

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-dihidroxiifenilacético (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).

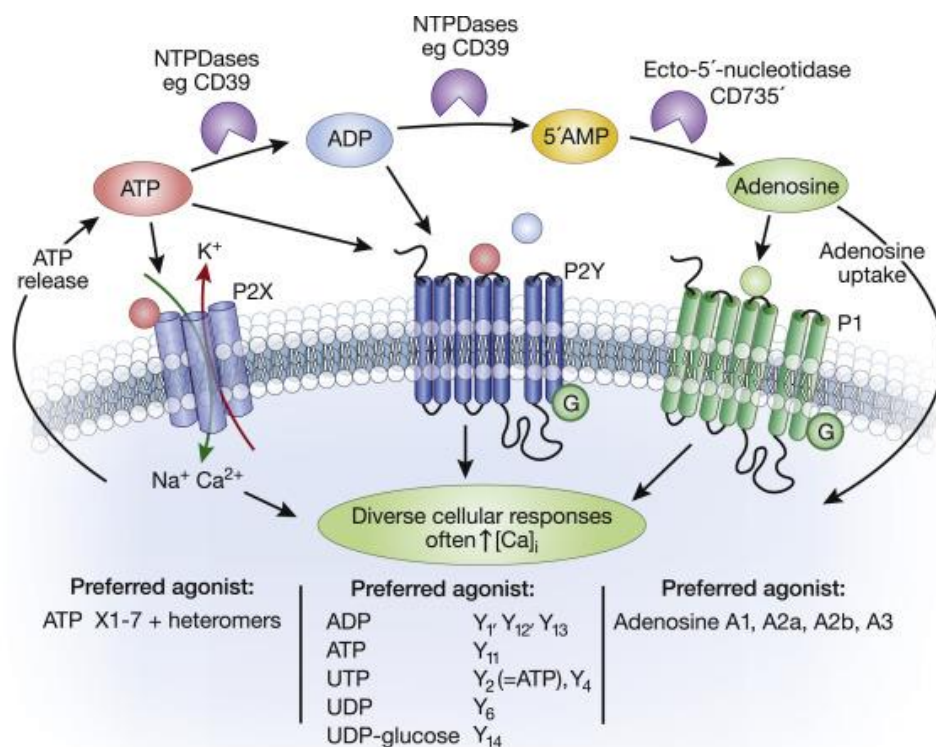


Figura 1: Visão geral da sinalização purinérgica. O sistema purinérgico é composto pelos receptores, que são divididos em P2X, P2Y e P1, e pelas ectonucleotidases, que estão representadas NTPDases (CD39), pela e pela ecto-5'-nucleotidase (CD73). O ATP pode ser liberado da célula por diversos mecanismos 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 (Cicarelli *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>

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.

Introduction

Environmental stressor in early-life, such as maternal separation or social isolation, can impair brain development and adult behavior (Möller, et al., 2013; Slotten et al., 2006; Wang et al., 2012) prompting psychiatric disorders (Brown, 2012; Leigh-Hunt et al., 2017; Owen et al., 2016). In this sense, social isolation rearing (SI) is a non-pharmacological approach that recapitulates several developmental alterations and its consequence in adult subject. The core is restrained social contact during the critical early post-natal brain development period, generally post-weaning, and maintain until adulthood. It is used to modeling neuropsychiatric conditions (Fone and Porkess, 2008).

Collectively, the behavioral changes described hitherto exhibit deficits in cognition, sensorimotor gating and locomotion (Möller et al., 2011; Möller et al., 2013a) which are consistent with inability to appropriately process environmental stimuli (Fone and Porkess, 2008). SI also results in marked changes in neurotransmission function, such as dopamine and serotonin and their metabolites (Hall et al., 1998; Möller et al., 2013b; Yorgason et al., 2015), as well as synaptic plasticity (Quan et al., 2010) and alterations of dendrites morphology in basolateral amygdala and in medial prefrontal cortex of rats (Wang et al., 2012).

The purinergic signaling system is a pathway in which purines and pyrimidine act as extracellular messengers and participates of many physiological and pathological conditions in the central nervous system (to review see Burnstock et al., 2011). Their action is determined by the balance between ATP and adenosine, regulated by an efficiently enzymatic chain named ectonucleotidases. Ectonucleotidases are divided in ecto-nucleoside

triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDases), ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs), and both hydrolyze ATP and ADP to AMP, and ecto-5'-nucleotidase, which converts AMP to adenosine (ADO) (Abbracchio et al., 2009; Zimmermann et al., 1998). Nucleotides can exert their actions on P2X ion channel receptor (P2X1-7) or on P2Y protein-coupled receptor (P2_{Y1}, P2_{Y2}, P2_{Y4}, P2_{Y6}, P2_{Y11}, P2_{Y12}, P2_{Y13}, P2_{Y14}), ATP- and ADP-sensitive. Moreover, the four subtypes of P1 receptor are sensitive to adenosine (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) (Burnstock 2007).

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is delivered to the extracellular matrix from neuronal and glial cells by several mechanisms (Pankratov et al., 2006; Zhang et al., 2007) and when released from damaged cells can act as a danger signal (Verkhasky et al., 2009). Furthermore, ATP is involved in synaptic transmission in many brain regions (as reviewed by Abbracchio et al. 2009) and can act both as fast excitatory neurotransmitter either act as a neuromodulator (Burnstock 2006). In this sense, some group of evidence has shown that this nucleotide may co-release with glutamate in the hippocampus (Mori et al., 2001) and with dopamine in the mesolimbic pathway (Krugel et al., 2003).

Regarding the ATP breakdown product, adenosine, exerts several functions in the brain, including modulation of neuronal and glial cells, neural development (Daré et al., 2007; Fellin et al., 2006) and neuroprotection (Cunha, 2005). The adenosine receptor foremost expressed in the central nervous system, A₁, has their role already established as an inhibitor on excitatory neurotransmission, through the presynaptic inhibition of glutamate release (Latini and Pedata, 2001; Thompson et al., 1992). Whereas A_{2A} receptor has excitatory actions (Latini and Pedata, 2001) in the basal ganglia, where it is prominently expressed, as well as described to facilitate the release of glutamate, GABA, glycine, acetylcholine,

noradrenaline and serotonin in different extra-striatal regions (Cunha, 2005). Moreover, both receptors are expressed in glial cells and are capable to modulate them to participate in neuron-glia interactions (Cunha, 2005) and neural development (Daré et al., 2007; Fellin et al., 2006).

As noted, purinergic signaling has a highly relevant role in brain function. Thus, the main goal of this work is to characterize this biochemical pathway in the neuropsychiatric model of social isolation rearing.

Materials and Methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), otherwise it is signaled.

Animal maintenance and rearing

At weaning (post-natal day 21) 94 males Wistar rats were randomly allocated to two groups: social isolation reared (1 animal/cage) or socially reared (3-4 animals/cage) during 8 weeks (post-natal day 77) (Quan et al., 2010). The rats were bred in the Biotério do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Both groups were handled only for sawdust change weekly to social rearing and twice a week for group housed. The rats were reared under identical conditions: cages 41 x 34 x 16 cm, temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), food and water *ad libitum*, 12:12 light-dark cycle (lights on at 7 am). Thus, the animals shared the same conditions and they could smell and hear other animals, but it was not allowed to interact with each other. Behavioral and biochemical experiments were accomplished at the

end of 8 weeks. One animal of control group died from unknown causes. The experimental procedures were according to the code of ethics in research under the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian College of Animal Experimentation (CONCEA) and this project was approved by Ethical Committee of UFRGS (protocol number 33550).

Behavioral tests

All behavioral tests were analyzed by trained experimenters blind to the groups. Animals were habituated to the experimental room at least 30 min before the test. The apparatuses were cleaned with ethanol 30% among each trial and all tests were carried out between 13h and 17h. The same animals were used to open field, Y-maze and social interaction tests. Prepulse inhibition and amphetamine-induced hyperlocomotion were carrying out on two independent experiments.

Sensorimotor gating test

Prepulse inhibition (PPI) test is widely used to analyze impairments in sensorimotor gating, caused by deficits in attentional and cognitions functions (Geyer et al., 2001). The PPI was performed in a sound-attenuated startle chamber (Insight®, São Paulo, Brazil) and the rats were placed on a movement-sensitive platform. The stabilimeter was calibrated before each session. First, the rats were habituated for 5 min acclimation period with 68 dB background level that continued throughout the test session. Posteriorly, the rats were submitted to 10 trials with white noise acoustic startle response (120 dB per 20 ms). This design was to establish a baseline of startle response at the beginning and these data were not included in the PPI analysis. The test was consisted of six different blocks with 10 trials each: the no-

stimulus trials where only the background noise was presented; trials with the 120 dB for 50 ms pulse alone; trials which prepulse stimulus (20 ms white noise, either 71 dB, 77 dB or 85 dB) was preceded 100 ms after by the onset of the startle stimulus. Each trial was delivered in a randomized manner with an average intertrial interval of 15 s (range, 10-20 s). The percentage of PPI (%PPI) was calculated according to the formula: %PPI = [100 – (startle response for Prepulse and Pulse trial)/(startle response for Pulse alone trial) x 100].

Open Field Test

Locomotor activity was assessed in an open field arena (47 cm x 47 cm x 47 cm) under 30 lux. Once placed in the center of the arena, rats were recorded during 30 min by ANY-Maze video-tracking system (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) (Domeney and Feldon, 1998; Weiss et al., 2000) Distance traveled was measured using the same software above.

Amphetamine-induced Hyperlocomotion

The stereotyped locomotion was measured by challenge with D-Amphetamine Sulfate and was performed in an open field arena (47 cm x 47 cm x 47 cm) under 30 lux. First, the animals were treated with saline and placed in the center of the arena. After 30 minutes, they were removed and injected with D-amphetamine 2 mg/kg, i.p., and returned to the arena where was allowed to explore during 60 minutes (Herrmann et al. 2014; Lapiz et al., 2003). The test was recorded and analyzed by ANY-Maze video-tracking system (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

Spontaneous Alternation Test

Working memory performance was assessed in Y-Maze apparatus consisting of three identical arms (50 cm long x 30 cm high x 10 cm wide) and converged to 120° apart. Rats were placed at the tip of the same arm and allowed to freely move for 8 min under dim lightening condition (8 lux). The test was recorded and the sequence of arm entries was analyzed manually. Each arm was namely A, B or C and an alternation were defined as the ability to switch among arms, without turn back to the arm which recently left. For example, a correct alternation was considered as ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA and wrong alternation was considered as ABA, BCB and so on. The percentage of spontaneous alternation was calculated as $(\text{total of alternation} / \text{total arm entries} - 2) \times 100$ (Maurice *et al.*, 1994).

