{( Cyanoimino )( 5-quinolinylamino ) dimethoxyphenyl ) acetamide ], a Novel and Selective P2X 7 Receptor Antagonist, Dose-Dependently Reduces Neuropathic Pain in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *319*, 1376–1385.
- Hutchinson, K. M., McLaughlin, K. J., Wright, R. L., Bryce Ortiz, J., Anouti, D. P., Mika, A., ... Conrad, C. D. 2012. Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiol. Learn. Mem.*, *97*, 250–60
- Illes, P., & Ribeiro, A. J. 2004. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.*, *483*, 5–17.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.*, *29*, 496–505.

- Jarvis, M. F., & Khakh, B. S. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, *56*, 208–15.
- Karlsson, R.-M., Holmes, A., Heilig, M., & Crawley, J. N. 2005. Anxiolytic-like actions of centrally-administered neuropeptide Y, but not galanin, in C57BL/6J mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *80*, 427–36
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. a, & Surprenant, a. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.*, *20*, 6347–58.
- Kukley, M., Stausberg, P., Adelmann, G., Chessell, I. P., & Dietrich, D. 2004. Ecto-nucleotidases and nucleoside transporters mediate activation of adenosine receptors on hippocampal mossy fibers by P2X7 receptor agonist 2'-3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP. *J. Neurosci.*, *24*, 7128–39.
- Labrousse, V. F., Costes, L., Aubert, A., Darnaudéry, M., Ferreira, G., Amédée, T., & Layé, S. 2009. Impaired interleukin-1beta and c-Fos expression in the hippocampus is associated with a spatial memory deficit in P2X(7) receptor-deficient mice. *PLoS one*, *4*, 1-9.
- Li, M., Chang, T.-H., Silberberg, S. D., & Swartz, K. J. 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat. Neurosci.*, *11*, 883–7.
- Maruyama, M., Sudo, T., Kasuya, Y., Shiga, T., Hu, B., & Osada, H. 2000. Immunolocalization of p38 MAP kinase in mouse brain. *Brain Res.*, *887*, 350–8.
- Morris, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, *11*, 47–60.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-portugal, M. T., & Krishtal, O. 1998. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, *10*, 3898–3902.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed. Elsevier Academic Press, London.
- Skaper, S. D., Debetto, P., & Giusti, P. 2010. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.*, *24*, 337–45.
- Sorge, R. E., Trang, T., Dorfman, R., Smith, S. B., Beggs, S., Ritchie, J., ... Mogil, J. S. 2012. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat. Med.*, *18*, 595–9.
- Speisman, R. B., Kumar, A., Rani, A., Pastoriza, J. M., Severance, J. E., Foster, T. C., & Ormerod, B. K. 2013. Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats. *Neurobiol. Aging*, *34*, 263–74.



- Sperlágh, B., Köfalvi, A., Deuchars, J., Atkinson, L., Milligan, C. J., Buckley, N. J., & Vizi, E. S. 2002. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J. Neurochem.*, *81*, 1196–211.
- Sun, H., Zhang, J., Zhang, L., Liu, H., Zhu, H., & Yang, Y. 2010. Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr. Neurovasc. Res.*, *7*, 268–80.
- Sztainberg, Y., & Chen, A. 2010. An environmental enrichment model for mice. *Nat. Protoc.*, *5*, 1535–1539.
- Thomas, G. M., & Huganir, R. L. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, *5*, 173–83.
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.*, *1*, 191–8.
- Veena, J., Srikumar, B. N., Raju, T. R., & Shankaranarayana Rao, B. S. 2009. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. *Neurosci. Lett.*, *455*, 178–82.
- Verkhatsky, A., Verkhasky, A., Krishtal, O. a, & Burnstock, G. 2009. Purinoceptors on neuroglia. *Mol. Neurobiol.*, *39*, 190–208.
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. a, Barros, D. M., De Souza, M. M., Rodrigues, C., Sant’Anna, M. K., ... Izquierdo, I. 2001. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, *34*, 233–40.
- White, N., & Burnstock, G. 2006. P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*, *27*, 211–7.
- Xie, T., Wang, W., Jia, L., Mao, Z., Qu, Z., Luan, S., & Kan, M. 2012. Environmental enrichment restores cognitive deficits induced by prenatal maternal seizure. *Brain Res.*, *1470*, 80–8
- Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomić, M., & Stojilkovic, S. S. 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.*, *132*, 563–73.

## 8. Figures

Figure 1.

