

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**O envolvimento do sistema purinérgico na formação e extinção da
memória aversiva condicionada em camundongos**

Luana Barreto Domingos

RIBEIRÃO PRETO

2020

Luana Barreto Domingos

Versão Corrigida

**O envolvimento do sistema purinérgico na formação e extinção da
memória aversiva condicionada em camundongos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel
Barbosa Moraes

RIBEIRÃO PRETO

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha Catalográfica

Domingos, Luana Barreto

O envolvimento do sistema purinérgico na formação e extinção da memória aversiva condicionada em camundongos, Ribeirão Preto, 2020.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

74 f.

Palavras-chave: Sistema purinérgico, receptor P2X7, ATP, medo condicionado, memória de extinção

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Barreto Domingos

O envolvimento do sistema purinérgico na formação e extinção da memória aversiva condicionada em camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara - UNESP

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Só sei que nada sei”

Sócrates

Dedicatória

*Aos meus pais, por todos os ensinamentos de
vida que motivaram a busca e conquista dos
meus ideais*

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, por ter me incentivado à carreira acadêmica. Agradeço todas as oportunidades que me proporcionou, pela confiança, ensinamentos e principalmente pela amizade em todos os momentos.

Aos Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco e Ricardo Luiz Nunes de Souza pela atenção e disponibilidade concedidas para participar da banca examinadora deste trabalho.

A Sara Cristina Hott e Ana Luiza Bernardes Terzian pelo apoio intelectual e pelo crescimento científico que me proporcionaram ao longo da minha trajetória profissional.

Ao Prof. Felipe Villela Gomes, pela amizade e por ter sempre estado disposto a esclarecer minhas dúvidas, contribuindo para o meu crescimento profissional.

A Jéssica Rosa pelo apoio profissional, pelas oportunidades e ensinamentos que sempre despertaram a minha paixão pelos meus estudos. Além disso, agradeço por todo suporte, afeto e amizade.

A todos amigos de laboratório Mayara, Anna Bárbara, Andreza, Cassiano, Davi, Dani, Leandro, Gabi e Téo, que me acompanharam ao longo desta trajetória, pela agradável e amorosa convivência.

A Laura Camargo e Orlando Mesquita pelo auxílio técnico. Vocês foram de extrema importância para a realização desse trabalho.

Aos funcionários Gislaine Pedroso de Moraes Marques e José Waldik Ramon por toda competência, disponibilidade e atenção com que atendem as nossas

necessidades burocráticas. Bem como a todos os demais funcionários do Departamento de Farmacologia.

As Professores do Departamento de Farmacologia, por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

A Profa. Dra. Sonia Correa e ao Prof. Dr. Jürgen Müller que me deram a oportunidade de conhecer e trabalhar em seus laboratórios na University of Bradford (Inglaterra).

Aos meus amigos Luan dos Santos de Oliveira e Diego Rinaldo Pavesi Nicollette por todo apoio e amizade durante o período de intercâmbio, com momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos Gabriela, Giovanna, Laísa, Emrah e Dmitriy pela companhia, pelos momentos de descontração e por tornar esta caminhada mais alegre.

A todos os amigos que fiz em Ribeirão Preto, pela amizade e colaboração.

Aos meus pais e irmãos que sempre me deram amor, carinho e o incentivo de que necessito para seguir em frente.

E ao Tiago Lopes Dias que com paciência, amor, carinho e compreensão me incentiva de forma incondicional para o meu crescimento pessoal, mostrando que o amor pode se revelar de diversas formas que eu poderia enumerar.

Resumo

RESUMO

Domingos LB. **O envolvimento do sistema purinérgico na formação e extinção da memória aversiva condicionada em camundongos** [Dissertação].

São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo; 2020.

O sistema purinérgico consiste em duas grandes famílias de receptores do tipo P2 - P2X e P2Y. Ambos são ativados pelo trifosfato de adenosina (ATP) e estão presentes em várias estruturas encefálicas, incluindo aquelas envolvidas com o controle emocional e processos de memória. Evidências sugerem que estes receptores podem modular respostas de medo, porém pouco se sabe sobre seu papel em situações aversivas aprendidas. Portanto, este estudo teve por objetivo investigar o envolvimento de receptores purinérgicos na expressão e extinção da memória de medo condicionado. Foram utilizados camundongos do tipo selvagem (WT) e *knockout* para o receptor P2X7 (P2X7^{-/-}). No protocolo de Medo Condicionado ao Contexto (MCC), os animais WT tratados via intraperitoneal (i.p.) 10 min antes da sessão de extinção com a maior dose do antagonista não seletivo de receptores P2 (P178) exibiram um aumento na expressão da resposta condicionada e prejuízo na retenção da memória de extinção. Resultados similares foram obtidos com o antagonista seletivo de receptores do subtipo P2X7 (A438079), mas não com o antagonista seletivo de receptores do subtipo P2Y1 (MRS2179). Contudo, tais respostas não foram observadas quando a administração do antagonista não seletivo de receptores P2 (P178) foi realizada imediatamente após a sessão de extinção. No paradigma do Medo Condicionado ao Som (MCS), animais WT tratados 10 min antes da sessão de extinção com antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079) apresentaram resistência no aprendizado da extinção, prejuízo na retenção dessa memória e generalização do medo. Nenhum efeito foi observado quando a droga foi administrada imediatamente após a sessão de extinção. Os animais P2X7^{-/-} exibiram perfil comportamental semelhante ao tratamento farmacológico em ambos os testes comportamentais. Os resultados sugerem que os receptores P2X7 estão envolvidos com resposta aversiva e o aprendizado associado à extinção da memória aversiva. Assim, o sistema purinérgico é um possível candidato para o

desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de transtornos de ansiedade.

Palavras-chave: Sistema purinérgico, receptor P2X7, ATP, medo condicionado, memória de extinção.

Abstract

ABSTRACT

Domingos LB. **Involvement of the purinergic system in the formation and extinction of fear memory in mice.** (Master's thesis). São Paulo: Ribeirão Preto Medical School, Department of Pharmacology, University of São Paulo; 2020.

The purinergic system consists of two families of P2 receptors - P2X and P2Y. Both are activated by adenosine triphosphate (ATP) and are present in several brain regions, including those involved in emotional control behavior and memory processes. Hence, they seem to modulate fear response, however, few is known about their role in fear learning memory. Therefore, this study investigated the involvement of purinergic receptors in the expression and extinction of aversive memory. Wild-type (WT) and P2X7 receptor knockout ($P2X7^{-/-}$) mice were used. In the Contextual Fear Conditioning protocol, WT mice received intraperitoneal (i.p.) injection 10 min prior the extinction session with the highest dose of the nonselective P2R antagonist (P178) exhibited an increase in the fear expression response and impaired retention of extinction memory. Similar results were observed with the selective P2X7R antagonist (A438079), but not with the selective P2Y1R antagonist (MRS2179). However, such responses were not observed when the administration of the non-selective P2 receptor antagonist (P178) was performed immediately after the extinction session. In the Cued Fear Conditioning protocol, WT mice treated 10 min before the extinction session with the selective P2X7R antagonist (A438079) showed resistance in the extinction learning, impaired retention of extinction memory and fear generalization. No effect was observed when the drug was administered immediately after the extinction session. The $P2X7^{-/-}$ mice showed behavior profile similar to the pharmacological treatment in both behavior protocols. These results suggest that P2X7 receptors are involved with aversive response and learning associated with the extinction of aversive memory. Thus, the purinergic system is a possible candidate for the development of new therapies for the treatment of anxiety disorders.

Keywords: Purinergic system, P2X7 receptor, ATP, fear conditioning, memory extinction.

Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

AMPA – do inglês, *alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

ANOVA – Análise de Variância

ATP - Adenosina 5'-trifosfato

dB - Decibéis

EPM – Erro Padrão da Média

i.p – Intraperitoneal

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

LTP – do inglês, *long-term potentiation* (potenciação de longa duração)

mA – Miliampère

MAPK – do inglês, *mitogen-activated protein kinases* (proteína quinases ativadas por mitógenos)

MCC – Medo Condicionado ao Contexto

MCS – Medo Condicionado ao Som

NMDA – do inglês, *N-methyl-D-aspartic acid*

REC – Resposta Emocional Condicionada

SNC – Sistema Nervoso Central

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. A memória aversiva.....	22
1.2. O condicionamento clássico e o estudo da memória	23
1.3. Os receptores purinérgicos	25
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Animais	33
3.2. Drogas.....	33
3.3. Testes comportamentais	33
3.3.1. Medo Condicionado ao Contexto (MCC)	34
3.3.2. Medo Condicionado ao Som (MCS)	35
3.4. Análise Estatística de Dados.....	36
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	36
4.1. Experimento 1: Efeito do antagonismo de receptores purinérgicos P2 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao contexto.	36
4.2. Experimento 2: Efeito do antagonismo de receptores purinérgicos P2X7 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao som.....	36
4.3. Experimento 3: Efeito da deleção dos receptores P2X7 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao contexto ou ao som.....	37
5. RESULTADOS	39
5.1. O antagonismo de receptores purinérgicos no processo de extinção da memória aversiva condicionada	39
5.2. Efeito da ausência de receptores P2X7 no processo de extinção da memória aversiva condicionada	44
6. DISCUSSÃO	48

7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS	57
Anexos	74

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A memória aversiva

A sobrevivência dos indivíduos de todas as espécies depende, em grande parte, da sua habilidade em reagir adequadamente aos perigos e desafios do ambiente que os cerca (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969; LEDOUX, 1994). Neste sentido, a antecipação de eventos aversivos tem um importante valor adaptativo, de tal forma que o aprendizado associativo, que possibilita prever algum perigo por meio de estímulos ambientais, é fundamental para a manutenção da integridade do organismo (BLANCHARD; YUDKO; RODGERS; BLANCHARD, 1993; BRANDÃO, 2004).

A memória é uma das principais características biológicas comuns entre os diferentes seres vivos, sendo gerada a partir da retenção de uma informação aprendida (IZQUIERDO, 2002). A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir (aquisição), armazenar (consolidação) e recordar (evocação) informações e vivências (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; MCGAUGH; IZQUIERDO, 2000). Os estados de ânimo, as emoções, o nível de alerta e a ansiedade modulam os processos de aprendizagem e memória (MCGAUGH, 2013). Em determinadas situações, a evocação excessiva de memórias associadas a reações de medo pode se tornar não adaptativa ou disfuncional, resultando em uma distorção da percepção do perigo (DIAS; BANERJEE; GOODMAN; RESSLER, 2013; NADER; HARDT; LANIUS, 2013; YEHUDA; JOELS; MORRIS, 2010). Em humanos, esta parece ser a base para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade (PAPE; PARE, 2010), incluindo aqueles associados a memórias traumáticas como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) (COLES; HEIMBERG, 2002; HOLMES; SINGEWALD, 2013) e ansiedade generalizada (ASOK; KANDEL; RAYMAN, 2018; JASNOW; LYNCH; GILMAN; RICCIO, 2017). Uma melhor compreensão das bases neurobiológicas do processamento da memória aversiva pode fornecer ferramentas adequadas para a prevenção e tratamento destes transtornos.

1.2. O condicionamento clássico e o estudo da memória

Alguns modelos animais que estudam os mecanismos neurais e bioquímicos subjacentes aos processos de memória se baseiam no condicionamento clássico ou pavloviano (BOUTON, 1993; MAREN, 2001).

Em roedores, o processo de aquisição da memória aversiva consiste no pareamento de um estímulo neutro (ex: contexto ou som) com um estímulo biologicamente significativo ou incondicionado (ex: choque nas patas) (FANSELOW, 2000).

Posteriormente, na fase de evocação, a apresentação isolada do estímulo anteriormente neutro passa a provocar uma resposta emocional condicionada (REC) (FANSELOW, 1980), a qual é caracterizada por um conjunto de reações de defesa que envolve o comportamento de congelamento (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969; FANSELOW, 1980; LEDOUX; IWATA; CICCHETTI; REIS, 1988) e alterações autonômicas, como aumento da pressão arterial média, frequência cardíaca e diminuição da temperatura cutânea da cauda (RESSTEL; CORREA; GUIMARAES, 2008; RESSTEL; JOCA; MOREIRA; CORREA *et al.*, 2006). Portanto, um estímulo neutro passa a ser um estímulo condicionado (MAREN, 2001).

As informações ou experiências recém-adquiridas encontram-se em um estado lábil e, ao longo do tempo, são estabilizadas e consolidadas (MCGAUGH, 2000; SQUIRE; ALVAREZ, 1995). Nesta etapa ocorrem diversos eventos metabólicos e síntese proteica em diferentes estruturas encefálicas, induzindo a plasticidade sináptica necessária para a formação e armazenamento da memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2007).

Uma vez consolidada, a memória pode ser evocada com um rápido acesso a uma informação previamente adquirida (LEWIS, 1979). Nesta fase, a memória evocada torna-se instável (IZQUIERDO; BEVILAQUA; ROSSATO; BONINI *et al.*, 2006; LEE; FLAVELL, 2014) e pode seguir dois processos distintos: reconsolidação ou extinção (GARELICK; STORM, 2005; SUZUKI; JOSSELYN; FRANKLAND; MASUSHIGE *et al.*, 2004; SZAPIRO; GALANTE; BARROS; LEVI DE STEIN *et al.*, 2002).

Durante a reconsolidação uma breve reexposição ao estímulo condicionado pode integrar novas informações ao conteúdo de uma memória previamente consolidada, permitindo sua modificação (NADER; SCHAFE; LE DOUX, 2000; SARA, 2000; SUZUKI; JOSSELYN; FRANKLAND; MASUSHIGE *et al.*, 2004). No entanto, no processo de extinção, uma nova memória é formada conforme o animal aprende que o estímulo condicionado não mais prediz situação aversiva. Sendo assim, a extinção é um processo distinto de aprendizado, que envolve as fases de aquisição e consolidação para sua posterior evocação (IZQUIERDO, 2002; QUIRK; MUELLER, 2008) sensível a manipulações farmacológicas e genéticas (PSOTTA; LESSMANN; ENDRES, 2013; SUZUKI; JOSSELYN; FRANKLAND; MASUSHIGE *et al.*, 2004), e cuja reexposição ao estímulo condicionado por um período maior de tempo resulta na redução da REC (MILAD; RAUCH; PITMAN; QUIRK, 2006).

Atualmente, existe um interesse crescente na compreensão dos mecanismos envolvidos na extinção da memória aversiva, especialmente quando esse processo é considerado como parte do tratamento de alguns transtornos psiquiátricos (ORSINI; MAREN, 2012; SINGEWALD; SCHMUCKERMAIR; WHITTLE; HOLMES *et al.*, 2015).

Diferentes fases do aprendizado dependem da atividade de diversas estruturas encefálicas. As ações combinadas de circuitos neurais que emergem da amígdala, do hipocampo e do córtex pré-frontal medial resultam na interpretação e na avaliação dos estímulos ambientais que são identificados como ameaçadores (PITKANEN; SAVANDER; LEDOUX, 1997) e estas estruturas desempenham um papel crucial nos processos de aquisição, consolidação e extinção da memória aversiva (HERRY; JOHANSEN, 2014; MATUS-AMAT; HIGGINS; BARRIENTOS; RUDY, 2004; TRIFILIEFF; CALANDREAU; HERRY; MONS *et al.*, 2007; ZIMMERMAN; RABINAK; MCLACHLAN; MAREN, 2007).

A formação hipocampal é uma estrutura em forma de “C” localizada bilateralmente no lobo temporal dividida em: Giro Denteado (DG), subículo, córtex entorrinal e o hipocampo propriamente dito que consiste nas regiões CA1, CA2 e CA3 (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014) com importantes contribuições para o aprendizado e memória (FASTENRATH; COYNEL; SPALEK; MILNIK *et al.*, 2014; JI; MAREN, 2008).

A amígdala ou complexo amigdaloide é um aglomerado heterogêneo de núcleos neurais (SAH; FABER; LOPEZ DE ARMENTIA; POWER, 2003) e dentre suas diversas regiões, o complexo basolateral (estrutura que se divide em núcleo lateral, basal e basomedial) é o principal núcleo de entrada de informações e recebe aferências excitatórias de estímulos sensoriais do tálamo e dos córtices sensoriais (SUN; GOOCH; SAH, 2020). Já o núcleo central parece ser um dos responsáveis pela expressão emocional de uma associação aprendida (MAREN, 2003).

Estas estruturas possuem conexões recíprocas com o córtex pré-frontal medial (BURGOS-ROBLES; BRAVO-RIVERA; QUIRK, 2013). Enquanto a porção pré-límbica opera na aquisição e consolidação do medo (SOTRES-BAYON; SIERRA-MERCADO; PARDILLA-DELGADO; QUIRK, 2012), a porção infralímbica relaciona-se com a extinção da memória (DO-MONTE; MANZANO-NIEVES; QUINONES-LARACUENTE; RAMOS-MEDINA *et al.*, 2015; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010).

Um dos sistemas presentes nessas áreas, com receptores expressos tanto em neurônios quanto em células gliais é o sistema purinérgico (BURNSTOCK, 2015; PANKRATOV; LALO; CASTRO; MIRAS-PORTUGAL *et al.*, 1999).

1.3. Os receptores purinérgicos

O sistema purinérgico é conhecido como uma forma de sinalização extracelular mediada por nucleotídeos ou nucleosídeos de purina (ABBRACCIO; BURNSTOCK; VERKHRATSKY; ZIMMERMANN, 2009).

A hidrólise de adenosina 5'-trifosfato (ATP) é a principal fonte de energia livre para os processos metabólicos da célula. O ATP intracelular possui um importante papel na homeostase energética (VERGARA; JARAMILLO-RIVERI; LUARTE; MOENNE-LOCCOZ *et al.*, 2019) e pode ser encontrado no citoplasma celular ou armazenado em vesículas com outros neurotransmissores como acetilcolina, dopamina, noradrenalina ou serotonina (SAWADA; ECHIGO; JUGE; MIYAJI *et al.*, 2008). Uma vez no meio extracelular, o ATP atua como um neurotransmissor e neuromodulador na comunicação bidirecional neurônio-glia (BUTT, 2011; FIELDS; STEVENS, 2000; KOLES; LEICHSENRING; RUBINI;

ILLES, 2011) em processos fisiológicos e patológicos no SNC (BODIN; BURNSTOCK, 2001; PEDATA; DETTORI; COPPI; MELANI *et al.*, 2016).

O ATP e a adenosina difosfato (ADP), um subproduto da rápida metabolização do ATP, induzem seus efeitos pela ativação de diferentes receptores purinérgicos (BURNSTOCK, 2007). Esses receptores foram descritos por pela primeira vez 1976 (BURNSTOCK, 1976) e após esse período houve um grande progresso com a identificação dos seus subtipos (BRAKE; WAGENBACH; JULIUS, 1994; BURNSTOCK; KENNEDY, 1985; LONDOS; COOPER; WOLFF, 1980).

Atualmente, os receptores purinérgicos são divididos em duas grandes famílias: receptores do tipo P1 e P2 (ABBRACCIO; BURNSTOCK, 1994; BURNSTOCK, 2007).

