

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Roberta Andrejew Caetano

**Envolvimento do sistema purinérgico no modelo de isolamento social em ratos Wistar
adultos**

Porto Alegre
2019

Roberta Andrejew Caetano

Envolvimento do sistema purinérgico no modelo de isolamento social em ratos Wistar adultos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador(a): Prof. Dra. Ana Maria O. Battastini
Coorientador(a): Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Andrejew Caetano, Roberta
Envolvimento do sistema purinérgico no modelo de
isolamento social em ratos Wistar Adultos / Roberta
Andrejew Caetano. -- 2019.
99 f.
Orientadora: Ana Maria Battastini.

Coorientador: Roberto Almeida.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Sistema purinérgico. 2. Isolamento social
pós-desmame. 3. Receptores purinérgicos. 4.
Ectonucleotidases. I. Battastini, Ana Maria, orient.
II. Almeida, Roberto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

Inicialmente, gostaria de agradecer a oportunidade de ter convivido com uma profissional tão exemplar, Professora Ana Battastini. Muito obrigada por me acolhido de maneira tão generosa em seu laboratório, por ter me dado liberdade e incentivo em trabalhar na minha área de interesse, pelo afeto, pelo tempo e pela prontidão dispensados com o intuito de sempre querer me ajudar. Admiro muito sua ética, seu caráter e sua paixão pela ciência. Agradeço a oportunidade de aprendizagem, amadurecimento científico, confiança e por me inspirar a ser uma profissional cada vez melhor.

Agradeço aos meus co-orientadores. Primeiramente ao Professor Roberto Almeida por ter ajudado em diversos aspectos, desde os experimentos comportamentais, a realização dos experimentos e análise dos dados. Foi um prazer trabalhar contigo e ter conquistado a sua amizade. À Professora Elaine Elisabetsky que me permitiu entrar na área da pesquisa básica, como minha primeira orientadora na graduação, e que retornou durante meu mestrado. Muito obrigada por sempre ter me estimulado a pensar criticamente na metodologia, resultados, análise de dados e rigor científico. Ao Professor Diogo Souza pela assistência e por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, muito obrigada.

Meu eterno obrigada a minha co-orientadora do coração, Dra. Carolina Gubert. Agradeço muito por todos os ensinamentos, que foram para além da bancada, por todos os momentos de grande felicidade compartilhados no laboratório e pela tua amizade que vou levar para o resto da vida.

Agradeço ao Laboratório 22, pelo companheirismo diário, pelas risadas, pelos momentos guardados na memória e pela amizade: Amanda, Andressa, Carol, César, Dani, Fabi, Fabrícia, Fabrício, Juliete, Lila, Luiz, Mery, Pauline e Vitória. Agradeço especialmente à Milla, que fez parte de todo trabalho e me ajudou muito na execução dele.

Meu eterno agradecimento a minha família, que incondicionalmente está do meu lado e me apoia em todas as minhas decisões. À minha mãe e minha vó, que o máximo de amor, carinho e dedicação nunca são suficientes e não medem esforços alguns para me ajudar, me ver bem e me cuidar. Não existem palavras para expressar o amor que sinto por vocês e para

agradecer o incentivo e apoio que me proporcionam para eu seguir meus sonhos. Vocês são fundamentais para mim e fazem parte da minha essência.

Minha enorme gratidão ao meu companheiro Vítor por ter entrado na minha vida neste último – e mais desafiador – ano. Muito obrigada pelo companheirismo, por não medir esforços em me ajudar, pela paciência, pelo carinho, por me apoiar nos meus objetivos e pelo crescimento pessoal.

Agradeço imensamente todos meus amigos que, mesmo às vezes de longe, estou sempre levando comigo. Sem a presença de vocês, essa fase seria muito mais difícil e com poucos momentos que me recordo com tanta alegria. Aos meus amigos que fiz durante a vida e aos amigos que o Departamento de Bioquímica me proporcionou.

Por fim, e não menos importante, deixo meu agradecimento aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, especialmente para Cléia e o Giordano, que fazem de tudo para que os alunos e professores sejam bem supridos e pelas condições de trabalho que proporcionam. Às agências de fomento que permitem que nossos trabalhos sejam concretizados: CNPq, CAPES, INCT, FAPERGS e PROPESQ/UFRGS.

“Together we stand, divided we fall”
(Roger Waters, Pink Floyd)

Apresentação

Esta dissertação está organizada em três partes, sendo cada uma constituída dos seguintes itens:

Parte I: Resumo, Resumo em inglês (*abstract*), Lista de Abreviações, Introdução e Objetivos;

Parte II: Manuscrito redigido a partir dos resultados obtidos nesta dissertação;

Parte III: Discussão, Conclusões, Referências bibliográficas utilizadas na Introdução da parte I e da Discussão da parte III e Anexos.

Sumário

PARTE I	7
Resumo	8
Abstract	9
Lista de abreviaturas	10
1. Introdução	11
1.1. Isolamento social pós-desmame.....	11
1.2. Sistema Purinérgico	13
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
PARTE II	20
3. Artigo científico	21
PARTE III	71
4. Discussão	72
5. Conclusões.....	83
6. Perspectivas.....	85
7. Referências	86

PARTE I

Resumo

O período do neurodesenvolvimento é caracterizado pela ampla estruturação do sistema nervoso central (SNC) e, portanto, é um momento de grande vulnerabilidade a agentes estressores endógenos e exógenos. Estresses ambientais como infecções durante a gravidez, adversidades na infância e isolamento do convívio social podem prejudicar a maturação do SNC, podendo, em última instância, servir como gatilho para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Roedores submetidos ao modelo de isolamento social pós-desmame apresentam prejuízos cognitivos, no filtro sensorio-motor, na neurotransmissão de dopamina e de plasticidade sináptica. O sistema purinérgico é mediado pela sinalização extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos. Com relação aos nucleotídeos de adenina, o ATP é hidrolisado até adenosina por ação de uma eficiente cadeia enzimática chamada de ectonucleotidases. Os nucleotídeos e nucleosídeos podem atuar nos receptores purinérgicos, que são divididos em receptores P1 e P2. Os receptores P2 são ainda subdivididos em P2X e P2Y. No SNC, as purinas exercem inúmeras funções fisiológicas e patológicas. Há uma evidente sobreposição dos mecanismos disfuncionais apresentados por animais socialmente isolados e pelas modulações que o sistema purinérgico exerce. Levando em consideração tais evidências, a presente dissertação teve como objetivo principal verificar se o isolamento social induz alterações na sinalização purinérgica em diferentes estruturas cerebrais de ratos. Para isso, ratos Wistar de 21 dias foram isolados socialmente por 8 semanas, e em seguida, verificamos diferentes fenótipos comportamentais e parâmetros neuroquímicos relacionados com o sistema purinérgico foram conduzidos. Primeiramente, foi observado prejuízos no filtro sensorio-motor e aumento da interação social com ratos desconhecidos nos ratos isolados socialmente. Quanto os parâmetros neuroquímicos, nossos resultados mostraram um acúmulo de ADP no líquido cefalorraquidiano e um aumento da hidrólise do ADP em sinaptossomas de hipocampo e estriado nos animais que foram criados isoladamente. Por último, nas análises de expressão gênica, observamos diferentes alterações em diferentes estruturas cerebrais. O córtex pré-frontal apresentou redução na expressão gênica de *adora2a*, *p2ry1* e *p2rx5* nos animais que passaram pelo isolamento social. O hipocampo, por sua vez, apresentou regulação positiva dos genes *p2ry4*, *p2ry13* e *p2ry14* nos mesmos animais. Foi observado, ainda, que o estriado foi mais afetado pelo isolamento social, uma vez os animais submetidos ao isolamento apresentaram uma modulação negativa dos genes *adora2a*, *p2rx4*, *p2ry2*, *p2ry6*, *p2ry12*, *p2ry13*, *entpd1*, *entpd2* e *entpd3*. Desta forma, nossos resultados demonstraram que o isolamento social pós-desmame promove abundantes alterações na sinalização purinérgica. Baseado em dados existentes na literatura, os dados obtidos nesse estudo podem indicar, no córtex pré-frontal, alterações de receptores envolvidos em processos cognitivos e de neurotransmissão de dopamina e glutamato. No hipocampo, apesar da escassez de estudos acerca desses receptores, parece haver indícios de disfunção microglial. O estriado, por sua vez, apresentou alterações de receptores associados, principalmente, com modulação de dopamina e disfunção microglial.

Abstract

The neurodevelopmental period is characterized by wide structuring of central nervous system (CNS), which implies in highly susceptibility to endogenous or exogenous stressors. Environmental stressor in early-life, such as maternal separation, childhood adversities or social isolation, can disrupt brain development prompting psychiatric diseases. Post-weaning social isolation in rodents causes impairments in cognition, sensorimotor gating, dopamine neurotransmission and synaptic plasticity. The purinergic system is mediated by extracellular signaling of nucleotides and nucleosides. The ATP is hydrolyzed to adenosine by an efficient enzyme chain named as ectonucleotidases. The nucleotides and nucleosides can act on the purinergic receptors, which are divided in P1 and P2 receptors. P2 receptors are subclassified in P2X and P2Y. Purines modulate many physiological and pathological mechanisms in the CNS. There is a noticeable overlap between social isolation dysfunction and the processes modulated by purinergic signaling. The main goal of this work was verify if post-weaning social isolation induces impairments in purinergic signaling. Thus, we randomly allocated Wistar rats at 21 postnatal day to social rearing or 8 weeks of social isolation. After the 8 weeks, we investigated the behavioral phenotype and performed neurochemical evaluation related to purinergic system. Initially, the results showed that post-weaning social isolation disrupted sensorimotor gating and increased social interaction. Posteriorly, we characterized the purinergic system in this model. There was an accumulation of ADP in cerebrospinal fluid and an increase of ADP hydrolysis in synaptic cleft of hippocampus and striatum of isolation rearing rats. Lastly, we evaluated which purinergic elements might be differentially expressed. To the best of our knowledge, were evidenced several purinergic receptors alteration in this neurodevelopmental model. In the prefrontal cortex we have found an upregulation of *adora2a*, *p2ry1* and *p2rx5* genes. Regarding the hippocampus, we demonstrate that *p2ry4*, *p2ry13* and *p2ry14* were downregulated. On the other hand, striatum was highly affected and presented several genes downregulated such as *adora2a*, *p2rx4*, *p2ry2*, *p2ry6*, *p2ry12*, *p2ry13*, *entpd1*, *entpd2* and *entpd3*. Although the neurodevelopmental neuropsychiatric model exhibited slight behavioral impairment, we now provide genetic evidences of several neurobiological processes that were mediated by purinergic signaling. These results may provide a construct validity of several neuropsychiatric conditions. Thus, our results evidenced that social isolation promotes several dysfunctions in the purinergic signaling. Based on the literature results, these alterations in the expression of purinergic receptors indicates a possible impairment in cognition and dopamine and glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex. In the hippocampus, few studies comprise the role of these receptors, although may be feasible a microglial dysfunction. Concerning several disturbances showed in the striatum they seem further related with dopamine neurotransmission and microglial dysfunction.

Lista de abreviaturas

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPH	<i>d</i> -anfetamina
ATP	Adenosina trifosfato
E-NPP	Ecto- nucleotídeo pirofosfatase/fosfosdiesterase
E-NTPDase	Ecto- nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
GH	Animais criados em grupo
GUO	Guanosine
INFγ	Interferon gama
SI	Isolamento social
SNC	Sistema nervoso central
TNFα	Fator de necrose tumor alfa
UDP	Uridina difosfato

1. Introdução

1.1. Isolamento social pós-desmame

O período do neurodesenvolvimento é caracterizado pela ampla estruturação do sistema nervoso central (SNC), onde ocorrem os processos de histogênese, proliferação e migração de células neuronais e gliais, diferenciação, sinaptogênese, podas sinápticas, apoptose e mielinização (Rice e Barone 2000). Diante do grande número de processos fisiológicos e bioquímicos que acontecem durante este período este é um momento de grande vulnerabilidade a agentes estressores endógenos e exógenos.