Social interaction

In order to measure deficits in social behavior, the rat under experimentation was placed in the center of an open field arena together with an unknown naïve Wistar rat. They were allowed to interact during 10 min and the time spent in active interactive behaviors, such as anogenital sniffing, approaching and staying with the partner were scored. The test was accomplished under red light and the animal's behaviors were recorded and analyzed based on averaged scores by two blind experimenters (Möller *et al.*, 2013a).

Biochemical analysis

Purines concentration in cerebrospinal fluid (CSF)

Nucleotides and their metabolites levels were measured in CSF by high-performance liquid chromatography (HPLC). For this, anesthesia was induced and maintained with 3 % isoflurane and placed in a stereotaxic apparatus. The CSF (approximately 100 µL) was

collected by direct puncture of the cisterna magna with an insulin syringe (30 gauge). All samples were centrifuged at 10000 x g at 4 °C for 10 min and immediately after, the samples were frozen in dry ice and stored at -80 °C until analysis (Almeida et al., 2017). Before applying in HPLC, the samples were filtered with a syringe filter (Millex®-GV 0.22 µM filter, Merck Millipore, Tullagreen, IRL). The reverse-phase HPLC (Shimadzu, Japan) was performed with 30 µL cell-free CSF aliquots using a C₁₈ column (Ultra C18, 25 cm 9 4.6 mm 9 5 lm, Restek–USA) and measured at 254 nm. ATP, ADP, AMP, adenosine (ADO), guanosine (GUO), inosine (INO), hypoxanthine (HYPO), xanthine (XAN) and uric acid (UA) were measured according to a previously described method (Voelter et al., 1980) and are expressed in µM. The puncture of CSF was performed 24 hours after the social interaction test.

Ectonucleotidases activity *ex vivo*

The protocol was performed according to a method previously described (Bruno et al., 2002). Briefly, the brains were maintained at incubation medium (115 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 2 mM CaCl₂, pH 7.4 and gassed with 95% O₂ and 5% CO₂) for structures dissection. Hippocampus and striatum were transversely cut to 400 µm thick on a McIlwan tissue chopper. For hippocampus two slices and for striatum one slice per microtube were allocated for incubation. The samples were preincubated for 10 min at 37 °C with 500 µL of incubation medium and incubated for 20 min with 2.0 mM ATP, ADP and AMP to ensure the linearity of reaction. The reaction was stopped with 100 µL of 10% trichloroacetic acid. The final volume of the reaction was 500 µL and 100 µL or 50 µL, of hippocampus or striatum samples respectively, were colored with 1000 µL of the malachite green mixture to measure released Pi (Chan et al., 1986). Protein was detected by

Bradford method (Bradford, 1976) and the enzymatic activity was expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein.

Ectonucleotidases activity in synaptosomal preparation

After removal, brains were placed in an ice-cold medium I (0.32M sucrose, 5 mM Hepes, pH 7.5 and 0.1 mM EDTA) and structures were dissected. Total hippocampi (0.105 – 0.155g of tissue) and total striatum (0.096 – 0.125g of tissue) of both hemispheres were gently homogenized in 5 times of medium I with a motor-driven Teflon-glass homogenizer. The synaptosomes preparation was accomplished based on a protocol previously described by Nagy and Delgado-Escueta (1984). Briefly, after 1000 x g and 12000 x g centrifugations, the crude mitochondrial pellet was resuspended in 500 µL of medium I. The Percoll gradients were made with a stock solution of isosmotic Percoll and medium II (0.25 M sucrose, 5 mM Hepes, pH 7.2 and 0.1 mM EDTA). The samples were mixed, posteriorly, in 4 mL of 8.5% Percoll solution and, then, layered onto a discontinuous gradient of 10% and 16% Percoll solution. The synaptosomes were collected in between 10% and 16% layers and washed twice at 15000 x g for 20 min with the medium I to remove the contaminating Percoll. The synaptosome pellet was suspended to a final protein concentration of approximately 0.5 mg/mL. Protein was measured by BCA method using bovine serum albumin as standard (Smith *et al.*, 1985).

The reaction medium used to incubate 1 mM ATP and ADP was essentially the same as described by Battastini and collaborators (1991) (5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 0.1 mM EDTA, 10 mM glucose, 225 mM sucrose and 45 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0). The incubation medium for AMP contained 10 mM MgCl₂, 0.15 M sucrose, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0

(Heymann et al., 1984). Around 15 μg of synaptosomes was added to 200 μL incubation medium and were preincubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. ATP, ADP and AMP (final concentration in 1 mM) were incubated for 30 min and the reaction was stopped added 200 μL of 10% trichloroacetic acid. In all enzymes assays, incubations times, sample dilutions and protein concentration were chosen in order to ensure the linearity of reactions. Controls to correct nonenzymatic hydrolysis were composed of the incubation medium, substrate and synaptosomes, after the reaction was stopped were used. The Pi released was measured by Chan and collaborators (1986) as described above. The enzymatic activity was expressed as nmol Pi/min/mg protein.

mRNA analysis RT-PCR

Total RNA from the prefrontal cortex, hippocampus and striatum were isolated with TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) under the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with Reverse Transcription System (Promega® Corporation, Madison, WI, USA) from 2 μg RNA, according to the manufacturer's instructions. An RT-PCR reaction was performed with the PCR Mastex Mix of Promega® Corporation in a final volume of 20 μL . The cycling settings consisted in an initial denaturation for 2 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, the following sequence of 35 cycles was carried out; denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 15s, primer annealing at 58 – 62 $^{\circ}\text{C}$ for 15s, and extension at 72 $^{\circ}\text{C}$ for 15s. The PCR was ended by a 5 min incubation at 72 $^{\circ}\text{C}$. The housekeeping gene used was actin beta (actb gene) and beta-2 microglobulin (b2m). The RT-PCR reaction were separated on a 2% agarose gel containing SYBR® Safe DNA and visualized by Geliance 600 Imaging System (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). A negative control was performed by substituting the templates with DNase/RNase-free distilled water in each RT-PCR reaction.

Real-time PCR analysis was performed in the StepOne™ Real-Time PCR Systems Instrument (Applied Biosystems®, Foster City, CA) using the PowerUp SYBR™ Green Master Mix amplification system, according to manufacturer's instructions and respective forward and reverse primers (10 μM). All results were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak et al., 1995), using for determination of relative expression data, taking β -2 microglobulin and β -actin gene expression as an endogenous control for normalization, when appropriate. A negative control was performed by substituting the templates with DNase/RNase-free distilled water in each reaction. Primers details are described in table 1.

Statistical analysis

First of all, the data were tested for Gaussian distribution using the Shapiro-Wilk normality test. For parametric distribution, we used two-tailed unpaired t test or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* multiple comparisons to identify group differences, when appropriate. Nonparametric data were analyzed with the Mann Whitney test. The data were analyzed using GraphPad Prism software version 6.0 for Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA) and significance was set at $p < 0.05$ and all data are expressed as mean \pm standard deviation.

Results

Social isolation promotes tenuous behavioral alterations

Sensorimotor gating test

Social isolation from postnatal day 21 produced a larger amplitude on startle response (1724 ± 91.53) when compared with group housed (1556 ± 157.3 ; $p = 0.0103$, t test) (Figure 1A).

Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis showed no differences between groups in percentage of prepulse inhibition at 71 dB (GH: -0.967 ± 5.6 ; SI: 0.458 ± 3.805 ; $p > 0.05$) in contrast with an impairment in prepulse inhibition at 77 dB (GH: 13.687 ± 10.17 ; SI: 3.504 ± 6.684 ; $p = 0.015$) and 85 dB (GH: 24.065 ± 8.462 ; SI: 9.602 ± 9.034 ; $p = 0.0004$) in socially isolated rats (Figure 1B). Additionally, two-way ANOVA analysis demonstrated a significant effect on prepulses intensities ($F(2, 51) = 24.18$, $p < 0.0001$) and in rearing condition ($F(1, 51) = 14.88$, $p = 0.003$), as well as the interaction between the two factors ($F(2, 51) = 5.594$, $p = 0.0064$)

Locomotor activity

In the open field apparatus, we did not find any differences in the distance travelled during 30 minutes (GH: $46.33 \text{ m} \pm 15.24$; SI: $43.77 \text{ m} \pm 10.83$; $p > 0.05$, *t* test) (Figure 1C). In order to see any difference on the stereotyped locomotion, we challenged all the animals with *d*-amphetamine 2 mg/kg. There are not any differences between groups to the amphetamine challenge along 60 minutes of test ($p > 0.05$ in all times), as well as we did not see any alterations in basal locomotor activity when the rats received saline injection ($p > 0.05$) (Figure 1D).

Working memory

Both groups presented similar percentage of spontaneous alternation in the Y-Maze (GH: 56.55 ± 11.92 ; SI: 63.97 ± 12.14 ; $p > 0.05$, *t* test) (Figure 1E), showing that isolation rearing did not promote impairment in working memory.

Social interaction

In the social interaction test, the total time of interaction with unknown animal was increase in the SI group when compared with control (GH: 121.8 ± 21.04 s; SI: 224.6 ± 22.60 s, $p < 0.0001$, t test) (Figure 1F).

Social isolation rearing modifies the ectonucleotidases functionality by the ADP hydrolysis

Purines level in the CSF

In order to investigate the potential role of purinergic system in the current model, we first evaluate the concentration of nucleotides and their metabolites in the CSF. HPLC analysis detected only an accumulation of ADP in the CSF of social isolated rats (GH: 1.385 ± 0.0471 μM ; SI: 2.714 ± 1.459 μM ; $p = 0.0006$, Mann-Whitney test). Additionally, we did not find any difference in ATP (GH: 3.324 ± 0.827 μM ; SI: 4.149 ± 0.879 μM ; $p > 0.05$, t test), AMP (GH: 0.982 ± 0.041 μM ; SI: 0.991 ± 0.038 μM ; $p > 0.05$, t test), adenosine (GH: 0.425 ± 0.154 μM ; SI: 0.362 ± 0.204 μM ; $p > 0.05$, t test), guanosine (GH: 0.238 ± 0.053 μM ; SI: 0.241 ± 0.02 μM ; $p > 0.05$, t test), inosine (GH: 0.420 ± 0.190 μM ; SI: 0.660 ± 0.762 μM ; $p > 0.05$, Mann-Whitney test), hypoxanthine (GH: 0.711 ± 0.378 μM ; SI: 0.817 ± 0.700 μM ; $p > 0.05$, t test), xanthine (GH: 3.294 ± 0.615 μM ; SI: 2.920 ± 0.437 μM ; $p > 0.05$, t test) and uric acid (GH: 11.63 ± 1.588 μM ; SI: 11.41 ± 1.678 μM ; $p > 0.05$, Mann-Whitney test) levels (Figure 2A-I).