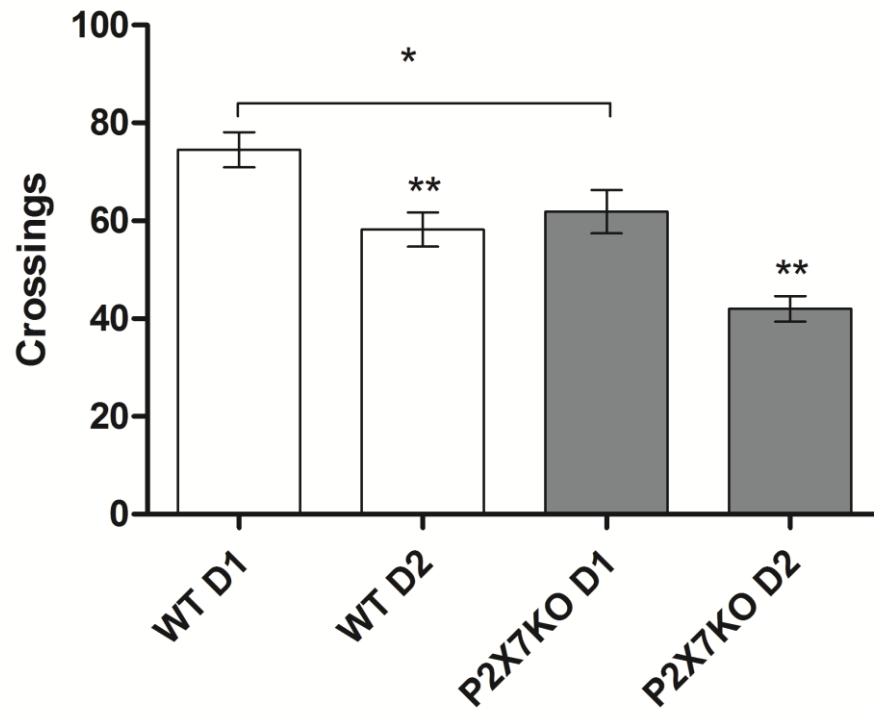


Figure 2.