Estresses ambientais como infecções durante a gravidez (Brown, 2012), separação materna (Slotten et al., 2006), imigração (Cantor-Graae e Pedersen, 2013), adversidades na infância (Varese et al., 2012) e isolamento do convívio social (Leigh-Hunt et al., 2017) podem perturbar as vias de sinalização envolvidas no neurodesenvolvimento, que podem estar diretamente associados com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (Brown, 2012; Cantor-Graae e Pedersen, 2013; Leigh-Hunt et al., 2017; Owen et al., 2016).

Assim como os humanos, roedores são animais pró-sociais, sendo recompensados e motivados a interações sociais (Panksepp e Lahvis, 2007). Portanto, a restrição de contato social é aversiva e estressante, sendo manifestada de diferentes maneiras em nível comportamental e neuroquímico (para revisão, veja Fone & Porkess, 2008). Com o intuito de compreender e caracterizar mecanismos envolvidos no estabelecimento de subtipos de transtornos psiquiátricos, foi desenvolvido um modelo animal não farmacológico de isolamento social. Um dos modelos de isolamento social amplamente empregado na literatura se baseia na premissa de impedir a socialização durante o período crítico de

neurodesenvolvimento pós-natal até a fase adulta. Esse período compreende ao desmame em roedores, normalmente realizado entre os dias 21 a 28 pós-natal (Fone and Porkess 2008). Durante a criação em isolamento, os animais são mantidos sozinhos em uma caixa moradia e podem ouvir, ver e sentir o cheiro de outros animais, mas são impossibilitados de interagir com eles (Fone and Porkess 2008).

O isolamento social crônico repercute em diversas alterações no desenvolvimento que são manifestados em prejuízos comportamentais. Déficits cognitivos foram vistos em macacos *Rhesus* isolados na fase juvenil com prejuízo na memória de trabalho durante a fase adulta (Sánchez et al., 1998) e, em ratos, no teste de reconhecimento de objetos (Möller et al., 2013a) e na memória espacial no teste de labirinto aquático de Morriz (Quan et al., 2010). Além disso, muitos estudos mostram que roedores submetidos ao isolamento social não são capazes de filtrar a informação sensório-motora adequadamente (Chang et al., 2015; Möller et al., 2013a; Murphy et al., 2010; Wang et al., 2012) e que há aumento de agressividade em ratos machos e fêmeas (Oliveira et al., 2019).

Além das manifestações fenotípicas, abundantes alterações neuroquímicas também são vistas nesse modelo. Estudos demonstram um prejuízo na neurotransmissão de dopamina, onde animais socialmente isolados apresentam um maior nível de dopamina basal no núcleo accumbens (Hall et al. 1998; Yorgason et al. 2015) e no estriado e uma diminuição no córtex frontal da dopamina e seus metabólitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (Dopac) e ácido homovalínico (Möller et al., 2013b; Yorgason et al., 2015). Ainda, foi observada uma diminuição no córtex frontal e um aumento no estriado dos níveis de serotonina, e seu metabólito ácido 5-hidroxiindoleacético (Möller et al., 2013b). Além da desregulação da

neurotransmissão, há relatos de um estado pró-inflamatório, tendo em vista o aumento de TNF- α e INF- γ e diminuição de interleucina 4 e 6 (Möller et al., 2013a).

A ruptura do neurodesenvolvimento ocasionado nesse modelo animal também promove alterações na plasticidade sináptica (Quan et al. 2010), na morfologia dos dendritos na amígdala basolateral e no córtex pré-frontal medial (Wang et al. 2012), bem como pode influenciar negativamente na maturação dos oligodendrócitos e, portanto, na mielinização do córtex pré-frontal medial de camundongos (Makinodan et al., 2012).

Considerando a importância desse modelo para os estudos relacionados com transtornos neuropsiquiátricos e apesar de ser um modelo animal bastante empregado na literatura, ainda há uma grande necessidade de melhor caracterizar a influência do sistema purinérgico neste modelo.

1.2. Sistema Purinérgico

Os nucleotídeos estão presentes em diversos tecidos e são liberados por diferentes tipos de células neurais. O metabolismo extracelular das purinas é realizado por uma eficiente cadeia enzimática denominada coletivamente de ectonucleotidases, que hidrolisam o ATP ao AMP, que, por sua vez, é hidrolisado à adenosina (ADO) (Yegutkin, 2014). O ATP, e seus produtos de degradação, exercem seus efeitos biológicos atuando nos receptores purinérgicos, que são classificados em receptores do tipo P1 e P2 (Yegutkin, 2014) (**Figura 1**). As ectonucleotidases, por sua vez, são divididas em: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs), ecto-fosfatases alcalinas, ecto-5'-nucleotidase/CD73 e a ecto-adenosina deaminase (Zimmermann et al., 1998). Essas enzimas promovem a regulação fina da sinalização

purinérgica, que é semelhante para os nucleotídeos purínicos e pirimidínicos (Yegutkin, 2014).

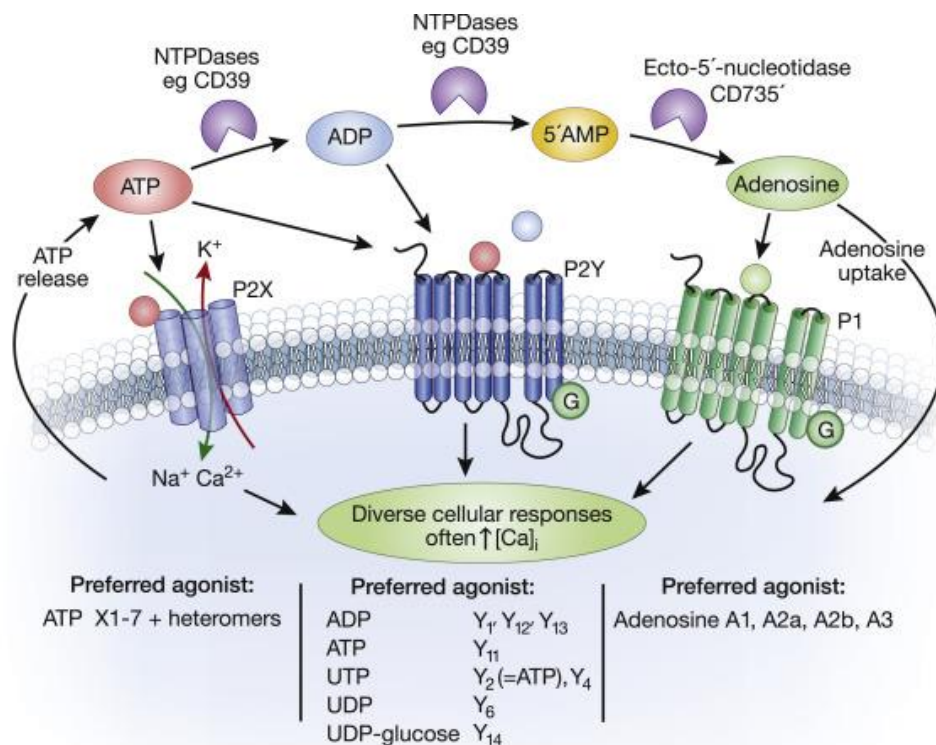


Figura 1: Visão geral da sinalização purinérgica. O sistema purinérgico é composto pelos receptores, que são divididos em P2X, P2Y e P1, e pelas ectonucleotidases, que estão representadas NTPDases (CD39), pela e pela ecto-5'-nucleotidase (CD73). O ATP pode ser liberado da célula por diversos mecanismos e no meio extracelular pode atuar nos receptores P2X ou P2Y ou, ainda, ser hidrolisado pelas ectonucleotidases até adenosina. A adenosina pode atuar nos receptores P1 ou retornar ao citoplasma celular pelos transportadores de nucleosídeo (não mostrado) ou, ainda, ser desaminada e metabolizada, por fim, a ácido úrico (não mostrado). NTPDases: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase. Adaptado de Menzies e colaboradores (2017).

As ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) são ectoenzimas que hidrolisam no meio extracelular os nucleosídeos trifosfatados e difosfatados, tendo, em sua maioria, preferência pelos trifosfatados (Robson et al., 2006). Dentro dessa família, existem oito diferentes genes para as E-NTPDases (Robson et al., 2006) e, dentre essas, as E-

NTPDases 1, 2 e 3 estão expressas no cérebro de mamíferos e são capazes de controlar a sinalização de ATP na fenda sináptica (Kukulski et al., 2004; Zimmermann, 1996).

As ecto-nucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (NPPs) podem hidrolisar ATP direto em AMP, liberando pirofosfato inorgânico (PPi) (Goding et al., 2003). No SNC, a NPP1, a NPP2 e a NPP3 estão expressas em diferentes tipos celulares, podendo contribuir na formação de mielina (Goding et al., 2003) e na secreção do líquido cefalorraquidiano (Bonan, 2012).

As ecto-fosfatases alcalinas (APs) são fosfomonoesterases não-específicas que liberam fosfatos de diversos compostos orgânicos e, também, degradam nucleosídeos trifosfatados, difosfatados e monofosfatados (Bonan, 2012). Elas são mais expressas, no SNC, nas células endoteliais das veias, no plexo coroide e nas meninges, mas também são encontradas em diversas outras regiões do encéfalo (Langer et al., 2008).

Participando da etapa final de desfosforilação dos nucleotídeos, a ecto-5'-nucleotidase está envolvida na etapa catalítica final de inativação e o catabolismo do ATP e na formação de adenosina a partir de AMP extracelular (Bonan, 2012; Zimmermann, 1992). Esta ectonucleotidase é ubíqua no encéfalo e está expressa tanto em neurônios, quanto em células gliais (Kovács et al., 2013).

A adenosina formada no fim da cadeia enzimática possui três destinos diferentes: (1) pode atuar nos receptores P1; (2) pode voltar para o meio intracelular por meio de transportadores de nucleosídeos, para a via de salvação das purinas; ou (3) pode ser desaminada à inosina pela ecto-adenosina deaminase (E-ADA) (Robson et al., 2006; Zimmermann, 1992).

Os receptores purinérgicos são divididos em receptores P1 (A_1 , A_{2A} , A_{2B} ou A_3), nos quais a adenosina tem seu sítio de ação; e receptores P2, que se subdividem em P2X(1–7)

(receptores ionotrópicos), que são ativados por ATP, e em P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14} (receptores metabotrópicos) (Yegutkin, 2014). A família dos receptores P2Y (P2YR) é dividida nos receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ que ativam a fosfolipase C/inositol trisfosfato e nos receptores que inibem a adenil ciclase, como o P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2009). Ainda, esses receptores diferem em seus agonistas endógenos: os P2Y₁R, P2Y₁₂R e P2Y₁₃R são principalmente responsivos ao ADP; o P2Y₂R e P2Y₄R ao UTP e ao ATP; o P2Y₁₁R ao ATP; e o P2Y₆R e o P2Y₁₄R ao UDP, sendo que este último é sensível, também a UDP-glicose e UDP-galactose (Abbracchio et al., 2009).

Os nucleotídeos e nucleosídeos exercem inúmeras funções biológicas no SNC. O ATP, por exemplo, pode ser liberado pelos axônios, dendritos, pelo corpo celular neuronal e pela glia (Fields e Burnstock, 2006), agindo como neurotransmissor ou como neuromodulador (Burnstock, 2006a). Evidencia-se que esse nucleotídeo também possa agir como um fator trófico e de crescimento (Abbracchio et al., 1995), alterando o desenvolvimento de neurônios (Mishra, 2006), pela regulação da concentração do cálcio citoplasmático e de AMPc (Fields e Burnstock, 2006), bem como pode controlar a função de astrócitos e a comunicação neurônio-glia (Koizumi, 2010), influenciando na atividade sináptica (Jourdain et al., 2007) e regular a diferenciação de oligodendrócitos e mielinização (Fumagalli et al., 2016). Em contrapartida, o nucleosídeo ADO exerce funções neuromoduladoras (Ribeiro *et al.*, 2003) de neurotransmissores como dopamina, GABA, glutamato e serotonina, bem como do ATP, (Burnstock, 2007) e ações anti-inflamatórias (Burnstock, 2006b). Visto que a adenosina é um produto da hidrólise do ATP e essas duas moléculas frequentemente exercem efeitos opostos, elas podem ser submetidas à regulação homeostática (Fields e Burnstock, 2006).