Ectonucleotidases activity in *in vitro* assay

Purines metabolism in the social isolated rats demonstrate an increase of ADP compared with control group. To further explore the ectonucleotidases activity in the synaptic terminal, we performed synaptosomal preparation to measure their activity in a subcellular neuronal fraction. Social isolation induced an increase in the ADP hydrolysis in the hippocampus (GH:

46.95 ± 10.21; SI: 59.72 ± 5.99; p = 0.0171, *t* test) and in the striatum (GH: 43.22 ± 10.56; SI: 62.54 ± 6.24; p = 0.0018, *t* test). ATP (GH: 189.7 ± 41.82; SI: 200.5 ± 16.96; p > 0.05, *t* test, hippocampus; ATP GH: 203.6 ± 74.56; SI: 237.3 ± 41.55; p > 0.05, *t* test, striatum) and AMP (GH: 18.32 ± 8.586; SI: 18.53 ± 9.593; p > 0.05, *t* test, hippocampus; GH: 21.98 ± 14.36; SI: 29.50 ± 17.14; p > 0.05, *t* test, striatum) hydrolysis did not show any differences in the both structures (Figure 3A-F). One outlier was removed in ADP analysis in the hippocampus and striatum by an aberrant data that is not normally seen in the literature. We only performed this analysis in these two structures once the prefrontal cortex does not yield enough content to accomplish this experiment.

Ectonucleotidases activity in *ex vivo* preparation

With the intention to demonstrate the function of ectonucleotidases in the tissue, we analyzed the nucleotides hydrolysis in the hippocampus and striatum slices. We did not observe any differences in ATP (GH: 49.65 ± 15.82; SI: 36.74 ± 13.07; p > 0.05, *t* test), ADP (GH: 32.01 ± 10.82; SI: 24.07 ± 11.52; p > 0.05, *t* test) and AMP (GH: 13.82 ± 3.549; SI: 10.22 ± 9.448; p > 0.05, *t* test) hydrolysis in the hippocampus. In the striatum, isolation rearing did not induce alterations in the ATPase (GH: 32.53 ± 15.77; SI: 29.53 ± 8.706; p > 0.05, *t* test), ADPase (GH: 23.54 ± 3.350; SI: 18.09 ± 10.72; p > 0.05, *t* test) and AMPase (GH: 7.528 ± 2.954; SI: 9.066 ± 6.869; p > 0.05, *t* test) activities (Figure 4A-F). We only performed this analysis in these two structures once the prefrontal cortex does not yield enough slices to accomplish this experiment.

Purinergic receptors seem to be involved in social isolation pathogenesis

Gene expression of purinergic components

Besides establishing the ectonucleotidases functioning in the hippocampus and striatum, we pursued if other components of the purinergic system would be involved. For this, we first performed RT-PCR in order to filter the genes differentially expressed to accomplish RT-qPCR posteriorly. The genes that appeared with alteration expression between groups in the prefrontal cortex were *p2rx5*, *adora2a*, *p2ry1* and *slc29a1*; in the striatum were *adora2a*, *p2rx1*, *p2rx4*, *p2ry2*, *p2ry6*, *p2ry12*, *p2ry13* and *entpd3*; and in the hippocampus were *p2rx1*, *p2ry1*, *p2ry4*, *p2ry13*, *p2ry14* and *entpd3* (data not shown).

Quantitative PCR revealed several alterations in the gene expression of purinergic components, mainly purinergic receptors. Social isolation rearing increased the expression of *adora2a* (GH: 1.032 ± 0.278 ; SI: 2.548 ± 0.981 ; $p = 0.0020$, *t* test) (Figure 5A), *p2rx5* (GH: 1.082 ± 0.462 ; SI: 2.763 ± 1.255 ; $p = 0.0061$, *t* test) (Figure 5B), *p2ry1* (GH: 1.045 ± 0.319 ; SI: 2.394 ± 0.764 ; $p = 0.0010$, *t* test) (Figure 5C) and did not modify the expression of *slc29a1* (GH: 1.050 ± 0.345 ; SI: 1.691 ± 0.715 ; $p > 0.05$, *t* test) (Figure 5D) in the prefrontal cortex.

On the other hand, *adora2a* (GH: 1.111 ± 0.489 ; SI: 0.4027 ± 0.1727 ; $p = 0.0036$, *t* test) (Figure 6A), *p2rx4* (GH: 1.045 ± 0.313 ; SI: 0.424 ± 0.187 ; $p = 0.0007$, *t* test) (Figure 6B), *p2ry2* (GH: 1.045 ± 0.345 ; SI: 0.508 ± 0.236 ; $p = 0.0041$, Mann-Whitney) (Figure 6C), *p2ry6* (GH: 1.024 ± 0.232 ; SI: 0.572 ± 0.17 ; $p = 0.0013$, *t* test) (Figure 6D), *p2ry12* (GH: 1.029 ± 0.251 ; SI: 0.513 ± 0.047 ; $p = 0.0002$, *t* test) (Figure 6E), *p2ry13* (GH: 1.018 ± 0.09 ; SI: 0.54 ± 0.144 , $p = 0.0003$, *t* test) (Figure 6F), *entpd1* (GH: 1.025 ± 0.25 ; SI: 0.4702 ± 0.137 ; $p = 0.0002$, *t* test) (Figure 6G), *entpd2* (GH: 1.033 ± 0.26 ; SI: 0.5059 ± 0.32 ; $p = 0.0053$, *t* test) (Figure 6H) and *entpd3* (GH: 1.183 ± 0.715 ; SI: 0.247 ± 0.156 ; $p = 0.0054$, *t* test) (Figure 6I)

were downregulated in the striatum. *P2rx1* (GH: 1.070 ± 0.451 ; SI: 0.738 ± 0.319 ; $p > 0.05$, *t* test) (Figure 6J) was not differentially expressed.

Furthermore, in the hippocampus the *p2ry4* (GH: 1.114 ± 0.539 ; SI: 0.518 ± 0.201 ; $p = 0.0179$, *t* test) (Figure 7A), *p2ry13* (GH: 1.017 ± 0.198 ; SI: 0.814 ± 0.127 ; $p = 0.0411$, *t* test) (Figure 7B) and *p2ry14* (GH: 1.154 ± 0.619 ; SI: 0.384 ± 0.165 ; $p = 0.0070$, Mann-Whitney) were reduced in social isolated animals, whereas *p2rx1* (GH: 1.029 ± 0.282 ; SI: 0.904 ± 0.377 ; $p > 0.05$, *t* test) (Figure 7C), *p2ry1* (GH: 1.019 ± 0.232 ; SI: 1.126 ± 0.2 ; $p > 0.05$, Mann-Whitney) (Figure 7D), and *entpd3* (GH: 1.37 ± 1.409 ; SI: 0.486 ± 0.469 ; $p > 0.05$, Mann-Whitney) (Figure 7E) did not demonstrated any differences in gene expression.

Discussion

Initially, we showed that Wistar rats isolated for 8 weeks presented mild behavioral alterations. The isolated animals had an augmentation of startle response and a disruption on 77 dB and 85 dB prepulse intensities in the rate of prepulse inhibition and an increase of total time spent interacting with an unknown rat. The dysfunction of sensorimotor gating is well described in this animal model (Chang et al., 2015; Möller et al., 2013a; Murphy et al., 2010; Wang et al., 2012), while other behavioral alterations are controversial, such as locomotor activity (Ferdman et al., 2007; Hall et al., 1998; Ko and Liu, 2015; Wang et al., 2012; Weiss et al., 2000), cognition (Hellemans et al., 2004; Möller et al., 2013a; Quan et al., 2010; Schrijver et al., 2004; Weiss et al., 2001) and social interaction (Ferdman et al., 2007; Möller et al., 2011; Möller et al., 2013a; Wongwitdecha and Marsden, 1996; Oliveira et al., 2019).

These discrepancies presented in the behavioral tasks may be explained by the strain differences. It was demonstrated that Wistar rats are less sensitive to PPI processing than

Lister hooded and Sprague-Dawley rats (Varty and Higgins, 1994). Regarding to the social isolation model, evidences points that Sprague-Dawley rats begin to manifest the impairments of isolation rearing after 4 weeks, while Lister hooded rats start to presented the same injury after 7 weeks of isolation (Bakshi and Geyer, 1999). Moreover, the robustness of PPI deficits is less apparent in Wistar rats (Domeney and Feldon, 1998; Weiss et al., 2000), than in Sprague-Dawley (Geyer *et al.* 1993; Ko and Liu 2015; Möller *et al.* 2013a)(Geyer et al., 1993; Ko and Liu, 2015; Möller et al., 2013a), Lister hooded (Cilia et al., 2001; Day-Wilson et al., 2006; Varty et al., 1999) or Long-Evans rats (Binder et al., 2001; Powell et al., 2003). Therefore, the lack of behavioral manifestation in the present work could be explained by the strain used.

A study analyzed the sensorimotor gating response and locomotor activity in different times of isolation. Interestingly, the PPI disruption was apparent in 4 weeks of isolation, while the socially isolated rats presented an increase of locomotion after 2 weeks of isolation (Bakshi and Geyer, 1999). These results demonstrate that two behaviors are independent and the locomotion seems to be a short-term consequence and the sensorimotor gating impairment seems to be a long-term consequence, which would explain our results about the traveled distance and the rate of prepulse inhibition.

Another controversial result in the literature is the highly sensitivity of isolated rats to the *d*-amphetamine-induced hyperlocomotion (Fabricius et al., 2010; Herrmann et al., 2014; Jones et al., 1992; Pritchard et al., 2013; Smith et al., 1997; Weiss et al., 2001). On the other hand, more consistent results to *d*-amphetamine sensitivity comprises the increase of release of dopamine in the accumbens nucleus, prefrontal cortex and caudate putamen (Fabricius et al.,

2011; Jones et al., 1992) and increase the inhibition of dopamine uptake in the nucleus accumbens and dorsal medial striatum (Yorgason et al., 2015) in socially isolated animals.

The fine tuning of extracellular nucleotides is promoted by ectonucleotidases functioning, which guarantees a homeostatic regulation (Fields and Burnstock, 2006) to prevent pathological processes (Burnstock, 2008). As far as we know, this is the first work to demonstrate the nucleotides levels, and their breakdown products, in the CSF in the neuropsychiatric social isolation model. Broadly speaking, our results show that there is no evident imbalance of extracellular purines in the CSF, however, ADP is accumulating, whereas ATP seems to be a tendency of accumulation. Noteworthy, ADP is the endogenous agonist of P2Y₁R, P2Y₁₂R and P2Y₁₃R (Abbracchio et al., 2009) that were all found differentially expressed in the socially isolated rats, which became evident the contribution of purinergic signaling in this model. Additionally, P2Y₁R is upregulated in the prefrontal cortex suggesting a possible over activation of this receptor. GUO is gaining attention in the last years and it has been demonstrated their modulation of glutamatergic neurotransmission (Tasca et al., 1998), antioxidant (Tasca et al., 2018), and antidepressant properties (Bettio et al., 2014). Few studies investigate possible role of GUO in neuropsychiatric conditions and our analysis showed that GUO is not altered in the social isolation model.