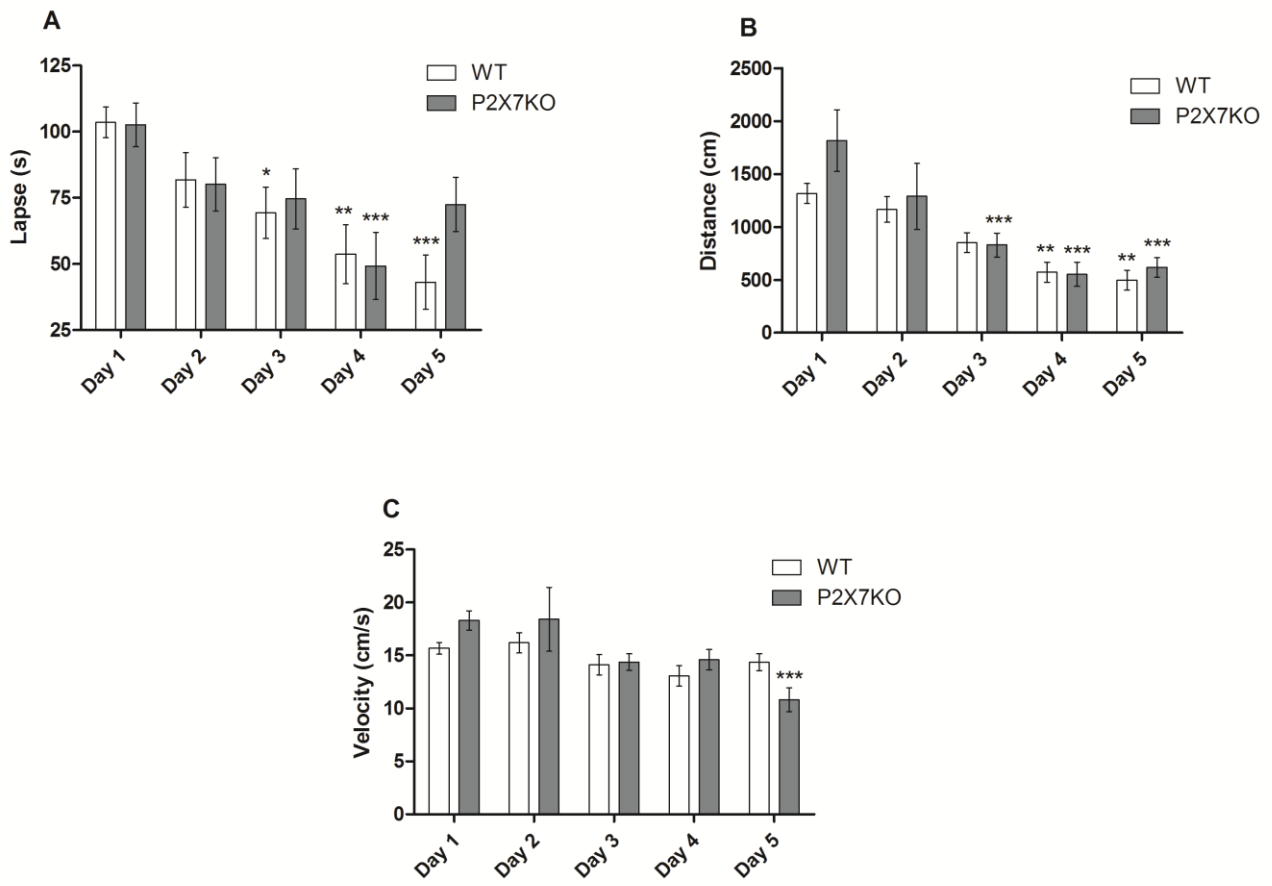


Figure 3.

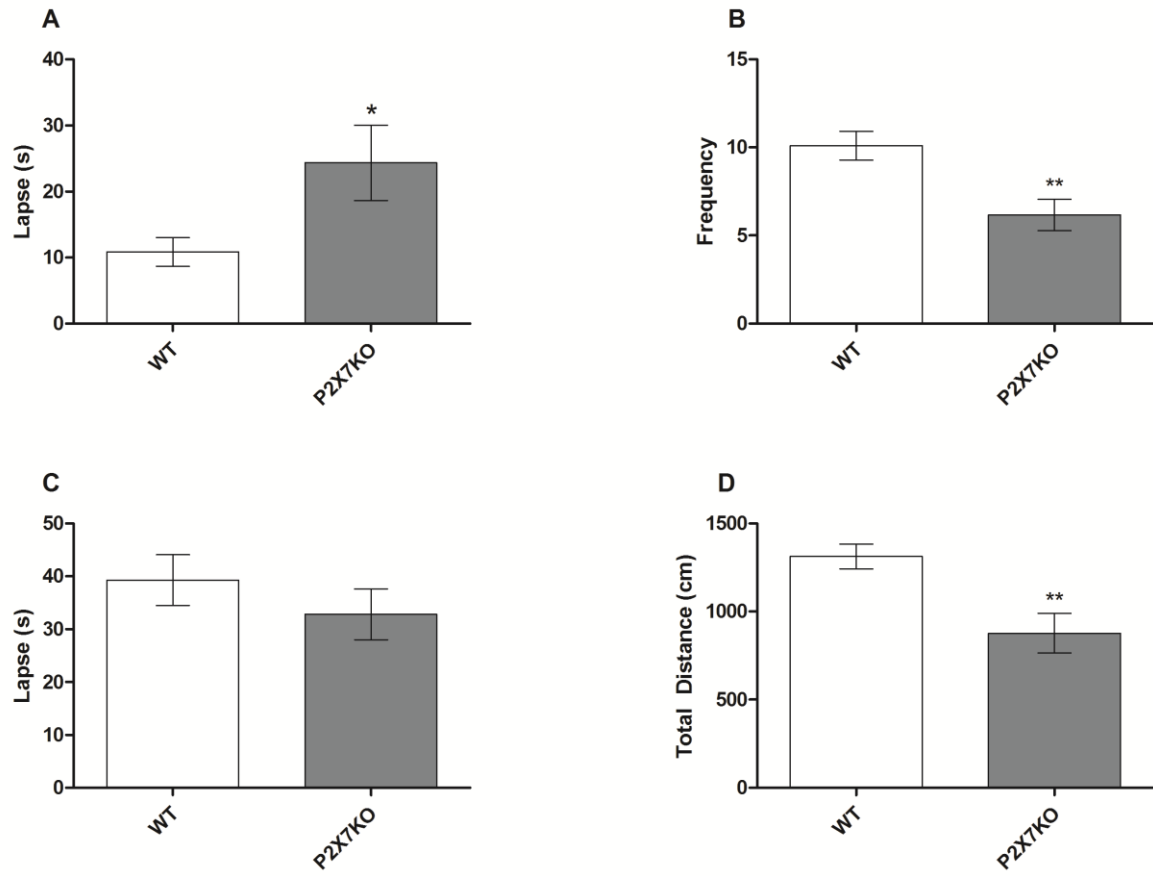


Figure 4.