Estudos demonstram que os A₁Rs e A_{2A}Rs estão co-localizados no hipocampo (Rebola et al., 2005), existindo uma interação funcional entre esses dois receptores adenosinérgicos,

e que, ainda, eles podem formar heterodímeros com os receptores metabotrópicos de glutamato tipo 1 (Ciruela *et al.*, 2004) e tipo 5 (Ferré *et al.*, 2002; Nishi *et al.*, 2003), respectivamente. Essas interações exercem efeitos opostos na liberação de glutamato: a modulação do A₁R pode inibir a liberação de glutamato pré-sináptico, enquanto que a ativação pós-sináptica do A_{2A} pode facilitar a liberação de glutamato (Coelho *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2002). Está bem descrito que o A_{2A}R promove a sinalização do receptor D2 de dopamina por meio da formação do heterodímero A_{2A}R-D2R (Ferré, 1997) e que porção extra-estriatal pode facilitar a liberação de GABA ou noradrenalina (Cunha, 2005). Ademais, têm se visto que o glutamato pode induzir acúmulo extracelular de ADO (Craig e White, 1993) e, no estriado, esse efeito é mediado, especificamente, pelos receptores NMDA (Delaney *et al.*, 1998).

Além das purinas derivadas da adenina, nos últimos anos têm sido estudadas, cada vez mais, as purinas baseadas na guanina: os nucleotídeos GTP, GDP, GMP e o nucleosídeo guanosina (GUO). Esses estudos têm consolidado os diversos efeitos biológicos dessas purinas, sendo a GUO mais amplamente estudada até agora (para revisão veja Tasca *et al.*, 2018). Apesar dos nucleotídeos baseados na adenina ou na guanina apresentarem semelhanças, fisiologicamente, existe diferenças importantes a respeito deles. A GUO, em comparação com as purinas baseadas em adenina, é preferencialmente acumulada sob condições fisiológicas e, em resposta a um insulto, a sua concentração aumenta progressivamente (Ciccarelli *et al.*, 1999). Contrariamente, aquelas derivadas do ATP são rapidamente metabolizadas (Ciccarelli *et al.*, 1999).

No campo das neurociências, foi demonstrado que o GTP pode ser armazenado em vesículas sinápticas dentro de células neurais e liberadas na fenda sináptica (Santos *et al.*, 2006). Semelhante ao ATP, no meio extracelular, o GTP pode ser hidrolisado pelas

ectonucleotidasas e formar, por fim, a GUO. Estudos demonstram que a GUO pode modular a transmissão glutamatérgica (Dal-Cim et al., 2013) e adenosinérgica (Schmidt et al., 2007), induzir proliferação de astrócitos (Ciccarelli *et al.*, 2000) e exercer efeitos antiapoptóticos (Di Iorio *et al.*, 2004; Pettifer *et al.*, 2004), antioxidante (Dal-Cim *et al.*, 2012) e anti-inflamatórios (D'Alimonte *et al.*, 2007).

Em resumo, o sistema purinérgico atua em muitos mecanismos no SNC, como a modulação de neurotransmissores, a neuroinflamação, a excitabilidade e funcionamento de neurônios e células gliais e a mielinização, por exemplo. O modelo de isolamento social, por sua vez, causa diversos prejuízos de funcionamento de neurotransmissores, maturação de oligodendrócitos, cognição e de plasticidade sináptica. Sendo assim, essa grande sobreposição dos mecanismos patofisiológicos suportam a ideia de que a sinalização purinérgica possa ter um papel na neurobiologia do isolamento social.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação é investigar o papel do sistema purinérgico na neurobiologia do isolamento social.

2.2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar as alterações comportamentais induzidas pelo modelo de isolamento social em ratos Wistar;
- II. Traçar o perfil do nível de purinas presentes no líquido cefalorraquidiano no modelo de isolamento social;

- III. Verificar a atividade das ectonucleotidasas em abordagens de fatias *ex vivo* e em preparação de sinaptossomos *in vitro* no hipocampo e no estriado.
- IV. Analisar a expressão gênica de elementos do sistema purinérgico no córtex pré-frontal, no hipocampo e no estriado.

PARTE II

3. Artigo científico

Esta seção da dissertação será apresentada na forma de artigo científico a ser submetido à revista

Journal of Neurochemistry. Normas de submissão foram retiradas do site:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14714159/homepage/forauthors.html>

Nesta versão parcial apenas o resumo do artigo será apresentado.

Post-weaning social isolation modulates purinergic system

Roberta Andrejew¹, Milla Paim², Cesar Eduardo Jacintho Moritz³, Fernando Carreño⁴, Stela Maris Kuze Rates⁴, Elaine Elisabetsky¹, Diogo Gomes de Souza¹, Roberto Farina Almeida¹, Ana Maria Battastini^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano, ESEFID, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Feral do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Dr Ana Maria Oliveira Battastini,
Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo,
CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil,
Tel: +55 (51) 3308.5554, Fax: +55 (51) 3308.5535,
E-mail: abattastini@gmail.com

Abstract

Environmental stressor in early life, such as social isolation, can disrupt brain development prompting psychiatric disorders. Post-weaning social isolation in rodents presents impairments in sensorimotor gating, dopamine neurotransmission and synaptic plasticity. Purinergic signaling is initiated by extracellular ATP which can be hydrolyzed to adenosine by ectonucleotidases and act in P1 or P2. Purines have a key role in physiological and pathological mechanisms and there is a noticeable overlap between these modulations with social isolation dysfunctions. The aim of this work was verify if social isolation impair the purinergic system. At weaning, Wistar rats were allocated to social rearing or social isolation for 8 weeks to investigate the behavioral features and the purinergic system in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum. We evidenced disruption in the sensorimotor gating and increased social interaction in rats socially isolated. Social isolation induced an accumulation of ADP in cerebrospinal fluid and increased of ADP hydrolysis in hippocampus and striatum synaptosomes. Socially isolated rats presented an upregulation of *adora2a*, *p2ry1* and *p2rx5* genes in the prefrontal cortex and a downregulation expression of *p2ry4*, *p2ry13* and *p2ry14* in hippocampus and *adora2a*, *p2rx4*, *p2ry2*, *p2ry6*, *p2ry12*, *p2ry13*, *entpd1*, *entpd2* and *entpd3* in striatum. Based on the literature, these results may indicate a impairment in cognition, dopamine and glutamate neurotransmission, microglia function and neurogenesis control, once these receptors are found to modulate these pathways. This work shed light of several processes poorly studied and, as far as we know, we are pioneering to demonstrate the several alterations in purinergic system that might be participating in this neuropsychiatric model.

Keywords: Social isolation; purinergic system; ectonucleotidases; purinergic receptors; prepulse inhibition.

PARTE III

4. Discussão

A socialização é fundamental e vital para a maioria dos animais e, dentre eles, é bem sabido o seu papel em humanos. Ela confere diversas vantagens evolutivas e o convívio social é protetivo (Cacioppo et al., 2015). Está bem estabelecido sabido que a sua ausência em qualquer período da vida causa diversos distúrbios fisiológicos, principalmente em nível de saúde mental (Xia and Li, 2017).

Nossos resultados demonstram que ratos Wistar machos isolados durante 8 semanas tiveram poucas manifestações comportamentais. Eles apresentaram uma maior resposta ao estímulo de sobressalto e um prejuízo na taxa de inibição do pré-pulso nas intensidades de 77 e 85 dB e um aumento no tempo de interação social. A disfunção do filtro sensorio-motor é bem descrito nesse modelo (Chang et al., 2015; Möller et al., 2013a; Murphy et al., 2010; Wang et al., 2012). No entanto, outras alterações fenotípicas são divergentes na literatura, uma vez que há relatos de aumento da atividade locomotora (Ko and Liu, 2015; Wang et al., 2012; Weiss et al., 2000) ou a não alteração (Ferdman et al., 2007; Hall et al., 1998), disfunção cognitiva (Hellemans et al., 2004; Möller et al., 2013a; Quan et al., 2010) e nenhum prejuízo cognitivo (Schrijver et al., 2004; Weiss et al., 2001), bem como a diminuição da interação social (Möller et al., 2011; Möller et al., 2013a) e o aumento da sociabilidade e agressividade (Ferdman et al., 2007; Wongwitdecha and Marsden, 1996; Oliveira et al., 2019).

É importante salientar que nem todos os experimentos foram conduzidos em ratos Wistar. Essas diferentes respostas apresentadas entre as cepas de ratos são amplamente discutidas. Varty e Higgins (1994) demonstraram que ratos Wistar são menos sensíveis à detecção e ao processamento dos estímulos de pré-pulsos no paradigma do teste de PPI

quando comparados com ratos Lister Hooded e Sprague-Dawley. Assim como as cepas de ratos podem apresentar respostas diferenciadas a um teste comportamental, é de se imaginar que a mesma lógica valha para a sensibilidade ao modelo de isolamento social. Nesse sentido, existem evidências mostrando que cada cepa manifesta os prejuízos do isolamento em tempos diferentes: ratos Sprague-Dawley começam a manifestar rupturas no teste de PPI a partir de 4 semanas de isolamento, enquanto que ratos Lister Hooded apresentam o mesmo déficit a partir de 7 semanas de isolamento pós- desmame (Bakshi e Geyer, 1999). O teste de inibição do pré-pulso é amplamente utilizado neste modelo e o prejuízo apresentado por ele tem sido replicado com robustez em ratos Lister Hooded (Cilia et al., 2001; Day-Wilson et al., 2006; Varty et al., 1999), Long-Evans (Binder et al., 2001; Powell et al., 2003) e Sprague-Dawley (Geyer et al., 1993; Ko e Liu, 2015; Möller et al., 2013a). Em contrapartida, ele é menos consistente e se nota efeitos menos robustos em ratos Wistar (Domeney e Feldon, 1998; Weiss et al., 2001). Por fim, até onde vimos, os estudos na literatura utilizando ratos Wistar variam de 5 a 11 semanas do tempo de isolamento, podendo acarretar nas diferenças encontradas no perfil comportamental (Ferdman et al., 2007; Murphy et al., 2010; Quan et al., 2010; Wang et al., 2012).

Um estudo analisou a atividade locomotora e o filtro sensorio-motor em períodos diferentes de isolamento. Curiosamente, ratos Sprague-Dawley isolados socialmente tiveram um déficit no PPI a partir de 4 semanas de isolamento, enquanto que o aumento da atividade locomotora foi bem mais evidente quando o isolamento durou 2 semanas. Isso demonstra que esses dois comportamentos são dissociáveis e que o isolamento afeta diferentemente esses índices, e, portanto, a locomoção parece ser uma consequência de curto prazo, enquanto que o filtro sensorio-motor parece ser de longo prazo (Bakshi e Geyer, 1999). Nesse sentido,

o nosso resultado da distância percorrida serem semelhantes entre os grupos pode ser explicado pelo tempo de 8 semanas de isolamento social.

Há relatos de que roedores criados em isolamento são mais sensíveis à *d*-anfetamina e, assim, apresentam hiperlocomação mais acentuada do que animais criados em grupo (Fabricius et al. 2010; Herrmann et al. 2014; Smith, Neill, and Costall 1997). No entanto, essas manifestações comportamentais são controversas e estudos mostram que não há diferenças de locomoção entre os grupos (Jones et al., 1992; Pritchard et al., 2013; Weiss et al., 2001), mesmo padrão que é demonstrado no presente trabalho. Evidências mais robustas quanto à sensibilidade a essa droga psicomimética são referentes à maior liberação de dopamina no núcleo accumbens, no córtex pré-frontal e no putâmen nos animais que são submetidos ao isolamento social (Fabricius et al., 2011; Jones et al., 1992), bem como a inibição da captação de dopamina no núcleo accumbens e no estriado dorsal medial (Yorgason et al., 2015).