Os receptores do tipo P1 são acoplados à proteína G e subdivididos em: receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ que podem ser ativados pela molécula de adenosina. Os receptores do tipo P2 são subdivididos em receptores P2X e P2Y. Os receptores P2X, com subtipos P2X₁₋₇, são canais iônicos em que o principal ligante é o ATP. Os receptores P2Y são acoplados à proteína G, com subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₁₁₋₁₄ são sensibilizados por ATP, ADP entre outros nucleotídeos (ABBRACCIO; BURNSTOCK, 1994; FREDHOLM; ABBRACCIO; BURNSTOCK; DALY *et al.*, 1994).

Os receptores P2 pré-sinápticos têm um papel importante no controle da liberação de neurotransmissores (RIBEIRO, 1995; SPERLAGH; VIZI, 1991). O ATP liberado nas sinapses se liga aos receptores P2 na membrana pré-sináptica para modular a liberação de glutamato nos terminais excitatórios (ATKINSON; BATTEN; MOORES; VAROQUI *et al.*, 2004; LARSSON; SAWADA; MORLAND; HIASA *et al.*, 2012). Os receptores P2X pós-sinápticos mediam a transmissão sináptica rápida em diferentes regiões do cérebro, como hipocampo (MORI; HEUSS; GAHWILER; GERBER, 2001; PANKRATOV; CASTRO; MIRAS-PORTUGAL; KRISHTAL, 1998), córtex (PANKRATOV; LALO; KRISHTAL; VERKHRATSKY, 2002), habénula medial (EDWARDS; GIBB; COLQUHOUN, 1992) e locus coeruleus (NIEBER; POELCHEN; ILLES, 1997). Os receptores P2Y pós-sinápticos estão frequentemente relacionados à proliferação, diferenciação e morte de células neurais e gliais (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2010; PETERSON; CAMDEN; WANG; SEYE *et al.*, 2010).

Entre os receptores purinérgicos, os receptores do tipo P2Y1, ativados por baixas concentrações de ATP, promovem a inibição tônica da liberação vesicular de glutamato (RODRIGUES; ALMEIDA; RICHARDSON; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Por outro lado, o subtipo P2X7, único membro da família P2X que é ativado por altas concentrações de ATP ($> 1\text{mM}$) (GREENBERG; DI VIRGILIO; STEINBERG; SILVERSTEIN, 1988) promove o aumento da sinalização glutamatérgica (ATKINSON; BATTEN; MOORES; VAROQUI *et al.*, 2004; CHO; CHOI; JANG, 2010). Os receptores de glutamato dos tipos AMPA e NMDA presentes em estruturas encefálicas como hipocampo, amígdala basolateral e córtex pré-frontal medial são importantes para os processos de formação e extinção da memória aversiva (GUSKJOLEN, 2016; LOPEZ; GAMACHE; SCHNEIDER; NADER, 2015; ORSINI; MAREN, 2012; RESSLER; ROTHBAUM; TANNENBAUM; ANDERSON *et al.*, 2004; SANTINI; MULLER; QUIRK, 2001).

Nos últimos anos houve um significativo avanço nos estudos da sinalização purinérgica e seu envolvimento na modulação de processos fisiológicos e patológicos no SNC, como plasticidade sináptica, funções cognitivas, dor neuropática, neuroinflamação e neurodegeneração (BEAMER; GOLONCSER; HORVATH; BEKO *et al.*, 2016; BURNSTOCK, 2016; KRUGEL, 2016; NORTH, 2016). Os receptores P2 tem recebido considerável interesse devido ao seu potencial envolvimento em transtornos psiquiátricos (BEAMER; GOLONCSER; HORVATH; BEKO *et al.*, 2016; BURNSTOCK, 2015; CIESLAK; CZARNECKA; ROSZEK, 2016; KOCH; BESPALOV; DRESCHER; FRANKE *et al.*, 2015; TEWARI; SETH, 2015).

Em estudos pré-clínicos, Kittner e colaboradores (1997) demonstraram que ratos que receberam uma injeção central de um análogo do ATP exibiram aumento da atividade locomotora e maior tempo de exploração das áreas centrais do campo aberto. Além disso, a ativação de receptores dos subtipos P2 e P2Y1 produziu um perfil comportamental do tipo ansiolítico, caracterizado pelo aumento da exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, e o antagonismo seletivo destes receptores produziu um efeito oposto, ou seja, um perfil do tipo ansiogênico (Kittner *et al.*, 2003).

Por outro lado, Pereira e colaboradores (2013) mostraram que camundongos Swiss que receberam tratamento sistêmico com antagonista

seletivo de receptores do tipo P2 e P2X não apresentaram diferença significativa no LCE, entretanto exibiram um tempo de imobilidade reduzido no teste do nado forçado, um modelo animal preditivo para drogas com potencial efeito antidepressivo. Além disso, observaram marcação positiva para os subtipos P2X7 e P2Y1 co-imunoprecipitados com a isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (NOS1) em regiões cerebrais como córtex pré-frontal, estriado e hipocampo, sugerindo que estes receptores possivelmente acoplados à NOS1 poderiam modular respostas comportamentais associadas a distúrbios relacionados ao estresse.

Basso e colaboradores (2009) relataram que camundongos knockout para receptores P2X7 evidenciaram um fenótipo do tipo antidepressivo nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, sem nenhuma alteração comportamental no LCE. No entanto, Boucher *et. al.* (2011) descreveu resultados contraditórios, relatando que camundongos P2X7 *knockout* reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado após sucessivas exposições, sugerindo que estes receptores parecem estar envolvidos nos mecanismos adaptativos suscitados pela exposição a estressores ambientais repetidos que levam ao desenvolvimento de comportamentos semelhantes aos da depressão. Neste mesmo estudo, os autores relatam que os camundongos P2X7 *knockout* submetidos ao LCE exibiram um perfil comportamental do tipo ansiogênico, com menor tempo de exploração dos braços abertos.

Além dos resultados contraditórios em relação ao papel dos receptores P2 nas respostas relacionadas à ansiedade, pouco se conhece sobre o envolvimento do sistema purinérgico e seus subtipos específicos no comportamento de medo aprendido e na extinção da memória aversiva.

A literatura científica recente reporta que o ATP desempenha um importante papel nos mecanismos de plasticidade sináptica e formação de memória (CUNHA; VIZI; RIBEIRO; SEBASTIAO, 1996; KHAKH, 2001; WIERASZKO, 1996) sendo capaz de induzir LTP (FUJII; KATO; KURODA, 1999; WIERASZKO; EHRLICH, 1994) via receptores P2X pós-sinápticos em fatias hipocampais (PANKRATOV; LALO; KRISHTAL, 2002; WANG; HAUGHEY; MATTSON; FURUKAWA, 2004). Além disso, há facilitação na liberação de glutamato (ILLES, 2001; MORI; HEUSS; GAHWILER; GERBER, 2001) e consequente influxo de cálcio e ativação de várias proteínas MAP quinases

(MAPK) (NORTH, 2002) essenciais para a formação e consolidação da memória (ATKINS; SELCHER; PETRAITIS; TRZASKOS *et al.*, 1998; SZAPIRO; VIANNA; MCGAUGH; MEDINA *et al.*, 2003). O ATP extracelular também pode inibir a liberação de glutamato pela ativação de receptores pré-sinápticos P2Y (GUZMAN; GEREVICH, 2016; INOUE, 1998; MENDOZA-FERNANDEZ; ANDREW; BARAJAS-LOPEZ, 2000).

Os processos de formação da memória e sinalização celular estão sujeitos à participação de diversos neurotransmissores no SNC (ABEL; LATTAL, 2001; IZQUIERDO; MEDINA, 1997; NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012) e muitos deles são bem descritos na literatura em situações aversivas aprendidas (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016; LIKHTIK; JOHANSEN, 2019; MYSKIW; IZQUIERDO; FURINI, 2014).

Diante do exposto, tornou-se interessante investigar a participação do sistema purinérgico no modelo do medo condicionado, um modelo de aprendizado aversivo. A primeira hipótese do trabalho foi que o antagonismo de receptores P2 promoveria aumento da resposta condicionada e prejuízo no aprendizado da extinção da memória aversiva. A segunda hipótese foi que esta resposta estaria diretamente relacionada ao envolvimento dos receptores do subtipo P2X7.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a participação do sistema purinérgico no modelo do medo condicionado

2.2. Objetivos Específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Investigar o papel dos receptores P2 e subtipos P2Y1 e P2X7 em animais submetidos ao protocolo de extinção do medo condicionado contextual
- Investigar a participação dos receptores purinérgicos do subtipo P2X7 na aquisição e consolidação da extinção do medo condicionado ao som
- Avaliar o efeito da deleção dos receptores P2X7 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao contexto ou ao som

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) C57BL/6 machos (8-10 semanas) fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) – Universidade de São Paulo. Camundongos *knockout* para o receptor P2X7 ($P2X7^{-/-}$, *background* C57BL/6) foram provenientes do *The Jackson Lab* (Bar Harbor, ME, EUA). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP em grupos (5-6 animais), em caixas de acrílico (32 cm x 20 cm x 21 cm; superfície de 344,17 cm²; Alesco ®, Monte Mor, Brasil), sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12h (luzes acesas às 6h00) e com água e comida *ad libitum*, exceto durante a realização do experimento. O Comitê de Ética em Experimentação Animal aprovou as condições de habitação e os procedimentos experimentais (processo número: 043/2013).

3.2. Drogas

Antagonista não seletivo P2R (Hidrato de sal tetrassódico de piridoxal-6-fosfato (benzeno-2,4-dissulfônico)) (P178, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), antagonista seletivo P2X7R (Cloridrato de 3-[[5-(2,3-diclorofenil)-1H-tetrazol-1-il] metil] (A438079, Tocris, Ellisville, MO, USA) e antagonista seletivo P2Y1 (Cloridrato de sal tetrassódico de 2'-desoxi-N6-metiladenosina 3',5'-bifosfato (MRS2179, Tocris, USA). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina estéril (veículo) e injetadas por via intraperitoneal (i.p) em um volume de 10 ml/kg na dose de 10 ou 30 mg/kg. As doses e o período de administração das drogas foram baseados e adaptados de Pereira et al. (2013) e Kittner et al. (2003) de acordo com a biodisponibilidade e bioequivalência de cada droga.

3.3. Testes comportamentais

Em todos os testes foi avaliada a porcentagem de tempo que o animal apresentou o comportamento de congelamento, considerado quando o animal

se encontra completamente imóvel, exceto pelos movimentos respiratórios.

3.3.1. Medo Condicionado ao Contexto (MCC)

Foi utilizada uma caixa (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) de 23 cm x 20 cm x 21 cm formada por três paredes opacas e uma parte frontal de acrílico transparente, cujo assoalho é constituído por 23 barras metálicas condutoras de corrente elétrica com 2 mm de diâmetro e espaçadas por 1 cm de distância. O experimento foi realizado em 3 dias consecutivos, conforme ilustrado no esquema representativo da Figura 1.

Dia 1 – Sessão de condicionamento: os animais foram colocados na caixa (contexto) e após 90s de habituação receberam três choques elétricos inescapáveis nas patas (0,85mA / 2s de duração) em intervalos pseudo-randomizados (variando de 30 a 60s). Após o último choque os animais permaneceram na caixa por mais 60s.

Dia 2 – Sessão de extinção: os animais foram reexpostos à mesma caixa onde foram previamente condicionados, porém em uma sala experimental diferente, por um tempo total de 21 min e sem apresentação de estímulos elétricos. Os seis primeiros minutos da sessão foram utilizados para avaliar a expressão do medo condicionado ao contexto.

Dia 3 – Sessão teste: os animais foram novamente colocados na caixa (contexto) por um período total de 5 min sem a apresentação dos estímulos elétricos.

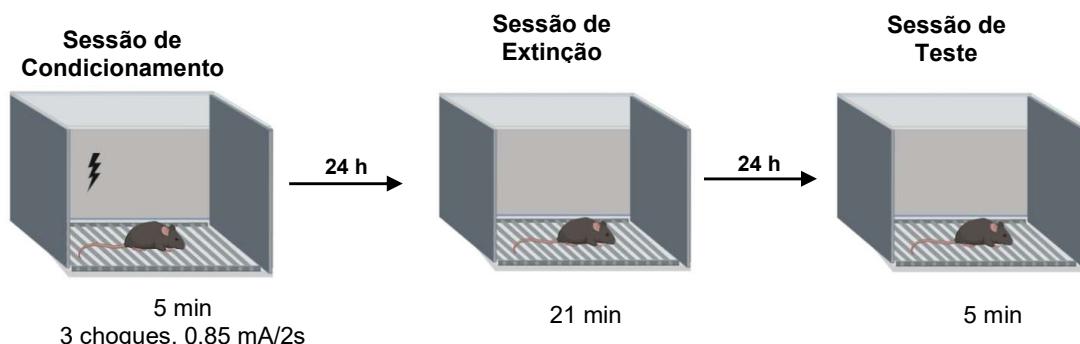


Figura 1: Esquema representativo do protocolo do Medo Condicionado ao Contexto (MCC). Figura elaborada pelo programa BioRend.

3.3.2. Medo Condicionado ao Som (MCS)

Neste paradigma comportamental foi utilizada uma caixa (Insight Ribeirão Preto, Brasil) de 23 cm x 23 cm x 21 cm com características distintas. O contexto A consiste de três paredes de cor preta e assoalho formado por 18 barras metálicas condutoras de corrente elétrica com 2 mm de diâmetro e espaçamento de 1 cm. No contexto B, as três paredes apresentam listras verticais preto e cinza opaco e assoalho de acrílico liso cinza opaco. Em ambos os contextos a parede frontal da caixa é de acrílico transparente. Tanto o contexto A quanto o B são iluminados com uma luz branca de 6 Lux posicionada na parede traseira da caixa. Uma pequena abertura na caixa guarda o alto-falante pelo qual o som é apresentado. O experimento foi realizado em 3 dias consecutivos, conforme esquema ilustrativo na Figura 2:

Dia 1 – Sessão de condicionamento: os animais foram colocados na caixa de condicionamento (contexto A) e após 120s de habituação foram apresentados 5 tons (1kHz, 70dB, 30s de duração) co-terminados com um choque elétrico nas patas (0,45mA / 1s de duração) em intervalos pseudo-randomizados (variando de 20 a 120s). Após o último estímulo os animais permaneceram na caixa por mais 120s.

Dia 2 – Sessão de extinção: os animais foram expostos a um novo contexto (contexto B), onde permaneceram 120s antes da apresentação de 18 tons (1kHz, 70dB, 30s).

Dia 3 – Sessão teste: os animais foram novamente colocados no contexto B e após 120s foram apresentados 9 tons (1kHz, 70dB, 30s).

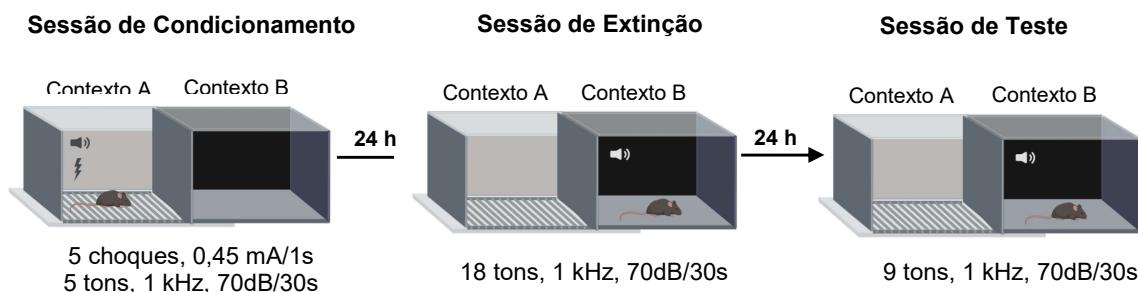


Figura 2: Esquema representativo do protocolo do Medo Condicionado ao Som (MCS). Figura elaborada pelo programa BioRend.

3.4. Análise Estatística de Dados

Os resultados foram analisados com ANOVA (análise de variância) de uma ou duas vias ou por teste t de Student, conforme apropriado. Os pós-testes foram realizados com o método mais adequado para o procedimento adotado. Os dados foram expressos como média ± EPM. A hipótese nula foi rejeitada com o $p < 0.05$.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Experimento 1: Participação dos receptores purinérgicos P2 e subtipos P2X7 e P2Y1 sobre a aquisição/consolidação da extinção no modelo do medo condicionado ao contexto.

Para avaliar a participação de receptores P2 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao contexto, os animais WT foram tratados com uma injeção i.p. 10 min antes ou imediatamente após a sessão de extinção. Grupos independentes de animais receberam o antagonista não seletivo de receptores P2 (P178; 10 ou 30 mg/kg, n=6-7), ou antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10 mg/kg, n=6), ou antagonista seletivo de receptores P2Y1 (MRS2179; 10 mg/kg, n=5), ou veículo (n=6-7).

4.2. Experimento 2: Participação dos receptores purinérgicos P2X7 sobre a aquisição/consolidação da extinção no modelo do medo condicionado ao som.

Para avaliar a participação de receptores P2X7 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao som, os animais WT foram tratados com uma injeção i.p. 10 min antes ou imediatamente após a sessão de extinção com antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10 mg/kg, n=8-11) ou veículo (n=9).

4.3. Experimento 3: Efeito da deleção dos receptores P2X7 sobre a extinção da memória de medo condicionado ao contexto ou ao som.

Camundongos P2X7^{-/-} (n=9-10) e seus respectivos controles (n=8-9) foram utilizados para avaliar a participação dos receptores P2X7 em todas as fases do medo condicionado.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. O antagonismo de receptores purinérgicos no processo de extinção da memória aversiva condicionada

Inicialmente, os animais submetidos ao MCC foram tratados com antagonista não seletivo de receptores P2 (P178) antes da sessão de extinção. Neste paradigma, aqueles que receberam a dose mais elevada de P178 (30 mg/kg) apresentaram maior porcentagem de congelamento quando comparados com o grupo veículo ($F_{2,17}=5,5$; $p<0,05$; Figura 3). Embora ambos os grupos tenham apresentado uma diminuição dos níveis de congelamento ao final dos 21 minutos da seção de extinção (tempo: $F_{6,102}=40,28$; $p<0,01$; tratamento: $F_{2,17}=4,40$; $p<0,01$; interação: $F_{12,102}=2,52$; $p<0,01$; Figura 3b), na sessão de teste apenas o grupo tratado com P178 na dose de 30 mg/kg apresentou elevados níveis de congelamento. Portanto, os dados sugerem que o antagonismo dos receptores P2 prejudica a retenção do aprendizado da extinção ($F_{2,17}=6,2$; $p<0,01$, Figura 3b).

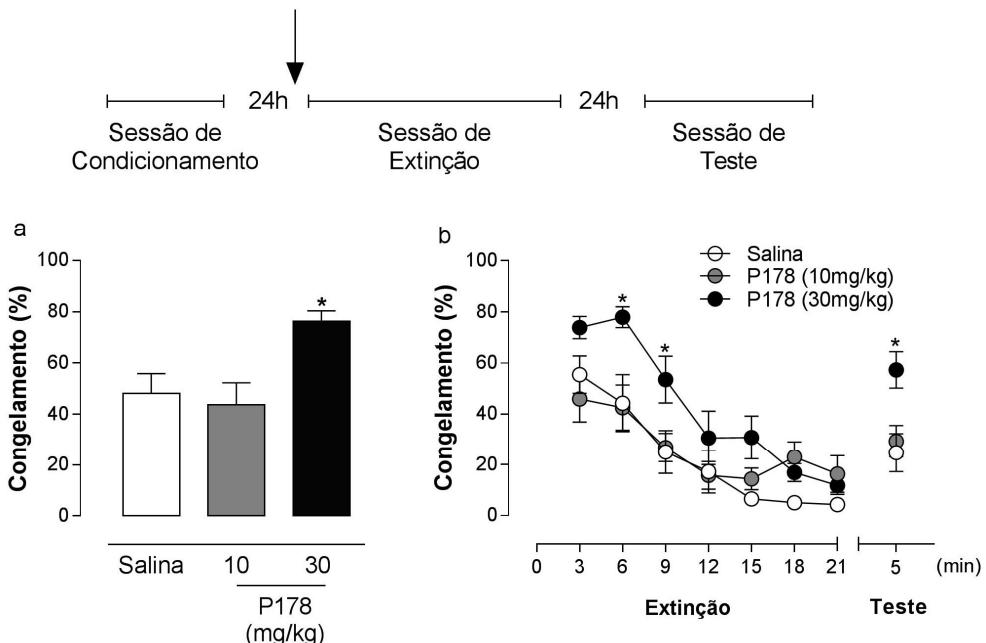


Figura 3: Antagonismo não seletivo de receptores purinérgicos P2, antes da sessão de extinção, prejudica a retenção da memória de extinção no paradigma do medo condicionado ao contexto. Efeito da injeção sistêmica do antagonista não seletivo de receptores P2 (P178; 10 ou 30 mg/kg, n=6-7/grupo) ou veículo (n=7) 10 minutos antes da sessão de extinção. **a)** expressão da memória de medo observada nos 6 primeiros minutos da sessão de extinção, ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnett. **b)** Perfil da extinção da memória aversiva durante os 21 min da sessão de extinção e teste; ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média ± EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo.

Em seguida foi avaliada a participação dos receptores P2X7 por meio da administração do antagonista seletivo (A438079; 10mg / kg; n=6), antes da sessão de extinção do MCC. Os animais apresentaram maiores níveis de congelamento durante o período de expressão da memória aversiva ($F_{2,15}=21,72$; p<0,05; Figura 4a), nos seis primeiros minutos da sessão de extinção, enquanto que os grupos tratados com o antagonista seletivo de receptores P2Y1 (MRS2179) ou veículo não exibiram diferença entre si. Todos os grupos mostraram aprendizado do processo de extinção (tempo: $F_{6,84}=72,24$; p<0,001; tratamento: $F_{2,14}=9,81$; p<0,05; interação: $F_{12,84}=4,05$; p<0,001; Figura 4b). Entretanto, durante a sessão de teste, apenas o grupo tratado com o antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079) apresentou aumento da resposta condicionada ($F_{2,14}=3,80$; p<0,05; Figura 4b) e prejuízo na retenção da memória de extinção no dia do teste ($F_{2,14}=3,8$; p=0,04; Figura 4b).

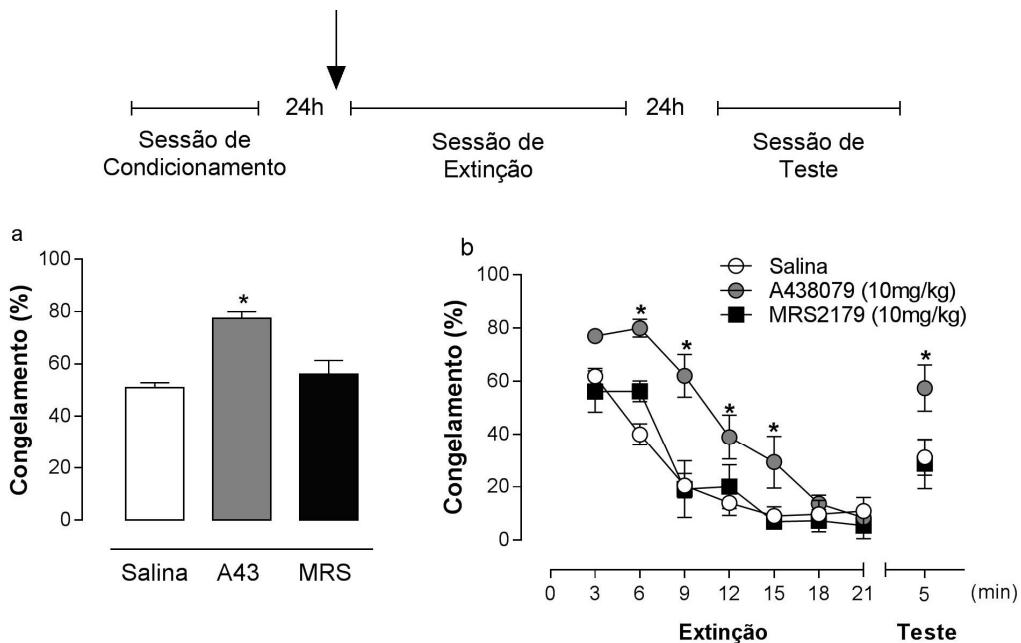


Figura 4: Antagonismo seletivo de receptores purinérgicos do tipo P2X7, antes da sessão de extinção, prejudica a retenção da memória de extinção no paradigma do medo condicionado ao contexto. Efeito da injeção sistêmica do antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10 mg/kg, n=5), antagonista seletivo de receptores P2Y1 (MRS2179; 10mg/kg; n=5) ou veículo (n=7) 10 minutos antes da sessão de extinção. **a)** expressão da memória de medo observada nos 6 primeiros minutos da sessão de extinção. Análise estatística realizada: ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnett. **b)** Perfil da extinção da memória aversiva durante os 21 min da sessão de extinção e sessão de teste da retenção da memória de extinção. Análise estatística realizada: ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média ± EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo.

No paradigma do MCC, animais tratados imediatamente após a sessão de extinção com antagonista não seletivo de receptores P2 (P178; 10 ou 30 mg / kg, n=6) não apresentaram diferença significativa nos processos de expressão ($F_{2,26}=1,9$; $p=0,16$; Figura 5a) e extinção da memória aversiva (tempo: $F_{6,156} = 41,0$; $p<0,001$; tratamento: $F_{2,26}=0,74$; $p=0,48$; interação: $F_{12,156}=1,10$; $p=0,36$; Figura 5b), assim como na retenção da memória de extinção durante a sessão de teste ($F_{2,27}=0,45$; $p=0,64$; Figura 5b).

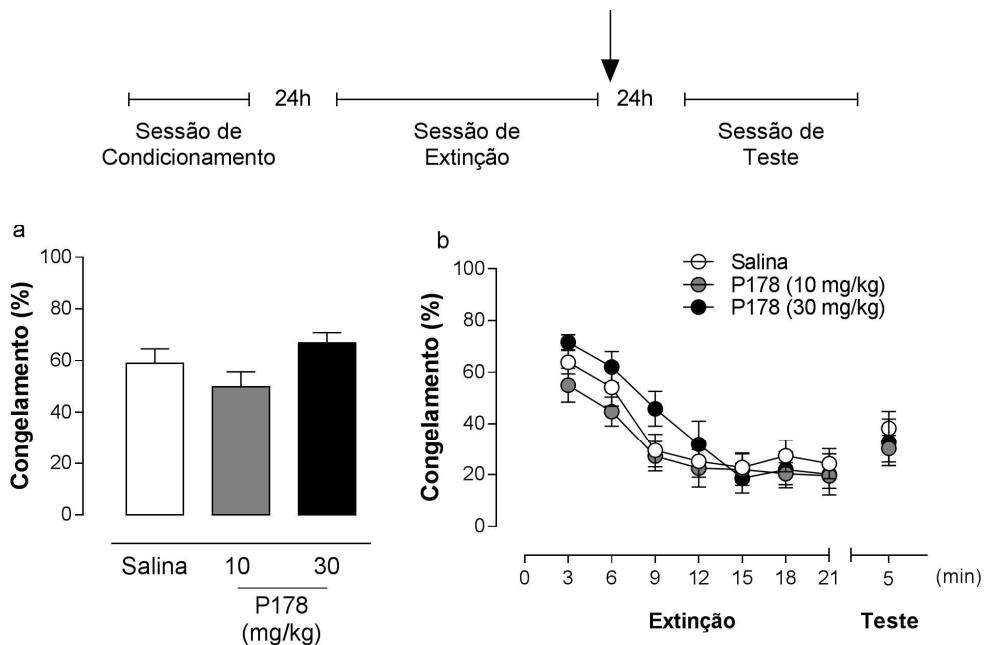


Figura 5: Antagonismo não seletivo de receptores purinérgicos P2, logo após a sessão de extinção, não afeta a consolidação da extinção do medo condicionado ao contexto. Efeito da injeção sistêmica do antagonista não seletivo de receptores P2 (P178; 10 ou 30 mg/kg, n=6-7/grupo) ou veículo (n=7) imediatamente após a sessão de extinção. **a)** expressão da memória de medo observada nos 6 primeiros minutos da sessão de extinção. Análise estatística realizada: ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Dunnett. **b)** Perfil da extinção da memória aversiva durante os 21 min da sessão de extinção e sessão de teste da retenção da memória de extinção. Análise estatística realizada: ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média ± EPM. *p<0,05 em relação ao grupo veículo.

No paradigma do MCS, todos os animais apresentaram aumento da porcentagem de congelamento ao longo do processo de aquisição da memória aversiva ao Contexto A ($F_{4,76}=64,78$; $p<0,001$) e não foi observada diferença entre os grupos ($F_{1,19}=4,28$; $p=0,523$; Figura 6 - Dia1).

No dia seguinte, durante a sessão de extinção no Contexto B, os animais apresentaram baixo nível basal de congelamento e ao iniciar a apresentação dos tons foi observado um aumento da resposta condicionada em ambos os grupos. Embora essa porcentagem tenha diminuído ao longo do processo de extinção, animais tratados com antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10mg/kg; n=11) antes da sessão de extinção, apresentaram diferença no perfil de extinção em relação ao grupo tratado com solução salina (n=9) (tempo: $F_{5,90}=63,22$; $p<0,0001$; tratamento: $F_{1,18}=7,84$; $p=0,011$; interação: $F_{5,90}=2,88$; $p=0,018$; Figura 6 - Dia2), sugerindo uma resistência no aprendizado da extinção. Na sessão de teste no Contexto B, os animais tratados com

antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079) exibiram alta porcentagem basal de congelamento, ou seja, antes da apresentação do tom ($t_{18}=3,149$; $p<0,0001$; Figura 6 - Dia3) quando comparados com os animais tratados com solução salina. Após o início da apresentação dos tons, esta diferença permaneceu significativa entre os grupos ($t_{18}=2,315$; $p<0,05$), sugerindo uma generalização do medo.

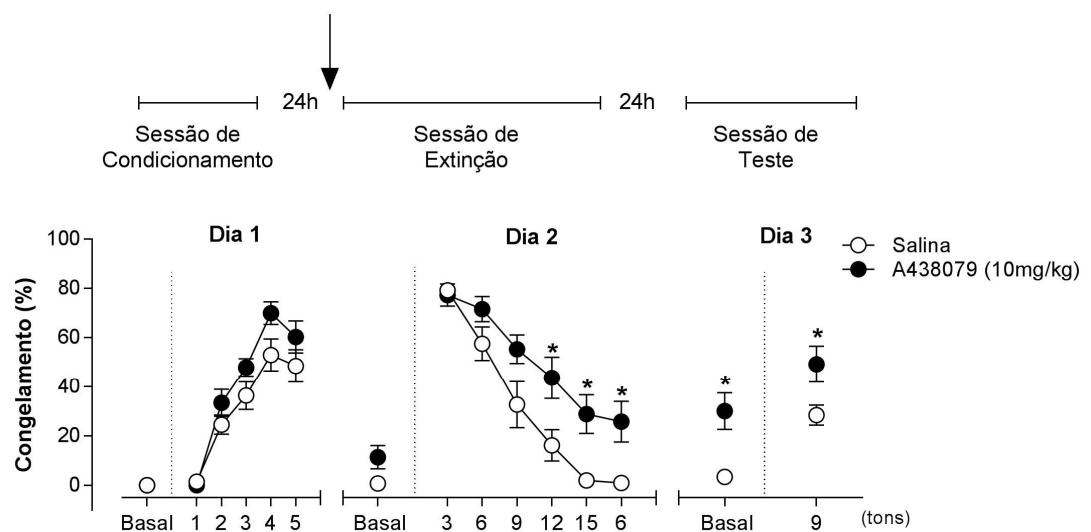


Figura 6: Antagonismo seletivo de receptores purinérgicos do tipo P2X7, antes da sessão de extinção, promove resistência ao aprendizado da extinção no paradigma do medo condicionado ao som e promove déficit na retenção da memória de extinção, sugerindo uma generalização da resposta aversiva no dia do teste. Efeito da injeção sistêmica do antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10 mg/kg, $n=11$) ou veículo ($n=9$) 10 minutos antes da sessão de extinção. **Dia 1**) Aquisição da memória aversiva durante apresentação de cada estímulo (tom + choque). **Dia 2**) Perfil de extinção da memória aversiva em relação à média de 3 tons apresentados. **Dia 3**) Sessão de teste da retenção da memória de extinção com um bloco de 9 tons. Análises estatísticas realizadas: ANOVA de duas vias ou teste t de Student seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

Para observar se o efeito do antagonismo dos receptores P2X7 se deve ao processo de consolidação da memória de extinção, o antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079 10mg/kg, $n=8$) foi administrado imediatamente após a sessão de extinção. Observa-se que não houve diferença significativa quando comparados ao grupo tratado com solução salina ($n=9$) ($t_{15}=1,285$; $p>0,05$); Figura 7 – Dia 3) sugerindo que os receptores P2X7 são importantes para a aquisição da memória de extinção no MCS.

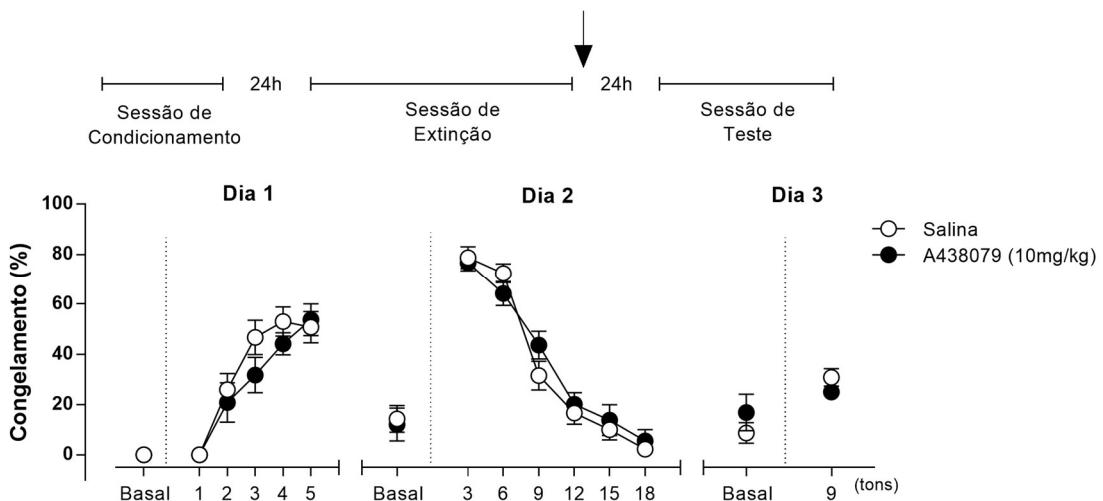


Figura 7: Antagonismo seletivo de receptores purinérgicos do tipo P2X7, logo após a sessão de extinção, não afeta a consolidação da extinção do medo condicionado ao som. Efeito da injeção sistêmica do antagonista seletivo de receptores P2X7 (A438079; 10 mg/kg, n=8) ou veículo (n=9) imediatamente após a sessão de extinção. **Dia 1**) Aquisição da memória aversiva durante apresentação de cada estímulo (tom + choque). **Dia 2**) Perfil de extinção da memória aversiva em relação à média de 3 tons apresentados. **Dia 3**) Sessão de teste da retenção da memória de extinção com um bloco de 9 tons. Análises estatísticas realizadas: ANOVA de duas vias ou teste t de Student seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média ± EPM. *p < 0,05 em relação ao grupo veículo.

5.2. Efeito da ausência de receptores P2X7 no processo de extinção da memória aversiva condicionada

No paradigma do medo condicionado ao contexto, os animais P2X7^{-/-} (n=9) apresentaram um aumento na expressão da memória aversiva ($t_{16}=2,84$; $p<0,05$; Figura 8a) durante os seis primeiros minutos da sessão de extinção, quando comparados aos seus respectivos controles (n=8). Além disso, ao longo da sessão de extinção, ambos os grupos exibiram redução no comportamento de congelamento (tempo: $F_{6,90}=74,66$; $p<0,001$; genótipo: $F_{1,15}=8,47$; $p<0,05$; interação: $F_{6,90}=3,38$; $p<0,01$ Figura 8b). Entretanto, na sessão de teste, somente os animais P2X7^{-/-} apresentaram maior tempo de congelamento quando comparados ao grupo controle ($t_{15} = 3,76$; $p<0,01$; Figura 8b).

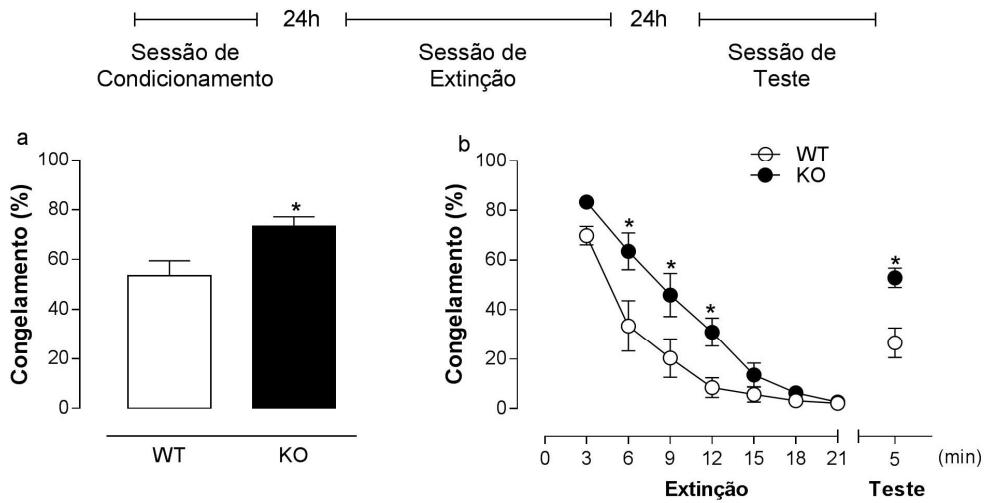


Figura 8: A ausência de receptores purinérgicos do tipo P2X7 prejudica a retenção da memória de extinção no paradigma do medo condicionado ao contexto. Efeito da deleção genética de receptores P2X7 ($n=9$) comparados ao grupo controle ($n=8$). a) expressão da memória de medo observada nos 6 primeiros minutos da sessão de extinção. Análise estatística realizada: One-way ANOVA e teste t de Student seguida pelo pós-teste de Dunnett. b) Perfil da extinção da memória aversiva durante os 21 min da sessão de extinção e sessão de teste da retenção da memória de extinção. Análise estatística realizada: ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p<0,05$ em relação ao grupo veículo.

No paradigma do medo condicionado ao som, todos os animais apresentaram aumento da porcentagem de congelamento ao longo do processo de aquisição da memória aversiva no Contexto A ($F_{4,76} = 46,69$; $p < 0,001$; Figura 9 – Dia1) e não foi observada diferença entre os grupos ($F_{1,19} = 0,209$, $p = 0,652$; Figura 9 - Dia1). No dia seguinte, durante a sessão de extinção no Contexto B, os animais $P2X7^{-/-}$ ($n=10$) exibiram alto nível basal de congelamento antes da apresentação do primeiro tom ($t_{19} = 8,234$; $p<0,0001$; Figura 9 – Dia2), além de prejuízo no aprendizado da extinção em relação ao grupo veículo ($n=11$) (tempo: $F_{5,95}=79,64$; $p<0,0001$; genótipo: $F_{1,19}=18,36$; $p=0,0004$; interação: $F_{5,95}=9,57$; $p<0,0001$; Figura 9 – Dia2). Na sessão de teste, no Contexto B, os animais $P2X7^{-/-}$ também apresentaram maior nível basal de congelamento e generalização do medo antes da apresentação do tom ($t_{18} = 3,149$; $p<0,0001$; Figura 9 – Dia3), assim como uma maior resposta condicionada quando comparados com seus respectivos controles ($t_{19}=5,086$; $p<0,0001$; Figura 9 – Dia3) após o início da apresentação dos tons.

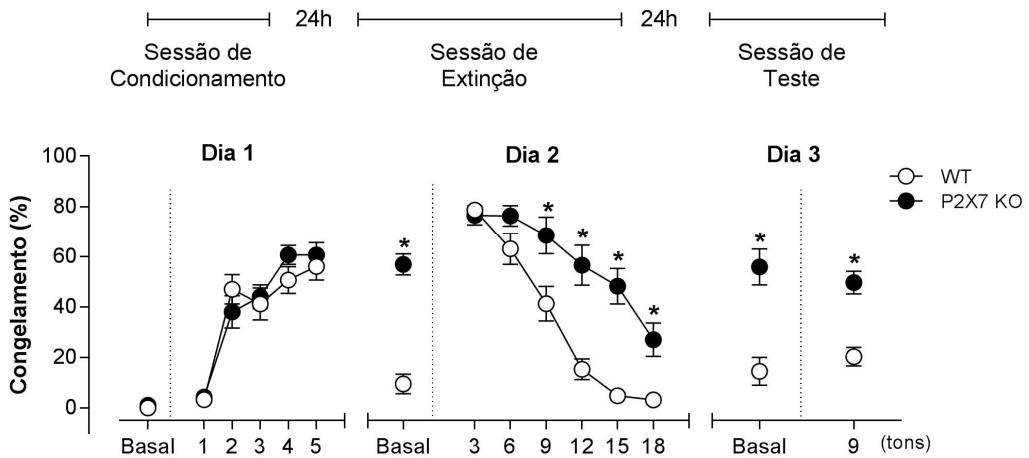


Figura 9: A ausência de receptores purinérgicos do tipo P2X7 promove resistência a extinção e prejudica a retenção da memória de extinção no paradigma do medo condicionado ao som, sugerindo generalização do medo. Efeito da deleção genética dos receptores P2X7 ($n=10$) comparados ao grupo controle ($n=9$). **Dia 1)** Aquisição da memória aversiva durante apresentação de cada estímulo (tom+choque). **Dia 2)** Perfil de extinção da memória aversiva em relação à média de 3 tons apresentados. **Dia 3)** Sessão de teste da retenção da memória de extinção com um bloco de 9 tons. Análises estatísticas realizadas: ANOVA de duas vias ou teste t de Student seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o antagonismo de receptores P2, antes da sessão de extinção, promoveu aumento da expressão do medo contextual e prejudicou a retenção da memória de extinção, como pode ser observado no dia do teste. Porém, o aumento da REC não impediu que os animais extinguissem a memória aversiva ao longo da sessão de extinção, uma vez que todos grupos apresentaram um decréscimo do porcentual de congelamento ao longo do tempo na sessão de extinção, ou seja, todos adquiriram uma nova memória. Resultados similares foram obtidos com o antagonismo seletivo de receptores do subtipo P2X7, mas não com o antagonismo seletivo de receptores P2Y1. Além disso, o perfil comportamental dos camundongos P2X7^{-/-} foi semelhante ao observado com o antagonismo farmacológico.

A administração de antagonista P178 (antagonista não seletivo de receptores P2), após a sessão de extinção, não interferiu com a retenção da memória de extinção no dia do teste no MCC, sugerindo que os receptores P2 participam de ambos os processos, aquisição e consolidação da memória de extinção.

O envolvimento do sistema purinérgico em respostas pré-clínicas relacionadas ao medo e à ansiedade até o momento é inconsistente, conforme descrito na sessão de introdução (BASSO; BRATCHER; HARRIS; JARVIS *et al.*, 2009; BOUCHER; ARNOLD; HUNT; SPIRO *et al.*, 2011; KITTNER; FRANKE; FISCHER; SCHULTHEIS *et al.*, 2003; PEREIRA; CASAROTTO; HIROAKI-SATO; SARTIM *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o LCE é um modelo de ansiedade que avalia a conduta natural da espécie de evitar espaços abertos e elevados (GRAEFF, 2005; KORTE; DE BOER, 2003). No modelo do medo condicionado, um modelo de aprendizado associativo aversivo, há aquisição de um novo comportamento em função da experiência, em outras palavras, aprendizagem. Portanto, o modelo do medo condicionado ilustra-se em termos cognitivos. Logo, o potencial de associação do estímulo a ser condicionado depende do grau de informação que ele fornece ao animal (GRAEFF, 2005; MAREN, 2001). É possível observar que esses testes são baseados em diferentes contingências aversivas que podem envolver substratos neurobiológicos diferentes (GOMES; KAKIHATA; SEMEDO; HOTT *et al.*, 2014).

É interessante ressaltar que nossos resultados não corroboram os observados por Campos et al. (2014), um estudo em que o antagonismo de receptores P2X7 no hipocampo de ratos ou a deleção de receptores P2X7 em camundongos promoveram um comportamento de congelamento reduzido no protocolo do MCC. Alguns aspectos poderiam explicar a discrepância encontrada, Campos et al. (2014) utilizaram um protocolo de choque com menor intensidade, menor tempo de exposição e não distribuídos aleatoriamente. Esses parâmetros podem gerar níveis mais baixos de REC. Além disso, os resultados opostos também poderiam ser explicados pelas diferentes vias de administração - central e sistêmica, em que a injeção sistêmica pode afetar diferentes regiões cerebrais, como amígdala, córtex pré-frontal e substância cinzenta periaquedatal, envolvidas no aprendizado da memória aversiva (QUIRK; MUELLER, 2008).

Entretanto, nossos resultados também mostraram que no protocolo do MCS, tanto o antagonismo farmacológico quanto a deleção genética de receptores P2X7 sugere um prejuízo na aprendizagem da extinção, em que os animais tratados apresentam uma resistência na extinção da memória aversiva quando comparados com o grupo controle durante a sessão de extinção. Além disso, no dia do teste, os animais exibiram uma resposta condicionada basal, ou seja, antes da apresentação do estímulo condicionado (som), sugerindo uma falha ao discriminar o estímulo aversivo e um perfil de generalização do medo. É interessante observar que os animais P2X7^(-/-) já exibiram a generalização antes da sessão de extinção.

Embora a generalização seja uma resposta adaptativa importante frente a situações de ameaça que apresentem características semelhantes à uma experiência prévia de perigo (ASOK; KANDEL; RAYMAN, 2018), a generalização excessiva é inadequada, sendo uma das principais características de transtornos de ansiedade (DUNSMOOR; PAZ, 2015). Portanto, a compreensão desse processo é fundamental não apenas para a identificação de mecanismos neuronais que se relacionam especificamente ao aprendizado associativo do medo, mas também para compreender a transição de estados emocionais de medo normal para a ansiedade patológica exibida em distúrbios afetivos, como o transtorno de estresse pós-traumático (LISSEK; POWERS;

MCCLURE; PHELPS *et al.*, 2005). Os dados do presente estudo mostram que os receptores P2X7 tem um papel importante na modulação deste processo.

Vale salientar que diferentes vias neurais podem ser recrutadas na resposta emocional eliciada tanto pelo MCC quanto pelo MCS (PHILLIPS; LEDOUX, 1992). No MCC, a codificação de que o estímulo condicionado é um contexto ocorre no hipocampo e, no MCS, a detecção de que o estímulo condicionado é uma pista específica (som) envolve a porção lateral da amígdala (ORSINI; MAREN, 2012; PHILLIPS; LEDOUX, 1995). Entretanto, estas duas estruturas formam uma representação conjuntiva importante que unem múltiplos elementos durante o condicionamento aversivo (MAREN, 2008). Junto com o córtex pré-frontal medial, essas regiões encefálicas parecem ser cruciais na generalização da memória aversiva (BESNARD; SAHAY, 2016; LISSEK, 2012).

A atividade dos circuitos neurais envolvidos no armazenamento e processamento da memória é governada pelo equilíbrio na modulação de vários neurotransmissores e moduladores no SNC (FROEMKE, 2015; MONGILLO; RUMPEL; LOEWENSTEIN, 2018; SINGEWALD; SCHMUCKERMAIR; WHITTLE; HOLMES *et al.*, 2015). Alterar esse balanço afeta as funções à nível de circuito, levando a alterações comportamentais distintas (MCINTYRE; MCGAUGH; WILLIAMS, 2012). Além do papel central na memória aversiva, essa modulação também é importante na generalização do medo (VIEIRA; CORCHES; LOVELACE; WESTBROOK *et al.*, 2015).

Alguns estudos propõem o envolvimento do ATP e dos receptores P2X nos mecanismos de plasticidade sináptica e formação de memória no hipocampo, mostrando que o ATP atua na potenciação de longo prazo e em outros mecanismos moleculares envolvidos com a aprendizagem e processos de memória (FUJII; KATO; KURODA, 2002; LORCA; ROZAS; LOYOLA; MOREIRA-RAMOS *et al.*, 2011; MORI; HEUSS; GAHWILER; GERBER, 2001). Os resultados do presente trabalho sugerem que o ATP endógeno atuando em receptores do subtipo P2X7 está envolvido na extinção da memória aversiva.

Entre os receptores P2X, o subtipo P2X7 tem recebido considerável interesse devido ao seu potencial envolvimento em transtornos psiquiátricos (TEWARI; SETH, 2015; YOUNG; GORECKI, 2018). Expresso tanto neurônios quanto em células gliais (JIMENEZ-MATEOS; SMITH; NICKE; ENGEL, 2019) estes receptores parecem modular a liberação de diferentes neurotransmissores

no SNC, como glutamato, serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) (CHO; CHOI; JANG, 2010; GOLONCSER; BARANYI; BALAZSFI; DEMETER *et al.*, 2017).

O ATP facilita a libertação de glutamato por um mecanismo pré-sináptico envolvendo receptores P2X7 no hipocampo de roedores (PAPP; VIZI; SPERLAGH, 2004; SPERLAGH; KOFALVI; DEUCHARS; ATKINSON *et al.*, 2002). Já no córtex cerebral de ratos, os P2X7 modulam tanto a liberação vesicular (BARROS-BARBOSA; LOBO; FERREIRINHA; CORREIA-DE-SA *et al.*, 2015; MARCOLI; CERVETTO; PALUZZI; GUARNIERI *et al.*, 2008) quanto a recaptação deste neurotransmissor (BARROS-BARBOSA; FONSECA; GUERRA-GOMES; FERREIRINHA *et al.*, 2016; LO; HUANG; CHOU; TSENG *et al.*, 2008).

Em cultura de neurônio corticais, antagonistas de receptores P2X7R reduziram a amplitude das correntes evocadas por glutamato (KOVANYI; CSOLLE; CALOVI; HANUSKA *et al.*, 2016). No hipocampo de animais P2X7^(-/-), foi detectado menor nível basal de glutamato extracelular (CSOLLE; BARANYI; ZSILLA; KITTEL *et al.*, 2013). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e a neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel fundamental na plasticidade sináptica e memória (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003; SINGEWALD; SCHMUCKERMAIR; WHITTLE; HOLMES *et al.*, 2015; TSIEN; HUERTA; TONEGAWA, 1996).

O processo de extinção conta com a participação dos receptores do tipo NMDA em estruturas como hipocampo, amígdala basolateral e córtex pré-frontal infralímbico (CORCORAN; DONNAN; TRONSON; GUZMAN *et al.*, 2011; ORSINI; MAREN, 2012) portanto, é possível sugerir que a modulação glutamatérgica e purinérgica podem juntas desempenhar um papel importante no aprendizado aversivo. Além disso, a fase de evocação requer tráfico de receptores do tipo AMPA e síntese proteica no hipocampo (LOPEZ; GAMACHE; SCHNEIDER; NADER, 2015) e alguns estudos mostram que os receptores P2X7 podem ativar diretamente a enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), um dos principais mediadores da inserção de AMPA (MAN; WANG; LU; JU *et al.*, 2003), propondo que esses receptores possam contribuir para a força sináptica e formação de memórias (BAINS; OLIET, 2007; JACQUES-SILVA; RODNIGHT; LENZ; LIAO *et al.*, 2004).

O papel do receptor P2X7 na regulação da liberação de 5-HT mostra que o antagonista destes receptores aumentou o nível extracelular de 5-HT no córtex pré-frontal *in vivo* e inibiu o transportador de 5-HT (LORD; ALUISIO; SHOBLOCK; NEFF *et al.*, 2014). No mesmo sentido, há trabalhos mostrando aumento nos níveis basais de 5-HT no hipocampo de camundongos P2X7^(-/-) (CSOLLE; BARANYI; ZSILLA; KITTEL *et al.*, 2013). O 5-HT pode apresentar diferentes funções nos diversos sistemas cerebrais, dependendo do subtipo de receptor serotonérgico específico para o neurotransmissor (DEAKIN; GRAEFF, 1991) e exerce efeitos complexos e muitas vezes paradoxais no medo aprendido (HOMBERG, 2012). Por exemplo, agonistas do receptor 5-HT_{2A/C} promovem efeito do tipo ansiogênico quando administrados diretamente na amígdala (CAMPBELL; MERCHANT, 2003; GIBSON; BARNFIELD; CURZON, 1994; JIANG; XING; YANG; VERMA *et al.*, 2009) e há relatos do aumento da concentração de 5-HT durante e após o condicionamento aversivo (KAWAHARA; YOSHIDA; YOKOO; NISHI *et al.*, 1993; YOKOYAMA; SUZUKI; SATO; MARUTA *et al.*, 2005). Entretanto, injeções sistêmicas facilitam tanto o consolidação quanto a extinção do medo (ZHANG; ASGEIRSDOTTIR; COHEN; MUNCHOW *et al.*, 2013).

A administração sistêmica aguda de inibidores seletivos da recaptação de serotonina aumenta a aquisição e a expressão do medo condicionado (BURGHARDT; SULLIVAN; MCEWEN; GORMAN *et al.*, 2004; HASHIMOTO; INOUE; MURAKI; KOYAMA, 2009). Por outro lado, a administração de agonistas de 5-HT_{1A} promove efeitos do tipo ansiolítico e diminui a aquisição e a expressão do medo condicionado ao contexto (LACIVITA; LEOPOLDO; BERARDI; PERRONE, 2008; STIEDL; MISANE; SPIESS; OGREN, 2000). Vale também lembrar que o aumento da 5-HT facilita as reações de defesa potencial ou distal na amígdala e observa-se um perfil ansiogênico em modelos animais de ansiedade (GRAEFF, 2002). No presente estudo foi observado um aumento da resposta condicionada e isso pode ser correlacionado com o aumento nos níveis de 5-HT mediado pelos receptores P2X7 em regiões encefálicas importantes para o processamento da memória aversiva.

Estudos também mostram que camundongos P2X7^(-/-) apresentam baixo nível basal de noradrenalina no hipocampo (CSOLLE; BARANYI; ZSILLA; KITTEL *et al.*, 2013). Este neurotransmissor é essencial para memória

(MCGAUGH, 2013) sendo que o aprimoramento farmacológico da transmissão noradrenérgica melhora a consolidação da memória aversiva (GAZARINI; STERN; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2013; TULLY; BOLSHAKOV, 2010). A noradrenalina também pode influenciar neurotransmissão glutamatérgica, promovendo a LTP e aumentando a inserção pós-sináptica de receptores do tipo AMPA (LUO; ZHOU; LI; WU *et al.*, 2015). Em cultura de células gliais, o bloqueio de receptores P2X7 atenuou completamente os efeitos da noradrenalina na força sináptica (BAINS; OLIET, 2007).

Codocedo et al. (2013) mostram também que o ATP induz a produção de NO no hipocampo independente da atividade do receptor NMDA, mas diretamente associado a ativação do receptor P2X7 e pode estar envolvido na regulação da excitabilidade neuronal, desempenhando um importante papel no processamento da memória no hipocampo.

Ao todo, existem evidências substanciais de que os receptores P2X7 modulam a liberação de 5-HT, NA, glutamato e NO, que são mecanismos consistentemente envolvidos na formação e processamento da memória aversiva.

Como previamente discutido em trabalho publicado pelo presente estudo, a ativação de receptores purinérgicos do subtipo P2X7 também parece estar envolvida com a regulação da liberação de IL-1 β e ativação do eixo HPA, consequentemente interferindo com os processos aprendizado do medo e extinção da memória (DOMINGOS; HOTT; TERZIAN; RESSTEL, 2018). Entretanto, muitos estudos ainda são necessários para verificar os mecanismos moleculares *downstream* dos receptores P2X7 envolvidos em tais efeitos.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo mostram a participação dos receptores purinérgicos do tipo P2X7 em situações aversivas aprendidas, em que a ação desses receptores está envolvida com a aquisição da extinção, de forma que o bloqueio farmacológico ou a ausência dos receptores P2X7 favorecem a resposta emocional condicionada. Portanto, é possível considerar que o sistema purinérgico seja um candidato para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de transtornos de ansiedade.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABBRACCIO, M. P.; BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? **Pharmacol Ther**, 64, n. 3, p. 445-475, 1994.

ABBRACCIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci**, 32, n. 1, p. 19-29, Jan 2009.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol**, 11, n. 2, p. 180-187, Apr 2001.

ASOK, A.; KANDEL, E. R.; RAYMAN, J. B. The Neurobiology of Fear Generalization. **Front Behav Neurosci**, 12, p. 329, 2018.

ATKINS, C. M.; SELCHER, J. C.; PETRAITIS, J. J.; TRZASKOS, J. M. et al. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nat Neurosci**, 1, n. 7, p. 602-609, Nov 1998.

ATKINSON, L.; BATTEN, T. F.; MOORES, T. S.; VAROQUI, H. et al. Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS. **Neuroscience**, 123, n. 3, p. 761-768, 2004.

BAINS, J. S.; OLIET, S. H. Glia: they make your memories stick! **Trends Neurosci**, 30, n. 8, p. 417-424, Aug 2007.

BARROS-BARBOSA, A. R.; FONSECA, A. L.; GUERRA-GOMES, S.; FERREIRINHA, F. et al. Up-regulation of P2X7 receptor-mediated inhibition of GABA uptake by nerve terminals of the human epileptic neocortex. **Epilepsia**, 57, n. 1, p. 99-110, Jan 2016.

BARROS-BARBOSA, A. R.; LOBO, M. G.; FERREIRINHA, F.; CORREIA-DE-SA, P. et al. P2X7 receptor activation downmodulates Na(+) -dependent high-affinity GABA and glutamate transport into rat brain cortex synaptosomes. **Neuroscience**, 306, p. 74-90, Oct 15 2015.

BASSO, A. M.; BRATCHER, N. A.; HARRIS, R. R.; JARVIS, M. F. et al. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behav Brain Res**, 198, n. 1, p. 83-90, Mar 2 2009.

BEAMER, E.; GOLONCSER, F.; HORVATH, G.; BEKO, K. *et al.* Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. **Neuropharmacology**, 104, p. 94-104, May 2016.

BESNARD, A.; SAHAY, A. Adult Hippocampal Neurogenesis, Fear Generalization, and Stress. **Neuropsychopharmacology**, 41, n. 1, p. 24-44, Jan 2016.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. **J Comp Physiol Psychol**, 68, n. 1, p. 129-135, May 1969.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO, E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res**, 58, n. 1-2, p. 155-165, Dec 20 1993.

BODIN, P.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochem Res**, 26, n. 8-9, p. 959-969, Sep 2001.

BOUCHER, A. A.; ARNOLD, J. C.; HUNT, G. E.; SPIRO, A. *et al.* Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. **Neuroscience**, 189, p. 170-177, Aug 25 2011.

BOUTON, M. E. Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. **Psychol Bull**, 114, n. 1, p. 80-99, Jul 1993.

BRAKE, A. J.; WAGENBACH, M. J.; JULIUS, D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. **Nature**, 371, n. 6497, p. 519-523, Oct 6 1994.

BRANDÃO, M. L. As Bases Biológicas do Comportamento. **EPU**, 2004.

BURGHARDT, N. S.; SULLIVAN, G. M.; MCEWEN, B. S.; GORMAN, J. M. *et al.* The selective serotonin reuptake inhibitor citalopram increases fear after acute treatment but reduces fear with chronic treatment: a comparison with tianeptine. **Biol Psychiatry**, 55, n. 12, p. 1171-1178, Jun 15 2004.

BURGOS-ROBLES, A.; BRAVO-RIVERA, H.; QUIRK, G. J. Prelimbic and infralimbic neurons signal distinct aspects of appetitive instrumental behavior. **PLoS One**, 8, n. 2, p. e57575, 2013.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **J Theor Biol**, 62, n. 2, p. 491-503, Oct 21 1976.

BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**, 87, n. 2, p. 659-797, Apr 2007.

BURNSTOCK, G. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. **Curr Med Chem**, 22, n. 7, p. 819-844, 2015.

BURNSTOCK, G. An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. **Neuropharmacology**, 104, p. 4-17, May 2016.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **Gen Pharmacol**, 16, n. 5, p. 433-440, 1985.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. **Cell Death Dis**, 1, p. e9, 2010.

BUTT, A. M. ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glial networks. **Semin Cell Dev Biol**, 22, n. 2, p. 205-213, Apr 2011.

CAMPBELL, B. M.; MERCHANT, K. M. Serotonin 2C receptors within the basolateral amygdala induce acute fear-like responses in an open-field environment. **Brain Res**, 993, n. 1-2, p. 1-9, Dec 12 2003.

CAMPOS, R. C.; PARFITT, G. M.; POLESE, C. E.; COUTINHO-SILVA, R. et al. Pharmacological blockage and P2X7 deletion hinder aversive memories: reversion in an enriched environment. **Neuroscience**, 280, p. 220-230, Nov 7 2014.

CHO, J. H.; CHOI, I. S.; JANG, I. S. P2X7 receptors enhance glutamate release in hippocampal hilar neurons. **Neuroreport**, 21, n. 13, p. 865-870, Sep 15 2010.

CIESLAK, M.; CZARNECKA, J.; ROSZEK, K. The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders. **Acta Biochim Pol**, 63, n. 1, p. 1004, 2016.

CODOCEDO, J. F.; GODOY, J. A.; POBLETE, M. I.; INESTROSA, N. C. et al. ATP induces NO production in hippocampal neurons by P2X(7) receptor activation independent of glutamate signaling. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e57626, 2013.

COLES, M. E.; HEIMBERG, R. G. Memory biases in the anxiety disorders: current status. **Clin Psychol Rev**, 22, n. 4, p. 587-627, May 2002.

CORCORAN, K. A.; DONNAN, M. D.; TRONSON, N. C.; GUZMAN, Y. F. *et al.* NMDA receptors in retrosplenial cortex are necessary for retrieval of recent and remote context fear memory. **J Neurosci**, 31, n. 32, p. 11655-11659, Aug 10 2011.

CSOLLE, C.; BARANYI, M.; ZSILLA, G.; KITTEL, A. *et al.* Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. **PLoS One**, 8, n. 6, p. e66547, 2013.

CUNHA, R. A.; VIZI, E. S.; RIBEIRO, J. A.; SEBASTIAO, A. M. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. **J Neurochem**, 67, n. 5, p. 2180-2187, Nov 1996.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, 5, n. 4, p. 305-315, Jan 1991.

DIAS, B. G.; BANERJEE, S. B.; GOODMAN, J. V.; RESSLER, K. J. Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. **Curr Opin Neurobiol**, 23, n. 3, p. 346-352, Jun 2013.

DO-MONTE, F. H.; MANZANO-NIEVES, G.; QUINONES-LARACUENTE, K.; RAMOS-MEDINA, L. *et al.* Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. **J Neurosci**, 35, n. 8, p. 3607-3615, Feb 25 2015.

DOMINGOS, L. B.; HOTT, S. C.; TERZIAN, A. L. B.; RESSTEL, L. B. M. P2X7 purinergic receptors participate in the expression and extinction processes of contextual fear conditioning memory in mice. **Neuropharmacology**, 128, p. 474-481, Jan 2018.

DUNSMOOR, J. E.; PAZ, R. Fear Generalization and Anxiety: Behavioral and Neural Mechanisms. **Biol Psychiatry**, 78, n. 5, p. 336-343, Sep 1 2015.

EDWARDS, F. A.; GIBB, A. J.; COLQUHOUN, D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. **Nature**, 359, n. 6391, p. 144-147, Sep 10 1992.

FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, 15, n. 4, p. 177-182, Oct-Dec 1980.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**, 110, n. 1-2, p. 73-81, Jun 1 2000.

FASTENRATH, M.; COYNEL, D.; SPALEK, K.; MILNIK, A. *et al.* Dynamic modulation of amygdala-hippocampal connectivity by emotional arousal. **J Neurosci**, 34, n. 42, p. 13935-13947, Oct 15 2014.

FIELDS, R. D.; STEVENS, B. ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. **Trends Neurosci**, 23, n. 12, p. 625-633, Dec 2000.

FREDHOLM, B. B.; ABBRACCIO, M. P.; BURNSTOCK, G.; DALY, J. W. *et al.* Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol Rev**, 46, n. 2, p. 143-156, Jun 1994.

FROEMKE, R. C. Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. **Annu Rev Neurosci**, 38, p. 195-219, Jul 8 2015.

FUJII, S.; KATO, H.; KURODA, Y. Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. **Neurosci Lett**, 276, n. 1, p. 21-24, Nov 26 1999.

FUJII, S.; KATO, H.; KURODA, Y. Cooperativity between extracellular adenosine 5'-triphosphate and activation of N-methyl-D-aspartate receptors in long-term potentiation induction in hippocampal CA1 neurons. **Neuroscience**, 113, n. 3, p. 617-628, 2002.

GARELICK, M. G.; STORM, D. R. The relationship between memory retrieval and memory extinction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 26, p. 9091-9092, Jun 28 2005.

GAZARINI, L.; STERN, C. A.; CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors. **Learn Mem**, 20, n. 4, p. 210-219, Mar 19 2013.

GIBSON, E. L.; BARNFIELD, A. M.; CURZON, G. Evidence that mCPP-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT2C receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**, 33, n. 3-4, p. 457-465, Mar-Apr 1994.

GOLONCSER, F.; BARANYI, M.; BALAZSFI, D.; DEMETER, K. *et al.* Regulation of Hippocampal 5-HT Release by P2X7 Receptors in Response to Optogenetic Stimulation of Median Raphe Terminals of Mice. **Front Mol Neurosci**, 10, p. 325, 2017.

GOMES, F. V.; KAKIHATA, A. M.; SEMEDO, A. C.; HOTT, S. C. *et al.* D-cycloserine injected into the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic-like effects in rats. **Behav Brain Res**, 271, p. 374-379, Sep 1 2014.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology (Berl)**, 163, n. 3-4, p. 467-476, Oct 2002.

GRAEFF, F. G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. G. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, n. São Paulo. Atheneu, p. 123-160, 2005.

GREENBERG, S.; DI VIRGILIO, F.; STEINBERG, T. H.; SILVERSTEIN, S. C. Extracellular nucleotides mediate Ca²⁺ fluxes in J774 macrophages by two distinct mechanisms. **J Biol Chem**, 263, n. 21, p. 10337-10343, Jul 25 1988.

GUSKJOLEN, A. J. Losing Connections, Losing Memory: AMPA Receptor Endocytosis as a Neurobiological Mechanism of Forgetting. **J Neurosci**, 36, n. 29, p. 7559-7561, Jul 20 2016.

GUZMAN, S. J.; GEREVICH, Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. **Neural Plast**, 2016, p. 1207393, 2016.

HASHIMOTO, S.; INOUE, T.; MURAKI, I.; KOYAMA, T. Effects of acute citalopram on the expression of conditioned freezing in naive versus chronic citalopram-treated rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 33, n. 1, p. 113-117, Feb 1 2009.

HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nat Neurosci**, 17, n. 12, p. 1644-1654, Dec 2014.

HOLMES, A.; SINGEWALD, N. Individual differences in recovery from traumatic fear. **Trends Neurosci**, 36, n. 1, p. 23-31, Jan 2013.

HOMBERG, J. R. Serotonergic modulation of conditioned fear. **Scientifica (Cairo)**, 2012, p. 821549, 2012.

ILLES, P., Wirkner, K., Nörenberg, W., Masino, S.A. and Dunwiddie, T.V. Interaction between the transmitters ATP and glutamate in the central nervous system. **Drug Dev. Res.**, 52, p. 76-82, 2001.

INOUE, K. The functions of ATP receptors in the hippocampus. **Pharmacol Res.**, 38, n. 5, p. 323-331, Nov 1998.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: ARTMED, 2002.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S. *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci.**, 29, n. 9, p. 496-505, Sep 2006.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiol Rev**, 96, n. 2, p. 695-750, Apr 2016.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997.

JACQUES-SILVA, M. C.; RODNIGHT, R.; LENZ, G.; LIAO, Z. *et al.* P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. **Br J Pharmacol**, 141, n. 7, p. 1106-1117, Apr 2004.

JASNOW, A. M.; LYNCH, J. F., 3rd; GILMAN, T. L.; RICCIO, D. C. Perspectives on fear generalization and its implications for emotional disorders. **J Neurosci Res**, 95, n. 3, p. 821-835, Mar 2017.

JI, J.; MAREN, S. Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. **Learn Mem**, 15, n. 4, p. 244-251, Apr 2008.

JIANG, X.; XING, G.; YANG, C.; VERMA, A. *et al.* Stress impairs 5-HT2A receptor-mediated serotonergic facilitation of GABA release in juvenile rat basolateral amygdala. **Neuropsychopharmacology**, 34, n. 2, p. 410-423, Jan 2009.

JIMENEZ-MATEOS, E. M.; SMITH, J.; NICKE, A.; ENGEL, T. Regulation of P2X7 receptor expression and function in the brain. **Brain Res Bull**, 151, p. 153-163, Sep 2019.

KAWAHARA, H.; YOSHIDA, M.; YOKOO, H.; NISHI, M. *et al.* Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. **Neurosci Lett**, 162, n. 1-2, p. 81-84, Nov 12 1993.

KHAKH, B. S. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. **Nat Rev Neurosci**, 2, n. 3, p. 165-174, Mar 2001.

KITTNER, H.; FRANKE, H.; FISCHER, W.; SCHULTHEIS, N. *et al.* Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. **Neuropsychopharmacology**, 28, n. 3, p. 435-444, Mar 2003.

KITTNER, H.; KRUGEL, U.; ILLES, P. 2-methylthio ATP (2-MeSATP) enhances dopaminergic mechanisms in the mesolimbic mesocortical system of the rat: An in vivo study. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, 356, n. 4, p. 207-207, 1997.

KOCH, H.; BESPALOV, A.; DRESCHER, K.; FRANKE, H. *et al.* Impaired cognition after stimulation of P2Y1 receptors in the rat medial prefrontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, 40, n. 2, p. 305-314, Jan 2015.

KOLES, L.; LEICHSENRING, A.; RUBINI, P.; ILLES, P. P2 receptor signaling in neurons and glial cells of the central nervous system. **Adv Pharmacol**, 61, p. 441-493, 2011.

KORTE, S. M.; DE BOER, S. F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **Eur J Pharmacol**, 463, n. 1-3, p. 163-175, Feb 28 2003.

KOVANYI, B.; CSOLLE, C.; CALOVI, S.; HANUSKA, A. *et al.* The role of P2X7 receptors in a rodent PCP-induced schizophrenia model. **Sci Rep**, 6, p. 36680, Nov 8 2016.

KRUGEL, U. Purinergic receptors in psychiatric disorders. **Neuropharmacology**, 104, p. 212-225, May 2016.

LACIVITA, E.; LEOPOLDO, M.; BERARDI, F.; PERRONE, R. 5-HT1A receptor, an old target for new therapeutic agents. **Curr Top Med Chem**, 8, n. 12, p. 1024-1034, 2008.

LARSSON, M.; SAWADA, K.; MORLAND, C.; HIASA, M. *et al.* Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. **Cereb Cortex**, 22, n. 5, p. 1203-1214, May 2012.

LEDOUX, J. E. Emotion, memory and the brain. **Sci Am**, 270, n. 6, p. 50-57, Jun 1994.

LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci**, 8, n. 7, p. 2517-2529, Jul 1988.

LEE, J. L.; FLAVELL, C. R. Inhibition and enhancement of contextual fear memory destabilization. **Front Behav Neurosci**, 8, p. 144, 2014.

LEWIS, D. J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychol Bull**, 86, n. 5, p. 1054-1083, Sep 1979.

LIKHTIK, E.; JOHANSEN, J. P. Neuromodulation in circuits of aversive emotional learning. **Nat Neurosci**, 22, n. 10, p. 1586-1597, Oct 2019.

LISSEK, S. Toward an account of clinical anxiety predicated on basic, neurally mapped mechanisms of Pavlovian fear-learning: the case for conditioned overgeneralization. **Depress Anxiety**, 29, n. 4, p. 257-263, Apr 2012.

LISSEK, S.; POWERS, A. S.; MCCLURE, E. B.; PHELPS, E. A. *et al.* Classical fear conditioning in the anxiety disorders: a meta-analysis. **Behav Res Ther**, 43, n. 11, p. 1391-1424, Nov 2005.

LO, J. C.; HUANG, W. C.; CHOU, Y. C.; TSENG, C. H. *et al.* Activation of P2X(7) receptors decreases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in RBA-2 astrocytes via distinct mechanisms. **J Neurochem**, 105, n. 1, p. 151-164, Apr 2008.

LONDOS, C.; COOPER, D. M.; WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 77, n. 5, p. 2551-2554, May 1980.

LOPEZ, J.; GAMACHE, K.; SCHNEIDER, R.; NADER, K. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. **J Neurosci**, 35, n. 6, p. 2465-2475, Feb 11 2015.

LORCA, R. A.; ROZAS, C.; LOYOLA, S.; MOREIRA-RAMOS, S. *et al.* Zinc enhances long-term potentiation through P2X receptor modulation in the hippocampal CA1 region. **Eur J Neurosci**, 33, n. 7, p. 1175-1185, Apr 2011.

LORD, B.; ALUISIO, L.; SHOBLOCK, J. R.; NEFF, R. A. *et al.* Pharmacology of a novel central nervous system-penetrant P2X7 antagonist JNJ-42253432. **J Pharmacol Exp Ther**, 351, n. 3, p. 628-641, Dec 2014.

LUO, Y.; ZHOU, J.; LI, M. X.; WU, P. F. *et al.* Reversal of aging-related emotional memory deficits by norepinephrine via regulating the stability of surface AMPA receptors. **Aging Cell**, 14, n. 2, p. 170-179, Apr 2015.

MAN, H. Y.; WANG, Q.; LU, W. Y.; JU, W. *et al.* Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. **Neuron**, 38, n. 4, p. 611-624, May 22 2003.

MARCOLI, M.; CERVETTO, C.; PALUZZI, P.; GUARNIERI, S. *et al.* P2X7 pre-synaptic receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals: a role in ATP-induced glutamate release. **J Neurochem**, 105, n. 6, p. 2330-2342, Jun 01 2008.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci**, 24, p. 897-931, 2001.

MAREN, S. The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. **Ann N Y Acad Sci**, 985, p. 106-113, Apr 2003.

MAREN, S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. **Eur J Neurosci**, 28, n. 8, p. 1661-1666, Oct 2008.

MATUS-AMAT, P.; HIGGINS, E. A.; BARRIENTOS, R. M.; RUDY, J. W. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. **J Neurosci**, 24, n. 10, p. 2431-2439, Mar 10 2004.

MCGAUGHH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, 287, n. 5451, p. 248-251, Jan 14 2000.

MCGAUGHH, J. L. Making lasting memories: remembering the significant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110 Suppl 2, p. 10402-10407, Jun 18 2013.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci**, 21, n. 6, p. 208-210, Jun 2000.

MCINTYRE, C. K.; MCGAUGH, J. L.; WILLIAMS, C. L. Interacting brain systems modulate memory consolidation. **Neurosci Biobehav Rev**, 36, n. 7, p. 1750-1762, Aug 2012.

MENDOZA-FERNANDEZ, V.; ANDREW, R. D.; BARAJAS-LOPEZ, C. ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. **J Pharmacol Exp Ther**, 293, n. 1, p. 172-179, Apr 2000.

MILAD, M. R.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K.; QUIRK, G. J. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. **Biol Psychol**, 73, n. 1, p. 61-71, Jul 2006.

MONGILLO, G.; RUMPEL, S.; LOEWENSTEIN, Y. Inhibitory connectivity defines the realm of excitatory plasticity. **Nat Neurosci**, 21, n. 10, p. 1463-1470, Oct 2018.

MORI, M.; HEUSS, C.; GAHWILER, B. H.; GERBER, U. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. **J Physiol**, 535, n. Pt 1, p. 115-123, Aug 15 2001.

MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. Modulation of the extinction of fear learning. **Brain Res Bull**, 105, p. 61-69, Jun 2014.

NADER, K.; HARDT, O.; LANIUS, R. Memory as a new therapeutic target. **Dialogues Clin Neurosci**, 15, n. 4, p. 475-486, Dec 2013.

NADER, K.; SCHAFÉ, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406, n. 6797, p. 722-726, Aug 17 2000.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, 100, n. 4, p. 656-664, Feb 2012.

NIEBER, K.; POELCHEN, W.; ILLES, P. Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurones of the rat. **Br J Pharmacol**, 122, n. 3, p. 423-430, Oct 1997.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev**, 82, n. 4, p. 1013-1067, Oct 2002.

NORTH, R. A. P2X receptors. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 371, n. 1700, Aug 5 2016.

ORSINI, C. A.; MAREN, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. **Neurosci Biobehav Rev**, 36, n. 7, p. 1773-1802, Aug 2012.

PANKRATOV, Y.; CASTRO, E.; MIRAS-PORTUGAL, M. T.; KRISHTAL, O. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. **Eur J Neurosci**, 10, n. 12, p. 3898-3902, Dec 1998.

PANKRATOV, Y.; LALO, U.; CASTRO, E.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. *et al.* ATP receptor-mediated component of the excitatory synaptic transmission in the hippocampus. **Prog Brain Res**, 120, p. 237-249, 1999.

PANKRATOV, Y.; LALO, U.; KRISHTAL, O.; VERKHRATSKY, A. Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. **Journal of Physiology-London**, 542, n. 2, p. 529-536, Jul 15 2002.

PANKRATOV, Y. V.; LALO, U. V.; KRISHTAL, O. A. Role for P2X receptors in long-term potentiation. **J Neurosci**, 22, n. 19, p. 8363-8369, Oct 1 2002.

PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. **Physiol Rev**, 90, n. 2, p. 419-463, Apr 2010.

PAPP, L.; VIZI, E. S.; SPERLAGH, B. Lack of ATP-evoked GABA and glutamate release in the hippocampus of P2X7 receptor-/- mice. **Neuroreport**, 15, n. 15, p. 2387-2391, Oct 25 2004.

PEDATA, F.; DETTORI, I.; COPPI, E.; MELANI, A. *et al.* Purinergic signalling in brain ischemia. **Neuropharmacology**, 104, p. 105-130, May 2016.

PEREIRA, V. S.; CASAROTTO, P. C.; HIROAKI-SATO, V. A.; SARTIM, A. G. *et al.* Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: Involvement of nitric oxide. **Eur Neuropsychopharmacol**, Feb 2013.

PETERSON, T. S.; CAMDEN, J. M.; WANG, Y.; SEYE, C. I. *et al.* P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. **Mol Neurobiol**, 41, n. 2-3, p. 356-366, Jun 2010.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, 106, n. 2, p. 274-285, Apr 1992.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Lesions of the fornix but not the entorhinal or perirhinal cortex interfere with contextual fear conditioning. **J Neurosci**, 15, n. 7 Pt 2, p. 5308-5315, Jul 1995.

PITKANEN, A.; SAVANDER, V.; LEDOUX, J. E. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. **Trends Neurosci**, 20, n. 11, p. 517-523, Nov 1997.

PSOTTA, L.; LESSMANN, V.; ENDRES, T. Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. **Neurobiol Learn Mem**, 103, p. 34-38, Jul 2013.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33, n. 1, p. 56-72, Jan 2008.

RESSLER, K. J.; ROTHBAUM, B. O.; TANNENBAUM, L.; ANDERSON, P. *et al.* Cognitive enhancers as adjuncts to psychotherapy: use of D-cycloserine in phobic individuals to facilitate extinction of fear. **Arch Gen Psychiatry**, 61, n. 11, p. 1136-1144, Nov 2004.

RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, 18, n. 9, p. 2027-2035, Sep 2008.

RESSTEL, L. B.; JOCA, S. R.; MOREIRA, F. A.; CORREA, F. M. *et al.* Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. **Behav Brain Res**, 172, n. 2, p. 294-298, Sep 25 2006.

RIBEIRO, J. A. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. **Pharmacol Toxicol**, 77, n. 5, p. 299-305, Nov 1995.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav Brain Res**, 140, n. 1-2, p. 1-47, Mar 18 2003.

RODRIGUES, R. J.; ALMEIDA, T.; RICHARDSON, P. J.; OLIVEIRA, C. R. *et al.* 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. **J Neurosci**, 25, n. 27, p. 6286-6295, Jul 6 2005.

RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Memory Reconsolidation or Updating Consolidation? In: BERMUDEZ-RATTONI, F. (Ed.). **Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging**. Boca Raton (FL), 2007. (Frontiers in Neuroscience).

SAH, P.; FABER, E. S.; LOPEZ DE ARMENTIA, M.; POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, 83, n. 3, p. 803-834, Jul 2003.

SANTINI, E.; MULLER, R. U.; QUIRK, G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. **J Neurosci**, 21, n. 22, p. 9009-9017, Nov 15 2001.

SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem**, 7, n. 2, p. 73-84, Mar-Apr 2000.

SAWADA, K.; ECHIGO, N.; JUGE, N.; MIYAJI, T. *et al.* Identification of a vesicular nucleotide transporter. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 15, p. 5683-5686, Apr 15 2008.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. **Front Neurol Neurosci**, 34, p. 6-17, 2014.

SINGEWALD, N.; SCHMUCKERMAIR, C.; WHITTLE, N.; HOLMES, A. *et al.* Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacol Ther**, 149, p. 150-190, May 2015.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Curr Opin Neurobiol**, 20, n. 2, p. 231-235, Apr 2010.

SOTRES-BAYON, F.; SIERRA-MERCADO, D.; PARDILLA-DELGADO, E.; QUIRK, G. J. Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. **Neuron**, 76, n. 4, p. 804-812, Nov 21 2012.

SPERLAGH, B.; KOFALVI, A.; DEUCHARS, J.; ATKINSON, L. *et al.* Involvement of P2X₇ receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. **J Neurochem**, 81, n. 6, p. 1196-1211, Jun 2002.

SPERLAGH, B.; VIZI, E. S. Effect of presynaptic P2 receptor stimulation on transmitter release. **J Neurochem**, 56, n. 5, p. 1466-1470, May 1991.

SQUIRE, L. R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Curr Opin Neurobiol**, 5, n. 2, p. 169-177, Apr 1995.

STIEDL, O.; MISANE, I.; SPIESS, J.; OGREN, S. O. Involvement of the 5-HT_{1A} receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. **J Neurosci**, 20, n. 22, p. 8515-8527, Nov 15 2000.

SUN, Y.; GOOCH, H.; SAH, P. Fear conditioning and the basolateral amygdala. **F1000Res**, 9, 2020.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W.; MASUSHIGE, S. *et al.* Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**, 24, n. 20, p. 4787-4795, May 19 2004.

SZAPIRO, G.; GALANTE, J. M.; BARROS, D. M.; LEVI DE STEIN, M. *et al.* Molecular mechanisms of memory retrieval. **Neurochem Res**, 27, n. 11, p. 1491-1498, Nov 2002.

SZAPIRO, G.; VIANNA, M. R.; MCGAUGH, J. L.; MEDINA, J. H. *et al.* The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. **Hippocampus**, 13, n. 1, p. 53-58, 2003.

TEWARI, M.; SETH, P. Emerging role of P2X₇ receptors in CNS health and disease. **Ageing Res Rev**, 24, n. Pt B, p. 328-342, Nov 2015.

TRIFILIEFF, P.; CALANDREAU, L.; HERRY, C.; MONS, N. *et al.* Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and amygdala may reveal a system consolidation of contextual fear memory. **Neurobiol Learn Mem**, 88, n. 4, p. 424-434, Nov 2007.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**, 87, n. 7, p. 1327-1338, Dec 27 1996.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Mol Brain**, 3, p. 15, May 13 2010.

VERGARA, R. C.; JARAMILLO-RIVERI, S.; LUARTE, A.; MOENNE-LOCCOZ, C. *et al.* The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. **Front Comput Neurosci**, 13, p. 49, 2019.

VIEIRA, P. A.; CORCHES, A.; LOVELACE, J. W.; WESTBROOK, K. B. *et al.* Prefrontal NMDA receptors expressed in excitatory neurons control fear discrimination and fear extinction. **Neurobiol Learn Mem**, 119, p. 52-62, Mar 2015.

WANG, Y.; HAUGHEY, N. J.; MATTSON, M. P.; FURUKAWA, K. Dual effects of ATP on rat hippocampal synaptic plasticity. **Neuroreport**, 15, n. 4, p. 633-636, Mar 22 2004.

WIERASZKO, A. Extracellular ATP as a neurotransmitter: its role in synaptic plasticity in the hippocampus. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, 56, n. 2, p. 637-648, 1996.

WIERASZKO, A.; EHRLICH, Y. H. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. **J Neurochem**, 63, n. 5, p. 1731-1738, Nov 1994.

YEHUDA, R.; JOELS, M.; MORRIS, R. G. The memory paradox. **Nat Rev Neurosci**, 11, n. 12, p. 837-839, Dec 2010.

YOKOYAMA, M.; SUZUKI, E.; SATO, T.; MARUTA, S. *et al.* Amygdalic levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. **Neurosci Lett**, 379, n. 1, p. 37-41, Apr 29 2005.

YOUNG, C. N. J.; GORECKI, D. C. P2RX7 Purinoceptor as a Therapeutic Target-The Second Coming? **Front Chem**, 6, p. 248, 2018.

ZHANG, G.; ASGEIRSDOTTIR, H. N.; COHEN, S. J.; MUNCHOW, A. H. *et al.* Stimulation of serotonin 2A receptors facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, 64, p. 403-413, Jan 2013.

ZIMMERMAN, J. M.; RABINAK, C. A.; MCLACHLAN, I. G.; MAREN, S. The central nucleus of the amygdala is essential for acquiring and expressing conditional fear after overtraining. **Learn Mem**, 14, n. 9, p. 634-644, Sep 2007.

Anexos



P2X7 purinergic receptors participate in the expression and extinction processes of contextual fear conditioning memory in mice



L.B. Domingos¹, S.C. Hott¹, A.L.B. Terzian, L.B.M. Resstel*

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 March 2017

Received in revised form

27 July 2017

Accepted 8 August 2017

Available online 9 August 2017

Keywords:

Purinergic system

P2X7 receptor

ATP

Contextual fear conditioning

Memory extinction

ABSTRACT

The purinergic system consists of two large receptor families – P2X and P2Y. Both are activated by adenosine triphosphate (ATP), although presenting different functions. These receptors are present in several brain regions, including those involved in emotion and stress-related behaviors. Hence, they seem to participate in fear- and anxiety-related responses. However, few studies have investigated the purinergic system in threatening situations, as observed in contextual fear conditioning (CFC). Therefore, this study investigated the involvement of purinergic receptors in the expression and extinction of aversive memories. C57Bl/6 background mice were submitted to the CFC protocol. Wildtype (WT) mice received i.p. injection of either a nonselective P2 receptor (P2R) antagonist, P178 (10 or 30 mg/kg); a selective P2X7 receptor (P2X7R) antagonist, A438079 (10 mg/kg); a selective P2Y1 receptor (P2Y1R) antagonist, MRS2179 (10 mg/kg); or vehicle 10 min prior to or immediately after the extinction session. Additionally, P2X7R KO mice were tested in the CFC protocol. After P2R antagonist treatment, contextual fear recall increased, while acquisition of extinction was impaired. Similar results were observed with the selective P2X7R antagonist, but not with the selective P2Y1R antagonist. Interestingly, P2X7R KO mice showed increased contextual fear recall, associated with impaired acquisition of extinction, in accordance with pharmacologic P2X7R antagonism. Our results suggest that specific pharmacological or genetic blockade of P2X7R promotes anxiogenic-like effects, along with deficits in extinction learning. Thus, these receptors could present an alternative treatment of stress-related psychiatric disorders.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Psychiatric disorders have a significant impact on the quality of individual life, resulting in personal, social and devastating economic consequences (WHO, 2008). Several stress-related disorders, such as anxiety, have been widely studied, but its pathophysiology is still poorly understood (Graeff, 2005). Nonetheless, the current treatment for several mood disorders – based on pharmacological intervention and psychotherapy – are not always effective (Hoffman and Mathew, 2008; Temel et al., 2012).

Besides symptoms related to increased alertness, patients diagnosed with anxiety-related emotional disorders might also present impairment in extinction of aversive memories (Muigg

et al., 2008; Gourley et al., 2009). Fear extinction has an enormous physiological and/or adaptive importance. In contrast, diminished ability to extinguish an aversive memory causes repeated or exacerbated responses to cues that no longer predict danger or even during safe situations (Izquierdo et al., 2002). Nowadays, there is a growing interest in understanding the neural basis and mechanisms involved in fear extinction, especially when this process is considered as part of anxiety-related disorders treatment (Taylor et al., 2003; Davis et al., 2006).

A widely used animal test to study fear-associated disorders is fear conditioning, based on classical Pavlovian conditioning. In this test, an initially neutral stimulus, such as a context, is associated with an aversive (unconditioned) stimulus, usually electric foot-shocks (Fendt and Fanselow, 1999). Thus, the previous neutral stimulus, now considered a conditioned stimulus, predicts the aversive stimulus when the animal is re-exposed to it. Therefore, conditioned-unconditioned stimuli association is observed, allowing the study of aversive memory acquisition. (Fanselow, 1980; Lattal and Abel, 2001). Moreover, prolonged exposure only to the

* Corresponding author. Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 3900, Bandeirantes Avenue, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil.

E-mail address: leoresstel@yahoo.com.br (L.B.M. Resstel).

¹ These authors contributed equally to this work.

conditioned stimulus initiates another learning processes named extinction of the aversive memory (Suzuki et al., 2004; Milad et al., 2006). During this process, a new memory is formed in which the animal learns that the context no longer predicts shock, and fear expression decreases (Vidal-Gonzalez et al., 2006; Burgos-Robles et al., 2007; Quirk and Mueller, 2008).

Extinction processing depends on several brain regions' activity, such as the hippocampus, amygdala and pre-frontal cortex (Fiorenza et al., 2012; Orsini and Maren, 2012). Interestingly, purines and purinergic receptors (P2R) are present in these areas, where these receptors and the main endogenous purine, adenosine 5'-triphosphate (ATP), are widely expressed and secreted in glial cells and neurons, respectively (del Puerto et al., 2013; Burnstock 2015).

The P2R are classified according to their function, pharmacological and molecular characteristics into two major families: the P2X ligand-gated cationic channel receptors (P2X1–7 subtypes) and the P2Y G protein-coupled receptors (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12 subtypes) (Kennedy and Burnstock, 1985; Abbracchio and Burnstock, 1994).

The interest in purines and the purinergic system has increased in the past years due to its involvement in the modulation of several physiological mechanisms such as synaptic plasticity, neuropathic pain, neuroinflammation and degeneration, cognition and behavior (Burnstock, 2007, 2015; Edwards et al., 1992; Inoue et al., 1996; Pankratov et al., 1999; Mori et al., 2001; Jo and Role, 2002; Fredholm et al., 2005; Illes et al., 2012). Lately, P2R have also been associated with several psychiatric disorders, such as anxiety (Köles et al., 2005; Burnstock, 2007, 2015; Matute and Cavalieri, 2011; Cieślak et al., 2017; Krugel, 2016). Nevertheless, more evidence is necessary to associate the purinergic system with the neurobiology of those mental disorders.

In preclinical studies, Kittner et al. (1997) demonstrated that animals centrally injected with an ATP analog showed increase in locomotor activity in the open field test. Additionally, P2Y1 receptor (P2Y1R) activation produced an anxiolytic-like effect on the elevated plus maze in a nitric oxide-dependent manner, while its antagonism produced the opposite effect (Kittner et al., 2003). Oppositely, no effect in the elevated plus maze was observed by Pereira et al. (2013) when animals received systemic treatment with different P2R antagonists (Pereira et al., 2013). Furthermore, genetic deletion of P2X7 receptor produced no significant differences in mice submitted to the elevated plus maze or the novelty suppressed feeding paradigm (Basso et al., 2009; Boucher et al., 2011).

In addition to the contradictory results regarding the role of P2R in anxiety-related responses, little is known about the involvement of the purinergic system and its specific receptors in learned behavior and aversive memory extinction.

Thus, considering the above mentioned, this work aimed to investigate the role of the purinergic system in animals submitted to the contextual fear conditioning, an animal model of anxiety based on aversive learning.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male C57BL/6 mice (WT) and ubiquitous P2X7 knockout (P2X7 KO) mice (8–10 weeks) from our local facility (School of Medicine of Ribeirão Preto, FMERP-USP, Ribeirão Preto, Brazil) were housed in groups of 4–5 mice/cage in standard laboratory conditions with free access to food and water, under a 12 h light-dark cycle (lights on at 06:00 a.m.). P2X7 KO mice (B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J) were obtained from The Jackson Laboratory

(USA; generated by Pfizer Inc.) (Solle et al., 2001).

All experiments were performed during the light phase (8 a.m.–4 pm). Procedures were conducted according to the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, following international laws and policies. The local ethical committee approved housing conditions and experimental procedures (Process number 043/2013).

2.2. Drugs

The nonselective P2R antagonist pyridoxal phosphate-6-azo (benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate (P178; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), the selective P2X7R antagonist 3-[[5-(2,3-Dichlorophenyl)-1H-tetrazol-1-yl] methyl] pyridine hydrochloride (A438079; Tocris, Ellisville, MO, USA) and the selective P2Y1 antagonist 2'-Deoxy-N6-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt hydrochloride (MRS2179; Tocris, Ellisville, MO, USA) were used. All drugs were prepared in sterile isotonic saline (NaCl 0.9%; vehicle) and injected intraperitoneally (i.p.) in a 10 mL/kg volume. All solutions were prepared immediately before use.

2.3. Contextual fear conditioning (CFC)

Conditioning, extinction, and test sessions were performed in conditioning chambers (23 × 20 × 21 cm, Insight, Ribeirão Preto, Brazil). The chambers had opaque walls except for one wall made of transparent Plexiglas. The floor was composed of 23 stainless steel rods (2 mm in diameter), spaced 1.0 cm apart, and wired to a footshock generator. After each animal was tested, the chamber was cleaned with 70% ethanol.

The CFC was divided into three sessions. The first session, *conditioning session*, consisted of three electric footshocks (0.85 mA/2 s) delivered pseudorandomly at 30–60 s intervals, which started 120 s after placing the animal into the chamber. After 5 min, the animal returned to its home cage.

Twenty-four hours after the conditioning session, the same chamber was used, but it was located in a different room. In this second session, *extinction session*, freezing behavior was evaluated for 21 min without any shock presentation.

After additional 24 h, the third session, *test session*, the animal was again placed in the contextual chamber for 5 min without shock presentation while freezing behavior was evaluated.

The aversive response was assessed as the percentage of time mice spent freezing (Suzuki et al., 2004). A blind experienced investigator manually scored freezing behavior. Freezing is defined as the complete lack of movement, except for that necessary for breathing (Fanselow, 1980).

2.4. Experimental procedure

In the pharmacological experiments, WT animals were treated with i.p. injection either 10 min prior to, or immediately after the extinction session. Independent groups received: a) a nonselective P2R antagonist, P178 (10 or 30 mg/kg); b) a selective P2X7R antagonist, A438079 (10 mg/kg); c) a selective P2Y1R antagonist, MRS2179 (10 mg/kg), or d) vehicle. Drugs doses and injection times were based and adapted from Pereira et al. (2013) and Kittner et al. (2003), related to drug's bioavailability and bioequivalence.

In the second set of experiments, P2X7R KO mice along with their WT control were used to evaluate the participation of P2X7R in every phase of contextual fear conditioning.

2.5. Statistical analysis

Freezing behavior was expressed as a percentage of the total test time. Data was analyzed using One-way ANOVA for fear recall, followed by Bonferroni's or Student's *t*-test when appropriate; or Two-way ANOVA with treatment or genotype as the main independent factor, followed by Bonferroni's post hoc test. Data were expressed as mean \pm SEM. $p < 0.05$ was assumed statistically significant compared to control group.

3. Results

Animals were evaluated during the conditioning phase, in order to access their freezing behavior levels prior to extinction. Both WT and P2X7R KO animals presented similar and satisfactory freezing levels, increasing after each shock presentation (time: $F_{2,16} = 97.31$, $p < 0.01$; treatment: $F_{1,8} = 2.84$, $p = 0.13$; interaction: $F_{2,16} = 1$, $p = 0.41$).

3.1. Effect of the pharmacological antagonism of purinergic receptors on contextual fear conditioning and extinction of aversive memory

Animals were treated with the nonselective P2R antagonist P178, prior to the extinction session. Those animals receiving P178 higher dose (30 mg/kg) presented significantly increased freezing levels when compared to the vehicle treated group ($F_{2,17} = 5.5$, $p < 0.05$; Group freezing percentage mean – Veh: 48.14 ± 7.7 ; P178 10 mg/kg: 43.66 ± 8.5 ; P178 30 mg/kg: 76.33 ± 4.0 . Veh vs 10 mg/kg, $p > 0.05$, $t = 0.44$; Veh vs P178 30 mg/kg, $p < 0.05$, $t = 2.68$; P178 10 mg/kg vs P178 30 mg/kg $p < 0.05$, $t = 3.10$. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Fig. 1b). Although all groups showed decreased freezing behavior at the end of the 21 min in the extinction section (time: $F_{6,102} = 40.28$, $p < 0.01$; treatment: $F_{2,17} = 4.40$, $p < 0.05$; interaction: $F_{12,102} = 2.52$, $p < 0.01$; Fig. 1c), 24 h later, in the test session, nonselective P2R antagonist P178

(30 mg/kg) group showed sustained freezing expression, indicating impaired acquisition of extinction learning ($F_{2,17} = 6.0$, $p < 0.01$; Group freezing percentage mean – Veh: 24.7 ± 7.5 ; P178 10 mg/kg: 29.27 ± 6.2 ; P178 30 mg/kg: 57.28 ± 7.1 . Veh vs 10 mg/kg, $p > 0.05$ $t_{17} = 0.47$; Veh vs P178 30 mg/kg, $p < 0.05$ $t_{17} = 3.25$; P178 10 mg/kg vs P178 30 mg/kg $p < 0.05$, $t_{17} = 2.80$. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Fig. 1c).

Treatment with the selective P2X7R antagonist A438079 (10 mg/kg; $n = 6$) prior to the extinction session increased fear recall, while P2Y1R antagonist MRS2179 (10 mg/kg; $n = 5$) showed no difference ($F_{2,15} = 21.72$; $p < 0.05$. Group freezing percentage mean – Veh: 50.88 ± 1.9 ; A438079: 77.54 ± 2.4 ; MRS2179: 56.17 ± 5.1 . Veh vs A438079, $p < 0.05$ $t_{15} = 6.20$; Veh vs MRS2179, $p > 0.05$ $t_{15} = 1.13$; A438079 vs MRS2179 $p < 0.05$, $t_{15} = 4.72$. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Fig. 2b).

The groups receiving P2X7R antagonist A438079 presented delayed fear extinction and increased freezing expression in the test session. Oppositely, animals treated with the selective P2Y1R antagonist MRS2179 showed no alteration in freezing levels in any phase when compared to the vehicle-treated group. Additionally, all groups were able to learn during the extinction session (time: $F_{6,84} = 72.24$; $p < 0.001$; treatment: $F_{2,14} = 9.81$; $p < 0.05$, interaction: $F_{12,84} = 4.05$; $p < 0.001$. Fig. 2c). However, during the test session, only the group treated with selective P2X7R antagonist A438079 showed increased freezing expression, which suggests a deficit in retention of extinction learning ($F_{2,14} = 3.80$, $p < 0.05$; Group freezing percentage mean – Veh: 31.17 ± 6.7 ; A438079: 57.45 ± 8.7 ; MRS2179: 28.73 ± 9.3 . Veh vs A438079, $p < 0.05$ $t_{14} = 2.32$; Veh vs MRS2179, $p > 0.05$ $t_{14} = 0.20$; A438079 vs MRS2179 $p > 0.05$, $t_{14} = 2.41$. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. Fig. 2c).

Furthermore, animals treated immediately after the extinction session with nonselective P2R antagonist P178 (10 or 30 mg/kg, $n = 6$) showed no difference in expression ($F_{2,26} = 1.9$, $p = 0.16$; Group freezing percentage mean – Veh: 59.01 ± 5.5 ; P178 10 mg/kg: 49.86 ± 5.8 ; P178 30 mg/kg: 66.85 ± 4.0 . Veh vs 10 mg/kg,

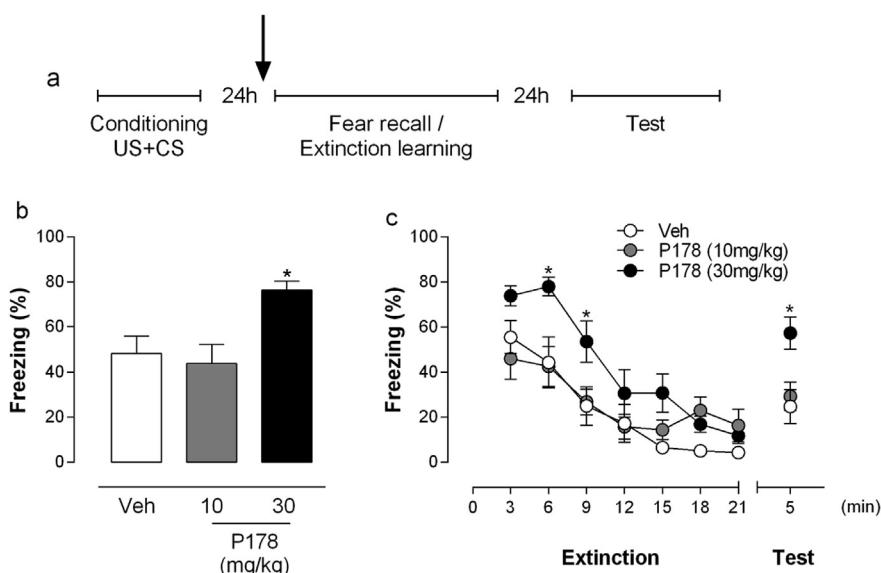


Fig. 1. P2R nonselective antagonism before the extinction session impairs contextual fear extinction learning. a) Protocol scheme of the effect of systemic injection of nonselective P2R antagonist P178 (10 or 30 mg/kg, $n = 6$ –7/group) or vehicle ($n = 7$) 10 min prior to the extinction session. b) Fear recall, observed in the first 6 min of the extinction session. Statistical analyses performed: One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. c) Extinction profile during the last 21 min of the extinction session, and freezing expression in the test session. Statistical analyses performed: Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. All data is expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to the vehicle group.

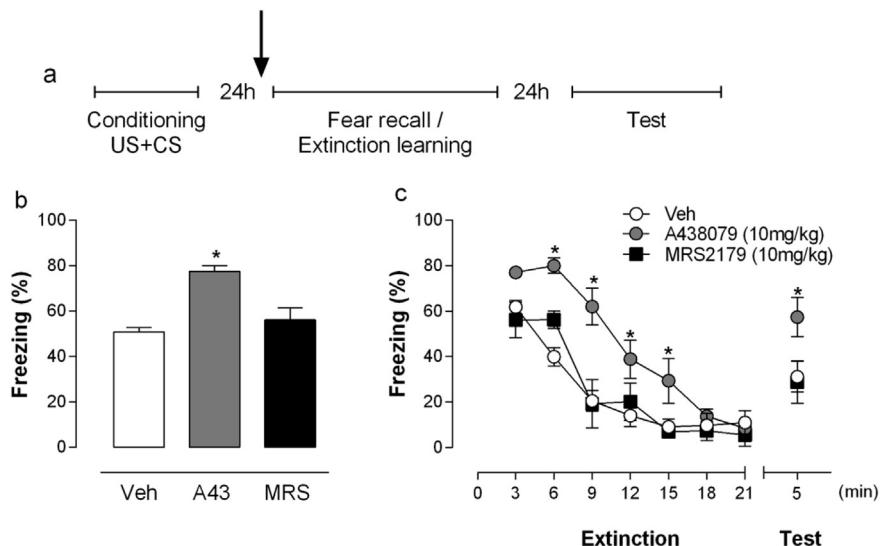


Fig. 2. Selective antagonism of P2X7R before the extinction session increases fear recall. **a)** Protocol scheme of the effect of systemic injection of selective P2X7R antagonist A438079 (10 mg/kg, n = 5), selective P2Y1R antagonist MRS2179 (10 mg/kg; n = 5) or vehicle (n = 7) 10 min prior to the extinction session. **b)** Fear recall, observed in the first 6 min of the extinction session. Statistical analyses performed: One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. **c)** Extinction profile during the last 21 min of the extinction session, and freezing expression in the test session. Statistical analyses performed: Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test All data is expressed as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the vehicle group.

$p > 0.05$ t = 1.22; Veh vs P178 30 mg/kg, p > 0.05 t = 0.86; P178 10 mg/kg vs P178 30 mg/kg p > 0.05, t = 1.89. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. **Fig. 3b**), fear extinction (time: F_{6,156} = 41.0, p < 0.001; treatment: F_{2,26}=0.74, p = 0.48; interaction: F_{12,156} = 1.10, p = 0.36; **Fig. 3c**) and freezing expression in the test session when compared to the control group (F_{2,27} = 0.45, p = 0.64; Group freezing percentage mean – Veh: 38.24 ± 6.5; P178 10 mg/kg: 30.20 ± 5.2; P178 30 mg/kg: 32.72 ± 9.2. Veh vs 10 mg/kg, p > 0.05 t = 0.94; Veh vs P178 30 mg/kg, p > 0.05 t = 0.52; P178 10 mg/kg vs P178 30 mg/kg p > 0.05, t = 0.24. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test. **Fig. 3c**).

3.2. Effect of the genetic deletion of P2X7R on contextual fear conditioning and extinction of aversive memory

Similar to the results obtained after pharmacological treatment, P2X7R KO animals (n = 9) showed an increase in contextual fear recall when compared to the WT control (n = 8) (t₁₆ = 2.84, p < 0.05; Group freezing percentage mean – WT: 53.55 ± 5.9; KO: 73.42 ± 3.7. **Fig. 4b**). Additionally, during the extinction phase, both groups showed reduction in freezing behavior (time: F_{6,90} = 74.66, p < 0.001; genotype: F_{1,15} = 8.47, p < 0.05; interaction: F_{6,90} = 3.38, p < 0.01; **Fig. 4c**). However, in the test session, P2X7R KO presented

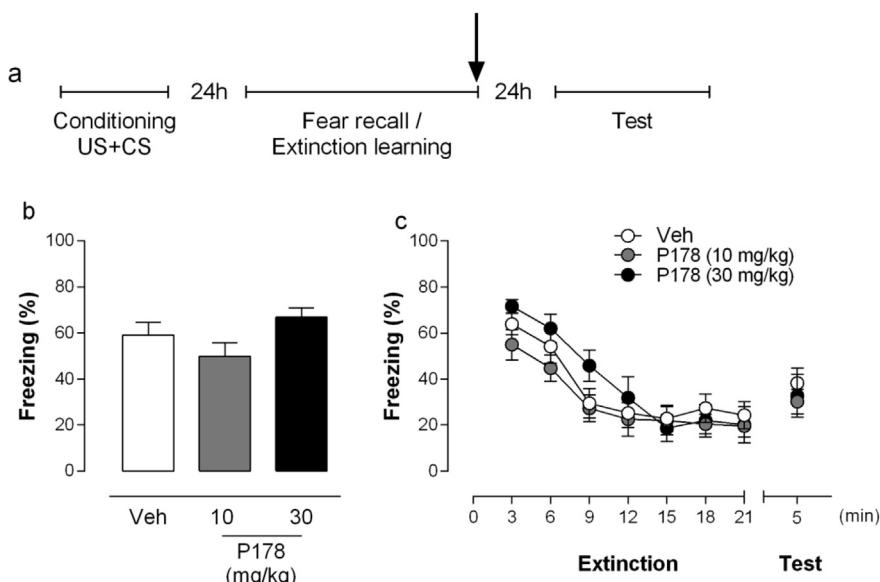


Fig. 3. P2R nonselective antagonism immediately after the extinction session does not affect consolidation of extinction learning. **a)** Protocol scheme of the effect of systemic injection of nonselective P2R antagonist P178 (10 or 30 mg/kg, n = 6–7/group) or vehicle (n = 7) immediately before the extinction session. **b)** Fear recall, observed in the first 6 min of the extinction session. Statistical analyses performed: One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. **c)** Extinction profile during the last 21 min of the extinction session, and freezing expression in the test session. Statistical analyses performed: Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. All data is expressed as mean ± SEM. *p < 0.05 compared to the vehicle group.

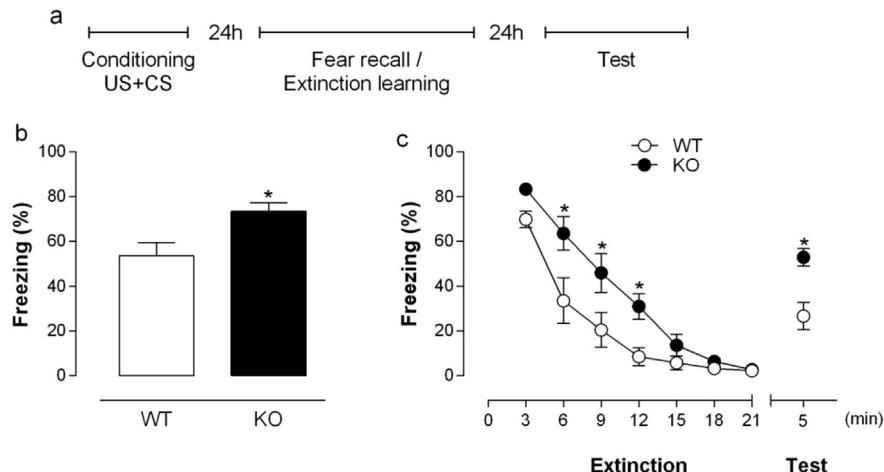


Fig. 4. P2X7R deletion impairs extinction learning and increases fear recall. **a)** Protocol scheme of the effect of ubiquitous deletion of P2X7R ($n = 9$) compared to WT ($n = 8$). **b)** Fear recall, observed in the first 6 min of the extinction session. Statistical analyses performed: One-way ANOVA followed by Student's *t*-test. **c)** Extinction profile during the last 21 min of the extinction session, and freezing expression in the test session. Statistical analyses performed: Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test Data is expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control group.

increased freezing recall, indicating impaired consolidation of extinction learning, when compared to the control group ($t_{15} = 3.76$, $P < 0.01$; Group freezing percentage mean – WT: 26.62 ± 6.0 ; KO: 52.89 ± 3.8 . Fig. 4c).

4. Discussion

The present study showed that blockade of purinergic neurotransmission by the non-selective P2R antagonist P178 increased freezing recall associated with contextual fear. In addition, P178 also impaired acquisition of extinction learning. Similar results were obtained after selective P2X7R antagonism with A438079, but not by selective pharmacological blockade of P2Y1R by MRS2179. Interestingly, the behavior profile of P2X7 KO mice mimicked the deficits observed after P2R antagonism, suggesting the involvement of these receptors in retention and expression of fear extinction learning.

Although the results observed after the pharmacological antagonism of purinergic receptors could also have involved state dependency, the similar results observed with the P2X7 KO animals (that would lack this signaling before both the extinction and test sessions) indicate this possibility is unlikely.

Considering the P2X receptor family, P2X7R has received considerable attention due to its involvement in psychiatric disorders. The gene responsible for P2X7R expression has been related to major depression (Lucae et al., 2006) and bipolar disorders (Barden et al., 2006). However, purinergic system involvement in preclinical anxiety-related responses is still inconsistent. P2X7R knockout mice showed increased or no alteration in exploration in the elevated plus maze (EPM) when compared to wildtype controls (Basso et al., 2009; Boucher et al., 2011). No alterations were observed also in Swiss mice submitted to the EPM after treatment with P2XR antagonists, PPADS or iso-PPADS (Pereira et al., 2013). In contrast, rats treated with PPADS presented anxiolytic-like responses in the same test (Kittner et al., 2003). Notwithstanding, P2Y1 receptors seem to be involved in the control of anxiety-related behaviors (Kittner et al., 2003). An anxiolytic-like effect was observed in the EPM after selective P2Y1 antagonism, which appears to depend on nitric oxide (NO) (Kittner et al., 2003). However, in the present study, no effect was observed after P2Y receptor antagonism.

It is worth noting that the EPM is an anxiety test based on innate

behavior – it generates an innate conflict between the animal's need to explore new environments while also avoiding potential risks, such as open and elevated spaces (Korte and De Boer, 2003; Graeff, 2005). On the other hand, fear conditioning is a classical Pavlovian conditioning test. It is based on experience learning, where the conditioned stimulus (i.e., context or sensorial cues) signals dangerous information (i.e. footshock) generating associative processes. Future exposure only to the conditioned stimulus triggers typical defense strategies, among which is the freezing response. In cognitive terms, the stimulus association depends on the information level provided to the animal (Maren, 2001; Graeff, 2005). Therefore, while both tests – EPM and fear conditioning – are widely used to study anxiety, they differ in aversive contents, which also recruit different neurobiological networks and systems (Gomes et al., 2014). Accordingly, our data reveals that only P2X7R is involved in fear conditioning learning and extinction processes, shown by impairing these responses after selective pharmacological or genetic blockade of P2X7R. These results suggest a tonic role of endogenous ATP in the control of emotional responses.

Regarding memory processing, our results did not corroborate those observed by Campos et al. (2014). In the latter study, after pharmacological P2X7R blockade in rats hippocampus or genetic P2X7R deletion in mice, animals showed reduced freezing behavior after contextual fear conditioning protocol (Campos et al., 2014). Several aspects could account for the discrepancy founded. Firstly, Campos et al. (2014) used a shock protocol with lower intensity, shorter exposure time, and not randomly delivered. These parameters could generate lower levels of fear conditioned response, resulting in less freezing expression. Opposite results could also be explained by the differences in route of administration – central vs systemic. Also, systemic injection can affect different brain regions – i.e. amygdala, prefrontal cortex, periaqueductal gray matter – involved in aversive memory processing, thus not only modulating hippocampus activity (Quirk and Mueller, 2008). Moreover, the different species used (mice vs rats) for pharmacological treatment with P2X7R antagonist is another possible explanation for the dissimilar results. Interestingly, in our study we observed similar responses after i.p. injections of non-selective and selective P2X7R and constitutive P2R7R KO, suggesting a robust participation of these receptors in aversive situations.

Another process associated with learning and memory is reconsolidation. Various studies indicate that this phase initiates

after memory reactivation, such as re-exposure to a stimulus or situation (Nader et al., 2000; Tronson and Taylor, 2007). Others suggest a possible interaction between the extinction and reconsolidation processes (Pedreira and Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004). The stimulus re-exposure duration determines which of the two processes will predominate. Therefore, a long re-exposure favors memory extinction, whereas a short re-exposure facilitates the reconsolidation process. Hence, any disruption in these processes caused by P2X7R antagonism might alter the conditioned emotional response as a direct consequence. Our results suggest that although freezing behavior reduces during the extinction session, when P2X7R antagonism occurs before the prolonged re-exposure, the acquisition of extinction memory is impaired.

Furthermore, memory consolidation is a dynamic process that requires gene expression and protein synthesis (McGaugh, 2000). Inhibition of protein synthesis before or immediately after recovery from a fearful experience may disrupt the subsequent memory expression (Nader et al., 2000). Suzuki et al. (2004) showed that protein synthesis inhibition before the extinction session interferes with new memory formation that encodes the dissociation between context and aversive stimulus. Consequently, expression of the original fear memory is unchanged. Nonetheless, Lattal and Abel (2001) showed that inhibition of protein synthesis during re-exposure in contextual fear conditioning and in the Morris water maze was not able to modify the expression of the original memory, but only memory acquisition. Notably, we observed that P2X7R is involved in both the expression and the acquisition of contextual fear memory. Still, the mechanisms by which P2X7R modulates both acquisition and extinction are still unclear.

Additionally, fear memory extinction does not erase the conditioned memory. Instead, it enables acquisition-related plasticity to remain relatively intact, acting as a form of inhibitory learning (Konorski, 1967). The contrasting nature of both processes – fear extinction and fear acquisition – relies on their valence, one inhibitory and the other excitatory, or neurotransmission involved (Quirk and Mueller, 2008). Indeed, P2X7 receptors mediate network plastic alterations, recruiting innumerable neurotransmitters, such as glutamate, norepinephrine, serotonin and dopamine, and different signaling pathways (Sperlagh et al., 2012).

As for glutamatergic participation, NMDA receptor blockade prior to extinction training impairs retrieval of extinction the following day (Westbrook et al., 1994; Baker and Azorlosa, 1996; Santini et al., 2001; Suzuki et al., 2004), which suggests a possible explanation for our results. Interestingly, presynaptic P2R modulates glutamate release in the brain (Krugel et al., 2004), which consequently could also control NO levels. Thus, some studies suggest that P2XR activation increases the production of NO (Li et al., 2003; Murakami et al., 2003; Narcisse et al., 2005). Similarly, Codocedo et al. (2013) showed that ATP induces NO production in the hippocampus directly associated with P2X7R activation, whereas P2XR7 antagonism decreases NO levels (Codocedo et al., 2013). Furthermore, the ATP-glutamate association induces long-term potentiation on CA1-CA3 hippocampal synapses (Pankratov et al., 2002; Pedrazza et al., 2007; Lorca et al., 2011). Other studies showed that ATP could either increase or decrease glutamate release in hippocampal neurons (Inoue, 1998; Inoue et al., 1999). Altogether, these results suggest that the purinergic system orchestrates its actions through the glutamate-NO-pathway (Inoue et al., 1992; Khakh and Henderson, 1998; Egashira et al., 2008; Khakh, 2009; Cho et al., 2010).

Another possible mechanism by which P2X7R can modulate conditioned fear responses is via calcium channels. The activation of purinergic receptors often results in increased intracellular free calcium concentrations. Changes in calcium are involved in the regulation of many physiological processes in the CNS (Burnstock,

2007, 2015). An equal blockade of extinction acquisition was observed by systemic administration of the voltage-gated calcium channel (VGCC) antagonist nifedipine (Cain et al., 2002; Barad et al., 2004).

Continuing, P2X7R is the only member of the P2X family capable of forming a pore, which regulates cell permeability, leads to an influx of cations such as sodium and calcium, and to the release of cytokines and/or apoptosis (Narcisse et al., 2005). It has been shown that P2X7R activation is also associated with IL-1 β release in addition to the release of several neurotransmitters (Perregaux and Gabel, 1994; Solle et al., 2001). Moreover, P2R antagonists regulate NO synthase (NOS) expression stimulated by IL-1 β in astrocytes (Liu et al., 2000). Hence, considering that IL-1 β production and gene expression are modulated by stressful situations (Minami et al., 1991; Nguyen et al., 1998; Goshen et al., 2007; Goshen and Yirmiya, 2009), many lines of evidence point to the involvement of this proinflammatory cytokine in the control of fear responses (Goshen and Yirmiya, 2009). Pugh et al. (1999) described impaired contextual fear recall related to the central activity of IL-1 β , while Shintani et al. (1995a) mimicked several stress-related behavioral and neuroendocrine responses after IL-1 β central administration (Shintani et al., 1995a). In the same direction, fear conditioning induced expression of the gene responsible for IL-1 β synthesis in the hippocampus (Goshen et al., 2007). Furthermore, IL-1 knockout animals showed a reduction in contextual fear recall (Avital et al., 2003). Additionally, IL-1 β receptor antagonism in the hypothalamus also inhibits the release of monoamines and HPA axis activation induced by restraint stress (Shintani et al., 1995b).

5. Conclusion

In conclusion, the present study provides the first evidence of purinergic system involvement in contextual fear recall and extinction in animals submitted to a contextual fear conditioning protocol. Our results suggest that selective P2X7R inhibition, but not P2Y1R, increases fear recall and impairs acquisition of extinction learning in rodents. This provides a new perspective for P2X7 receptor as a novel target for the treatment for psychiatric disorders (Basso et al., 2009; Boucher et al., 2011; Csolle et al., 2013). Nevertheless, more studies are necessary to verify the molecular mechanisms underlying P2X7R in those responses.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest, including financial, personal or conflicts of any other nature.

Acknowledgement

The authors would like to thank Laura H. Camargo for technical support and Dr Francisco S. Guimarães for insightful discussions. In addition, the authors would like to thank CAPES, CNPq, FAEPA and FAPESP (LBD grant number: 2013/08674-0, ALBT grant number: 2014/22604-8) for financial support.

References

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445–475.
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R., 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus* 13, 826–834.
- Baker, J.D., Azorlosa, J.L., 1996. The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 110, 618–620.
- Barad, M., Blouin, A.M., Cain, C.K., 2004. Like extinction, latent inhibition of conditioned fear in mice is blocked by systemic inhibition of L-type voltage-

- gated calcium channels. *Learn Mem.* 11, 536–539.
- Barden, N., Harvey, M., Gagne, B., Shink, E., Tremblay, M., Raymond, C., Labbe, M., Villeneuve, A., Rochette, D., Bordeleau, L., Stadler, H., Holsboer, F., Muller-Myhsok, B., 2006. Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141B, 374–382.
- Basso, A.M., Bratcher, N.A., Harris, R.R., Jarvis, M.F., Decker, M.W., Rueter, L.E., 2009. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav. Brain Res.* 198, 83–90.
- Boucher, A.A., Arnold, J.C., Hunt, G.E., Spiro, A., Spencer, J., Brown, C., McGregor, I.S., Bennett, M.R., Kassiou, M., 2011. Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience* 189, 170–177.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., Quirk, G.J., 2007. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53, 871–880.
- Burnstock, G., 2007. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483.
- Burnstock, G., 2015. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system. *Curr. Med. Chem.* 22, 819–844.
- Cain, C.K., Blouin, A.M., Barad, M., 2002. L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression, of conditional fear in mice. *J. Neurosci.* 22, 9113–9121.
- Campos, R.C., Parfit, G.M., Polese, C.E., Coutinho-Silva, R., Morrone, F.B., Barros, D.M., 2014. Pharmacological blockage and P2X7 deletion hinder aversive memories: reversion in an enriched environment. *Neuroscience* 280, 220–230.
- Cho, J.H., Choi, I.S., Jang, I.S., 2010. P2X7 receptors enhance glutamate release in hippocampal hilar neurons. *Neuroreport* 21, 865–870.
- Cieślak, M., Wojtczak, A., Komoszyński, M., 2017 Feb. Role of the purinergic signaling in epilepsy. *Pharmacol. Rep.* 69 (1), 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.09.018> [Epub 2016 Sep 22].
- Codocedo, J.F., Godoy, J.A., Poblete, M.I., Inestrosa, N.C., Huidobro-Toro, J.P., 2013. ATP induces NO production in hippocampal neurons by P2X(7) receptor activation independent of glutamate signaling. *PLoS One* 8, e57626.
- Csolle, C., Baranyi, M., Zsilla, G., Kittel, A., Goloncsér, F., Illes, P., Papp, E., Vizi, E.S., Sperlagh, B., 2013. Neurochemical changes in the mouse Hippocampus underlying the antidepressant effect of genetic deletion of P2X7 receptors. *PLoS One* 8, e66547.
- Davis, M., Myers, K.M., Chhatwal, J., Ressler, K.J., 2006. Pharmacological treatments that facilitate extinction of fear: relevance to psychotherapy. *NeuroRx* 3, 82–96.
- del Puerto, A., Wandosell, F., Garrido, J.J., 2013 Oct 28. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Front. Cell Neurosci.* 7, 197.
- Edwards, F.A., Gibb, A.J., Colquhoun, D., 1992. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature* 359, 144–147.
- Egashira, N., Okuno, R., Harada, S., Matsushita, M., Mishima, K., Iwasaki, K., Nishimura, R., Oishi, R., Fujiwara, M., 2008. Effects of glutamate-related drugs on marble-burying behavior in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. *Eur. J. Pharmacol.* 586, 164–170.
- Fanselow, M.S., 1980. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov. J. Biol. Sci.* 15, 177–182.
- Fendt, M., Fanselow, M.S., 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 743–760.
- Fiorenza, N.G., Rosa, J., Izquierdo, I., Myskiw, J.C., 2012. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav. Brain Res.* 232, 210–216.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenssonsson, P., Vaugeois, J.M., 2005. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 191–270.
- Gomes, F.V., Kakihata, A.M., Semedo, A.C., Hott, S.C., Uliana, D.L., Guimaraes, F.S., Ressell, L.B., 2014. D-cycloserine injected into the dorsolateral periaqueductal gray induces anxiolytic-like effects in rats. *Behav. Brain Res.* 271, 374–379.
- Goshen, I., Kreisel, T., Ounallah-Saad, H., Renbaum, P., Zalztein, Y., Ben-Hur, T., Levy-Lahad, E., Yirmiya, R., 2007. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology* 32, 1106–1115.
- Goshen, I., Yirmiya, R., 2009. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 30–45.
- Gourley, S.L., Kedves, A.T., Olausson, P., Taylor, J.R., 2009. A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropharmacology* 34, 707–716.
- Graeff, F.G., 2005. Medicamentos ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.G. (Eds.), *Fundamentos de Psicofarmacología*, pp. 123–160.
- Hoffman, E.J., Mathew, S.J., 2008. Anxiety disorders: a comprehensive review of pharmacotherapies. *Mit. Sinai J. Med.* 75, 248–262.
- Illes, P., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Franke, H., 2012. P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *Neuroscientist* 18, 422–438.
- Inoue, K., 1998. The functions of ATP receptors in the hippocampus. *Pharmacol. Res.* 38, 323–331.
- Inoue, K., Koizumi, S., Ueno, S., 1996. Implication of ATP receptors in brain functions. *Prog. Neurobiol.* 50, 483–492.
- Inoue, K., Koizumi, S., Ueno, S., Kita, A., Tsuda, M., 1999. The functions of ATP receptors in the synaptic transmission in the hippocampus. *Prog. Brain Res.* 120, 193–206.
- Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., Watano, T., Takanaka, A., 1992. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 134, 215–218.
- Izquierdo, I., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Szapiro, G., Coitinho, A.S., Muller, L., Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., 2002. Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox. Res.* 4, 573–593.
- Jo, Y.H., Role, L.W., 2002. Coordinate release of ATP and GABA at *in vitro* synapses of lateral hypothalamic neurons. *J. Neurosci.* 22, 4794–4804.
- Kennedy, C., Burnstock, G., 1985. Evidence for two types of P2-purinoceptor in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur. J. Pharmacol.* 111, 49–56.
- Khakh, B.S., 2009. ATP-gated P2X receptors on excitatory nerve terminals onto interneurons initiate a form of asynchronous glutamate release. *Neuropharmacology* 56, 216–222.
- Khakh, B.S., Henderson, G., 1998. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* 54, 372–378.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., Schultheis, N., Krugel, U., Illes, P., 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropharmacology* 28, 435–444.
- Kittner, H., Krugel, U., Illes, P., 1997. 2-methylthio ATP (2-MeSATP) enhances dopaminergic mechanisms in the mesolimbic mesocortical system of the rat: an *in vivo* study. *N. S. Arch. Pharmacol.* 356, 207–207.
- Köles, L., Furst, S., Illes, P., 2005. P2X and P2Y receptors as possible targets of therapeutic manipulations in CNS illnesses. *Drug News Perspect.* 18, 85–101.
- Konorski, J., 1967. Some new ideas concerning the physiological mechanisms of perception. *Acta Biol Exp (Warsz)* 27, 147–161.
- Korte, S.M., De Boer, S.F., 2003. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 163–175.
- Krugel, U., 2016. Purinergic receptors in psychiatric disorders. *Neuropharmacology* 104, 212–225.
- Krugel, U., Spies, O., Regenthal, R., Illes, P., Kittner, H., 2004. P2 receptors are involved in the mediation of motivation-related behavior. *Purinergic Signal* 1, 21–29.
- Lattal, K.M., Abel, T., 2001. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *J. Neurosci.* 21, 5773–5780.
- Li, N., Sul, J.Y., Haydon, P.G., 2003. A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *J. Neurosci.* 23, 10302–10310.
- Liu, J.S., John, G.R., Sikora, A., Lee, S.C., Brosnan, C.F., 2000. Modulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 5292–5299.
- lorca, R.A., Rozas, C., Loyola, S., Moreira-Ramos, S., Zeise, M.L., Kirkwood, A., Huidobro-Toro, J.P., Morales, B., 2011. Zinc enhances long-term potentiation through P2X receptor modulation in the hippocampal CA1 region. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1175–1185.
- Lucae, S., Salyakina, D., Barden, N., Harvey, M., Gagne, B., Labbe, M., Binder, E.B., Uhr, M., Paez-Pereira, M., Sillaber, I., Ising, M., Bruckl, T., Lieb, R., Holsboer, F., Muller-Myhsok, B., 2006. P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder. *Neuropharmacology* 31, S233–S233.
- Maren, S., 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 897–931.
- Matute, C., Cavaliere, F., 2011 Apr. Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (2), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.02.011> [Epub 2011 Feb 12]. Review. PMID: 21320622.
- McGaugh, J.L., 2000. Memory—a century of consolidation. *Science* 287, 248–251.
- Milad, M.R., Rauch, S.L., Pitman, R.K., Quirk, G.J., 2006 Jul. Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol. Psychol.* 73 (1), 61–71 [Epub 2006 Feb 13]. Review.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y., Satoh, M., 1991. Immobilization stress induces interleukin-1 beta mRNA in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 123, 254–256.
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B.H., Gerber, U., 2001. Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* 535, 115–123.
- Muigg, P., Hetzenauer, A., Hauer, G., Hauschild, M., Gaburro, S., Frank, E., Landgraf, R., Singewald, N., 2008. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety—evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur. J. Neurosci.* 28, 2299–2309.
- Murakami, K., Nakamura, Y., Yoneda, Y., 2003. Potentiation by ATP of lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in cultured astrocytes. *Neuroscience* 117, 37–42.
- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726.
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S.C., Brosnan, C.F., 2005. The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49, 245–258.
- Nguyen, K.T., Deak, T., Owens, S.M., Kohno, T., Fleshner, M., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1998. Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. *J. Neurosci.* 18, 2239–2246.
- Orsini, C.A., Maren, S., 2012. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1773–1802.

- Pankratov, Y., Lalo, U., Castro, E., Miras-Portugal, M.T., Krishtal, O., 1999. ATP receptor-mediated component of the excitatory synaptic transmission in the hippocampus. *Prog. Brain Res.* 120, 237–249.
- Pankratov, Y.V., Lalo, U.V., Krishtal, O.A., 2002. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J. Neurosci.* 22, 8363–8369.
- Pedrazza, E.L., Riboldi, G.P., Pereira, G.S., Izquierdo, I., Bonan, C.D., 2007. Habituation to an open field alters ecto-nucleotidase activities in rat hippocampal synaptosomes. *Neurosci. Lett.* 413, 21–24.
- Pedreira, M.E., Maldonado, H., 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38, 863–869.
- Pereira, V.S., Casarotto, P.C., Hiroaki-Sato, V.A., Sartim, A.G., Guimaraes, F.S., Joca, S.R., 2013 Dec. Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: involvement of nitric oxide. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23 (12), 1769–1778.
- Perregaux, D., Gabel, C.A., 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269, 15195–15203.
- Pugh, C.R., Nguyen, K.T., Gonyea, J.L., Fleshner, M., Wakins, L.R., Maier, S.F., Rudy, J.W., 1999. Role of interleukin-1 beta in impairment of contextual fear conditioning caused by social isolation. *Behav. Brain Res.* 106, 109–118.
- Quirk, G.J., Mueller, D., 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33, 56–72.
- Santini, E., Muller, R.U., Quirk, G.J., 2001. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J. Neurosci.* 21, 9009–9017.
- Shintani, F., Nakaki, T., Kanba, S., Kato, R., Asai, M., 1995a. Role of interleukin-1 in stress responses. A putative neurotransmitter. *Mol. Neurobiol.* 10, 47–71.
- Shintani, F., Nakaki, T., Kanba, S., Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Aiso, S., Kato, R., Asai, M., 1995b. Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotropic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J. Neurosci.* 15, 1961–1970.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A., 2001. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 125–132.
- Sperlagh, B., Csolle, C., Ando, R.D., Goloncsér, F., Kittel, A., Baranyi, M., 2012. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 14, 231–238.
- Suzuki, A., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., Masushige, S., Silva, A.J., Kida, S., 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J. Neurosci.* 24, 4787–4795.
- Taylor, S., Thordarson, D.S., Maxfield, L., Fedoroff, I.C., Lovell, K., Ograniczuk, J., 2003. Comparative efficacy, speed, and adverse effects of three PTSD treatments: exposure therapy, EMDR, and relaxation training. *J. Consult Clin. Psychol.* 71, 330–338.
- Temel, Y., Hescham, S.A., Jahanshahi, A., Janssen, M.L., Tan, S.K., van Overbeeke, J.J., Ackermann, L., Oosterloo, M., Duits, A., Leentjens, A.F., Lim, L., 2012. Neuro-modulation in psychiatric disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 107, 283–314.
- Tronson, N.C., Taylor, J.R., 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 262–275.
- Vidal-Gonzalez, I., Vidal-Gonzalez, B., Rauch, S.L., Quirk, G.J., 2006 Nov-Dec. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem.* 13 (6), 728–733. PMID: 17142302.
- Westbrook, R.F., Good, A.J., Kiernan, M.J., 1994 Nov. Effects of the interval between exposure to a novel environment and the occurrence of shock on the freezing responses of rats. *Q. J. Exp. Psychol. B* 47 (4), 427–446. PMID: 7809406.
- WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2008. mhGAP: Mental Health Gap Action Programme: Scaling up Care for Mental, Neurological and Substance Use Disorders, ISBN 978-92-4-159620-6. NLM classification: WM 140.