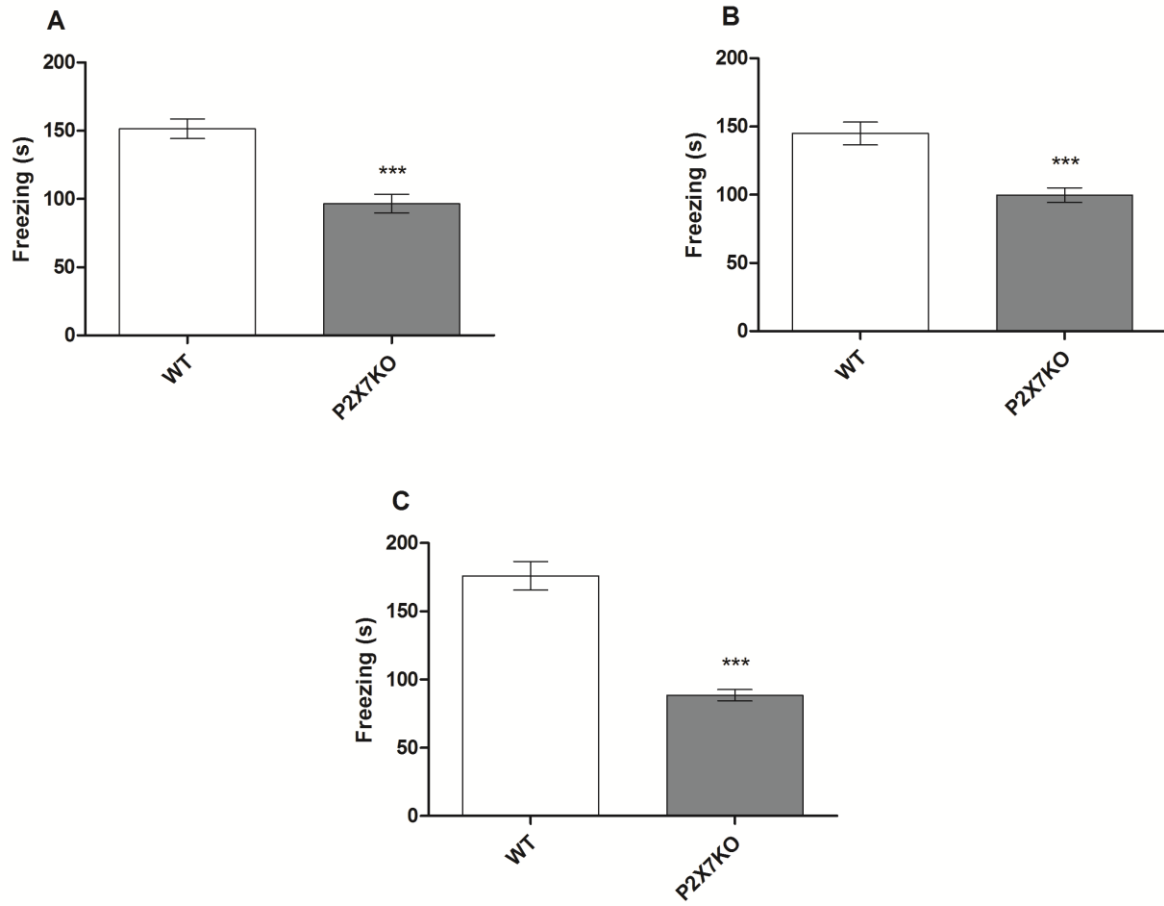


Figure 5.