As ectonucleotidases promovem um ajuste fino da concentração de nucleotídeos no meio extracelular. O ATP pode ter função de neuromodulação e de neurotransmissão (Burnstock, 2006a) e pode agir como um sinal de perigo (Verkhasky et al., 2009). A adenosina, seu produto final da degradação, age como um neuromodulador e tem ações anti-inflamatórias (Ribeiro et al., 2003). Por essa razão, os nucleotídeos extracelulares devem ter seus níveis estritamente regulados, a fim de garantir um balanço homeostático (Fields e Burnstock, 2006), evitando assim, que a desregulação culmine em processos patológicos (Burnstock, 2008). Um elegante estudo demonstrou em preparações histológicas de encéfalo que as ectonucleotidases estão expressas em basicamente todo cérebro e que, em pH fisiológico, as E-NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase são as ectonucleotidases predominantes,

mesmo que haja presença das outras famílias dessas enzimas (Langer et al., 2008). Até onde sabemos, nós somos os primeiros a relatar o nível de nucleotídeos no líquido cefalorraquidiano no modelo neuropsiquiátrico de isolamento social. Nossos dados demonstram que, em termos gerais, não existe um desequilíbrio muito evidente dessas purinas no meio extracelular, mas que há um acúmulo de ADP e uma tendência ao acúmulo de ATP. A guanosina tem sido cada vez mais estudada e tem sido relatado que ela é capaz de modular a transmissão glutamatérgica (Tasca et al., 1998) tem papel ansiolítico (Almeida et al., 2010), antidepressivo (Bettio et al., 2014) e antioxidante (Tasca et al., 2018). Considerando que o GTP é uma purina também que sofre ação das ectonucleotidases, investigamos se a guanosina não poderia estar alterada no líquido cefalorraquidiano dos animais. Poucos estudos avaliam o papel da guanosina em modelos neuropsiquiátricos, e nós demonstramos que seus níveis não estão alterados no modelo animal de isolamento social.

Pela sabida necessidade de regulação dos níveis de ATP extracelular na fenda sináptica e pelos estudos iniciais que relataram que o ATP e o ADP eram hidrolisados em preparações de sinaptossomas em várias regiões encefálicas e em várias espécies de animais (Zimmermann, 1996; Zimmermann e Braun, 1999) postulou-se que as ectonucleotidases eram principalmente expressas nas sinapses. Nossos resultados demonstraram que o isolamento social induziu um aumento na atividade de hidrólise do ADP em sinaptossomas de hipocampo e estriado dos ratos submetidos ao isolamento social. Esses dados podem sugerir que após um longo período de isolamento, possa haver um aumento na expressão das enzimas que hidrolisam o ADP por uma maior necessidade de hidrolisá-lo a nível sináptico, o que, dessa forma, como um mecanismo compensatório, evitaria que houvesse o acúmulo de ATP ou de ADP, os quais poderiam ativar vias de sinalização pró-inflamatórias (Chakfe

et al., 2002), de morte neuronal (Bernardino et al., 2008) ou de astrogliose (Franke et al., 2001). Entretanto, a atividade ATPásica, ADPásica e AMPásica em fatias *ex vivo* de hipocampo e de estriado não foram moduladas pelo modelo de isolamento social. Esse resultado nos leva a pensar que apesar de haver uma disfunção local da atividade ADPásica sináptica, em uma preparação celular mais complexa, como as fatias de tecido, as células neuronais e gliais presentes em cada tecido estão sendo capazes de equilibrar essa desregulação sináptica.

Após estabelecer a funcionalidade das ectonucleotidases, nós partimos para a abordagem de expressão gênica dos elementos do sistema purinérgico. O receptor A_{2A} ($A_{2A}R$) é principalmente localizado nas sinapses (Rebola et al., 2005a) e seletivamente controla o receptor NMDA (Rebola et al., 2008), a neuroinflamação (Rebola et al., 2011) e a plasticidade sináptica (Costenla et al., 2011). Além disso, há relatos que a sua ativação acarreta em um prejuízo de memória de curto prazo (Pagnussat et al., 2015). O $A_{2A}R$ é expresso em diversas estruturas encefálicas, mas sua mais abundante expressão está no estriado (Fink et al., 1992). Sua expressão extra-estriatal foi localizada principalmente nas sinapses glutamatérgicas (Rebola et al., 2005b), bem como já é consolidada sua função de facilitar a liberação de glutamato (Latini e Pedata, 2001). Interessantemente, foi demonstrado que a inativação de $A_{2A}R$ no estriado aumenta os efeitos psicoestimulantes, enquanto que a inativação do mesmo receptor no prosencéfalo (principalmente hipocampo e córtex) atenua os efeitos psicoestimulantes (Shen et al., 2008). Esses dados sugerem, portanto, que o $A_{2A}R$ extra-estriatal e estriatal podem exercer efeitos opostos (Shen et al., 2008). Os nossos dados de expressão gênica de *adora2a* mostram que o isolamento social foi capaz de regular positivamente a expressão desse receptor no córtex pré-frontal e regular negativamente no

estriado. Esses resultados indicam que no córtex pré-frontal pode haver uma modulação positiva na liberação de glutamato, podendo ocasionar excitotoxicidade glutamatérgica e, que apesar de o teste comportamental empregado não ter detectado prejuízo na memória de trabalho, o aumento da expressão de A_{2A} poderia induzir um prejuízo cognitivo, como é mostrado em trabalhos que modulam esse receptor (Pagnussat et al., 2015; Pereira et al., 2005; Takahashi et al., 2008). No estriado, o A_{2A}R forma um heterômero funcional com o receptor D2 de dopamina, isto é, quando a adenosina se liga ao A_{2A}R, a afinidade do D2R pela dopamina diminui (Ferré et al., 2016). Nosso achado de diminuição da expressão desse receptor no estriado pode indicar, portanto, que a afinidade do D2R pela dopamina está aumentada, podendo haver uma maior atividade dopamenérgica e menor atividade glutamatérgica. Até onde sabemos, esse é o primeiro relato de que um modelo não farmacológico induz esses efeitos opostos do receptor A_{2A}R na porção estriatal e extra-estriatal já descritos (Shen et al., 2008), demonstrando a necessidade emergencial de se estudar o papel desse receptor adenosinérgico com suas múltiplas funções em diferentes áreas do encéfalo.

O receptor P2Y₁ (P2Y₁R) é expresso e modula neurônios (Guzman et al., 2010), astrócitos (Fam et al., 2003; Fumagalli et al., 2003) e microglia (Ballerini et al., 2005; Boucsein et al., 2003), mas seu papel em condições patológicas tem sido atribuído principalmente à capacidade de propagação de ondas de cálcio na rede de comunicação entre os astrócitos, acarretando em reatividade astrocitária (Bowser e Khakh, 2007; Fam et al. 2003; Neary et al., 2003) e que essa sinalização é acoplada à exocitose de glutamato dependente de cálcio (Domercq et al., 2006). Aprimorando o conhecimento científico acerca das funcionalidades do P2Y₁R, um importante estudo demonstrou que o agonista MRS2365

induziu prejuízos na resposta comportamental cognitiva, incluindo o paradigma do PPI, via córtex pré-frontal (Koch et al., 2015). No presente estudo, o isolamento social pós-desmame modulou positivamente a expressão gênica do *p2ry1* no córtex pré-frontal e, é de se pensar, que ele possa estar sendo aberrantemente ativado, tendo em vista o acúmulo de ADP, seu agonista endógeno (Abbracchio et al., 2009), observado no líquido cefalorraquidiano. É possível que o déficit encontrado no teste de PPI tenha sido parcialmente ocasionado por essa indução de expressão, uma vez que Koch e colaboradores (2015) também encontraram essa disfunção ao ativar esse receptor. Ainda, esse mesmo estudo demonstrou o aumento da liberação de dopamina em nível de curta duração no córtex pré-frontal e de longa duração no núcleo accumbens (Koch et al., 2015). Apesar de estar descrito na literatura que há diminuição da dopamina basal no córtex frontal em ratos que são submetidos ao isolamento social (Möller et al., 2013; Yorgason et al., 2015), quando esses animais são desafiados com *d*-anfetamina, há uma exacerbação da liberação de dopamina no córtex pré-frontal quando comparados com animais que foram criados socialmente (Fabricius et al., 2011; Jones et al., 1992). Portanto, é possível que o receptor P2Y₁R medeia, ao menos parcialmente, o mecanismo da sensibilidade à *d*-anfetamina dos animais criados em isolamento social. Por fim, em neurônios do córtex pré-frontal medial a ativação do receptor P2Y₁ inibiu a depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*), um mecanismo envolvido na plasticidade sináptica da aprendizagem e da memória (Guzman et al., 2010). Uma vez que animais isolados apresentam alterações na plasticidade sináptica (Quan et al., 2010), esse pode ser outro mecanismo por trás das alterações encontradas nesse modelo.

Pouco se sabe sobre a função do receptor P2X₅ (P2X₅R) no SNC. Um estudo propõe que esse receptor pode funcionar como uma subunidade auxiliar, associando-se com os

receptores P2X1, P2X2 e P2X4 (Compan et al., 2012). Eles ainda demonstram que o heterotrímero P2X2/5 está presente em neurônios proprioceptivos e que podem exibir propriedades funcionais semelhantes ao do receptor P2X7 (Compan et al., 2012). Outro estudo demonstrou que esse receptor está co-localizado em neurônios que contém arginina, vasopressina e óxido nítrico sintase no hipotálamo, podendo exercer alguma função relacionada à hipóxia (Xiang et al., 2006). No estudo conduzido por Xiang e Burnstock (2005) eles mostraram, pela primeira vez, que o P2X5 está presente em diferentes áreas do cerebelo em desenvolvimento. Por fim, outro estudo relatou que o heterômero P2X1/5 parece contribuir com a sinalização do receptor NMDA em astrócitos corticais (Palygin et al., 2010). Nós encontramos uma regulação positiva induzida pelo modelo de isolamento social, indicando que esse receptor possa ter um importante papel em modelos neuropsiquiátricos.

O receptor P2X4 (P2X4R) é o receptor P2X mais abundante no SNC (Rogove et al., 2002), ele é amplamente expresso em células neuronais (Bo et al., 2003) e células gliais, principalmente na microglia (McLarnon, 2005). Estudos demonstram que ele está localizado em neurônios dopaminérgicos da substância *nigra* e do estriado (Amadio et al., 2007) e que o ATP pode modular a atividade de disparo dos neurônios da substância nigra, como a liberação pré-sináptica (Choi et al., 2009). Um estudo demonstrou que o bloqueio farmacológico do P2X4R e P2Y₁₂R suprimiu a quimiotaxia da microglia (Ohsawa et al., 2007). No mesmo sentido, em cérebro de camundongo deficiente de P2Y₁₂R, as células microgliais apresentaram motilidade normal, mas foram incapazes de polarizar, migrar e estender seus processos (Haynes et al., 2006), sendo assim, o P2Y₁₂R é considerado um marcador da microglia saudável no cérebro (Mildner et al., 2017). O isolamento social promoveu uma disfunção da expressão gênica de ambos receptores no estriado, o que pode

significar que esses animais apresentam prejuízo na migração e na capacidade de mudança dos estados pró- e anti-inflamatórios. Há relatos na literatura que animais criados em isolamento apresentam um estado pró-inflamatório, pelo aumento de TNF- α e INF- γ e diminuição de interleucina 4 e 6 (Möller et al., 2013a).