The well-known synaptic activity of ectonucleotidases (Zimmermann, 1996; Zimmermann and Braun, 1999) made us inquire whether post-weaning social isolation could modulate the ectonucleotidases functionality in synaptosomal preparation. Here, we show that isolation rearing induces an increase of ADP hydrolysis in hippocampus and striatum synaptosomes. These results may suggest that long periods of isolation prompt the necessity to an increase of ADP metabolism in the synaptic cleft. This could be a compensatory mechanism, once

ATP or ADP accumulation can lead to pro-inflammatory pathways (Chakfe et al., 2002), neuron death (Bernardino et al., 2008) or astrogliosis (Franke et al., 2001). There are no differences in the ATP, ADP or AMP hydrolysis pattern in *ex vivo* slices of hippocampus and striatum, indicating that the presence of neurons and glial cells are regulating between them.

After establishing the role of ectonucleotidases, our next goal was to verify the gene expression of the constituents of purinergic signaling. The A_{2A} receptor (A_{2A}R) is widely studied and have many functions described, such as neuroinflammation process (Rebola et al., 2011), NMDA modulation (Rebola et al., 2008) and the activation of this receptor could lead to an impairment of short-term memory (Pagnussat et al., 2015). A very interesting study evidenced that striatal A_{2A}R inactivation was able to increase the psychostimulants effects, whereas the same inactivation of forebrain A_{2A}R diminished the psychostimulants effects (Shen et al., 2008). Remarkably, post-weaning social isolation showed upregulation of *adora2a* expression in the prefrontal cortex and downregulation of expression in the striatum. It could be possible to prefrontal cortex positively modulate glutamate release, may occurring in glutamatergic excitotoxicity. Although the behavioral test used did not detect impairments in working memory, the increase of A_{2A}R expression might induce cognitive deficits (Pagnussat et al., 2015; Pereira et al., 2005; Takahashi et al., 2008). It is well described the functional striatal heteromer between A_{2A}R and dopamine receptor 2 (D2R) in which D2R diminish their affinity by dopamine when adenosine binds in A_{2A}R (Ferré et al., 2016). Regarding striatal A_{2A}R in isolation rearing rats, our results indicate the dopamine affinity is augmented by D2R, which may lead to dopaminergic hyperactivity and glutamatergic hypoactivity. To the best of our knowledge, this is the first study that found this opposite

modulation in gene expression of A_{2A}R striatal and extra-striatal structures in a nonpharmacological neuropsychiatric model.

The pathological role of P2Y₁ receptor (P2Y₁R) has been assigned to astrocytic reactivity (Bowser and Khakh, 2007; Fam et al., 2003; Neary et al., 2003) coupled to glutamate exocytosis (Domercq et al., 2006). A relevant study showed impairments in cognition response, including PPI paradigm, via prefrontal cortex and an increase of dopamine release in the prefrontal cortex and nucleus accumbens by P2Y₁R activation with MRS2365 agonist (Koch et al., 2015). In the present study, socially isolated rats presented upregulation of *p2ry1* in the prefrontal cortex. Together with the result of the accumulation of ADP in CSF, it is possible to consider that this receptor could be aberrantly activated. Moreover, it is feasible suppose that PPI deficit may be caused, at least partially, by this upregulation.

Microglia cells express the ionotropic receptor P2X₄ and P2X₇ and metabotropic receptors P2Y₆, P2Y₁₂ and P2Y₁₃ (Calovi et al., 2018). The pharmacological blockade of P2X₄R and P2Y₁₂R suppress the microglia chemotaxis (Ohsawa et al., 2007) and the microglia of knockout mice to P2Y₁₂R presented normal motility, but are unable to polarize, migrate and extend their processes (Haynes et al., 2006), may indicating it as a marker of healthy microglia (Mildner et al., 2017). Here we show the dysfunction induced by rearing condition of both receptors in the striatum suggesting that isolated rats might have impairments in chemotaxis, migration and polarization.

On the other hand, under physiological conditions P2Y₆R is almost no expressed in microglial cells (Koizumi et al., 2013) and when activated by UDP their motility increase and the phagocytosis processes are initiated, acting as a phagocytic receptor (Inoue et al.,

2009; Koizumi et al., 2007). *P2ry6* seems to be decreased in socially isolated rats, thus, under a challenge of immune system it is possible to consider that isolated rearing rats would present impairments in phagocytic response in the brain and under basal conditions this alteration may not be manifested.

Recent studies propose P2Y₁₃R role in release of pro-inflammatory cytokines (Liu et al., 2017), in the suppression of astroglial proliferation, via microglial cells (Quintas et al., 2018) and microglial P2Y₁₃R seems to attenuate the neural progenitor proliferation in the hippocampus, suggesting a key role in the homeostatic control of neurogenesis (Stefani et al., 2018). Moreover, P2Y₁₃R deletion reduced the microglial complexity and extension process, indicating the possible participation in the microglial structure (Stefani et al., 2018). Our RT-qPCR analysis evidenced *p2ry13* downregulation in the hippocampus and striatum of isolation rearing animals that may imply in deficits of physiological control of neurogenesis, indirect suppression of astroglial proliferation and microglial formation. A study described that short period of isolation was able to inhibit neurogenesis process induced by physical exercise (Leasure and Decker, 2009) and we suppose that P2Y₁₃R may be mediating this event.

Few studies were conducted to elucidate the role of P2X₅, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₁₄ receptors in the brain. P2X₅R seems co-localized with neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase on the hypothalamus, would may exert hypoxia related function (Xiang et al., 2006) and in different areas of developing cerebellum (Xiang and Burnstock, 2005). It was suggested that P2X_{1/5} heteromer may contribute with NMDA receptor signaling in cortical astrocytes (Palygin et al., 2010). P2Y₂R seems to modulate integrins activation, astrogliosis, growth factor, cellular proliferation and migration (Peterson et al., 2010) and their function

in the brain pathologies is mainly linked to Alzheimer disease (Ajit et al., 2014; Kim et al., 2012). It was proposed that P2Y₄R is localized in presynaptic of glutamatergic neurons in the hippocampus and may inhibit its release (Rodrigues *et al.* 2005) and in the hypothalamus (Sergeeva et al., 2006) which have an early postnatal expression peak, indicating a possible modulation of neuronal migration and differentiation (Sergeeva et al., 2006). P2Y₁₄R are poorly studied although it is known their broadly distribution in the brain (Chambers et al., 2000). Our results of gene expression demonstrate a downregulation of *p2ry2* in the striatum and *p2ry4* and *p2ry14* in the hippocampus in post-weaning social isolation group. To better understand the potential role of these receptors in neuropsychiatric models, more studies are necessary to unveil the physiological functions.

Finally, our RT-qPCR analysis showed a decreased expression of *entpd1*, *entpd2* and *entpd3* genes, although no difference on ectonucleotidases activity was found on striatum and hippocampus slices. These appearing divergent results could be explained by possible post-translational regulation mechanisms and should be further investigated.

Summarizing, we provide relevant and completely new data concerning purinergic signaling in a neurodevelopmental neuropsychiatric model. We evidenced that post-weaning social isolation promotes alterations in sensorimotor gating and social interaction. Concerning the purinergic system there was an accumulation of ADP in cerebrospinal fluid and an increase of ADP hydrolysis in synaptic cleft of hippocampus and striatum of isolation reared rats. We highlight the several differentially expressed genes induced by this model. Our data indicated, in the prefrontal cortex, an upregulation of genes that may outcome in negative modulation of dopamine and glutamate, deficits in sensorimotor gating and cognitive functions. Few evidences regarding the CNS functionality of receptors modulated in the hippocampus are

available. However, they seem to be involved in the astrocytic proliferation, neurogenesis control and microglia structuring. We demonstrated that social isolation mainly affects the purinergic receptors in the striatum. These receptors are related to chemotaxis, polarization, migration and phagocytic functions of microglia, dopamine modulation and neurogenesis control. Although the isolation rearing exhibits mild behavioral impairments, we now provide genetic evidence that purinergic signaling may be modulating several neurobiological alterations already shown in the literature. Gathering the results we can presume neurochemical similarities with neuropsychiatric conditions, mainly schizophrenia (to review, see Burnstock et al., 2011).

As far as we know, we are the first work that evidenced alterations in purinergic signaling parameters in a non-pharmacological neurodevelopmental model. Several modifications presented here were discussed based on the previous studies findings and some of these receptors do not have their functions well described in the literature, demonstrating huge demand for further studies in this area.

Acknowledgments

This study was supported by the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001; INCT.MCTI/CNPq/CAPES/FAPERGS (project number 465671/2014-4), CNPq/PQ (project number 302879/2017-0), FAPERGS PQG (project number 17/2551- 0000 970-3) and FAPERGS/PRONEX (project number 16/2551- 0000473-0). RA is recipient of scholarships from CNPq/Brazil and CEJM from CAPES/ Brazil.

References

- Abbracchio M. P., Burnstock G., Verkhratsky A., Zimmermann H. (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**, 19–29.
- Ajit D., Woods L. T., Camden J. M., Thebeau C. N., El-Sayed F. G., Greeson G. W., Erb L., et al. (2014) Loss of P2Y2 nucleotide receptors enhances early pathology in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **49**, 1031–1042.
- Almeida R. F., Cereser V. H., Faraco R. B., Böhmer A. E., Souza D. O., Ganzella M. (2010) Systemic administration of GMP induces anxiolytic-like behavior in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **96**, 306–311.
- Almeida R. F., Comasseto D. D., Ramos D. B., Hansel G., Zimmer E. R., Loureiro S. O., Ganzella M., Souza D. O. (2017) Guanosine Anxiolytic-Like Effect Involves Adenosinergic and Glutamatergic Neurotransmitter Systems. *Mol. Neurobiol.* **54**, 423–436.
- Bakshi V. P., Geyer M. A. (1999) Ontogeny of isolation rearing-induced deficits in sensorimotor gating in rats. *Physiol. Behav.* **67**, 385–392.
- Battastini A. M. O., Rocha J. B. T. da, Barcellos C. K., Dias R. D., Sarkis J. J. F. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* **16**, 1303–1310.
- Bernardino L., Balosso S., Ravizza T., Marchi N., Ku G., Randle J. C., Malva J. O., Vezzani A. (2008) Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: A crucial role of P2X7receptor-mediated IL-1 β

release. *J. Neurochem.* **106**, 271–280.

Bettio L. E. B., Freitas A. E., Neis V. B., Santos D. B., Ribeiro C. M., Rosa P. B., Farina M., Rodrigues A. L. S. (2014) Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **127**, 7–14.