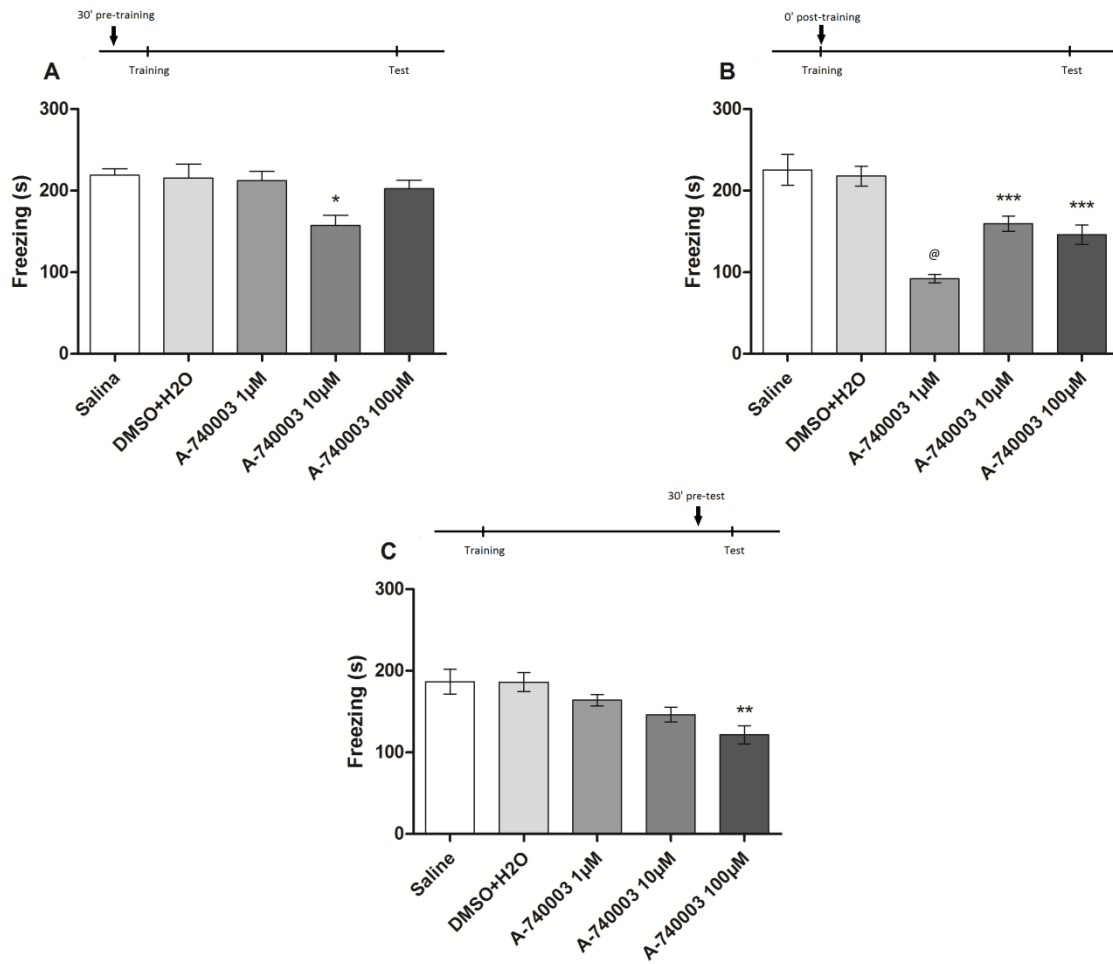


Figure 6.

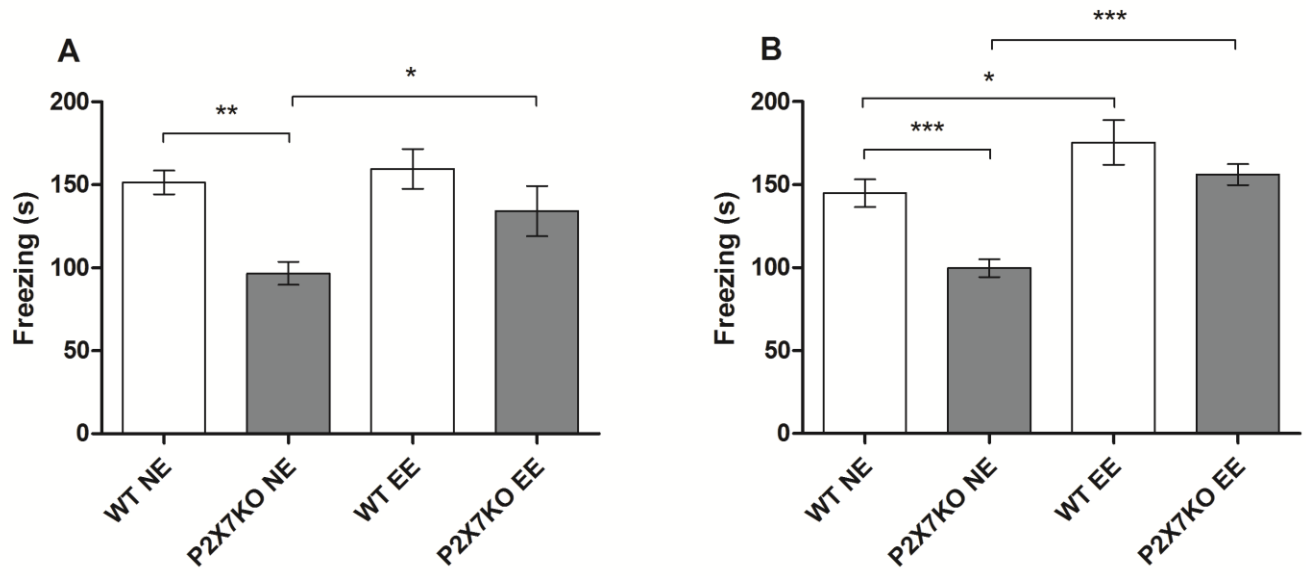
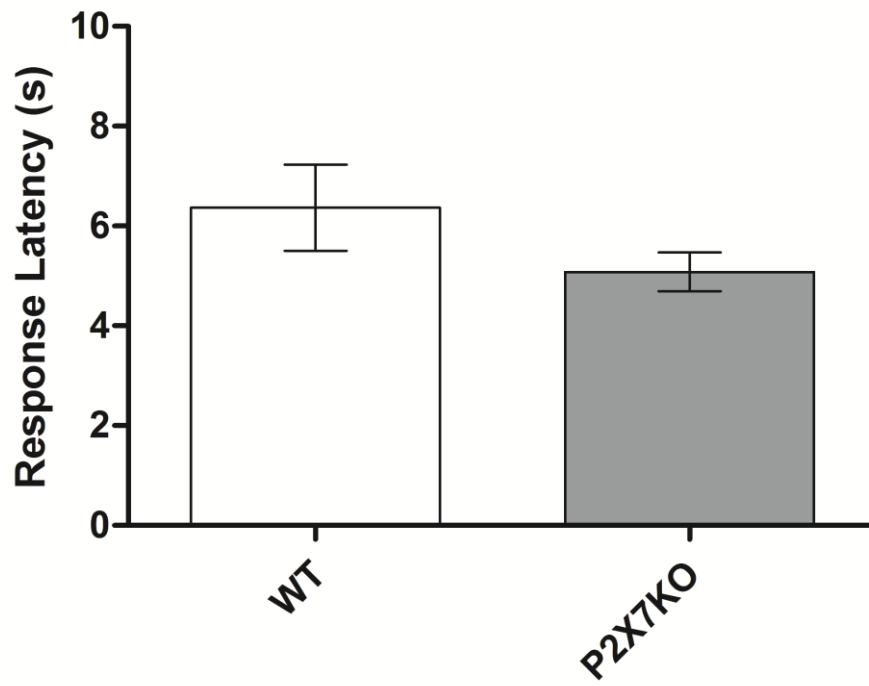