Semelhantemente a esse contexto, o receptor P2Y₆ está expresso na microglia (Koizumi et al., 2007) e, em condições fisiológicas, a sua expressão é quase inexistente nessas células (Koizumi et al., 2013). A ativação por UDP acarreta no aumento da motilidade e medeia a fagocitose de moléculas alvo, agindo como um receptor de fagocitose (Inoue et al., 2009; Koizumi et al., 2007). Como demonstramos, ratos isolados apresentam uma diminuição da expressão gênica desse receptor. Fisiologicamente é possível que essa alteração não esteja sendo manifestada a nível comportamental ou neuroquímico, no entanto, caso haja um desafio imune, seja por infecção externa ou um desbalanço endógeno, é possível que animais isolados tenham um prejuízo na resposta fagocítica no sistema nervoso central.

A expressão do receptor P2Y₁₃ (P2Y₁₃R) está localizada na microglia (Crain et al., 2009) e nos astrócitos (Fumagalli et al., 2004), esse receptor pode mediar a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela microglia (Liu et al., 2017). Dados recentes demonstram que o receptor não atua diretamente na proliferação astrogliar, mas ele causa a supressão da proliferação por meio da microglia (Quintas et al., 2018). Além disso, o P2Y₁₃R microglial constitutivo parece atenuar a proliferação de progenitores neurais do hipocampo, apresentando um papel significativo no controle homeostático da neurogênese e que, ainda, a deleção desse receptor reduz a complexidade e a extensão dos processos microgliais, sugerindo que o P2Y₁₃R tem um papel fundamental na estrutura da microglia (Stefani et al., 2018). Nossos resultados demonstraram uma modulação negativa da expressão gênica no

estriado e no hipocampo de ratos que passaram por isolamento social, podendo significar e esses processos de modulação indireta da proliferação astrogliar, do controle fisiológico da neurogênese, no caso do hipocampo, e da estrutura das células microgliais podem estar sendo prejudicados. Um estudo relatou que o isolamento social de curto prazo impediu a neurogênese induzida pelo exercício físico (Leasure e Decker, 2009), que pode estar sendo modulada pela diminuição de expressão do receptor P2Y₁₃R.

O receptor P2Y₂ (P2Y₂R) está associado a uma variedade de vias de transdução de sinal pela ativação de integrinas, fatores de crescimento, migração e proliferação celular e astrogliose (Peterson et al., 2010). Na literatura, há poucos relatos de seu envolvimento em modelos neuropsiquiátricos, sendo mais amplamente estudado na doença de Alzheimer, onde sua regulação positiva parece ser protetivo contra os agentes dessa doença (Ajit et al., 2014; Kim et al., 2012). Poucos estudos têm investigado o papel do receptor P2Y₄ (P2Y₄R) no SNC, no entanto, foi demonstrando de uma maneira muito elegante que esse receptor tem expressão em neurônios glutamatérgicos nas porções pré-sinápticas de CA1 e CA3 e que ele pode inibir a liberação de glutamato (Rodrigues et al., 2005). Além da localização no hipocampo, esse receptor também é expresso no hipotálamo, onde ele tem ação excitatória. Seu pico de expressão logo após o nascimento pode indicar um envolvimento na migração e diferenciação neuronal (Sergeeva et al., 2006). Da mesma maneira, o P2Y₁₄ é pouco estudado ainda, mas sabe-se que ele é amplamente expresso no cérebro (Chambers et al., 2000). Nossos resultados demonstram uma diminuição da expressão do *p2ry2* no estriado e do *p2ry4* e *p2ry14* no hipocampo de ratos isolados pós-desmame. É necessário que haja mais estudos de funcionalidade desses receptores no SNC para que, então, possamos entender os seus possíveis papéis neste modelo neuropsiquiátrico.

Finalmente, nossa análise por RT-qPCR demonstrou uma diminuição na expressão gênica da *entpd1*, *entpd2* e *entpd3*, apesar de não termos encontrado nenhuma diferença no padrão de hidrólise do ATP e do ADP nas fatias de estriado. Esses dados aparentemente divergentes entre expressão gênica e funcionalidade das enzimas podem ser explicados por mecanismos pós-transcricionais e merecem ser mais bem investigados.

A ruptura do neurodesenvolvimento pelo isolamento social pós-desmame induziu diversas alterações no sistema purinérgico, principalmente em nível de purinoreceptores. Nossos dados mostraram o acúmulo de ADP no líquido cefalorraquidiano e o aumento de sua metabolização na fenda sináptica do estriado e do hipocampo, sugerindo tênues alterações na funcionalidade das ectonucleotidases, uma vez que não foram detectadas alterações na hidrólise dos três nucleotídeos em fatias *ex vivo* de estriado e hipocampo.

Apesar de as ectonucleotidases estarem eficientemente controlando a desregulação dos níveis de ADP, o isolamento social provocou extensas alterações na expressão gênica dos receptores. No córtex pré-frontal, as os genes diferencialmente expressos parecem estar principalmente correlacionados com a modulação negativa da dopamina e positiva do glutamato, com o déficit no filtro sensorio-motor e com a cognição. Quanto aos genes modificados no hipocampo, há poucos estudos que relatam seus papéis fisiológicos no SNC, mas parece estar envolvido com os processos de liberação de citocinas pró-inflamatórias, proliferação astrocítica, controle da neurogênese e estruturação da microglia. Nossos resultados indicam que o isolamento social afeta principalmente a sinalização purinérgica do estriado, principalmente os receptores que parecem estar envolvidos com a modulação de dopamina, quimiotaxia, polarização, extensão de processos e migração microglial, processo fagocítico microglial e controle da neurogênese. Portanto, existem fortes indícios de que há

comprometimento da neurotransmissão, cognição e de função microglial. Coletivamente, esses resultados podem parecer ter grandes similaridades com transtornos neuropsiquiátricos, principalmente a esquizofrenia (para revisão, veja Burnstock et al., 2011).

Certamente outros mecanismos podem estar contribuindo com a patofisiologia nesse modelo neuropsiquiátrico, bem como a sinalização purinérgica pode contribuir em outras rotas e mecanismos não abordados na presente dissertação. No entanto, preferimos abordar os mecanismos disfuncionais do modelo de isolamento social pós-desmame que já estão suportados na literatura. Nós sugerimos que esses prejuízos podem estar sendo mediados, ao menos em parte, pela sinalização purinérgica.

5. Conclusão

Sintetizando, o presente trabalho apresentou resultados importantes e originais quanto à sinalização purinérgica no modelo neuropsiquiátrico de neurodesenvolvimento. Primeiramente, nós demonstramos que ratos Wistar isolados durante 8 semanas apresentaram alterações comportamentais tênues, como o prejuízo no filtro sensorio-motor e um aumento da socialização. Essas alterações comportamentais controversas na literatura podem ser explicadas pela sensibilidade dos ratos Wistar e pela duração do isolamento social. Em seguida, nós caracterizamos a sinalização purinérgica neste modelo. Nós encontramos um acúmulo de ADP no líquido cefalorraquidiano e um aumento da hidrólise do ADP em sinaptossomos de hipocampo e estriado nos animais que foram criados isolados. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos no padrão de hidrólise do ATP, ADP ou AMP nas fatias *ex vivo* do hipocampo e do estriado. Após a determinação da funcionalidade das

ectonucleotidases, nosso próximo objetivo era analisar o perfil de todos os elementos do sistema purinérgico. Para isso, nós partimos para a abordagem de expressão gênica. Pela primeira vez foi demonstrada uma proeminente alteração do sistema purinérgico em um modelo de neurodesenvolvimento. O córtex pré-frontal modulou negativamente a expressão dos genes *adora2a*, *p2ry1* e *p2rx5* nos animais que passaram pelo isolamento social. O hipocampo, por sua vez, evidenciou uma regulação positiva na expressão gênica do *p2ry4*, *p2ry13* e *p2ry14* nos mesmos animais. Nós demonstramos, ainda, que o estriado foi mais afetado pelo isolamento social, uma vez que apresentou uma expressão diferencial dos genes *adora2a*, *p2rx4*, *p2ry2*, *p2ry6*, *p2ry12*, *p2ry13*, *entpd1*, *entpd2* e *entpd3*. Sendo assim, apesar de esse modelo de ruptura do neurodesenvolvimento ter apresentado alterações comportamentais tênues, nós mostramos extensas evidências genéticas de desregulações neurobiológicas que são mediadas pela sinalização purinérgica. Coletivamente esses dados pressupõem similaridades com transtornos neuropsiquiátricos, principalmente a esquizofrenia (para revisão, veja Burnstock et al., 2011), podendo ser considerados como uma validade de construto do modelo animal de isolamento social.

Até onde sabemos, nós somos o primeiro trabalho que evidencia alterações em parâmetros do sistema purinérgico em um modelo animal não-farmacológico de ruptura do neurodesenvolvimento. Diversas modificações apresentadas nesse trabalho foram discutidas com base em achados de estudos previamente publicados e, ainda, alguns desses receptores não têm suas funções bem descrevidas na literatura, demonstrando a demasiada necessidade de mais estudos nessa área do conhecimento.

6. Perspectivas

- Utilizar cepas de roedores mais sensíveis ao isolamento social e verificar a sinalização purinérgica;
- Empregar testes comportamentais mais finos para verificar se não houve perda de informação nos parâmetros analisados;
- Realizar ensaios de funcionalidade dos receptores para verificar se além da expressão gênica existe alteração funcional;
- Evidenciar se as modulações realizadas pelos receptores purinérgicos estão presentes no modelo de isolamento social;
- Investigar por meio de modulação farmacológica a função de cada receptor no presente modelo;
- Investigar mais detalhadamente as potenciais modulações induzidas pela *d*-anfetamina no sistema purinérgico e na neurotransmissão de dopamina no modelo de isolamento social.

7. Referências

- Abbracchio, M. P., S. Ceruti, R. Langfelder, F. Cattabeni, M. J. Saffrey, and G. Burnstock. 1995. "Effects of ATP Analogues and Basic Fibroblast Growth Factor on Astroglial Cell Differentiation in Primary Cultures of Rat Striatum." *International Journal of Developmental Neuroscience* 13(7):685–93.
- Abbracchio, Maria P., Geoffrey Burnstock, Alexei Verkhratsky, and Herbert Zimmermann. 2009. "Purinergic Signalling in the Nervous System: An Overview." *Trends in Neurosciences* 32(1):19–29.
- Ajit, Deepa, Lucas T. Woods, Jean M. Camden, Christina N. Thebeau, Farid G. El-Sayed, Glen W. Greeson, Laurie Erb, Michael J. Petris, Douglas C. Miller, Grace Y. Sun, and Gary A. Weisman. 2014. "Loss of P2Y2 Nucleotide Receptors Enhances Early Pathology in the TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Molecular Neurobiology* 49(2):1031–42.
- Almeida, Roberto Farina, Victor Hermes Cereser, Rafael Berger Faraco, Ana Elisa Böhmer, Diogo Onofre Souza, and Marcelo Ganzella. 2010. "Systemic Administration of GMP Induces Anxiolytic-like Behavior in Rats." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 96(3):306–11.
- Amadio, Susanna, Cinzia Montilli, Barbara Picconi, Paolo Calabresi, and Cinzia Volonté. 2007. "Mapping P2X and P2Y Receptor Proteins in Striatum and Substantia Nigra: An Immunohistological Study." *Purinergic Signalling* 3(4):389–98.
- Bakshi, V. P. and M. A. Geyer. 1999. "Ontogeny of Isolation Rearing-Induced Deficits in Sensorimotor Gating in Rats." *Physiology and Behavior* 67(3):385–92.
- Ballerini, Patrizia, P. Di Iorio, R. Ciccarelli, F. Caciagli, A. Poli, A. Beraudi, S. Buccella, I. D'Alimonte, M. D'Auro, E. Nargi, P. Patricelli, D. Visini, and U. Traversa. 2005. "P2Y1 and Cysteinyl Leukotriene Receptors Mediate Purine and Cysteinyl Leukotriene Co-Release in Primary Cultures of Rat Microglia." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18(2):255–68.
- Bernardino, Liliana, Silvia Balosso, Teresa Ravizza, Nicola Marchi, George Ku, John C. Randle, João O. Malva, and Annamaria Vezzani. 2008. "Inflammatory Events in Hippocampal Slice Cultures Prime Neuronal Susceptibility to Excitotoxic Injury: A Crucial Role of P2X7-receptor-Mediated IL-1 β Release." *Journal of Neurochemistry* 106(1):271–80.
- Bettio, Luis E. B., Andiara E. Freitas, Vivian B. Neis, Danúbia B. Santos, Camille M. Ribeiro, Priscila B. Rosa, Marcelo Farina, and Ana Lúcia S. Rodrigues. 2014. "Guanosine Prevents Behavioral Alterations in the Forced Swimming Test and Hippocampal Oxidative Damage Induced by Acute Restraint Stress." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 127:7–14.
- Binder, E. B., B. Kinkead, M. J. Owens, C. D. Kilts, and C. B. Nemeroff. 2001. "Enhanced Neurotensin Neurotransmission Is Involved in the Clinically Relevant Behavioral