Binder E. B., Kinkead B., Owens M. J., Kilts C. D., Nemeroff C. B. (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**, 601–608.

Bowser D. N., Khakh B. S. (2007) Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes. *J. Gen. Physiol.* **129**, 485–491.

Bradford M. M. (1976) Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plásticos En Colombia Rotoplast. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Brown A. S. (2012) Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev. Neurobiol.* **72**, 1272–1276.

Bruno A. N., Bonan C. D., Wofchuk S. T., Sarkis J. J. F., Battastini A. M. O. (2002) ATP diphosphohydrolase (NTPDase 1) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on the enzyme activity in different phases of development. *Life Sci.* **71**, 215–225.

Burnstock G. (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 166–176.

Burnstock G. (2007) Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission.

Physiol. Rev. **87**, 659–797.

Burnstock G. (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **7**(7):575-90. doi: 10.1038/nrd2605.

Burnstock G., Krügel U., Abbracchio M. P., Illes P. (2011) Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* **95**, 229–274.

Calovi S., Mut-Arbona P., Sperlágh B. (2018) Microglia and the Purinergic Signaling System Stefano. *Neuroscience* December.

Chakfe Y., Seguin R., Antel J. P., Morissette C., Malo D., Henderson D., Seguela P. (2002) ADP and AMP Induce Interleukin-1beta Release from Microglial Cells through Activation of ATP-Primed P2X7 Receptor Channels. *J. Neurosci.* **22**, 3061–3069.

Chambers J. K., Macdonald L. E., Sarau H. M., Ames R. S., Freeman K., Foley J. J., Zhu Y., et al. (2000) A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* **275**, 10767–10771.

Chan K., Delfert D., Junger K. D. (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* **157**, 375–380.

Chang C. H., Hsiao Y. H., Chen Y. W., Yu Y. J., Gean P. W. (2015) Social isolation-induced increase in NMDA receptors in the hippocampus exacerbates emotional dysregulation in mice. *Hippocampus* **25**, 474–485.

Cilia J., Reavill C., Hagan J. J., Jones D. N. C. (2001) Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **156**, 327–337.

- Cunha R. A. (2005) 2005 A1activation to A2a.pdf. 111–134.
- Daré E., Schulte G., Karovic O., Hammarberg C., Fredholm B. B. (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol. Behav.* **92**, 15–20.
- Day-Wilson K. M., Jones D. N. C., Southam E., Cilia J., Totterdell S. (2006) Medial prefrontal cortex volume loss in rats with isolation rearing-induced deficits in prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience* **141**, 1113–1121.
- Domeney A., Feldon J. (1998) The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the wistar rat: How robust is the effect? *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**, 883–890.
- Domercq M., Brambilla L., Pilati E., Marchaland J., Volterra A., Bezzi P. (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: Control by tumor necrosis factor- α and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* **281**, 30684–30696.
- Fabricius K., Helboe L., Fink-Jensen A., Wörtwein G., Steiniger-Brach B., Sotty F. (2010) Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: An electrophysiological study. *Neurosci. Lett.* **482**, 117–122.
- Fabricius K., Steiniger-Brach B., Helboe L., Fink-Jensen A., Wörtwein G. (2011) Socially isolated rats exhibit changes in dopamine homeostasis pertinent to schizophrenia. *Int. J. Dev. Neurosci.* **29**, 347–350.
- Fam S. R., Gallagher C. J., Kalia L. V., Salter M. W. (2003) Differential Frequency Dependence of P2Y1- and P2Y2- Mediated Ca²⁺ Signaling in Astrocytes. *J. Neurosci.* **23**, 4437–4444.
- Fellin T., Pascual O., Haydon P. (2006) Astrocytes Coordinate Synaptic Networks: Balanced

Excitation and Inhibition. *Physiology* **21**, 208–215.

Ferdman N., Murmu R. P., Bock J., Braun K., Leshem M. (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. *Behav. Brain Res.* **180**, 174–182.

Ferré S., Bonaventura J., Tomasi D., Navarro G., Moreno E., Cortés A., Lluís C., Casadó V., Volkow N. D. (2016) Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2receptor heterotetramer. *Neuropharmacology* **104**, 154–160.

Fields R.D., Burnstock G. (2006). Purinergic signalling in neuron–glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7: 423–436.

Fone K. C. F., Porkess M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-Relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **32**, 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.

Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L., Swerdlow N. R. (2001) *Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: A decade in review.*

Geyer M. A., Wiliinson L. S., Humby T., Robbins T. W. (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **34**, 361–372.

- Hall F. S., Wilkinson L. S., Humby T., Inglis W., Kendall D. A., Marsden C. A., Robbins T. W. (1998) Isolation rearing in rats: Pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**, 859–872.
- Haynes S. E., Hollopeter G., Yang G., Kurpius D., Dailey M. E., Gan W. B., Julius D. (2006) The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* **9**, 1512–1519.
- Hellems K. G. C., Bengel L. C., Olmstead M. C. (2004) Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Dev. Brain Res.* **150**, 103–115.
- Herrmann A. P., Benvenutti R., Pilz L. K., Elisabetsky E. (2014) N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. *Schizophr. Res.* **155**, 109–111.
- Heymann D., Reddington M., Kreutzberg G. (1984) Subcellular Localization of 5'-Nucleotidase in Rat Brain. *J. Neurochem.* **43**, 971–8.
- Inoue K., Koizumi S., Kataoka A., Tozaki-Saitoh H., Tsuda M. (2009) Chapter 12 P2Y₆-Evoked Microglial Phagocytosis. *Int. Rev. Neurobiol.* **85**, 159–163.
- Jones G. H., Hernandez T. D., Kendall D. A., Marsden C. A., Robbins T. W. (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: Study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **43**, 17–35.
- Kim H. J., Ajit D., Peterson T. S., Wang Y., Camden J. M., Wood W. G., Sun G. Y., Erb L., Petris M., Weisman G. A. (2012) Nucleotides released from A β 1-42-treated microglial

- cells increase cell migration and A β 1-42 uptake through P2Y₂ receptor activation. *J. Neurochem.* **121**, 228–238.
- Ko C. Y., Liu Y. P. (2015) Isolation rearing impaired sensorimotor gating but increased pro-inflammatory cytokines and disrupted metabolic parameters in both sexes of rats. *Psychoneuroendocrinology* **55**, 173–183.
- Koch H., Bernalov A., Drescher K., Franke H., Krügel U. (2015) Impaired cognition after stimulation of P2Y₁ receptors in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **40**, 305–314.
- Koizumi S., Ohsawa K., Inoue K., Kohsaka S. (2013) Purinergic receptors in microglia: Functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* **61**, 47–54.
- Koizumi S., Shigemoto-Mogami Y., Nasu-Tada K., Shinozaki Y., Ohsawa K., Tsuda M., Joshi B. V., Jacobson K. A., Kohsaka S., Inoue K. (2007) UDP acting at P2Y₆ receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091–1095.
- Kruegel U., Kittner H., Franke H., Illes P. (2003) Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. *Synapse* **47**, 134–142.
- Lapiz M.D., Fulford A., Muchimapura S., Mason R., Parker T., Marsden C.A. (2001). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behaviour and neurotransmission. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 87(6):730-51.
- Latini S., Pedata F. (2001) Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* **79**, 463–484.
- Leasure J. L., Decker L. (2009) Social isolation prevents exercise-induced proliferation of

hippocampal progenitor cells in female rats. *Hippocampus* **19**, 907–912.

Leigh-Hunt N., Bagguley D., Bash K., Turner V., Turnbull S., Valtorta N., Caan W. (2017)

An overview of systematic reviews on the public health consequences of social isolation and loneliness. *Public Health* **152**, 157–171.

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* **26**;10:1755-1767.

Livak K. J., Flood S. J., Marmaro J., Giust, W., Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with

fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization', *PCR Methods Appl*, 4:357-62.

Masahiro Mori, Christian Heuss, Beat H. Gähwiler, Urs Gerber (2001) Fast synaptic

transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* **535**, 115–123.

Maurice T., Hiramatsu M., Kameyama T., Hasegawa T., Nabeshima T. (1994).

Cholecystokinin-related peptides, after systemic or central administration, prevent carbon monoxide-induced amnesia in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **269**(2):665-73.

Mildner A., Huang H., Radke J., Stenzel W., Priller J. (2017) P2Y₁₂receptor is expressed on

human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia* **65**, 375–387.

Möller M., Preez J. L. Du, Emsley R., Harvey B. H. (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. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **21**, 471–483.
- Möller M., Preez J. L. Du, Viljoen F. P., Berk M., Emsley R., Harvey B. H. (2013a) Social isolation rearing induces mitochondrial, immunological, neurochemical and behavioural deficits in rats, and is reversed by clozapine or N-acetyl cysteine. *Brain. Behav. Immun.* **30**, 156–167.
- Möller M., Preez J. L. Du, Viljoen F. P., Berk M., Harvey B. H. (2013b) N-acetyl cysteine reverses social isolation rearing induced changes in cortico-striatal monoamines in rats. *Metab. Brain Dis.* **28**, 687–696.
- Murphy K. J., Horst J. P. F. Ter, Cassidy A. W., Desouza I. E. J., Morgunova M., Li C., Connole L. M., et al. (2010) Temporal dysregulation of cortical gene expression in the isolation reared Wistar rat. *J. Neurochem.* **113**, 601–614.
- Nagy A., Delgado-Escueta A. V. (1984) Rapid Preparation of Synaptosomes from Mammalian Brain Using Nontoxic Isoosmotic Gradient Material (Percoll). *J. Neurochem.* **43**, 1114–1123.
- Neary J. T., Kang Y., Willoughby K. A., Ellis E. F. (2003) Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J. Neurosci.* **23**, 2348–56.
- 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* 18. pii: S0028-3908(19)30022-X.
- Owen M. J., Sawa A., Mortensen P. B. (2016) Schizophrenia. *Lancet* 6736, 1–12.
- Pagnussat N., Almeida A. S., Marques D. M., Nunes F., Chenet G. C., Botton P. H. S., Mioranza S., Loss C. M., Cunha R. A., Porciúncula L. O. (2015) Adenosine A₂A receptors are necessary and sufficient to trigger memory impairment in adult mice. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 3831–3845.
- Palygin O., Lalo U., Verkhatsky A., Pankratov Y. (2010) Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* **48**, 225–231.
- Pankratov Y., Lalo U., Verkhatsky A., North R. A. (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **452**, 589–597.
- Pereira G. S., Rossato J. I., Freitas Sarkis J. J., Cammarota M., Bonan C. D., Izquierdo I. (2005) Activation of adenosine receptors in the posterior cingulate cortex impairs memory retrieval in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **83**, 217–223.
- Peterson T. S., Camden J. M., Wang Y., Seye C. I., Wood W. G., Sun G. Y., Erb L., Petris M. J., Weisman G. A. (2010) P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol. Neurobiol.* **41**, 356–366.
- Powell S. B., Geyer M. A., Preece M. A., Pitcher L. K., Reynolds G. P., Swerdlow N. R. (2003) Dopamine depletion of the nucleus accumbens reverses isolation-induced

- deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuroscience* **119**, 233–240.
- Pritchard L. M., Kempen T. A. Van, Zimmerberg B. (2013) Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neurosci. Lett.* **536**, 47–51.
- Quan M. N., Tian Y. T., Xu K. H., Zhang T., Yang Z. (2010) Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. *Neuroscience* **169**, 214–222.
- Quintas C., Vale N., Gonçalves J., Queiroz G. (2018) Microglia P2Y₁₃ receptors prevent astrocyte proliferation mediated by P2Y₁ receptors. *Front. Pharmacol.* **9**, 1–12.
- Rebola N., Lujan R., Cunha R. A., Mulle C. (2008) Adenosine A_{2A} Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron* **57**, 121–134.
- Rebola N., Simões A. P., Canas P. M., Tomé A. R., Andrade G. M., Barry C. E., Agostinho P. M., Lynch M. A., Cunha R. A. (2011) Adenosine A_{2A} receptors control neuroinflammation and consequent hippocampal neuronal dysfunction. *J. Neurochem.* **117**, 100–111.
- Rodrigues R., Almeida T., Richardson P. J., Oliveira C. R., Cunha R. A. (2005) Dual Presynaptic Control by ATP of Glutamate Release via Facilitatory P_{2X}₁, P_{2X}_{2/3}, and P_{2X}₃ and Inhibitory P_{2Y}₁, P_{2Y}₂, and/or P_{2Y}₄ Receptors in the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **25**, 6286–6295.
- Schrijver N. C. A., Pallier P. N., Brown V. J., Würbel H. (2004) Double dissociation of social

- and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav. Brain Res.* **152**, 307–314.
- Sergeeva O. A., Klyuch B. P., Fleischer W., Eriksson K. S., Korotkova T. M., Siebler M., Haas H. L. (2006) P2Y receptor-mediated excitation in the posterior hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1413–1426.
- Shen H.-Y., Coelho J. E., Ohtsuka N., Canas P. M., Day Y.-J., Huang Q.-Y., Rebola N., et al. (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. *J. Neurosci.* **28**, 2970–2975.
- Slotten H. A., Kalinichev M., Hagan J. J., Marsden C. A., Fone K. C. F. (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: Gender-dependent effects. *Brain Res.* **1097**, 123–132.
- Smith P.K., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**:76-85.
- Smith J. K., Neill J. C., Costall B. (1997) Post-weaning housing conditions influence the behavioural effects of cocaine and d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*. **131**, 23–33.
- Stefani J., Tschesnokowa O., Parrilla M., Robaye B. (2018) Disruption of the Microglial ADP Receptor P2Y₁₃ Enhances Adult Hippocampal Neurogenesis. **12**, 1–19.
- Takahashi R. N., Pamplona F. A., Daniel R., Prediger S. (2008) Departamento de Farmacologia, Centro de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Santa Catarina,

Campus Trindade, Florianopolis-SC 88049-900, Brazil. 4, 2614–2632.

Tasca C. I., Cardoso L. F., Martini L. H., Ramírez G., Souza D. O. (1998) Guanine nucleotides inhibit cAMP accumulation induced by metabotropic glutamate receptor activation. *Neurochem. Res.* **23**, 183–188.

Tasca C. I., Lanznaster D., Oliveira K. A., Fernández-Dueñas V., Ciruela F. (2018) Neuromodulatory effects of guanine-based purines in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–14.

Thompson B. Y. S. M., Haast H. L., Gahwiler B. H. (1992) Comparison of. 347–363.

Varty G. B., Higgins G. A. (1994) Differences between three rat strains in sensitivity to prepulse inhibition of an acoustic startle response: Influence of apomorphine and phencyclidine pretreatment. *J. Psychopharmacol.* **8**, 148–156.

Varty G. B., Marsden C. A., Higgins G. A. (1999) Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. *Brain Res.* **824**, 197–203.

Verkhasky A., Krishtal O. A., Burnstock G. (2009) Purinoceptors on neuroglia. *Mol. Neurobiol.* **39**, 190–208.

Voelter W., Zech K., Arnold P., Ludwig G. (1980). Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. *J Chromatogr* 31;199:345-54.

Wang Y. C., Ho U. C., Ko M. C., Liao C. C., Lee L. J. (2012) Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after

- postweaning social isolation. *Brain Struct. Funct.* **217**, 337–351.
- Weiss I. C., Domeney A. M., Heidbreder C. A., Moreau J. L., Feldon J. (2001) Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **70**, 397–409.
- Weiss I. C., Lorio L. Di, Feldon J., Domeney A. M. (2000) Strain differences in the isolation-induced effects on prepulse inhibition of the acoustic startle response and on locomotor activity. *Behav. Neurosci.* **114**, 364–373.
- Wongwitdecha N., Marsden C. A. (1996) Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res.* **75**, 27–32.
- Xiang Z., Burnstock G. (2005) Changes in expression of P2X purinoceptors in rat cerebellum during postnatal development. *Dev. Brain Res.* **156**, 147–157.
- Xiang Z., He C., Burnstock G. (2006) P2X5 receptors are expressed on neurons containing arginine vasopressin and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Brain Res.* **1099**, 56–63.
- Yorgason J. T., Calipari E. S., Ferris M. J., Karkhanis A. N., Fordahl C., Weiner J. L., Jones S. R., Ferris M. J., Karkhanis A. N. (2015) Social Isolation Rearing Increases Dopamine Uptake and Psychostimulant Potency in the Striatum. *Neuropharmacology* **101**, 471–9.
- Zhang Z., Chen G., Zhou W., Song A., Xu T., Luo Q., Wang W., Gu X. S., Duan S. (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 945–953.

Zimmermann H. (1996) *Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system.*

Zimmermann H., Braun N. (1999) Ecto-nucleotidases—molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog. Brain Res.* **120**, 371–385.

Zimmermann H., Braun N., Kegel B., Heine P. (1998) New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* **32**, 421–425.

Table of primers

Gene	Primer sequence (5' to 3')	Product length (bp)
<i>Adora1</i>	Forward: ATTGCTGTGGATCGATACC	100
	Reverse: GAATCCAGCAGCCAGCTAT	
<i>Adora2a</i>	Forward: GCAGATTCCATCTTTAG	100
	Reverse: CGCCCTCACACCTGTCA	
<i>Adora2b</i>	Forward: TCCATCTTTAGCCTCTTGG	99
	Reverse: TCCTCTTGCTCGTGTTC	
<i>Adora3</i>	Forward: CTGCGAGTCAAAGCTGAC	151
	Reverse: GTCCACCAAGAAAGGACA	
<i>P2rx1</i>	Forward: AGAATGGGACAAACCGTCG	177
	Reverse: GCAGGATGTGGAGCAATAAGAG	
<i>P2rx2</i>	Forward: AAGAACAGCATCCACTACCC	197
	Reverse: ATGACTCCAATGACACCGC	
<i>P2rx3</i>	Forward: ATGGACGTGTGGATTATGTG	122
	Reverse: CGGTACTTCTCTTCAATCTCTGG	
<i>P2rx4</i>	Forward: GTATGTGGAAGACTACGAGCAG	180
	Reverse: CCCTGAGTATTTGTGGAGTGG	
<i>P2rx5</i>	Forward: CAAGGAGGCACCTGGAAAAC	218
	Reverse: TTA CTTGCTCCCTCTCCA	
<i>P2rx6</i>	Forward: GAGGACCAAGTATGAAGAGGC	196
	Reverse: GGAATGGATAGCTGACACC	
<i>P2rx7</i>	Forward: TCCCTTTCAGGGGAACTC	288
	Reverse: GTACGGTGAAGTTTTCGGC	
<i>P2ry1</i>	Forward: GTCTGTCCTTTCGAGTAGCTG	132
	Reverse: CGATTGTA CTGTTTCCCAAAG	
<i>P2ry2</i>	Forward: ACCCGCACCTCTATTACTCCTTC	130
	Reverse: AGTAGAGCACAGGGTCAAGGCAAC	
<i>P2ry4</i>	Forward: AAGTATCGAAACCACTCCAG	194
	Reverse: GTTAGTCCCTTCATATCCAGCA	
<i>P2ry6</i>	Forward: AA ACTAAGACCCAACTGCC	199
	Reverse: AGTCGCTTGAAATCCTCAG	
<i>P2ry12</i>	Forward: CCTGCCTTGATCCATTATCT	185
	Reverse: AAAGACTGAAGCAACCTCC	
<i>P2ry13</i>	Forward: CTGTTTTACCGGTGATTGCC	172
	Reverse: TGGTTTGACTGTGGGTGATG	
<i>P2ry14</i>	Forward: AACTGCGCTCTAAGTAACCAAG	197
	Reverse: CCATCCCGATATTCGGTTGAG	
<i>Entpd1</i>	Forward: ACACCCAAGACAAACGAGG	161
	Reverse: TCAGTCCCAAGCAATCAAAG	
<i>Entpd2</i>	Forward: CTGCTACTTTGCGTCCCTAC	200
	Reverse: GGGTCA TTTGCATAGCTGGAG	
<i>Entpd3</i>	Forward: TGCTGAGCATCGTGGTA	120
	Reverse: CAGTGGTTCTGGAAAGGCCG	
<i>E5nt</i>	Forward: CAAATCTGCCTCTGGAAAGC	160
	Reverse: ACCTTCCAGAAAGGACCCTGT	
<i>Slc29a1</i>	Forward: GCCAACAGAAACCAATCCATC	172
	Reverse: CCACAGGGATGAAGTAGCAG	
<i>B2m</i>	Forward: TCCTGGCTCACACTGAATTC	194
	Reverse: CTTTGTGGATAAATTGFATAGCA	
<i>Actb</i>	Forward: GCAGGAGTACGATGAGTCCG	74
	Reverse: ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	

Legends of figures

Figure 1: Social isolation rearing induces slight behavioral alterations. (A) Startle amplitude response elicited by PPI test was prominent in social isolated rats ($n = 10$) when compared with socially reared rats ($n = 9$), as demonstrated by t test. (B) Two-way ANOVA analysis demonstrated a significant effect on prepulses intensities ($F(2, 51) = 24.18, p < 0.0001$) and in rearing condition ($F(1, 51) = 14.88, p = 0.003$), as well as the interaction between the two factors ($F(2, 51) = 5.594, p = 0.0064$). Socially isolated rats presented impairment in percentage of prepulse inhibition (%PPI) at 77 dB and 85 dB. (C) t test showed no differences in the total distance traveled during 30 minutes in the open field test ($n = 10/\text{group}$); (D) Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test showed no alterations in the total distance traveled, here demonstrated in 5 minutes bin. Initially, the rats were injected with saline (SAL) and 30 minutes later they were challenged with amphetamine 2 mg/kg (AMPH) ($n = 10$ to GH and 9 to SI group); (E) Discrimination index of the three arms in the Y-maze test ($n = 10/\text{group}$) had no alterations in the t test. (F) t test found an increase of social interaction with unknown rat in the socially isolated group ($n = 10/\text{group}$). The p -values are described in the figure. Data presented as mean \pm standard deviation.

Figure 2: ADP metabolism is impaired in isolation cerebrospinal fluid of social isolated rats. High-pressure liquid chromatography (HPLC) detected the purine levels (μM): (A) ATP, (B) ADP, (C) AMP, (D) adenosine, (E) guanosine, (F) inosine, (G) hypoxanthine, (H) xanthine and (I) uric acid. To ATP, AMP, adenosine, guanosine, hypoxanthine and xanthine we performed t test. ADP, inosine and uric acid are analyzed with Mann-Whitney test. The p -value is described in the figure. Data presented as mean \pm standard deviation ($n = 7-8$).

Figure 3: Social isolated rats have an increase in ADP hydrolysis in the synaptic terminal. (A) ATP, (B) ADP and (C) AMP hydrolysis in hippocampus synaptosomes and (D) ATP, (E) ADP and (F) AMP hydrolysis of striatum synaptosomes. We performed the t test to all data. The p -value is described in the figure. Data presented as mean \pm standard deviation ($n = 6-7$).

Figure 4: Social isolation did not induce alterations in ectonucleotidases activities in ex vivo slices. In the hippocampus the ATPase (A), ADPase (B) and AMPase (C) activities are not different between groups and the same pattern was seen in (D) ATP, (E) ADP and (F) AMP hydrolysis in the striatum. We performed the t test to all data. The p -value is described in the figure. Data presented as mean \pm standard deviation ($n = 6-7$).

Figure 5: Some receptors are upregulated in the prefrontal cortex of socially isolated rats. (A) Adora2a, (B) p2rx5 and (C) p2ry1 are increased in the social isolation model. (D) Slc29a1 is not have statically different in both groups. Beta-2 microglobulin was used as a normalizer. Results are expressed in fold-change relative to group housed animals. We performed the t

test to all data. The p-value is described in the figure. Data presented as mean \pm standard deviation (n = 7/group).

Figure 6: Social isolation promotes downregulation of several purinergic components in the striatum. Gene expression of (A) adora2a, (B) p2rx4, (C) p2ry2, (D) p2ry6, (E) p2ry12, (F) p2ry13, (G) entpd1, (H) entpd2, (I) entpd3 and (J) p2rx1. Beta-2 microglobulin was used as a normalizer. Results are expressed in fold-change relative to group housed animals. To adora2a, p2rx4, p2ry6, p2ry12, p2ry13, entpd3 and p2rx1 we performed the *t* test. P2ry2 was analyzed with Mann-Whitney test. Data presented as mean \pm standard deviation (n = 7/group).

Figure 7: Socially isolated rats have some purinergic receptors downregulated in the hippocampus. Gene expression of (A) p2ry4, (B) p2ry13, (C) p2ry14, (D) p2rx1, (E) p2ry1 and (F) entpd3. Beta actin was used as a normalizer. Results are expressed in fold-change relative to group housed animals. P2ry4, p2ry13 and p2rx1 were analyzed by *t* test. Mann-Whitney test was applied to p2ry14, p2ry1 and entpd3 analysis. Data presented as mean \pm standard deviation (n = 7/group).

Figures

Figure 1:

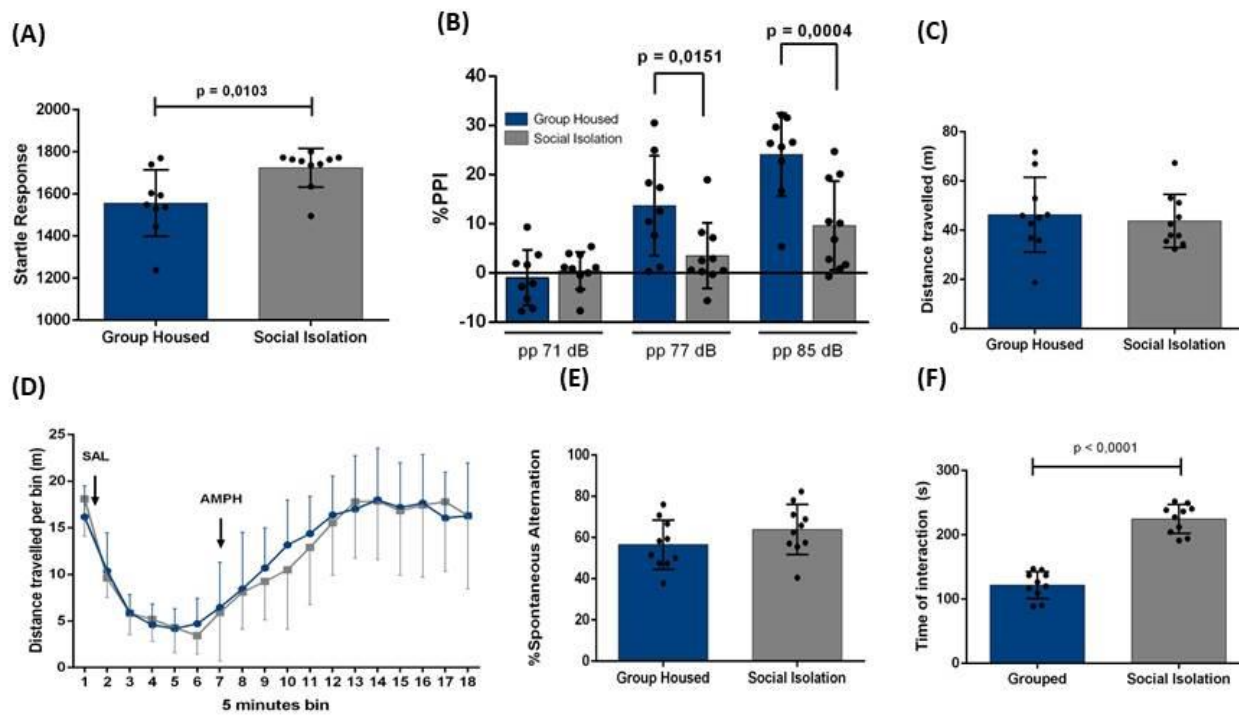


Figure 2:

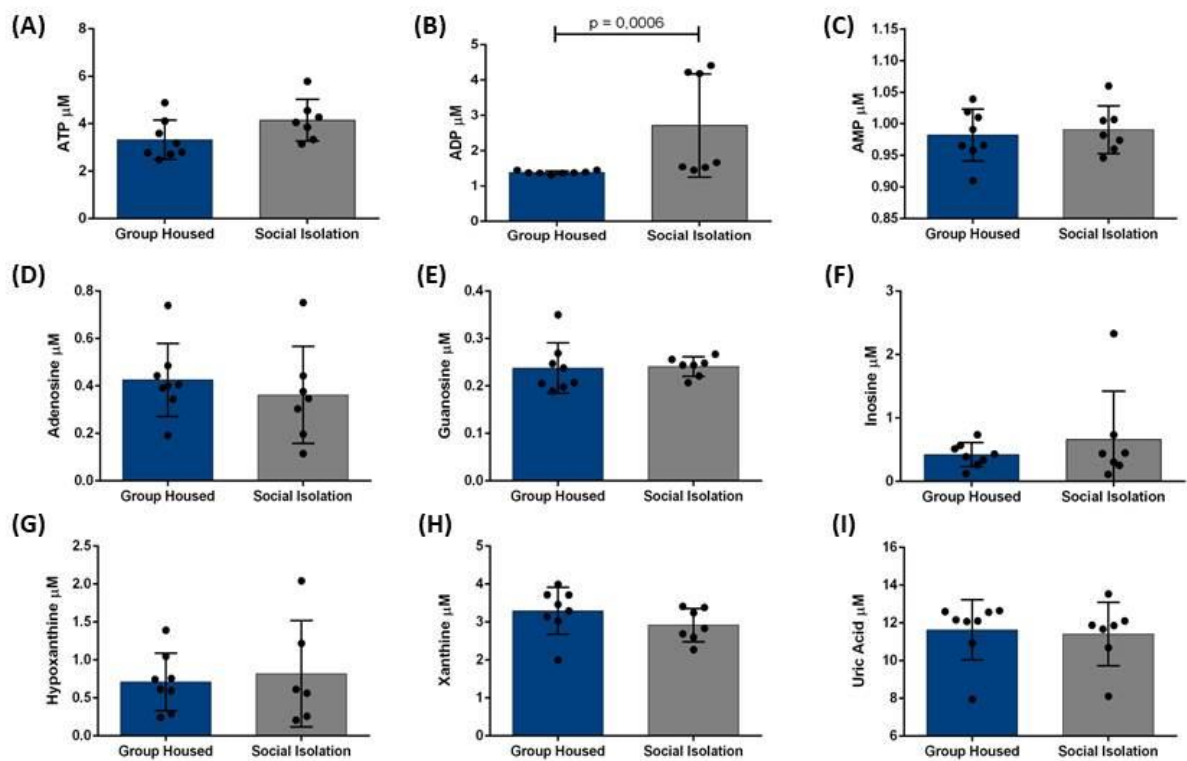


Figure 3

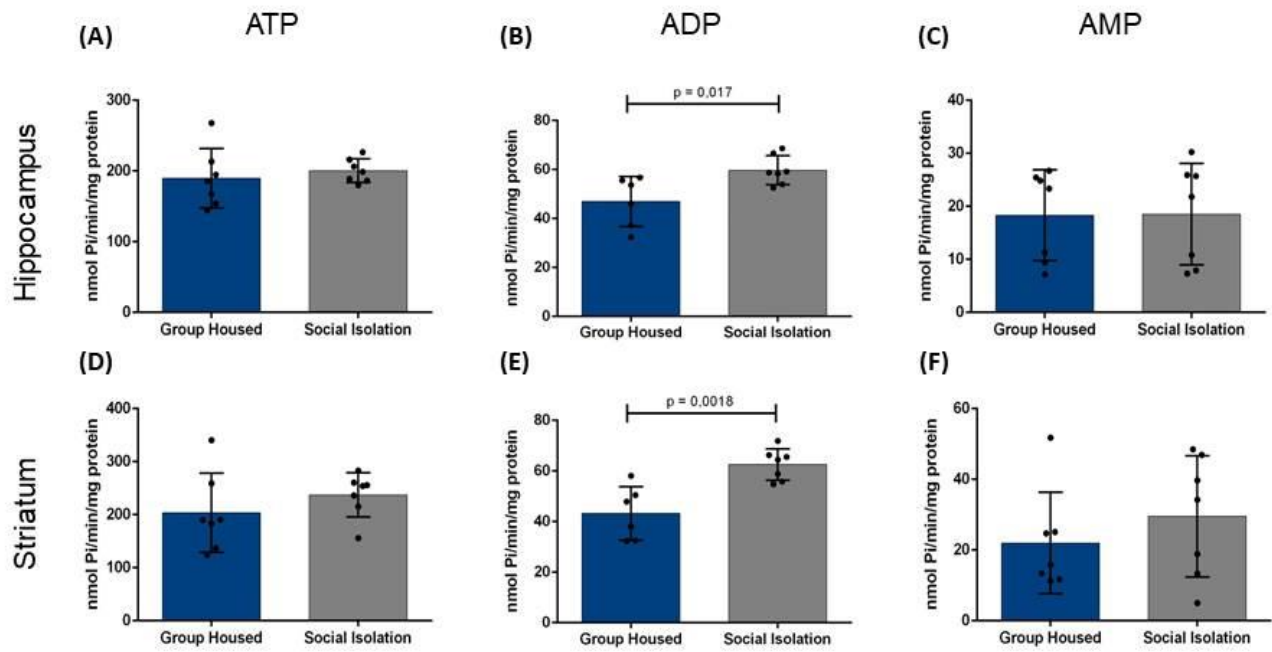


Figure 4

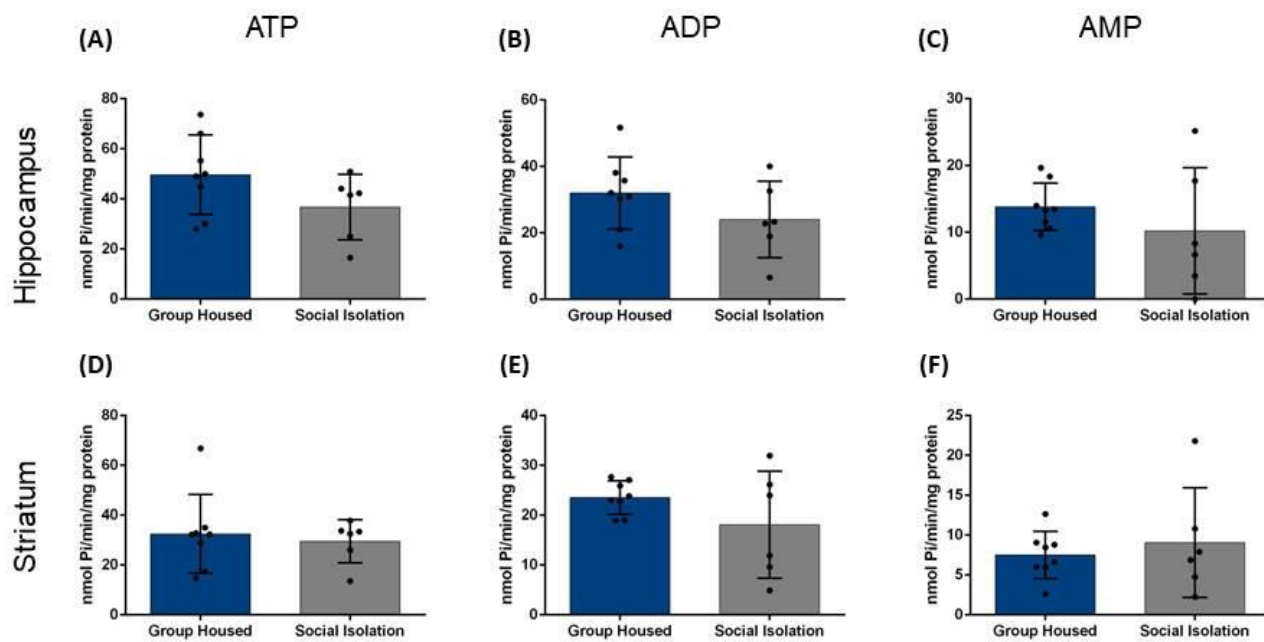


Figure 5

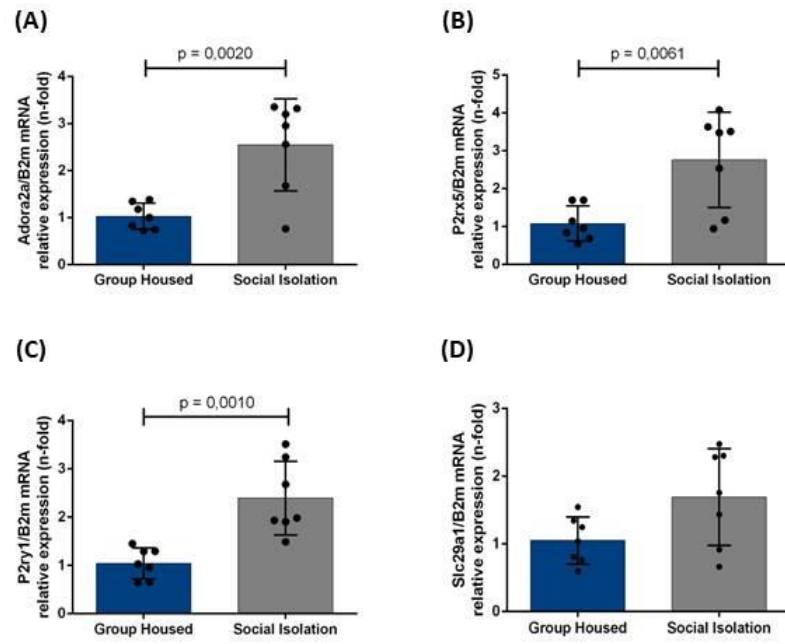


Figure 6

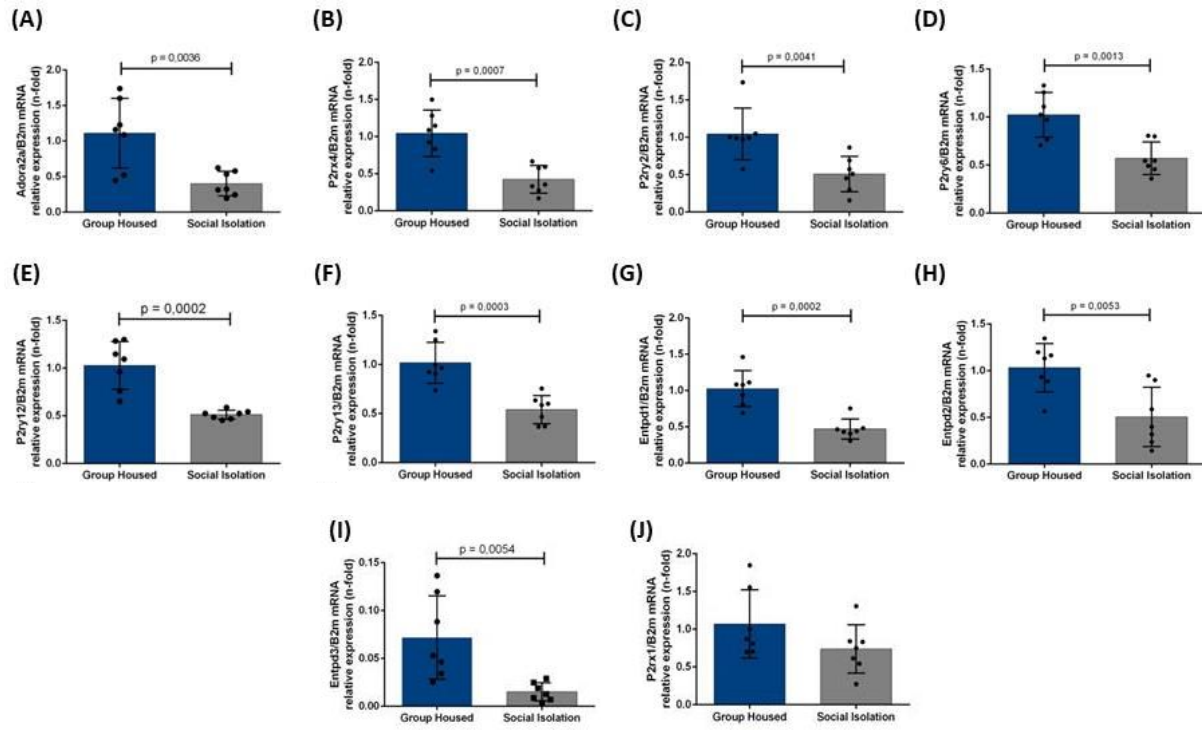
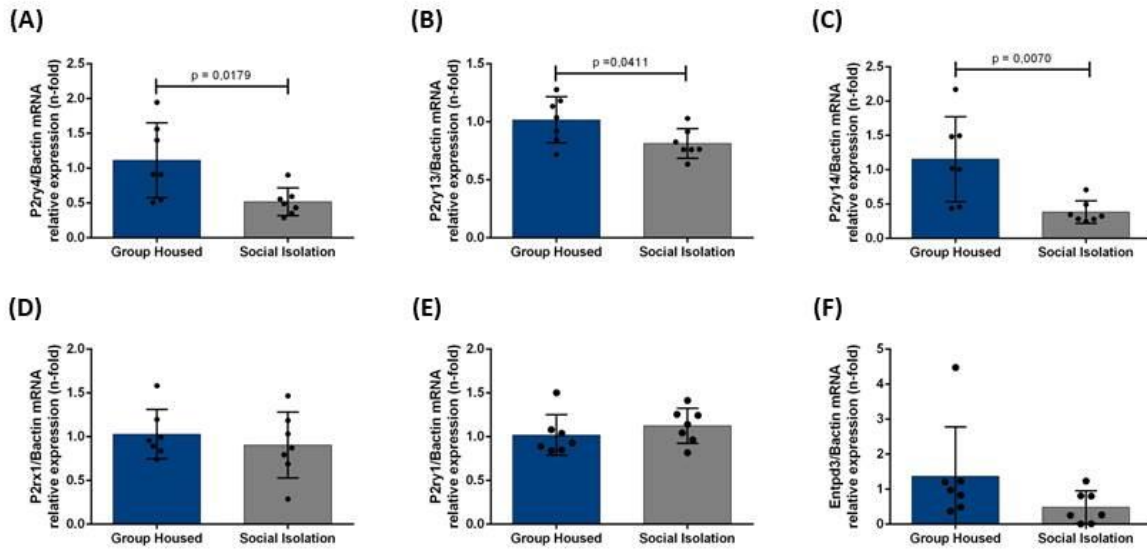


Figura 7



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 extraestriatal 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 medie, 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., Andiará 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, Luísa 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, Bartłomiej 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.
- Verkhasky, 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 Caetano - 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/CBS/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