Figure 7.





#### **IV. Considerações Finais**

Este trabalho fornece informações importantes para a melhor compreensão da participação do subtipo de receptor purinérgico P2X7 nos processos cognitivos em roedores. Tendo em vista as diversas evidências sugerindo a influência exercida pelo sistema purinérgico sobre os eventos subjacentes à plasticidade, confirma-se, através deste estudo, um componente purinérgico nos processos de formação das memórias aversivas de curto e longo prazo. Esta observação se deu através da avaliação do desempenho de camundongos com deleção gênica para o receptor P2X7 aos 90 min e às 24hs após treino na tarefa de medo condicionado contextual.

Ademais, similar prejuízo foi observado no processo de formação da memória espacial, avaliada através da tarefa do labirinto aquático de Morris, com a utilização do mesmo modelo animal. Ainda, o mencionado componente purinérgico conta com a participação dos receptores ionotrópicos P2X7 em especial na região CA1 do hipocampo, como sugerido pelos resultados dos experimentos farmacológicos obtidos com ratos, neste estudo. Estes efeitos foram evidenciados tanto pelos déficits na fase de aquisição da memória como nas fases de consolidação e evocação, observados após a administração de um antagonista específico do receptor P2X7 em diferentes pontos da formação da memória. Surpreendentemente, os efeitos benéficos do enriquecimento ambiental sobre processos cognitivos de camundongos se comprovaram suficientes para que os prejuízos mnemônicos observados nos experimentos iniciais com camundongos KO fossem revertidos e, ainda, para que se observasse uma melhora no desempenho mnemônico de camundongos selvagens submetidos a este tipo de estimulação prolongada.

Como perspectivas, estudos na área de biologia molecular, especificamente relacionados à expressão de genes envolvidos na formação da memória com c-fos e zif 268, bem como a participação de interleucinas, poderiam complementar as informações comportamentais e farmacológicas contidas neste trabalho, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos através dos quais o receptor P2X7 pode estar atuando nos processos cognitivos avaliados.

## V. Referências

- ABBRACCHIO, M. P. et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in neurosciences*, v. 32, n. 1, p. 19-29, jan. 2009.
- ALBERINI, C. M. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiological reviews*, p. 121-145, 2009.
- BAINS, J. S.; OLIET, S. H. R. Glia: they make your memories stick! *Trends in neurosciences*, v. 30, n. 8, p. 417-24, ago. 2007.
- BASSO, A. M. et al. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behavioural brain research*, v. 198, n. 1, p. 83-90, 2 mar. 2009.
- BERMÚDEZ-RATTONI, F. Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging. New York, *CRC Press*, 2007.
- BURNASHEV, N. Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium*, v. 24, p. 325-332, 1998.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, v. 24, n. 3, 509-581, 1972.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *Journal of theoretical biology*, v. 62, n. 2, p. 491-503, 21 out. 1976.
- BURNSTOCK, G. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. *Physiology reviews*, n. 87, p. 659-797, 2007.
- BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling in the CNS. *The open neuroscience journal*, v. 44, n. 0, p. 24-30, 2010.
- BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Progress in neurobiology*, v. 95, n. 2, p. 229-74, out. 2011.
- BURNSTOCK, G.; FREDHOLM, B. B.; VERKHRATSKY, A. Adenosine and ATP receptors in the brain. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 11, n. 8, p. 973-1011, jan. 2011.
- COCKROFT, S.; GOMPERTS, B. D. ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature*, v. 279, n. 5713, p. 461-558, mar. 1979.
- CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry international*, v. 38, n. 2, p. 107-25, fev. 2001.
- D'HOOGHE, R.; DEYN, P. P. DE. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain research. Brain research reviews*, v. 36, n. 1, p. 60-90, ago. 2001.
- DAVIS, M. Neurobiology of Fear Responses: The Role of the Amygdala. *The Journal of neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 9, n. 3, p. 382-402, 1997.

- DEUCHARS, S. A et al. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *The Journal of neuroscience*, v. 21, n. 18, p. 7143-52, 15 set. 2001.
- DIÓGENES, M. J. et al. Homeostatic Control of Synaptic Activity by Endogenous Adenosine is Mediated by Adenosine Kinase. *Cerebral cortex* (New York, N.Y. 1991), 20 set. 2012.
- DRURY, A.; SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology*, 1929.
- DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 211-6, abr. 2002.
- EDWARDS, F. A; GIBB, A J. ATP – A fast neurotransmitter. *FEBS letters*, v. 325, n. 1-2, p. 86-9, 28 jun. 1993.
- EGAN, T. M.; KHAKH, B. S. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *The Journal of neuroscience*, v. 24, n. 13, p. 3413-20, 31 mar. 2004.
- ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. *The New England journal of medicine*, v. 367, n. 24, p. 2322-33, 13 dez. 2012.
- FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 7, n. 6, p. 423-36, jun. 2006.
- FREDHOLM, B. B. et al. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 362, n. 4-5, p. 364-374, 17 out. 2000.
- FREDHOLM, B. B. et al. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 45, n. 30, p. 385-412, jan. 2005.
- FUJII, S.; KATO, H.; KURODA, Y. Cooperativity between extracellular adenosine 5'-triphosphate and activation of N-methyl-D-aspartate receptors in long-term potentiation induction in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience*, v. 113, n. 3, p. 617-28, jan. 2002
- GOMES, C. V et al. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1808, n. 5, p. 1380-99, maio. 2011.
- GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *The Biochemical journal*, v. 233, n. 2, p. 309-19, 15 jan. 1986.
- HOUSLEY, G. D.; BRINGMANN, A.; REICHENBACH, A. Purinergic signaling in special senses. *Trends in neurosciences*, v. 32, n. 3, p. 128-41, mar. 2009.
- HUSSL, S.; BOEHM, S. Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, v. 452, n. 5, p. 538-51, ago. 2006.

ILLES, P.; RIBEIRO, A. J. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology*, v. 483, n. 1, p. 5-17, jan. 2004a.

ILLES, P.; RIBEIRO, J. A. Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 4, n. 8, p. 831-8, jan. 2004b.

IZQUIERDO, I. Memória. 2ª Ed. Porto Alegre: *Artmed*, 2011.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, v. 68, n. 3, p. 285-316, nov. 1997.

JARVIS, M. F.; KHAKH, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology*, v. 56, n. 1, p. 208-15, jan. 2009.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)*, v. 294, n. 5544, p. 1030-8, 2 nov. 2001.

KIM, M. et al. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *The EMBO journal*, v. 20, n. 22, p. 6347-58, 15 nov. 2001.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 5, n. 1, p. 45-54, jan. 2004.

LEDOUX, J. E.; ROMANSKI, M.; XAGORARIS, A. The Lateral Amygdaloid Nucleus: Sensory Interface of the Amygdala in Fear Conditioning. *Journal of neuroscience*, v. 10, n. April, p. 1062-1069, 1990.

LEE, Y.-S.; SILVA, A. J. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 10, n. 2, p. 126-40, fev. 2009.

LI, M. et al. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 8, p. 883-7, ago. 2008.

LOCOVEI, S. et al. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS letters*, v. 581, n. 3, p. 483-8, 6 fev. 2007.

LØMO, T. The discovery of long-term potentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 358, n. 1432, p. 617-20, 29 abr. 2003.

MALENKA, R. C. Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science*, v. 285, n. 5435, p. 1870-1874, 17 set. 1999.

MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 5, n. 11, p. 844-52, nov. 2004.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology*, v. 202, n. 1-3, p. 3-14, jan. 2009.

- MENDONÇA, A. DE; RIBEIRO, J. A. Adenosine and Synaptic Plasticity. *Drug development research*, v. 290, p. 283-290, 2001.
- MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 10, n. 12, p. 850-60, dez. 2009.
- MORGADO-BERNAL, I. Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data. *Neuroscience*, v. 176, p. 12-9, 10 mar. 2011.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, v. 11, n. 1, p. 47-60, maio. 1984.
- NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*, v. 82, n. 4, p. 1013-67, out. 2002.
- OPAZO, P.; CHOQUET, D. A three-step model for the synaptic recruitment of AMPA receptors. *Molecular and cellular neurosciences*, v. 46, n. 1, p. 1-8, jan. 2011.
- PANKRATOV, Y. et al. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Pflügers Archiv: European journal of neuroscience*, v. 10, n. May, p. 3898-3902, 1998.
- PANKRATOV, Y. et al. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, v. 452, n. 5, p. 589-97, ago. 2006.
- PANKRATOV, Y. et al. Quantal release of ATP in mouse cortex. *The Journal of general physiology*, v. 129, n. 3, p. 257-65, mar. 2007.
- PANKRATOV, Y. et al. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*, v. 158, n. 1, p. 137-48, 12 jan. 2009.
- PAPE, H.; PARE, D. Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition , Expression , and Extinction of Conditioned Fear. *Physiology reviews*, n. 90, p. 419-463, 2010.
- PAPP, L.; VIZI, E. S.; SPERLÁGH, B. P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 355, n. 2, p. 568-74, 6 abr. 2007.
- PELEGRIN, P.; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*, v. 25, n. 21, p. 5071-5082, 2006.
- PEREIRA, G. S. et al. Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiology of learning and memory*, v. 83, n. 3, p. 217-23, maio. 2005.
- PHELPS, E. A; LEDOUX, J. E. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*, v. 48, n. 2, p. 175-87, 20 out. 2005.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; MCNAMARA, J. O.; WILLIAMS, S. M.; - Neuroscience. 3ª Ed. Sunderland: *Sinauer Associates, Inc*, 2004.

- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews*, v. 50, n. 3, p. 413-92, set. 1998.
- RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M. Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's disease*, v. 20 Suppl 1, p. S3-15, jan. 2010.
- RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A. M.; MENDONÇA, A. DE. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in Neurobiology*, v. 68, n. 6, p. 377-392, dez. 2002.
- ROBERTSON, S. J.; EDWARDS, F. A. ATP and glutamate are released from separate neurones in the rat medial habenula nucleus: frequency dependence and adenosine-mediated inhibition of release. *The Journal of physiology*, v. 508 (Pt 3), p. 691-701, 1 maio. 1998.
- RUBIO, M. E.; SOTO, F. Distinct Localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *The Journal of neuroscience*, v. 21, n. 2, p. 641-53, 15 jan. 2001.
- SAK, K.; WEBB, T. E. A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 397, n. 1, p. 131-6, 1 jan. 2002.
- SAWADA, K. et al. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 15, p. 5683-6, 15 abr. 2008.
- SIEGEL, G.; ALBERS, R.; BRADY, S. Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects. 7th. Ed. London: *Elsevier Academic Press*, 2006.
- SIERRA-MERCADO, D.; PADILLA-COREANO, N.; QUIRK, G. J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, v. 36, n. 2, p. 529-38, jan. 2011.
- SIM, J. A et al. Altered hippocampal synaptic potentiation in P2X4 knock-out mice. *The Journal of neuroscience*, v. 26, n. 35, p. 9006-9, 30 ago. 2006.
- SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. P2X7 Receptors in Neurological and Cardiovascular Disorders. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, v. 2009, jan. 2009.
- SKAPER, S. D.; DEBETTO, P.; GIUSTI, P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB journal*, v. 24, n. 2, p. 337-45, fev. 2010.
- SPERLÁGH, B. et al. The triangular septal nucleus as the major source of ATP release in the rat habenula: a combined neurochemical and morphological study. *Neuroscience*, v. 86, n. 4, p. 1195-207, out. 1998.
- SPERLÁGH, H. SERSHEN, A. LAJTHA, E. S. V. Co-release of endogenous ATP and (3H)noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *Neuroscience*, v. 82, n. 2, p. 511-520, 1998.

SPERLÁGH, B. et al. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry*, v. 81, n. 6, p. 1196-211, jun. 2002.

VERKHRATSKY, A. et al. Purinoceptors on neuroglia. *Molecular neurobiology*, v. 39, n. 3, p. 190-208, jun. 2009.

WHITE, N.; BURNSTOCK, G. P2 receptors and cancer. *Trends in pharmacological sciences*, v. 27, n. 4, p. 211-7, abr. 2006.

WHITLOCK, J.; HEYNEN, A. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, v. 313, n. August, p. 1093-1097, 2006.

YAN, Z. et al. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *The Journal of general physiology*, v. 132, n. 5, p. 563-73, nov. 2008.

ZARRINDAST, M. R.; SHAFAGHI, B. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *European journal of pharmacology*, v. 256, n. 3, p. 233-9, 2 maio. 1994.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, v. 52, n. 1-2, p. 44-56, jan. 2001.