- Effects of Antipsychotic Drugs: Evidence from Animal Models of Sensorimotor Gating." *J Neurosci* 21(2):601–8.
- Bo, Xuenong, Miran Kim, Stefania L. Nori, Ralf Schoepfer, Geoffrey Burnstock, and R. Alan North. 2003. "Tissue Distribution of P2X4 Receptors Studied with an Ectodomain Antibody." *Cell and Tissue Research* 313(2):159–65.
- Boucsein, Clemens, Robert Zacharias, Katrin Färber, Sanja Pavlovic, Uwe Karsten Hanisch, and Helmut Kettenmann. 2003. "Purinergic Receptors on Microglial Cells: Functional Expression in Acute Brain Slices and Modulation of Microglial Activation in Vitro." *European Journal of Neuroscience* 17(11):2267–76.
- Bowser, David N. and Baljit S. Khakh. 2007. "Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes." *The Journal of General Physiology* 129(6):485–91.
- Burnstock, G. 2007. "Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission." *Physiological Reviews* 87(2):659–797.
- Burnstock, Geoffrey. 2006a. "Historical Review: ATP as a Neurotransmitter." *Trends in Pharmacological Sciences* 27(3 SPEC. ISS.):166–76.
- Burnstock, Geoffrey. 2006b. "Purinergic Signalling." *British Journal of Pharmacology* 147(SUPPL. 1):172–81.
- Burnstock, Geoffrey, Ute Krügel, Maria P. Abbracchio, and Peter Illes. 2011. "Purinergic Signalling: From Normal Behaviour to Pathological Brain Function." *Progress in Neurobiology* 95(2):229–74.
- Cacioppo, John T., Stephanie Cacioppo, Steven W. Cole, John P. Capitanio, Luc Goossens, and Dorret I. Boomsma. 2015. "Loneliness Across Phylogeny and a Call for Comparative Studies and Animal Models John." 10(2):202–12.
- Chakfe, Yassar, Rosanne Seguin, Jack P. Antel, Celine Morissette, Danielle Malo, Duncan Henderson, and Philippe Seguela. 2002. "ADP and AMP Induce Interleukin-1beta Release from Microglial Cells through Activation of ATP-Primed P2X7 Receptor Channels." *J. Neurosci.* 22(8):3061–69.
- Chambers, Jon K., Lynn E. Macdonald, Henry M. Sarau, Robert S. Ames, Katie Freeman, James J. Foley, Yuan Zhu, Megan M. McLaughlin, Paul Murdock, Lynette McMillan, John Trill, Ann Swift, Nambi Aiyar, Paul Taylor, Lisa Vawter, Sajda Naheed, Philip Szekeres, Guillaume Hervieu, Claire Scott, Jeanette M. Watson, Andrew J. Murphy, Emir Duzic, Christine Klein, Derk J. Bergsma, Shelagh Wilson, and George P. Livi. 2000. "A G Protein-Coupled Receptor for UDP-Glucose." *Journal of Biological Chemistry* 275(15):10767–71.
- Chang, Chih Hua, Ya Hsin Hsiao, Yu Wen Chen, Yang Jung Yu, and Po Wu Gean. 2015. "Social Isolation-Induced Increase in NMDA Receptors in the Hippocampus Exacerbates Emotional Dysregulation in Mice." *Hippocampus* 25(4):474–85.

- Choi, Y. M., J. Y. Jang, M. Jang, S. H. Kim, Y. K. Kang, H. Cho, S. Chung, and M. K. Park. 2009. "Modulation of Firing Activity by ATP in Dopamine Neurons of the Rat Substantia Nigra Pars Compacta." *Neuroscience* 160(3):587–95.
- Ciccarelli R., Di Iorio P., D'Alimonte I., Giuliani P., Florio T., Caciagli F., Middlemiss P.J., Rathbone M.P. (2000) Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia* 29: 202–211.
- Ciccarelli R., Di Iorio P., Giuliani P., D'Alimonte I., Ballerini P., Caciagli F., Rathbone M.P. (1999) Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia* 25: 93–98.
- Cilia, J., C. Reavill, J. J. Hagan, and D. N. C. Jones. 2001. "Long-Term Evaluation of Isolation-Rearing Induced Prepulse Inhibition Deficits in Rats." *Psychopharmacology* 156(2–3):327–37.
- Coelho, Joana E., Pedro Alves, Paula M. Canas, Jorge S. Valadas, Tatiana Shmidt, Vânia L. Batalha, Diana G. Ferreira, Joaquim A. Ribeiro, Michael Bader, Rodrigo A. Cunha, Frederico Simões do Couto, and Luísa V. Lopes. 2014. "Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety." *Frontiers in Psychiatry* 5(JUN):1–8.
- Ciruela F., Escriche M., Burgueno J., Angulo E., Casado V., Soloviev M.M., Canela E.I., Mallol J., Chan W.Y., Lluís C., McIlhinney R.A., Franco R. (2001) Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem* 276(21):18345–51.
- Compan, V., L. Ulmann, O. Stelmashenko, J. Chemin, S. Chaumont, and F. Rassendren. 2012. "P2X2 and P2X5 Subunits Define a New Heteromeric Receptor with P2X7-Like Properties." *Journal of Neuroscience* 32(12):4284–96.
- Costenla, Ana R., Maria J. Diógenes, Paula M. Canas, Ricardo J. Rodrigues, Célia Nogueira, João Maroco, Paula M. Agostinho, Joaquim A. Ribeiro, Rodrigo A. Cunha, and Alexandre de Mendonça. 2011. "Enhanced Role of Adenosine A2A Receptors in the Modulation of LTP in the Rat Hippocampus upon Ageing." *European Journal of Neuroscience* 34(1):12–21.
- Craig C.G., White T.D. (1993) N-methyl-D-aspartate- and non-N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* 60: 1073–80.
- Crain, Jessica M., Maria Nikodemova, and Jyoti J. Watters. 2009. "Expression of P2 Nucleotide Receptors Varies with Age and Sex in Murine Brain Microglia." *Journal of Neuroinflammation* 6:24.
- Cunha, Rodrigo A (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signalling* 111–34.
- D. Bonan, Carla. 2012. "Ectonucleotidases and Nucleotide/Nucleoside Transporters as

Pharmacological Targets for Neurological Disorders.” *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 11(6):739–50

- D’Alimonte I., Flati V., D’Auro M., Toniato E., Martinotti S., Rathbone M.P., Jiang S., Ballerini P., Di Iorio P., Caciagli F., Ciccarelli R. (2007). Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. *J Immunol* 178: 720–731..
- Dal-Cim T., Molz S., Egea J., Parada E., Romero A., Budni J., Martín de Saavedra M.D., del Barrio L., Tasca C.I., López M.G. (2012). Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3beta pathway. *Neurochem Int* 61: 397–404.
- Dal-Cim, Tharine, Fabiana K. Ludka, Wagner C. Martins, Charlise Reginato, Esther Parada, Javier Egea, Manuela G. López, and Carla I. Tasca. 2013. “Guanosine Controls Inflammatory Pathways to Afford Neuroprotection of Hippocampal Slices under Oxygen and Glucose Deprivation Conditions.” *Journal of Neurochemistry* 126(4):437–50..
- Day-Wilson, K. M., D. N. C. Jones, E. Southam, J. Cilia, and S. Totterdell. 2006. “Medial Prefrontal Cortex Volume Loss in Rats with Isolation Rearing-Induced Deficits in Prepulse Inhibition of Acoustic Startle.” *Neuroscience* 141(3):1113–21.
- Delaney S.M., Shepel P.N., Geiger J.D. (1998). Levels of endogenous adenosine in rat striatum. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 561–7.
- Di Iorio P., Ballerini P., Traversa U., Nicoletti F., D’Alimonte I., Kleywegt S., Werstiuk E.S., Rathbone M.P., Caciagli F., Ciccarelli R. (2004). The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/ AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia*; 46: 356–368
- Domeney, Annette and Joram Feldon. 1998. “The Disruption of Prepulse Inhibition by Social Isolation in the Wistar Rat: How Robust Is the Effect?” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59(4):883–90.
- Domercq, Maria, Liliana Brambilla, Ethel Pilati, Julie Marchaland, Andrea Volterra, and Paola Bezzi. 2006. “P2Y1 Receptor-Evoked Glutamate Exocytosis from Astrocytes: Control by Tumor Necrosis Factor- α and Prostaglandins.” *Journal of Biological Chemistry* 281(41):30684–96.
- Fabricius, Katrine, Lone Helboe, Anders Fink-Jensen, Gitta Wörtwein, Björn Steiniger-Brach, and Florence Sotty. 2010. “Increased Dopaminergic Activity in Socially Isolated Rats: An Electrophysiological Study.” *Neuroscience Letters* 482(2):117–22.
- Fabricius, Katrine, Björn Steiniger-Brach, Lone Helboe, Anders Fink-Jensen, and Gitta Wörtwein. 2011. “Socially Isolated Rats Exhibit Changes in Dopamine Homeostasis Pertinent to Schizophrenia.” *International Journal of Developmental Neuroscience* 29(3):347–50.

- Fam, Sami R., Conor J. Gallagher, Lorraine V. Kalia, and Michael W. Salter. 2003. "Differential Frequency Dependence of P2Y1- and P2Y2- Mediated Ca²⁺ Signaling in Astrocytes." *Journal of Neuroscience* 23(11):4437–44.
- Ferdman, N., R. P. Murmu, J. Bock, K. Braun, and M. Leshem. 2007. "Weaning Age, Social Isolation, and Gender, Interact to Determine Adult Explorative and Social Behavior, and Dendritic and Spine Morphology in Prefrontal Cortex of Rats." *Behavioural Brain Research* 180(2):174–82.
- Ferré S. (1997). Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 133: 107–20.
- Ferré S., Karcz-Kubicha M., Hope B.T., Popoli P., Burgueño J., Gutiérrez M.A., Casadó V., Fuxe K., Goldberg S.R., Lluís C., Franco R., Ciruela F. (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11940–5.
- Ferré, Sergi, Jordi Bonaventura, Dardo Tomasi, Gemma Navarro, Estefanía Moreno, Antonio Cortés, Carme Lluís, Vicent Casadó, and Nora D. Volkow. 2016. "Allosteric Mechanisms within the Adenosine A2A-Dopamine D2receptor Heterotetramer." *Neuropharmacology* 104:154–60.
- Fields R.D., Burnstock G. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423–436.
- Fink, J. Stephen, David R. Weaver, Scott A. Rivkees, Robert A. Peterfreund, Alexia E. Pollack, Elizabeth M. Adler, and Steven M. Reppert. 1992. "Molecular Cloning of the Rat A2adenosine Receptor: Selective Co-Expression with D2dopamine Receptors in Rat Striatum." *Molecular Brain Research* 14(3):186–95.
- Fone, Kevin C. F. and M. Veronica Porkess. 2008. "Behavioural and Neurochemical Effects of Post-Weaning Social Isolation in Rodents-Relevance to Developmental Neuropsychiatric Disorders." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32(6):1087–1102.
- Franke H., Grosche J., Schädlich H., Krügel U., Allgaier C., Illes P. (2001). P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience* 108(3):421-9.
- Fumagalli, Marta, Roberta Brambilla, Nadia D'Ambrosi, Cinzia Volonté, Michela Matteoli, Claudia Verderio, and Maria P. Abbracchio. 2003. "Nucleotide-Mediated Calcium Signaling in Rat Cortical Astrocytes: Role of P2X and P2Y Receptors." *Glia* 43(3):218–30.
- Fumagalli, Marta, Davide Lecca, and Maria P. Abbracchio. 2016. "CNS Remyelination as a Novel Reparative Approach to Neurodegenerative Diseases: The Roles of Purinergic Signaling and the P2Y-like Receptor GPR17." *Neuropharmacology* 104:82–93.
- Fumagalli, Marta, Letizia Trincavelli, Davide Lecca, Claudia Martini, Paolo Ciana, and Maria P. Abbracchio. 2004. "Cloning, Pharmacological Characterisation and Distribution of the Rat G-Protein-Coupled P2Y13 Receptor." *Biochemical*

Pharmacology 68(1):113–24.

- Geyer, M. A., L. S. Wilinson, T. Humby, and T. W. Robbins. 1993. “Isolation Rearing of Rats Produces a Deficit in Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Similar to That in Schizophrenia.” *Biological Psychiatry* 34(6):361–72.
- Goding, James W., Bert Grobбен, and Herman Slegers. 2003. “Physiological and Pathophysiological Functions of the Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Family.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1638(1):1–19.
- Guzman, Segundo J., Hartmut Schmidt, Heike Franke, Ute Krügel, Jens Eilers, Peter Illes, and Zoltan Gerevich. 2010. “P2Y1 receptors Inhibit Long-Term Depression in the Prefrontal Cortex.” *Neuropharmacology* 59(6):406–15.
- Hall, F. S., L. S. Wilkinson, T. Humby, W. Inglis, D. A. Kendall, C. A. Marsden, and T. W. Robbins. 1998. “Isolation Rearing in Rats: Pre- and Postsynaptic Changes in Striatal Dopaminergic Systems.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 59(4):859–72.
- Haynes, Sharon E., Gunther Hollopeter, Guang Yang, Dana Kurpius, Michael E. Dailey, Wen Biao Gan, and David Julius. 2006. “The P2Y12 Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides.” *Nature Neuroscience* 9(12):1512–19.
- Hellemans, Kim G. C., Luis C. Benge, and Mary C. Olmstead. 2004. “Adolescent Enrichment Partially Reverses the Social Isolation Syndrome.” *Developmental Brain Research* 150(2):103–15.
- Herrmann, Ana P., Radharani Benvenuti, Luisa K. Pilz, and Elaine Elisabetsky. 2014. “N-Acetylcysteine Prevents Increased Amphetamine Sensitivity in Social Isolation-Reared Mice.” *Schizophrenia Research* 155(1–3):109–11.
- Inoue, Kazuhide, Schuichi Koizumi, Ayako Kataoka, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, and Makoto Tsuda. 2009. “Chapter 12 P2Y6-Evoked Microglial Phagocytosis.” *International Review of Neurobiology* 85(09):159–63.
- Jones, G. H., T. D. Hernandez, D. A. Kendall, C. A. Marsden, and T. W. Robbins. 1992. “Dopaminergic and Serotonergic Function Following Isolation Rearing in Rats: Study of Behavioural Responses and Postmortem and in Vivo Neurochemistry.” *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 43(1):17–35.
- Jourdain, Pascal, Linda H. Bergersen, Khaleel Bhaukaurally, Paola Bezzi, Mirko Santello, Maria Domercq, Carlos Matute, Fiorella Tonello, Vidar Gundersen, and Andrea Volterra. 2007. “Glutamate Exocytosis from Astrocytes Controls Synaptic Strength.” *Nature Neuroscience* 10(3):331–39.
- Kim, Hye Jung, Deepa Ajit, Troy S. Peterson, Yanfang Wang, Jean M. Camden, W. Gibson Wood, Grace Y. Sun, Laurie Erb, Michael Petris, and Gary A. Weisman. 2012. “Nucleotides Released from A β 1-42-Treated Microglial Cells Increase Cell Migration and A β 1-42 Uptake through P2Y 2 Receptor Activation.” *Journal of Neurochemistry* 121(2):228–38.

- Ko, Chih Yuan and Yia Ping Liu. 2015. "Isolation Rearing Impaired Sensorimotor Gating but Increased Pro-Inflammatory Cytokines and Disrupted Metabolic Parameters in Both Sexes of Rats." *Psychoneuroendocrinology* 55:173–83.
- Koch, Holger, Anton Bernalov, Karla Drescher, Heike Franke, and Ute Krügel. 2015. "Impaired Cognition after Stimulation of P2Y1 Receptors in the Rat Medial Prefrontal Cortex." *Neuropsychopharmacology* 40(2):305–14.
- Koizumi, Shuichi. 2010. "Synchronization of Ca²⁺ Oscillations: Involvement of ATP Release in Astrocytes." *FEBS Journal* 277(2):286–92.
- Koizumi, Shuichi, Keiko Ohsawa, Kazuhide Inoue, and Shinichi Kohsaka. 2013. "Purinergic Receptors in Microglia: Functional Modal Shifts of Microglia Mediated by P2 and P1 Receptors." *Glia* 61(1):47–54.
- Koizumi, Shuichi, Yukari Shigemoto-Mogami, Kaoru Nasu-Tada, Yoichi Shinozaki, Keiko Ohsawa, Makoto Tsuda, Bhalchandra V. Joshi, Kenneth A. Jacobson, Shinichi Kohsaka, and Kazuhide Inoue. 2007. "UDP Acting at P2Y6 receptors Is a Mediator of Microglial Phagocytosis." *Nature* 446(7139):1091–95.
- Kovács, Zsolt, Árpád Dobolyi, Katalin Kékesi, and Gábor Juhász. 2013. "5'-Nucleotidases, Nucleosides and Their Distribution in the Brain: Pathological and Therapeutic Implications." *Current Medicinal Chemistry* 20(34):4217–40.
- Kukulski, Filip, Jean Sévigny, and Michał Komoszyński. 2004. "Comparative Hydrolysis of Extracellular Adenine Nucleotides and Adenosine in Synaptic Membranes from Porcine Brain Cortex, Hippocampus, Cerebellum and Medulla Oblongata." *Brain Research* 1030(1):49–56.
- Langer, David, Klaus Hammer, Patrycja Koszalka, Jürgen Schrader, Simon Robson, and Herbert Zimmermann. 2008. "Distribution of Ectonucleotidases in the Rodent Brain Revisited." *Cell and Tissue Research* 334(2):199–217.
- Latini, Serena and Felicita Pedata. 2001. "Adenosine in the Central Nervous System: Release Mechanisms and Extracellular Concentrations." *Journal of Neurochemistry* 79(3):463–84.
- Leasure, J. Leigh and Linda Decker. 2009. "Social Isolation Prevents Exercise-Induced Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells in Female Rats." *Hippocampus* 19(10):907–12.
- Liu P.W., Yue M.X., Zhou R., Niu J., Huang D.J., Xu T., Luo P., Liu X.H., Zeng J.W. (2017). P2Y12 and P2Y13 receptors involved in ADPβs induced the release of IL-1β, IL-6 and TNF-α from cultured dorsal horn microglia. *J Pain Res* 10:1755-1767.
- Lopes L.V., Cunha R.A., Kull B., Fredholm B.B, Ribeiro J.A. (2002). Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience* 112(2):319-29.
- Makinodan, Manabu, Kenneth M. Rosen, Susumu Ito, and Gabriel Corfas. 2012. "A Critical

- Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination.” *Science* 337(6100):1357–60.
- McLarnon, James G. 2005. “Purinergic Mediated Changes in Ca²⁺ Mobilization and Functional Responses in Microglia: Effects of Low Levels of ATP.” *Journal of Neuroscience Research* 81(3):349–56.
- Menzies R.I., Tam F.W., Unwin R.J., Bailey M.A. (2017). Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney Int.* 91(2):315-323.
- Mildner, Alexander, Hao Huang, Josefine Radke, Werner Stenzel, and Josef Priller. 2017. “P2Y₁₂receptor Is Expressed on Human Microglia under Physiological Conditions throughout Development and Is Sensitive to Neuroinflammatory Diseases.” *Glia* 65(2):375–87.
- Mishra, S. K. 2006. “Extracellular Nucleotide Signaling in Adult Neural Stem Cells: Synergism with Growth Factor-Mediated Cellular Proliferation.” *Development* 133(4):675–84.
- Möller, Marisa, Jan L. Du Preez, Robin Emsley, and Brian H. Harvey. 2011. “Isolation Rearing-Induced Deficits in Sensorimotor Gating and Social Interaction in Rats Are Related to Cortico-Striatal Oxidative Stress, and Reversed by Sub-Chronic Clozapine Administration.” *European Neuropsychopharmacology* 21(6):471–83.
- Möller, Marisa, Jan L. Du Preez, Francois P. Viljoen, Michael Berk, Robin Emsley, and Brian H. Harvey. 2013. “Social Isolation Rearing Induces Mitochondrial, Immunological, Neurochemical and Behavioural Deficits in Rats, and Is Reversed by Clozapine or N-Acetyl Cysteine.” *Brain, Behavior, and Immunity* 30:156–67.
- Möller, Marisa, Jan L. Du Preez, Francois P. Viljoen, Michael Berk, and Brian H. Harvey. 2013. “N-Acetyl Cysteine Reverses Social Isolation Rearing Induced Changes in Cortico-Striatal Monoamines in Rats.” *Metabolic Brain Disease* 28(4):687–96.
- Murphy, Keith J., Judith P. F. Ter Horst, Andrew W. Cassidy, Ian E. J. Desouza, Marina Morgunova, Christine Li, Laura M. Connole, Niamh C. O’Sullivan, Jennifer S. Loscher, Angela T. Brady, Nanette Rombach, Joanna Connellan, Paul A. McGettigan, Darren Scully, Rocio Fedriani, Bartlomiej Lukasz, Mary P. Moran, Olive M. McCabe, Caitlin M. Wantuch, Zoe A. Hughes, Sean K. Mulvany, Desmond G. Higgins, Menelas N. Pangalos, Karen L. Marquis, William T. O’Connor, Robert H. Ring, David Von Schack, and Ciaran M. Regan. 2010. “Temporal Dysregulation of Cortical Gene Expression in the Isolation Reared Wistar Rat.” *Journal of Neurochemistry* 113(3):601–14.
- Neary, Joseph T., Yuan Kang, Karen A. Willoughby, and Earl F. Ellis. 2003. “Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Stretch-Induced Injury in Astrocytes Involves Extracellular ATP and P₂ Purinergic Receptors.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23(6):2348–56.
- Nishi A., Liu F., Matsuyama S., Hamada M., Higashi H., Nairn A.C., Greengard P. (2003) Metabotropic mGlu5 receptors regulate adenosine A_{2A} receptor signalling. *Proc Natl*

Acad Sci USA 100: 1322–7.

- Ohsawa K., Irino Y., Nakamura Y., Akazawa C., Inoue K., Kohsaka S. (2007). Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. *Glia* 15;55(6):604-16.
- Oliveira V.E.M., Neumann I.D., de Jong T.R. (2019). Post-weaning social isolation exacerbates aggression in both sexes and affects the vasopressin and oxytocin system in a sex-specific manner. *Neuropharmacology*. pii: S0028-3908(19)30022-X.
- Pagnussat, N., A. S. Almeida, D. M. Marques, F. Nunes, G. C. Chenet, P. H. S. Botton, S. Mioranza, C. M. Loss, R. A. Cunha, and L. O. Porciúncula. 2015. “Adenosine A₂ Receptors Are Necessary and Sufficient to Trigger Memory Impairment in Adult Mice.” *British Journal of Pharmacology* 172(15):3831–45.
- Palygin, Oleg, Ulyana Lalo, Alexei Verkhratsky, and Yuriy Pankratov. 2010. “Ionotropic NMDA and P2X1/5 Receptors Mediate Synaptically Induced Ca²⁺ Signalling in Cortical Astrocytes.” *Cell Calcium* 48(4):225–31.
- Pereira, Grace Schenatto, Janine Inez Rossato, João José Freitas Sarkis, Martín Cammarota, Carla Denise Bonan, and Iván Izquierdo. 2005. “Activation of Adenosine Receptors in the Posterior Cingulate Cortex Impairs Memory Retrieval in the Rat.” *Neurobiology of Learning and Memory* 83(3):217–23.
- Peterson, Troy S., Jean M. Camden, Yanfang Wang, Cheikh I. Seye, W. G. Wood, Grace Y. Sun, Laurie Erb, Michael J. Petris, and Gary A. Weisman. 2010. “P2Y2 Nucleotide Receptor-Mediated Responses in Brain Cells.” *Molecular Neurobiology* 41(2–3):356–66.
- Pettifer K.M., Kleywegt S., Bau C.J., Ramsbottom J.D., Vertes E., Ciccarelli R., Caciagli F., Werstiuk E.S., Rathbone M.P. (2004). Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. *Neuroreport* 15: 833–836.
- Powell, S. B., M. A. Geyer, M. A. Preece, L. K. Pitcher, G. P. Reynolds, and N. R. Swerdlow. 2003. “Dopamine Depletion of the Nucleus Accumbens Reverses Isolation-Induced Deficits in Prepulse Inhibition in Rats.” *Neuroscience* 119(1):233–40.
- Pritchard, L. M., T. A. Van Kempen, and B. Zimmerberg. 2013. “Behavioral Effects of Repeated Handling Differ in Rats Reared in Social Isolation and Environmental Enrichment.” *Neuroscience Letters* 536(1):47–51.
- Quan, M. N., Y. T. Tian, K. H. Xu, T. Zhang, and Z. Yang. 2010. “Post Weaning Social Isolation Influences Spatial Cognition, Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Hippocampal Potassium Ion Channels in Wistar Rats.” *Neuroscience* 169(1):214–22.
- Quintas, Clara, Nuno Vale, Jorge Gonçalves, and Glória Queiroz. 2018. “Microglia P2Y13 receptors Prevent Astrocyte Proliferation Mediated by P2Y1 receptors.” *Frontiers in Pharmacology* 9(MAY):1–12.

- Rebola, N., P. M. Canas, C. R. Oliveira, and R. A. Cunha. 2005. "Different Synaptic and Subsynaptic Localization of Adenosine A2A Receptors in the Hippocampus and Striatum of the Rat." *Neuroscience* 132(4):893–903.
- Rebola, N., R. J. Rodrigues, L. V. Lopes, P. J. Richardson, C. R. Oliveira, and R. A. Cunha. 2005. "Adenosine A1 and A2A Receptors Are Co-Expressed in Pyramidal Neurons and Co-Localized in Glutamatergic Nerve Terminals of the Rat Hippocampus." *Neuroscience* 133(1):79–83.
- Rebola, Nelson, Rafael Lujan, Rodrigo A. Cunha, and Christophe Mulle. 2008. "Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses." *Neuron* 57(1):121–34.
- Rebola, Nelson, Ana Patrícia Simões, Paula M. Canas, Angelo R. Tomé, Geanne M. Andrade, Claire E. Barry, Paula M. Agostinho, Marina A. Lynch, and Rodrigo A. Cunha. 2011. "Adenosine A2A Receptors Control Neuroinflammation and Consequent Hippocampal Neuronal Dysfunction." *Journal of Neurochemistry* 117(1):100–111.
- Ribeiro J.A., Sebastião A.M., De Mendonça A. (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News & Perspectives* 16: 80–86.
- Robson, Simon C., Jean Sévigny, and Herbert Zimmermann. 2006. "The E-NTPDase Family of Ectonucleotidases: Structure Function Relationships and Pathophysiological Significance." *Purinergic Signalling* 2(2):409–30.
- Rodrigues, R., Teresa Almeida, Peter J. Richardson, Catarina R. Oliveira, and Rodrigo A. Cunha. 2005. "Dual Presynaptic Control by ATP of Glutamate Release via Facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and Inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 Receptors in the Rat Hippocampus." *Journal of Neuroscience* 25(27):6286–95.
- Rogove, A. D., W. Lu, and S. E. Tsirka. 2002. "Microglial Activation and Recruitment, but Not Proliferation, Suffice to Mediate Neurodegeneration." *Cell Death and Differentiation* 9(8):801–6.
- Sánchez, M. Mar, Elizabeth F. Hearn, Dung Do, James K. Rilling, and James G. Herndon. 1998. "Differential Rearing Affects Corpus Callosum Size and Cognitive Function of Rhesus Monkeys." *Brain Research* 812(1–2):38–49.
- Santos T.G., Souza D.O., Tasca C.I. (2006). GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. *Brain Res* 1070: 71–76.
- Schmidt, André P., Diogo R. Lara, and Diogo O. Souza. 2007. "Proposal of a Guanine-Based Purinergic System in the Mammalian Central Nervous System." *Pharmacology and Therapeutics* 116(3):401–16.
- Schrijver, N. C. A., Patrick N. Pallier, Verity J. Brown, and Hanno Würbel. 2004. "Double Dissociation of Social and Environmental Stimulation on Spatial Learning and Reversal Learning in Rats." *Behavioural Brain Research* 152(2):307–14.
- Sergeeva, Olga A., Boris P. Klyuch, Wiebke Fleischer, Krister S. Eriksson, Tatiana M.

- Korotkova, Mario Siebler, and Helmut L. Haas. 2006. "P2Y Receptor-Mediated Excitation in the Posterior Hypothalamus." *European Journal of Neuroscience* 24(5):1413–26.
- Shen, H. Y., J. E. Coelho, N. Ohtsuka, P. M. Canas, Y. J. Day, Q. Y. Huang, N. Rebola, L. Yu, D. Boison, R. A. Cunha, J. Linden, J. Z. Tsien, and J. F. Chen. 2008. "A Critical Role of the Adenosine A2A Receptor in Extrastriatal Neurons in Modulating Psychomotor Activity as Revealed by Opposite Phenotypes of Striatum and Forebrain A2A Receptor Knock-Outs." *Journal of Neuroscience* 28(12):2970–75.
- Smith, J. K., J. C. Neill, and B. Costall. 1997. "Post-Weaning Housing Conditions Influence the Behavioural Effects of Cocaine and d-Amphetamine." *Psychopharmacology* 131(1):23–33.
- Stefani, Jennifer, Olga Tschesnokowa, Marta Parrilla, and Bernard Robaye. 2018. "Disruption of the Microglial ADP Receptor P2Y 13 Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis." 12(May):1–19.
- Takahashi, Reinaldo Naoto, Fabricio Alano Pamplona, Rui Daniel, and Schroder Prediger. 2008. "Departamento de Farmacologia, Centro de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade, Florianopolis-SC 88049-900, Brazil." (4):2614–32.
- Tasca, Carla I., Luciana F. Cardoso, Lúcia H. Martini, Galo Ramírez, and Diogo O. Souza. 1998. "Guanine Nucleotides Inhibit CAMP Accumulation Induced by Metabotropic Glutamate Receptor Activation." *Neurochemical Research* 23(2):183–88.
- Tasca, Carla I., Débora Lanznaster, Karen A. Oliveira, Victor Fernández-Dueñas, and Francisco Ciruela. 2018. "Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12(October):1–14.
- Varty, G. B., C. A. Marsden, and G. A. Higgins. 1999. "Reduced Synaptophysin Immunoreactivity in the Dentate Gyrus of Prepulse Inhibition-Impaired Isolation-Reared Rats." *Brain Research* 824(2):197–203.
- Varty, Geoffrey B. and Guy A. Higgins. 1994. "Differences between Three Rat Strains in Sensitivity to Prepulse Inhibition of an Acoustic Startle Response: Influence of Apomorphine and Phencyclidine Pretreatment." *Journal of Psychopharmacology* 8(3):148–56.
- Verkhrasky, Alexei, Oleg A. Krishtal, and Geoffrey Burnstock. 2009. "Purinoceptors on Neuroglia." *Molecular Neurobiology* 39(3):190–208.
- Wang, Yu Chun, Ue Cheung Ho, Meng Ching Ko, Chun Chieh Liao, and Li Jen Lee. 2012. "Differential Neuronal Changes in Medial Prefrontal Cortex, Basolateral Amygdala and Nucleus Accumbens after Postweaning Social Isolation." *Brain Structure and Function* 217(2):337–51.
- Weiss, Isabelle C., Annette M. Domeney, Christian A. Heidbreder, Jean L. Moreau, and Joram Feldon. 2001. "Early Social Isolation, but Not Maternal Separation, Affects

- Behavioral Sensitization to Amphetamine in Male and Female Adult Rats.” *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 70(2–3):397–409.
- Weiss, Isabelle C., Lucia Di Lorio, Joram Feldon, and Annette M. Domeney. 2000. “Strain Differences in the Isolation-Induced Effects on Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Response and on Locomotor Activity.” *Behavioral Neuroscience* 114(2):364–73.
- Wongwitdecha, N. and C. A. Marsden. 1996. “Social Isolation Increases Aggressive Behaviour and Alters the Effects of Diazepam in the Rat Social Interaction Test.” *Behavioural Brain Research* 75(1–2):27–32.
- Xia, Ning and Huige Li. 2017. “Loneliness, Social Isolation, and Cardiovascular Health.” *Antioxidants & Redox Signaling* 28(9):ars.2017.7312.
- Xiang, Zhenghua and Geoffrey Burnstock. 2005. “Changes in Expression of P2X Purinoceptors in Rat Cerebellum during Postnatal Development.” *Developmental Brain Research* 156(2):147–57.
- Xiang, Zhenghua, Cheng He, and Geoffrey Burnstock. 2006. “P2X5 Receptors Are Expressed on Neurons Containing Arginine Vasopressin and Nitric Oxide Synthase in the Rat Hypothalamus.” *Brain Research* 1099(1):56–63.
- Yegutkin, Gennady G. 2014. “Enzymes Involved in Metabolism of Extracellular Nucleotides and Nucleosides: Functional Implications and Measurement of Activities.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 49(6):473–97.
- Yorgason, Jordan T., Erin S. Calipari, Mark J. Ferris, Annushree N. Karkhanis, C. Fordahl, Jeffrey L. Weiner, Sara R. Jones, Mark J. Ferris, and Anushree N. Karkhanis. 2015. “Social Isolation Rearing Increases Dopamine Uptake and Psychostimulant Potency in the Striatum.” *Neuropharmacology* 101:471–79.
- Zimmermann, H. 1992. “5’-Nucleotidase: Molecular Structure and Functional Aspects.” *The Biochemical Journal* 285 (Pt 2):345–65.
- Zimmermann, H. 1996. *Biochemistry, Localization and Functional Roles of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System*. Vol. 49.
- Zimmermann, H., N. Braun, B. Kegel, and P. Heine. 1998. “New Insights into Molecular Structure and Function of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System.” *Neurochemistry International* 32(5–6):421–25.
- Zimmermann, Herbert and Norbert Braun. 1999. “Ecto-Nucleotidases—molecular Structures, Catalytic Properties, and Functional Roles in the Nervous System.” *Progress in Brain Research* 120:371–85.

Anexo A: Carta de Aprovação do CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33550

Título: INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PURINERGICO EM UM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA

Vigência: 15/09/2017 à 31/12/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI - coordenador desde 15/09/2017
DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA - pesquisador desde 15/09/2017
ELAINE ELISABETSKY - pesquisador desde 15/09/2017
Roberta Andrejew Castano - Aluno de Mestrado desde 15/09/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 86 ratos Wistar, machos, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 13 de Outubro de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética