

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**SISTEMA PURINÉRGICO NA MEMÓRIA DA TAREFA DE
ESQUIVA INIBITÓRIA EM CÓRTEX CINGULADO E CÓRTEX
PRÉ-FRONTAL DE RATOS**

GRACE SCHENATTO PEREIRA

Orientadora:

Prof^ª. Dra. CARLA DENISE BONAN

Co-orientador:

Prof^º. Dr. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito
básico para obtenção do título de mestre em Bioquímica.**

**Porto Alegre
2001**

AGRADECIMENTOS

Aos mestres

A minha querida orientadora Carla, por toda dedicação, compreensão, confiança, exemplo de profissionalismo e principalmente pela sua amizade. Agradeço a Deus por ter proporcionado que uma pessoa tão especial como tu fizesse parte da minha vida!

Ao Sarkis, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar em seu convívio e oferecer um ambiente de trabalho extremamente estimulante do ponto de vista científico e pessoal.

À Ana, pela sua colaboração e disponibilidade na execução deste trabalho.

Ao Prof. Izquierdo, por proporcionar parte do suporte técnico e científico na realização deste trabalho, concedendo o espaço de seu laboratório e seu tempo, sempre que foi preciso esclarecer dúvidas.

Ao Prof. Luiz Glock que desde o início da minha graduação me incentivou ao máximo na realização de uma ótima iniciação científica.

Aos colegas e amigos

À Egna, por ter me apresentado ao “mundo apirásico” e ter oportunizado, assim, a conquista de grandes amizades.

A todo pessoal do Centro de Memória pela sempre presente receptividade e acessibilidade.

Ao Tadeu, cuja participação foi indispensável para a execução deste trabalho, pela sua amizade e paciência.

A todos os colegas do laboratório 22 e 24, Márcia, Simone, Alessandra B., Andréia, Jean, Bárbara, Inajara, Elisandra, Alessandra T., Karina e Emerson pela amizade.

Aos meus colegas da PUCRS, em especial a Tatiana e a Fernanda que sempre me apoiaram nos momentos difíceis com incentivos e críticas.

Ao Departamento de Bioquímica

A todos os professores e funcionários que de uma maneira ou outra me auxiliaram durante o período da realização deste trabalho

As meninas da secretaria, Cléia, Sandra e Isabel, pela ajuda burocrática e pela amizade.

A Família

Aos meus pais por terem me dado uma infância sadia, uma adolescência responsável e contribuírem constantemente para que a minha vida adulta seja repleta de satisfações.

Ao meu querido irmão pela sua existência e companheirismo.

Ao meu grande amor Rovani, que nunca poupou uma crítica construtiva para contribuir no meu crescimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | I |
| ABSTRACT | II |
| ÍNDICE DE FIGURAS | III |
| ÍNDICE DE TABELAS | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS | VII |
| I. INTRODUÇÃO | 1 |
| I.1. MEMÓRIA E PLASTICIDADE..... | 1 |
| I.2. ESQUIVA INIBITÓRIA..... | 3 |
| I.3. REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS..... | 4 |
| I.3.1. CÓRTEX CINGULADO..... | 5 |
| I.3.2. CÓRTEX PRÉ-FRONTAL..... | 6 |
| I.4. SISTEMAS MODULATÓRIOS E ESTRESSE..... | 9 |
| I.5. ATP EXTRACELULAR E MEMÓRIA..... | 10 |
| I.6. ADENOSINA E MEMÓRIA..... | 11 |
| I.7. ECTONUCLEOTIDASES..... | 19 |
| I.8. OBJETIVOS..... | 23 |

II. ARTIGOS CIENTÍFICOS

| | |
|---|----|
| II.1. CAPÍTULO 1 - <u>PEREIRA, G.S.</u> ; MELLO E SOUZA, T.; BATTASTINI, A.M.O. IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.; BONAN, C.D. Effects of inhibitory avoidance training and/or isolated foot-shock on ectonucleotidase activities in synaptosomes from the anterior and posterior cingulate cortex and the medial precentral area (fr2) of adult rats. Behavioural Brain Research , 2001, <i>in press</i> | 24 |
| II.2. CAPÍTULO 2 - <u>PEREIRA, G.S.</u> ; MELLO E SOUZA, T.; VINADÉ, E.R.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I; SARKIS, J.J.F.; BONAN, C.D. Facilitative effect of an adenosine a1 receptor blockade in the posterior cingulate cortex on short and long-term memory for inhibitory avoidance in rats, submetido ao Europeun Journal of Pharmacology..... | 32 |
| III. DISCUSSÃO | 47 |
| IV. CONCLUSÕES GERAIS | 56 |
| V. PERSPECTIVAS | 58 |
| VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| VII. ANEXOS | 81 |

RESUMO

A memória pode ser definida como o armazenamento e a evocação de uma informação aprendida. Sendo um processo dinâmico, requer a ativação de diversos sistemas para que a informação adquirida seja consolidada. O ATP é um importante neurotransmissor que, após a sua liberação e conseqüente ativação de seus receptores específicos, precisa ser inativado. Esta remoção do ATP da fenda sináptica ocorre através de sua hidrólise promovida pelas ectonucleotidasas. Como um dos produtos da hidrólise do ATP, a adenosina é considerada um potente neuromodulador e exerce suas ações através de receptores específicos com ações excitatórias (A_{2A} e A_{2B}) ou inibitórias (A_1 e A_3). Vários trabalhos já demonstraram a participação do sistema purinérgico nos processos relacionados a memória da tarefa de esquiiva inibitória. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram a participação das ectonucleotidasas sinaptossomais de hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal na consolidação da memória para esquiiva inibitória. No entanto, existem poucos estudos a respeito do sistema purinérgico nos mecanismos de consolidação da memória em outras regiões cerebrais, tais como o córtex cingulado anterior (CA) e posterior (CP) e a área pré-central medial (FR2). Portanto, na primeira parte deste estudo, avaliamos as atividades ectonucleotidásicas em sinaptossomas de CA, CP e FR2 de ratos submetidos à tarefa de esquiiva inibitória. Nossos resultados demonstraram um aumento na hidrólise de ATP em sinaptossomas de FR2 e CA; e na hidrólise de ADP em sinaptossomas de FR2 e CP. Este aumento na hidrólise de ATP e ADP ocorreu devido ao choque administrado na tarefa, já que o grupo de animais que não recebeu choque não apresentou alterações na hidrólise de ATP e ADP. Este efeito observado provavelmente não está associado à consolidação da memória, mas a mudanças neuroquímicas e neurohumorais induzidas pelo estresse após o choque. Além disso, foi observado um aumento relacionado ao aprendizado na atividade ATPásica e ADPásica em CP e CA, respectivamente. Estes resultados sugerem fortemente que estas enzimas participam da consolidação da memória em CP e CA. O aumento na hidrólise de ATP e ADP sugere um possível aumento na concentração de adenosina nestas regiões. Portanto, na segunda parte deste estudo, verificamos a influência de agonistas e antagonistas de receptores de adenosina nas memórias de curta (STM) e de longa (LTM) duração na tarefa de esquiiva inibitória. Então, neste estudo administramos intrafusões de análogos de adenosina em CP, imediatamente após o treino em esquiiva inibitória. Os resultados demonstraram que a intrafusão de DPCPX, um antagonista de receptores A_1 , em CP, na concentração de 50 nM, aumentou significativamente a retenção da tarefa em ambas STM e LTM. Além disso, a administração de CPA, um agonista de receptores A_1 de adenosina, não alterou ambas STM e LTM nas concentrações testadas. Portanto, este estudo sugere que os receptores A_1 exercem uma modulação inibitória em CP tanto na STM quanto na LTM para o aprendizado de esquiiva inibitória. A regulação dos níveis de ATP e adenosina pelas ectonucleotidasas em CP, CA e FR2 controlaria a ativação dos receptores A_1 nestas estruturas, podendo exercer efeitos modulatórios na consolidação da memória nestas estruturas.

ABSTRACT

Memory can be defined as the storage and retrieval of an acquired learning. It is a dynamic process that requires the activation of several systems to the consolidation of an acquired learning. ATP is an important neurotransmitter that, after its release and subsequent activation of specific receptors, needs to be inactivated. This removal of ATP in the synaptic cleft occurs through of its hydrolysis promoted by ectonucleotidasas. As one of the products of ATP hydrolysis, adenosine is considered a potent neuromodulator and exerts its actions through specific receptors with excitatory (A_{2A} and A_{2B}) or inhibitory effects (A_1 and A_3). Several studies demonstrated the participation of the purinergic system in the processes related to the inhibitory avoidance learning. Studies from our laboratory have showed the involvement of synaptosomal ectonucleotidasas from hippocampus, entorhinal cortex and parietal cortex in the consolidation of inhibitory avoidance memory. Nevertheless, there are few studies about purinergic system in the memory

consolidation mechanisms in other structures, such as anterior cingulate cortex (AC), posterior cingulate cortex (PC) and medial pre-central area (FR2). Therefore, firstly we evaluated the ectonucleotidase activities in synaptosomes from AC, PC and FR2 of rats submitted to inhibitory avoidance task. Our results demonstrated an increase in ATP hydrolysis in synaptosomes from FR2 and AC; and in the ADP hydrolysis in synaptosomes from FR2 and PC. This increase occurs due the foot-shock used in the inhibitory avoidance task, since that the unshocked group did not present changes in ATP and ADP hydrolysis. The observed effect is very likely to be associated not to memory consolidation, but to neurochemical and neurohumoral changes induced by stress after foot-shock. Furthermore, it was observed a learning-specific increase in ATPase and ADPase activities in PC and AC, respectively. These results strongly suggest that these enzymes participate of the memory consolidation in PC and AC. The increase of ATP and ADP hydrolysis in synaptosomes of PC and AC suggests a possible increase in the adenosine levels in these structures. Therefore, in the second part of this study we analyze the influence of agonists and antagonists of adenosine receptors in the short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) in the inhibitory avoidance task. Thus, in this study we administrated infusions of adenosine analogues in PC, immediately after training in inhibitory avoidance task. The results showed that the infusion of DPCPX, an antagonist of A₁ receptors in PC, at 50 nM, increase significantly the retention of the task in both STM e LTM. Furthermore, CPA, an agonist of A₁ adenosine did not alter both STM and LTM in the concentrations tested. Thus, this study suggest that the A₁ receptors exerts an inhibitory modulation in CP in both STM and LTM in the inhibitory avoidance learning. The regulation of ATP and adenosina by ectonucleotidases em CP, CA e FR2 would control the activation of A₁ receptors , exerting modulatory effects in the memory consolidation in these structures.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA I.1. | Desenho esquemático do mapa cortical do cérebro do rato adulto em diferentes cortes sagitais. RSG e RSA (siglas do inglês referentes aos córtices retroespleniais granular e agranular, respectivamente) pertencem ao córtex cingulado posterior. A sigla FR2 compreende a área pré-central medial. As siglas Cg1, Cg2 e Cg3 correspondem ao córtex cingulado anterior. Adaptado de Zilles e Wree, 1995..... | 8 |
| FIGURA I.2. | Prognóstico da topografia de membrana das ectonucleotidases..... | 19 |

FIGURA I.3. Liberação de ATP na fenda sináptica e as ações desencadeadas por esse neurotransmissor pré- e pós-sinápticamente.....22

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.1. ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in synaptosomes from posterior cingulate cortex of rats sacrificed immediately after either isolated foot-shock (IF) or inhibitory avoidance (IA) training. White, gray and black bars represent naïve, shocked (IF) and trained (IA) animals, respectively. Bars indicate mean \pm S.D. *N* per group was 5-8. * Significantly different from any other group (one-way ANOVA, $P < 0.05$). (a) Significantly different from naïve animals due to a main effect for TASK (general factorial ANOVA, $P < 0.005$).....27

FIGURA 1.2. ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in synaptosomes from anterior cingulate cortex of rats sacrificed immediately after either isolated foot-shock (IF) or inhibitory avoidance (IA) training. *N* per group was 5-9. * Significantly different from any other group (one-way ANOVA, $P < 0.05$). # Significantly different from naïve animals due to a main effects for TIME and TASK (general factorial ANOVA, $P < 0.005$).....28

FIGURA 1.3. ATP (A) and ADP (B) hydrolysis in synaptosomes from FR2 of rats sacrificed immediately after either isolated foot-shock (IF) or inhibitory avoidance (IA) training. *N* per group was 5-7. (b) and # indicates a significant difference from naïve animals due to a main effect for TIME and for TIME and TASK, respectively (general factorial ANOVA, $P < 0.005$).....29

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1. Schematic drawing of rat brain section at coronal plane A - 0.58 cm from the atlas of Paxinos and Watson (1986) showing (stippled) the extension of the area reached by infusions into PC. The figure illustrates a composite of all infusions given on both sides. The maximum extension reached by any individual infusion was less than 1 mm³ in the animals with

correct infusion placements. Infusions were restricted to areas 29 a, b, and c (retrosplenial granular,RSG).....45

FIGURA 2.2. Medians (interquartile range) of retention scores of training (white bars) and test sessions for STM (gray bars) and LTM (hatched bars) in groups bilaterally infused into PC, immediately after training, with (A) DPCPX (1nM, 25nM, or 50 nM) in DMSO 20% (VEH) or VEH, or (B) CPA (1nM, 50nM, or 100 nM) in phosphate buffered saline (SAL; pH 7.4; 15mM CaCl₂) or SAL. Asterisk indicates statistical significance in the Mann-Whitney U test, two-tailed, at $p < 0.05$, respectively, from the respective control group (in this case, VEH). N = 22 and 18 in SAL and VEH, respectively.....46

TABELA 1.1. Classificação dos receptores de adenosina.....13

TABELA 1.2. Efeitos da adenosina sobre testes de aprendizado e memória.....16

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina 5'-difosfato

AMP – adenosina 5'-monofosfato

AMPc – adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico

AP5 – ácido aminofosfonopentanoico

ATP – adenosina 5'-trifosfato

CAMKII – proteína

CPA – N6-ciclopentiladenosina

DAG – diacilglicerol

DPCPX - 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina

GABA - γ -ácido aminobutírico

IP3- inositol 1, 4, 5- trifosfato

LTD – potenciação de curta duração

LTP – potenciação de longa duração

NMDA – *N*-metil-*D*-aspartato

PKA – proteína quinase A, proteína quinase dependente de AMP cíclico

PKC – proteína quinase C

PLC – fosfolipase C

I. INTRODUÇÃO

I.1. MEMÓRIA E PLASTICIDADE

A aprendizagem e a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central (SNC), sendo que ambas estão intimamente relacionadas. A memória a que nos referimos neste trabalho pode ser definida como o armazenamento e a evocação de uma informação aprendida (IZQUIERDO, 1992). Sendo um processo dinâmico, a memória pode ser dividida em três etapas: (1) **aquisição** da informação através da exposição a um evento, seja ele interno ou externo ao indivíduo, (2) **consolidação**, onde a informação adquirida é processada e (3) **armazenamento** desta informação (McGAUGH, 1996 e 2000; IZQUIERDO, 1989). A melhor maneira de estudar e avaliar o armazenamento da memória se dá através da **evocação** da memória, quando observamos a mudança de comportamento do animal devido ao processo de memorização (QUILFELDT, 1994).

O aprendizado é quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após sua repetição. Esta probabilidade alterada está baseada na memória daquilo que foi aprendido pelo organismo após uma sessão de treino. A memória necessária para o aprendizado é definida como memória de curta duração (STM, do inglês *short-term memory*). Já a evocação de um comportamento horas ou semanas depois envolve a formação da memória de longa duração (LTM, do inglês *long-term memory*) (AGRANOFF et al., 1998). Por muitos anos, acreditou-se que para a formação da LTM era necessária a formação da STM, sendo que estudos recentes demonstraram que a STM e a LTM são, pelo menos em parte, processos distintos (IZQUIERDO et al., 1998).

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido a plasticidade sináptica, fenômeno característico do SNC. O conceito de plasticidade é extremamente amplo, incluindo todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem em um cérebro maduro. Essas reorganizações podem ser observadas sob o aspecto fisiológico (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológico (morfologia e ultraestrutura da glia) ou bioquímico (atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica) (AU LOUIS et al., 1997). O cérebro tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante longos períodos, podendo durar por toda a vida, sendo que a plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (AU LOUIS et al., 1997). Estudos demonstraram que o SNC pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade, como por exemplo, o aprendizado de uma nova tarefa (COTMAN, 1998).

Em SNC de mamíferos, dois importantes fenômenos plásticos têm sido descritos: a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (AU LOUIS et al., 1997).

A LTP, sendo um tipo de plasticidade neuronal, foi primeiramente observada em hipocampo e subseqüentemente em muitas outras regiões cerebrais, tais como o córtex entorrinal (JEFFERY, 1997) e o córtex cingulado posterior (HEDBERG & STANTON, 1995). Imediatamente após sua descoberta, a LTP foi reconhecida como um mecanismo básico para memória. Sendo assim, a hipótese de explicar a memória através da LTP tornou-se habitual (IZQUIERDO, 1994; MALENKA & NICOLL, 1999). No entanto, ainda não há estudos que comprovem a existência de uma memória dependente de LTP ou a ocorrência de LTP durante a formação da memória, estabelecendo, então, uma correlação entre as duas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997 a,b). Sendo assim, a LTP pode ser vista como um modelo parcial para a memória medida em nível eletrofisiológico (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

Um outro fenômeno envolvido nas alterações sinápticas de longa duração que pode corresponder a uma base neurofisiológica para a memória é a LTD (depressão de longa duração) (LINDEN, 1994). A LTD compreende uma persistente redução na eficiência sináptica, a qual ocorre tipicamente após repetidas estimulações aferentes de baixa frequência (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHAN, 2001). Recentemente, foi relatado que a LTD na região CA1 do hipocampo pode ser associada com a aquisição da memória em ratos (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHAN, 2001). A expressão da LTD na região CA1 pode também ser aumentada em condições de estresse. Isto sugere um papel mais complexo para esta forma de plasticidade do que simplesmente servir para a prevenção da saturação sináptica, como, por exemplo, revertendo a LTP (BRAUNEWELL & MANAHAN-VAUGHAN, 2001).

I.2. ESQUIVA INIBITÓRIA

A tarefa de esquiva inibitória envolve o aprendizado de uma tarefa aversiva onde, na sessão de treino, o animal recebe um choque de baixa intensidade ao descer da plataforma. Na sessão de teste, que pode ocorrer em vários tempos pós-treino, o animal é exposto novamente aquele ambiente, testando-se então sua memória. Para avaliar o quanto o animal aprendeu, mede-se o tempo de latência em que este permanece na plataforma e, conseqüentemente, a retenção da tarefa. Trata-se de um aprendizado adquirido em uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos iniciados no treino (GOLD, 1986; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

O aprendizado de esquiva inibitória em ratos desencadeia uma série de eventos bioquímicos que são necessários para a retenção desta tarefa. Os eventos são similares aqueles descritos para outras formas de plasticidade neural (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; MAREN & BAUDRY, 1995; IZQUIERDO & MEDINA, 1995b, 1997a). Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória desta tarefa no hipocampo envolvem a ativação de receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, receptores metabotrópicos e um aumento dos níveis de NMDA1 e GluR1, subunidades dos receptores NMDA e AMPA, respectivamente (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; CAMMAROTA et al., 1996; RIEDEL, 1996). Além disso, cascatas bioquímicas desencadeadas por proteínas quinases participam da formação da memória de esquiva inibitória. Evidências indicam que a ativação das cascatas mediadas por proteína quinase G, CAMKII, proteína quinase C e a proteína quinase A são fundamentais na fase inicial da plasticidade de longa duração induzida pela esquiva inibitória, minutos após a realização do treino (BERNABEU et al., 1995, 1996, 1997; CAMMAROTA et al., 1997; ITO et al., 1991; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

Os eventos bioquímicos são regulados logo após o treino por mecanismos hormonais relacionados com a ansiedade e o estresse, sendo modulados por sinapses GABAérgicas, colinérgicas, noradrenérgicas e por mensageiros retrógrados. A fase mais tardia, 3-6 horas após o treino, é modulada por mecanismos relacionados ao humor e ao afeto, envolvendo vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas (IZQUIERDO & MEDINA, 1997a, 1997b).

I.3. REGIÕES CEREBRAIS ENVOVIDAS

O hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal são interconectados e, além disso, o córtex entorrinal está ligado ao córtex parietal posterior e ao córtex pré-frontal (WITTER et al., 1989; HYMAN et al., 1990), sendo que estas estruturas desempenham um papel fundamental na memória, provavelmente de uma forma integrada (IZQUIERDO et al., 1997a). Além dessas estruturas, existem outras regiões cerebrais envolvidas no processamento da memória, tais como o córtex cingulado e o córtex pré-frontal (MELLO & SOUZA et al., 1999; MELLO & SOUZA et al., 2000).

I.3.1. CÓRTEX CINGULADO

O córtex cingulado é um marcador sináptico do hipocampo e da informação sensorial talâmica, ocupando uma posição estratégica no circuito Papez do processamento da emoção. O córtex cingulado media sinais entre a formação hipocampal e o neocórtex associativo (BEAR, et al., 1995; MARTIN, 1996; ZILLES & WREE, 1995). O núcleo talâmico anterior recebe um número de projeções diretas e indiretas do hipocampo e projeta diferentemente a ambos córtex cingulado anterior (CA) e ao córtex cingulado posterior (CP) (HORIKAWA et al., 1988; SHIBATA, 1993; VOGT et al., 1981). Postula-se que este circuito tenha uma função comparativa, aonde os dados que chegam são comparados com dados mnemônicos e se eles estiverem se equiparando, respostas comportamentais já projetadas são executadas, se não estiverem, informações são geradas intensificando a atenção e inibindo as ações planejadas (KUBOTA & GABRIEL, 1995).

O CP, também conhecido como córtex retrosplenial (ZILLES & WREE, 1995), exhibe frequência teta coerente com o que ocorre no hipocampo (HEDBERG et al., 1993; LEUNG & BORTS, 1987), e ambas LTP e LTD têm sido descritas no CP (HEDBERG et al., 1995). Além disso, o CP media a memória espacial em ratos (SUTHERLAND & HOESING, 1993) e o desenvolvimento de estratégias em ratos submetidos à tarefa espacial em labirinto aquático (RIEKKINEN et al., 1995). Estudos recentes demonstraram que a

consolidação da memória no cíngulo posterior para a tarefa de esQUIVA inibitória é sensível a infusões de muscimol, um agonista de receptores γ -ácido aminobutírico tipo A (GABA_A) e de AP5, um antagonista de receptores NMDA (MELLO E SOUZA et al., 1999).

O CA (FIG. I.1) apresenta LTP dependente de NMDA (SAH & NICOLL, 1991) e faz parte do córtex pré-frontal medial, devido a estas conexões recíprocas com o núcleo talâmico dorsal medial (ZILLES & WREE, 1995). Existem evidências do envolvimento de CA e do córtex pré-frontal medial na memória de trabalho e na memória de curta duração em ratos (BROERSEN et al., 1994; BROERSEN et al., 1995, FREEMAN et al., 1996). No entanto, o papel do CA e do córtex pré-frontal medial na memória de longa duração permanece controversa. Infusões imediatamente pós-treino de escopolamina em CA prejudica a consolidação da memória da tarefa de esQUIVA inibitória em ratos (RIEKKINEN et al., 1995). Diferentemente de CP, infusões de muscimol e AP5 administradas no cíngulo anterior não produziram modificações na consolidação da memória, sugerindo que a atividade normal desta área não é essencial para a consolidação da memória em esQUIVA inibitória até 180 minutos após o treino (MELLO E SOUZA et al., 1999).

I.3.2. CÓRTEX PRÉ-FRONTAL

De todo o córtex, a região pré-frontal é diretamente responsável por nossa alta capacidade de planejamento e de verbalização, bem como de socialização (DAMÁSIO, 1996).

A identificação do córtex pré-frontal é baseada nas suas conexões com o núcleo dorsal medial do tálamo (ZILLES & WREE, 1995), apesar da inclusão da área pré-central medial de ratos (FR2) (FIG. I.1) e a área infralímbica (IL) como partes do córtex pré-frontal medial (GROENEWEGEN, 1988; UYLINGS, 1990; VAN ÉDEN et al., 1992). FR2 compreende uma área equivalente a soma das áreas de Brodmann 8 e 10 (CAVINESS, 1975; CAVINESS & FROST, 1981) em humanos, as quais correspondem a uma parte do córtex associativo pré-frontal.

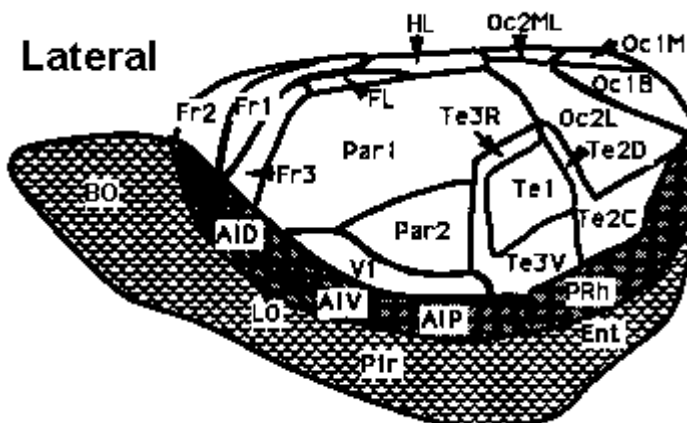
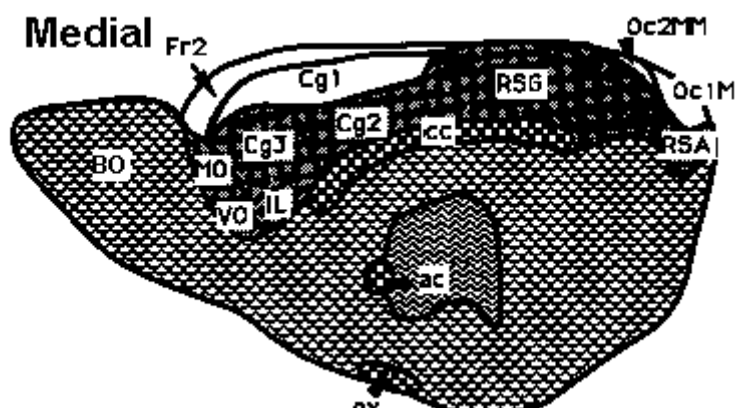
O córtex pré-frontal em humanos é anatomicamente diferente do córtex pré-frontal em ratos. No entanto, quanto ao aspecto funcional, existem regiões corticais no rato que por desempenharem funções similares às da região pré-frontal em humanos, são também incluídas nesta região (SEAMANS et al., 1995). Como exemplo, temos a área pré-central medial (FR2) (CAVINESS, 1975; CAVINESS & FROST, 1981).

O FR2, juntamente com outras estruturas mediam a memória de trabalho (GOLDMAN-RAKIC, 1996; SALMON et al., 1996), a qual é definida como um sistema que processa e influencia a informação por

períodos curtos (segundos) e pelo qual o animal desenvolve respostas cognitivas, tais como compreensão, pensamento e planejamento (BADDELEY, 1986; GOLDMAN-RAKIC, 1996).

O FR2 também parece incluir uma área correspondente a área pré-motora e a área motora suplementar de cérebro de primatas (CAVINESS, 1975; CAVINESS & FROST, 1981; HICKS & HUERTA, 1991; VAN ÉDEN et al., 1992), a qual recebe axônios convergentes do córtex pré-frontal e do córtex parietal e converte sinais que codificam as ações desejadas em como as ações serão realizadas (BEAR et al., 1995). A área pré-motora dos primatas está também envolvida na memória de trabalho (JONIDES et al., 1993; SMITH & JONIDES, 1995; WATANABE et al., 1997), bem como na consolidação da memória motora (SHADMEHR & HOLCOMB, 1997).

sagi
resp
mec
199



ulito em diferentes cortes
s granular e agranular,
sende a área pré-central
aptado de Zilles e Wree,

Além disso, estudos demonstraram que os sistemas glutamatérgicos, GABAérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos na consolidação da memória para esQUIVA inibitória em FR2, ou diretamente, ou como parte de um sistema modulatório (MELLO E SOUZA et al., 2000).

I.4. SISTEMAS MODULATÓRIOS E ESTRESSE

Uma variedade de sistemas periféricos modulatórios têm sido mencionados por participarem da formação da memória (IZQUIERDO & MEDINA, 1997b). A β -endorfina e outros opióides, acetilcolina, vasopressina, ocitocina, glicocorticóides, epinefrina, norepinefrina e glicose (BOHUS, 1994; CAHILL & McGAUGH, 1998; GOLD, 1991, 1995; GRIGORYAN et al., 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997b; McGAUGH, 1989; McGAUGH et al., 1995), entre outras, são de fato liberadas durante muitas formas de treinamento comportamental (GOLD, 1991; IZQUIERDO, 1989), indicando que estas substâncias participam da consolidação e evocação da memória (IZQUIERDO, 1989; ZORNETZER, 1978).

Muitos dos processos neuromodulatórios que acompanham a consolidação e a evocação da memória interagem entre si. Como exemplo, temos a β -endorfina que exerce seu efeito, geralmente amnésico, (IZQUIERDO, 1989) na amígdala, através da sua influência sobre as sinapses β -adrenérgicas e D2-dopaminérgicas (McGAUGH, 1989), sendo que, esse efeito provavelmente deva ocorrer em outras regiões cerebrais (IZQUIERDO, 1989).

De fato, eventos neuromodulatórios e hormonais que estão presentes no momento do treino modulam a cascata bioquímica em diferentes passos. Para tanto, importantes estudos a respeito das influências modulatórias sobre a memória, em ambos níveis comportamentais e bioquímicos, estão relacionados ao estresse (GOLD, 1995; GOLD & McCARTY, 1995; IZQUIERDO & MEDINA, 1995a). Em níveis moderados de funcionamento, os sistemas relacionados ao estresse podem facilitar a formação da memória, enquanto que em altos níveis de atividade podem prejudicar a memória (GOLD, 1991). Evidências apontam para uma modulação da memória por mecanismos neurohumorais relacionados a ansiedade (WOLFMAN et al., 1991).

I.5. ATP EXTRACELULAR E MEMÓRIA

O armazenamento da informação no cérebro está envolvido com um aumento na eficiência sináptica de vias estimulatórias (WIERASZKO & EHRLICH, 1994). Desde a primeira demonstração da liberação de

ATP dependente de estimulação no sistema nervoso (HOLTON, 1959), existe um crescente interesse no papel do ATP na transmissão sináptica (revisado em CUNHA & RIBEIRO, 2000).

O ATP é o principal nucleotídeo de adenina liberado nos terminais nervosos de diferentes áreas cerebrais (RICHARDSON & BROWN, 1987; FIEDLER et al., 1992). Este neurotransmissor é estocado nos terminais nervosos e co-liberado com vários outros neurotransmissores em diferentes preparações biológicas de uma maneira Ca^{+2} -dependente (PHILLIS & WU, 1981). Dependendo da concentração, o ATP exógeno pode exercer diferentes efeitos sobre as propriedades celulares. Em fatias hipocâmpais de camundongos e cobaias, o ATP é capaz de induzir LTP (WIERASZKO & SEYFRIED, 1989; NISHIMURA et al., 1990; FUJII et al., 1999). O sistema purinérgico está envolvido nos mecanismos de potenciação de longa duração induzidos eletricamente, sendo que o ATP extracelular e seu análogo ATP- γ -S amplificaram permanentemente a magnitude das respostas sinápticas. Para explicar estes efeitos, os autores sugerem que a remoção do fosfato gama do ATP e do ATP- γ -S por uma ecto-proteína quinase poderia ser necessária para a ocorrência do efeito facilitatório sobre a LTP (WIERASZKO & EHRLICH, 1994).

Entretanto, os efeitos do ATP podem ser inibitórios ou estimulatórios nas funções hipocâmpais, dependendo do sítio de ação e do subtipo de receptores estimulados. Evidências indicam que o ATP extracelular pode inibir a liberação de glutamato em hipocampo de ratos, através de receptores purinérgicos pré-sinápticos (INOUE & KOIZUME, 2001). No entanto, o mesmo autor, observou que em alguns neurônios hipocâmpais, o ATP era capaz de induzir a liberação de glutamato e um aumento no cálcio intracelular através da estimulação de receptores purinérgicos (INOUE & KOIZUME, 2001). Além disso, o ATP pode estimular a liberação de ácido γ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor que inibe a função excitatória de glutamato (INOUE, 1998).

O ATP extracelular produz respostas no SNC através de receptores ionotrópicos do tipo P2X (P2X₁₋₇) e receptores acoplados a proteína G do tipo P2Y (P2Y₁₋₄, P2Y₆, P2Y₁₁) (BURNSTOCK, 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Após a liberação do ATP no espaço extracelular e a ativação de receptores específicos, os nucleotídeos de adenina podem ser metabolizados pela ação de ecto-enzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (ZIMMERMANN, 1996).

1.6. ADENOSINA E MEMÓRIA

A adenosina é uma purina endógena com importante papel na regulação da excitabilidade neuronal e na transmissão sináptica de baixa frequência, sendo também considerada como neuromodulador no fenômeno de plasticidade sináptica (DUNWIDDIE & HOFFER, 1980; CUNHA, 2001).

A adenosina é liberada por muitas células, incluindo neurônios e células gliais. Ela modula a atividade do sistema nervoso central agindo pré-sinápticamente, inibindo ou facilitando a liberação de neurotransmissores, e pós-sinápticamente (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000).

Considerando seu papel homeostático relacionado ao controle do metabolismo celular (MCLLWAIN, 1979), a adenosina tem sido considerada como “hormônio local” (ARCH & NEWSHOLME, 1978) e metabólito retaliatório (NEWBY, 1984) para explicar a sua participação em situações de estresse, onde o estoque energético é comprometido. Em tais situações, a concentração de adenosina, a qual é estimada na faixa do nanomolar, aumenta para concentrações micromolares (NORDSTRÖM et al., 1977; BARDENHEUER & SCHRADER, 1986), sendo então liberada no meio extracelular (MEGHJI et al., 1989) para reprimir o metabolismo celular das células vizinhas.

A adenosina media seus efeitos através da ativação de receptores específicos. Os receptores A_1 e A_3 inibem a adenilato ciclase, diminuindo a quantidade de AMPc, enquanto os subtipos A_{2A} e A_{2B} estimulam a adenilato ciclase e produzem efeitos excitatórios no sistema nervoso central (LINDEN, 1994; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; CUNHA 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos receptores de adenosina

| | A₁ | A_{2A} | A_{2B} | A₃ |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|
| Proteína G | Gi/0 | Gs | Gs, Gq | Gi, Gq |
| Efeitos | ↓ AMPc ↑ IP3 ↑ K+ | ↑ AMPc | ↑ AMPc ↑ IP3 | ↓ AMPc ↑ IP3 |
| Agonistas seletivos | CPA, CHA, R-PIA | CGS21680, APEC, WRC-0470 | – | IB-MECA |
| Antagonistas seletivos | DPCPX, XAC, WRC 0571 | CSC | – | MRS 1067 |

Adaptado a partir de RALEVIC & BURNSTOCK, 1998

Abreviações utilizadas: APEC, 2-[(2-aminoetilamino)carboniletilfeniletilaminol]-5'-*N*-etilcarboximidoadenosina; CGS21680, 2-[*p*-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5'-*N*-etilcarboxamidoadenosina; CHA, N⁶-ciclohexiladenosina; CPA, N⁶-ciclopentiladenosina; CSC, 8-(3-clorostiri)cafeína; DPCPX, 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina; IB-MECA, N⁶-(3-iodo-benzil); MRS 1067, 3,6-dicloro-2'-isopropiloxi-4'-metilflavona; R-PIA, (*R*)N⁶-fenilisopropiladenosina; WRC 0470, 2-cicloexilmetilidenedrazinoadenosina; WRC 0571, 8-(*N*-metilisopropil)amino-N⁶-(5'-endoidroxi-endonorbonil)-9-metiladenina.

Os receptores A₁ mediam respostas amplas devido ao fato de estarem acoplados a diferentes proteínas G, da família Gi/0 (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). A via mais reconhecida da ação dos receptores A₁ é a da inibição da adenilato ciclase, causando uma diminuição no segundo mensageiro, AMPc. Isto modula a atividade da proteína quinase dependente de AMPc, a qual fosforila diversas proteínas marcadoras. O receptor A₁ acoplado a adenilato ciclase tem sido descrito em vários tecidos, incluindo o tecido nervoso e adiposo. Adicionalmente, a modulação direta das vias que diminuem o AMPc, via inibição da adenilato ciclase, bloqueia os efeitos de outros agentes os quais agem por estimular a adenilato ciclase (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Outro mecanismo sinalizador dos receptores A₁ é a ativação da fosfolipase C (PLC), levando ao metabolismo do fosfoinositol de membrana com o conseqüente aumento de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e mobilização de cálcio (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Na maioria das condições experimentais, observa-se que o efeito da adenosina ou de seus análogos é a inibição da atividade neuronal mediada pela ativação de seus receptores do tipo A₁ (GREENE & HASS, 1991; DUNWIDDIE, 1995; CUNHA, 2001). Estes efeitos mediados pelo A₁ resultam de uma ação combinada de: (1) hiperpolarização pós-sináptica e conseqüente ativação da condutância de potássio

(DUNWIDDIE & FREDHOLM, 1989; THOMPSON et.al., 1992) e (2) inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores (PROCTOR & DUNWIDDIE, 1987; AMBRÓSIO et.al., 1997).

Além dos receptores A₁ estarem acoplados a proteínas Gi/G₀ (NANOFF et. al., 1995; JOCKERS et.al., 1994), eles podem também estar acoplados a outras proteínas G (ASANO et al., 1995) ativando, então, diferentes sistemas de transdução (AKBAR et.al., 1994; SANTOS et.al., 1998; CASCALHEIRA & SEBASTIÃO, 1998). Em particular, a inibição da liberação de neurotransmissores mediada por A₁ é, geralmente, independente dos seus efeitos sobre os níveis de AMPc. Na maioria das vezes, depende de uma inibição direta, via proteína G, dos principais canais de cálcio do tipo N (YAWO & CHUHMA, 1993; WU & SAGGAU, 1994).

Foi demonstrado na literatura que a adenosina exógena ou seus análogos, agindo nos receptores A₁, inibem a LTP em fatias hipocâmpais (ARAI et.al., 1990; de MENDONÇA & RIBEIRO, 1990). Interessantemente, a adenosina endógena agindo sobre os receptores A₁ atenua LTD em ratos neonatos (de MENDONÇA et.al. 1997) e previne a LTD em ratos adultos (KEMP & BASHIR, 1997). Além disso, o bloqueio dos receptores A₁ em fatias hipocâmpais, utilizando o seu antagonista DPCPX, aumenta a LTP, sendo que esta é completamente prevenida pela adição de AP5, um seletivo antagonista de receptores NMDA (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000). A ligação de [³H]DPCPX para receptores A₁ de adenosina em cérebro de humanos é maior na parte mais inferior do cíngulo posterior bem como em outras regiões corticais frontais (SVENNINGSSON et al., 1997). A afinidade da ligação de [³H]DPCPX no cérebro de humanos foi de 5 a 10 vezes inferior a descrita em cérebro de ratos (JOHANSSON et al., 1993; SVENNINGSSON & FREDHOLM, 1997). Tem sido mostrado que em cérebro de ratos a adição de GTP no meio de incubação aumenta a afinidade da marcação de [³H]DPCPX (WEBER et al., 1990). Estas mudanças estão provavelmente relacionadas com a ligação de adenosina endógena a sítios de alta afinidade de receptores A₁ (SVENNINGSSON et al., 1997).

Com relação aos efeitos da adenosina nas funções relacionadas com a memória, vários agonistas de receptores A₁ administrados sistematicamente têm sido reportados por diminuir a aprendizagem inibitória em camundongos (NORMILE & BARRACO, 1991; ZARRINDEST & SHAFAGHI, 1994). Experimentos realizados em fatias provenientes de uma área do cérebro de aves envolvida nos eventos de aprendizado e memória associados com tarefa de esquiva passiva demonstraram que o agonista de A₁, CHA, inibiu especificamente a liberação de glutamato (DAISLEY & ROSE, 1999). O pré-tratamento com DPCPX,

antagonista de receptores A₁, preveniu o aumento de erros na memória de trabalho induzida por intransfusão de CPA, agonista de receptor A₁, em hipocampo de ratos (OHNO & WATANABE, 1996).

Desde que o sistema adenosinérgico é capaz de regular mudanças de longa duração na eficiência das sinapses, é esperado que este sistema também modifique a performance de testes experimentais de aprendizado e memória em animais. Podemos observar a amplitude dos efeitos da adenosina sobre tarefas de aprendizado e memória analisando a Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos da adenosina sobre testes de aprendizado e memória

| Testes comportamentais | Espécie | Efeito | Droga | Mecanismo de ação | Referência |
|--|------------|------------|-----------|----------------------------|--|
| Aprendizado passivo | camundongo | diminuição | CPA | Agonista seletivo de A1 | Normile & Barraco (1991); Ohno & Watanabe (1996) |
| Memória de trabalho (Three-panel runway) | rato | diminuição | CHA | Agonista seletivo de A1 | Ohno & Watanabe (1996) |
| Memória de trabalho (Nonmating-to-sample task) | rato | sem efeito | R-PIA | Agonista seletivo de A1 | Pontecorvo et.al. (1991) |
| Memória espacial Morris water maze (labirinto aquático) | camundongo | aumento | CPA | Agonista seletivo de A1 | Von Lubitz et.al. (1993) |
| Aprendizado passivo (Déficit induzido por escopolamina) | rato | aumento | KF 153772 | Antagonista seletivo de A1 | Suzuki et.al. (1993) |

Adaptado a partir de de MENDONÇA & RIBEIRO (2001).

Abreviações utilizadas: CPA, N⁶-ciclopentiladenosina; CHA, N⁶-ciclohexiladenosina; R-PIA, R-N⁶-fenilisopropiladenosina; KF 15372, 8-(3-diciclopropilmetil)-1,3-dipropilxantina.

Tem aumentado a aceitação de que os efeitos neuromodulatórios da adenosina não estão restritos a sua inibição mediada pelos receptores A₁. Sabe-se que a utilização de agonistas e principalmente antagonistas

de receptores A_{2A} demonstrou o papel destes receptores no controle da liberação de neurotransmissores em várias regiões cerebrais (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 1996).

Os receptores A_{2A} são na maioria acoplados a proteína Gs (OLAH, 1997; CUNHA et al., 1999) mas também podem estar acoplados a proteínas Gi/GO (CUNHA et al., 1999). A modulação da liberação de neurotransmissores mediada pelos receptores A_{2A} é atenuada por inibidores da adenilato ciclase e por análogos de AMPc. No entanto, inibidores da proteína quinase A (PKA) fracamente inibem (CUNHA & RIBEIRO, 2000) ou não afetam (KIRK & RICHARDSON, 1995) os efeitos da ativação de receptores A_{2A} . Em contraste, inibidores da proteína quinase C (PKC) (KIRK & RICHARDSON, 1995; CUNHA & RIBEIRO, 2000) ou da fosfolipase C (NÖRENBERG et al., 1998) são capazes de inibir os efeitos da ativação dos receptores A_{2A} .

Além dos receptores A_{2A} , existem os receptores A_{2B} que estão acoplados a diferentes vias sinalizadoras, incluindo a ativação da adenilato ciclase (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Pouco se sabe sobre estes receptores já que não foi ainda relatado na bibliografia a presença de agonistas seletivos para A_{2B} .

Os receptores A_3 foram clonados e identificados em diferentes espécies (MEYERHOF et al., 1991; SALVATORE et al., 1993; JACOBSON et al., 1993). A ativação de receptores A_3 estimula a fosfolipase C e aumenta a geração de inositol trifosfato em fatias de cérebro de rato (ABBRACCHIO et al., 1995a). Além disso, estes receptores também inibem a atividade de adenilato ciclase (ZHOU et al., 1992; ABBRACCHIO et al., 1995b). Mas os efeitos fisiológicos dos receptores A_3 no sistema nervoso central ainda permanecem desconhecidos.

O maior alvo de estudos são os receptores A_1 e os receptores A_{2A} já que eles modulam a excitabilidade neuronal. Dados encontrados na literatura demonstraram a sua co-expressão e co-localização na região CA1 do hipocampo (CUNHA et al., 1994). De fato, existe uma interação funcional entre estes receptores sendo que a ativação dos receptores A_{2A} com baixas concentrações de CGS 21680, agonista de A_{2A} , diminuiu a eficiência do agonista de receptores A_1 , CPA, em inibir a excitabilidade hipocampal (CUNHA et al., 1994). Isto indica que existe uma comunicação entre estes receptores no hipocampo, e sugere que as ações da adenosina endógena mediadas pelos receptores A_1 podem ser diminuídas se houver a concomitante ativação dos receptores A_{2A} (CUNHA et al., 1994; LOPES et al., 1999).

Tem sido proposto uma inibição, mediada por receptores A_1 , da ação dos receptores A_{2A} , desde que a dessensibilização dos receptores A_1 estriatais é acompanhada por uma amplificação, tempo dependente, da estimulação da adenilato ciclase mediada por A_{2A} (ABRACHIO et.al., 1992).

A co-existência de ambos receptores A_1 e A_{2A} emerge um questionamento de como a adenosina escolhe qual receptor ela irá ativar e sob quais condições ela discrimina estes receptores. Acredita-se que a adenosina formada a partir de nucleotídeos de adenina age preferencialmente nos receptores A_{2A} , enquanto que a adenosina liberada como tal age preferencialmente nos receptores A_1 (CUNHA et al., 1996 a, b). Isto pode resultar de uma diferente localização dos receptores A_1 e A_{2A} em relação aos sítios de liberação de adenosina e a localização das ectonucleotidasas, enzimas que hidrolisam os nucleotídeos de adenina até adenosina (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000).

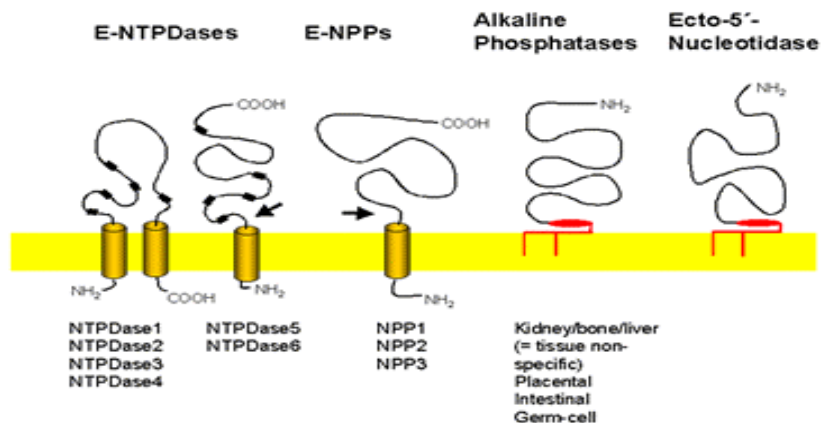
I.7. ECTONUCLEOTIDASAS

Após a liberação do ATP como neurotransmissor e sua conseqüente ligação nos seus receptores específicos, faz se necessário um sistema efetivo para a inativação do seu sinal. Este nucleotídeo pode ser inativado através de sua hidrólise, a qual é realizada por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular. Estas enzimas são chamadas de ectonucleotidasas e dentro deste grupo podemos destacar a presença da ecto-ATP difosfoidrolase ou ecto-apirase (EC 3.6.1.5), da ecto-ATPase (EC 3.6.1.3) e da ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5.) (BONAN et al., 2001).

Atualmente, foi proposta uma classificação para essas enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares, onde a ecto-apirase e a ecto-ATPase estão incluídas numa mesma família denominada E-NTPDase (ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase) (ZIMMERMANN, 2001) (Figura I.2).

FIGURA I.2. Prognóstico da topografia das ectonucleotidasas de membrana (Zimmermann, 2001).

As enzimas desta família, em mamíferos, hidrolisam nucleosídeos 5'-trifosfatados e difosfatados.



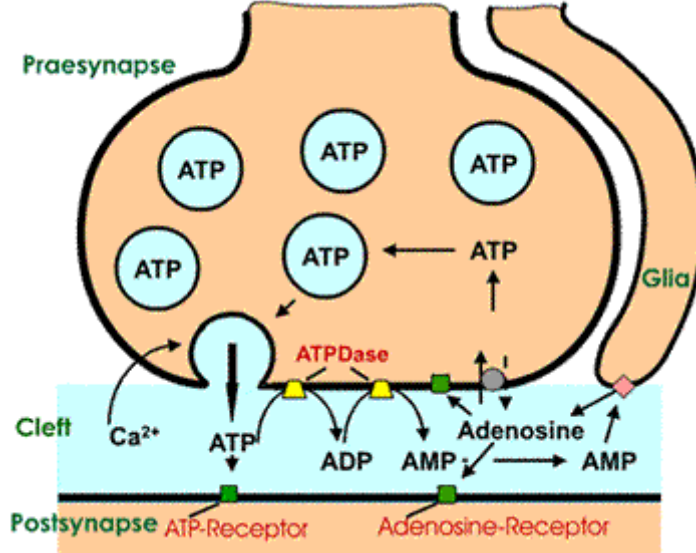
No entanto, há uma considerável diferença na preferência por tipos individuais de nucleotídeos. A apirase,

também denominada NTPDase1, CD39 ou ecto-ATP difosfohidrolase, hidrolisa ATP e ADP quase que igualmente (KACZMAREK et al., 1996; WANG & GUIDOTTI, 1996; HEINE et al., 1999). A ectoATPase, também denominada NTPDase 2 ou CD39L1, tem uma preferência maior pela hidrólise de ATP (30 vezes) do que ADP (KEGEL et al., 1997; KIRLEY, 1997; MATEO et al., 1999). Interessantemente, a NTPDase3 ou CD39L3, encontrada em humanos e aves, é um intermediário funcional e hidrolisa ATP aproximadamente 3 vezes melhor que o ADP (SMITH & KIRLEY, 1998). Até o presente momento, as diferenças funcionais na especificidade pelo substrato e suas conseqüências específicas nas células ou tecidos não estão completamente entendidas. As três enzimas podem produzir um impacto surpreendentemente diferente na sinalização dos receptores de nucleotídeos. A partir destas propriedades funcionais (HEINE et al., 1999) é possível sugerir que NTPDase1 pode hidrolisar nucleosídeos tri e difosfatados igualmente bem, resultando na formação de nucleosídeos monofosfatados e a inativação de todos os receptores P2. A NTPDase2 pode seletivamente inativar os nucleosídeos trifosfatados e agir como um produtor extracelular de nucleosídeos difosfatados. A NTPDase3, com suas propriedades intermediárias, hidrolisa efetivamente nucleosídeos trifosfatados, mas a hidrólise de nucleosídeos difosfatados pode ser diminuída e, portanto, o nucleosídeo difosfatado pode permanecer um maior período de tempo até que seja hidrolisado (ZIMMERMANN, 2001).

Apesar destas diferenças catalíticas, há cinco domínios com seqüência altamente conservada nesta família de enzimas, denominada “regiões conservadas da apirase”, que possivelmente participam da formação do sítio catalítico destas enzimas (HANDA & GUIDOTTI, 1996). Além disso, KEGEL et al. (1997) demonstraram que uma ecto-ATPase e uma ecto-apirase são co-expressas em cérebro de ratos.

Uma outra enzima pertencente ao grupo das ectonucleotidases é a ecto-5'-nucleotidase. Esta enzima encontra-se presente na maioria dos tecidos e sua principal função é a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, a seus respectivos nucleosídeos. No sistema nervoso central, a ecto-5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado esta atividade associada a neurônios (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998). A ecto-5'-nucleotidase é transitoriamente expressa na superfície de células neuronais e nas sinapses durante o desenvolvimento sináptico (SCHOEN & KREUTZBERG, 1994; BRAUN et al., 1995).

Inicialmente, a maioria dos estudos sobre as ectonucleotidases apresentava como objetivo principal o conhecimento da distribuição destas atividades enzimáticas, bem como de suas características cinéticas. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado a participação destas enzimas em uma série de condições fisiológicas e patológicas.



Vários estudos realizados no nosso laboratório demonstraram a participação da cadeia enzimática das ectonucleotidases em eventos de plasticidade sináptica, como o processamento da memória. BONAN et al. (1998) observaram que imediatamente após a sessão de treino em esQUIVA inibitória, houve um decréscimo na atividade ATPásica e ADPásica da ATP difosfoidrolase, bem como na atividade da ecto-5'-nucleotidase em sinaptossomas hipocámpais de ratos. Além disso, sinaptossomas hipocámpais de ratos sacrificados 30 minutos após a sessão de treino também apresentaram uma diminuição da atividade ATPásica. Posteriormente, BONAN et al. (2000) verificaram que após 180 minutos da sessão de treino, na mesma tarefa, a atividade ATPásica e ADPásica da apirase de sinaptossomas de hipocampo apresentava-se diminuída. Além disso, foi observado que, em córtex entorrinal, a enzima demonstrou uma diminuição da atividade ATPásica e ADPásica imediatamente após a sessão de treino (BONAN et al., 2000).

Portanto, a ação combinada das diversas ectonucleotidases se constitui uma via altamente sofisticada (Figura I.3.) desenvolvida com o objetivo de controlar os níveis extracelulares de ATP e adenosina, capazes de modular uma série de processos fundamentais a nível celular em muitos órgãos e tecidos, principalmente no sistema nervoso central.

Figura I.3. Liberação de ATP na fenda sináptica e as ações desencadeadas por esse neurotransmissor pré- e pós-sinápticamente. (Adaptado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann).

5'-nucleotidase

I.8. OBJETIVOS

Considerando que (i) o córtex cingulado e o córtex pré-frontal são estruturas envolvidas no processamento da memória, (ii) a via das ectonucleotidases encontra-se alterada após a tarefa de esquiva inibitória em hipocampo e córtex entorrina de ratos, e (iii) a adenosina é um produto da via das ectonucleotidases e que está envolvida no processamento da memória, este trabalho tem como objetivos:

1. Analisar as atividades das ectonucleotidases em sinaptossomas de córtex cingulado anterior e posterior de ratos submetidos a tarefa de esquiva inibitória.
2. Investigar a atividade das ectonucleotidases em sinaptossomas de cortex pré-frontal (área precentral medial) de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória.
3. Verificar o efeito da intrainfusão em cingulado posterior de DPCPX (1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina), uma antagonista seletivo de receptores A_1 , na retenção da memória de curta duração e longa duração para a tarefa de esquiva inibitória.
4. Verificar o efeito da intrainfusão em cingulado posterior de CPA (N6-ciclopentiladenosina), um agonista seletivo de receptores A_1 , na retenção da memória de curta duração e longa duração para a tarefa de esquiva inibitória.

II.1. CAPÍTULO 1 - PEREIRA, G.S.; MELLO E SOUZA, T.; BATTASTINI, A.M.O. IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J.F.; BONAN, C.D. Effects of inhibitory avoidance training and/or isolated foot-shock on ectonucleotidase activities in synaptosomes from the anterior and posterior cingulate cortex and the medial precentral area (fr2) of adult rats. **Behavioural Brain Research**, 2001, *in press*.

II.2. CAPÍTULO 2 - PEREIRA, G.S.; MELLO E SOUZA, T.; VINADÉ, E.R.; BATTASTINI, A.M.O.; IZQUIERDO, I; SARKIS, J.J.F.; BONAN, C.D. Facilitative effect of an adenosine A₁ receptor blockade

in the posterior cingulate cortex on short and long-term memory for inhibitory avoidance in rats,
submetido ao European Journal of Pharmacology

**Facilitative effect of an adenosine A1 receptor blockade in the posterior cingulate
cortex on short and long memory for inhibitory avoidance in rats.**

Grace S. Pereira^{1,#}, Tadeu Mello e Souza^{1,#}, Elsa R. do Canto Vinadé¹, Henrique Choi¹, Cristina Rodrigues¹,
Ana M.O. Battastini¹, Iván Izquierdo¹, João J. F. Sarkis¹ and Carla D. Bonan^{1,2}

1. Laboratório de Enzimologia e Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Both are first authors

*Corresponding author:

Carla Denise Bonan, Departamento de Ciências Fisiológicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

e-mail address: bonan@portoweb.com.br

FAX: +55 51 3320 3612, Phone: +55 51 3320 3500 Extension 4158

ABSTRACT

Male Wistar rats were bilaterally implanted with indwelling cannulae in the caudal region of the posterior cingulate cortex. After recovery, animals were trained in a step-down inhibitory avoidance task (3.0-s, 0.4-mA foot shock) and received, immediately after training, a 0.5- μ l infusion of the adenosine A₁ receptor agonist N⁶-cyclopentyladenosine (CPA; 1nM, 50nM, or 100 nM) or the adenosine A₁ receptor antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX; 1nM, 25nM, or 50 nM). Animals were tested twice, 1.5 h and, again, 24 h after training, in order to examine the effects of these agents on short- and long-term memory, respectively. Only DPCPX at 50 nM was effective in altering memory, promoting a facilitation. These results suggest that adenosine A₁ receptors in the posterior cingulate cortex inhibit memory consolidation in a way that their blockade facilitates memory for inhibitory avoidance in rats.

Keywords: adenosine A₁ receptor, posterior cingulate cortex, STM, LTM

1. INTRODUCTION

Adenosine is considered to have an important role in the modulation of central synaptic transmission and neuronal excitability (Sebastião and Ribeiro, 2000). Adenosine mediates its effects through four types of receptors, A₁, A_{2a}, A_{2b}, and A₃, to which G proteins are coupled (Hauber and Bareiß, 2001). A₁ receptors are the most prevalent and have the highest affinity among the adenosine receptors in the central nervous system (Brundege and Dunwiddie, 1997). Adenosine A₁ receptors inhibit neurotransmitter release (reviewed in Cunha, 2001), as well as affecting activity-dependent synaptic plasticity in the hippocampus, attenuating long-term depression (LTD) and inhibiting long-term potentiation (LTP) (de Mendonça and Ribeiro, 1997).

Several adenosine A₁ receptor agonists and antagonists administered systemically have been reported to alter inhibitory avoidance learning (Normile and Barranco, 1991; Von Lubitz et al., 1993; Zarrindast and Bijan, 1994; Ohno and Watanabe, 1996; Kopf et al., 1999). Most of the available data demonstrate a modulatory role of adenosine in memory in the hippocampus (de Mendonça and Ribeiro, 2000). However, cortical structures other than the hippocampus are also involved in the consolidation of memory for the step-down inhibitory avoidance task (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al., 1997; Mello and Souza et al., 1999). In fact, there is increasing evidence to indicate that the posterior cingulate cortex (PC) is important for memory processes, such as those involved in step-down inhibitory avoidance (Mello and Souza et al., 1999; Souza et al., 2001). Interestingly, binding of [³H]DPCPX to adenosine A₁ receptors is higher in the more inferior part of PC (Svenningsson et al., 1997), where synaptic plasticity is observed (Hedberg and Stanton, 1995).

Since there are no studies providing support for an involvement of adenosine A₁ receptors in PC in memory, the aim of the present work was to evaluate the effect of immediate post-training infusions into PC of the adenosine A₁ receptor agonist N⁶-cyclopentyladenosine (CPA) and of the adenosine A₁ receptor

antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX) on short- (STM) and long-term memory (LTM) for inhibitory avoidance.

2. MATERIAL AND METHODS

A total of one hundred and thirty male Wistar rats (age, 60 to 90 days) from our breeding colony was used. The animals were housed five to a cage with food and water ad libitum. The animal house was on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Procedures for the care and use of animals were according to the regulation of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior.

The animals were bilaterally implanted under thionembutal anesthesia (30 mg/kg, i.p.) with 27-gauge guide cannulae. After at least 48 h, all animals were trained in a step-down inhibitory avoidance task (Izquierdo et al., 1997). Latency to step down placing the four paws on the grid was measured. In the training session, immediately upon stepping down, the animals received a 3.0-s, 0.4-mA foot-shock. Animals were tested twice, 1.5 h and, again, 24 h after training, in order to measure STM and LTM, respectively (Izquierdo et al., 1998 a, b). Test sessions were procedurally identical to the training session except that no foot shock was given and the step-down latency was cut off at 180 s; i.e., test session values higher than 180 s were counted as 180 s. Retention test performances were taken as measurements of retention.

At the time of infusion, 30-g cannulae were fitted into the guide cannulae (Izquierdo et al., 1997). Animals received, immediately after training, a bilateral infusion of 0.5 μl of the adenosine A_1 receptor agonist N6-cyclopentyladenosine (CPA; 1nM, 50nM, or 100 nM) in phosphate buffer saline (SAL; pH 7.4; 15mM CaCl_2), of the adenosine A_1 receptor antagonist 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine (DPCPX; 1nM, 25nM, or 50 nM) in DMSO 20% (VEH), or of either SAL or VEH.. Infusion site was chosen using coordinates from bregma and dura obtained from the Atlas of Paxinos & Watson (1986), as follows (units in cm): A - 0.58, L \pm 0.10, V 0.28 (Fig. 1).

The histological localisation of infusion sites was confirmed as explained elsewhere (Izquierdo et al., 1997). Only animals with correct cannulae locations (Fig.1) were included in the final statistical analysis.

Parametric statistics were used when comparing groups in the training session, where latencies may be presumed to have a normal distribution. In this case, there was no difference among groups in the training session [one-way ANOVA: $F(7,107) = 1.637$; $p = .133$; overall mean, 6.1 s; s.e.m., 0.4 s]. In test sessions distribution was not normal by definition: there was a 180-s latency ceiling. Thus, retention test data are

reported as medians (interquartile range) of retention scores of all test sessions (Fig. 2), and non-parametric statistics were applied (a Kruskal-Wallis ANOVA followed by individual Mann-Whitney U test, two-tailed).

3. RESULTS

DPCPX at 50nM ($n = 16$) significantly increased the retention test performance for STM ($p = .031$) and LTM ($p = .011$). DPCPX at lower doses (1nM and 25nM; $n = 11$ and $n = 10$, respectively) did not alter either STM ($p = .355$ and $p = .745$, respectively) or LTM ($p = .244$ and $p = .935$, respectively) (Mann-Whitney U test; Fig. 2A; $n = 22$ for VEH). Our results show that memory is facilitated when A_1 receptors in PC are strongly inhibited immediately after training. Since infusions were given post-training, our results also show that this facilitation was due to an alteration of memory consolidation rather than acquisition, indicating that memory consolidation of inhibitory avoidance is under a modulatory inhibition promoted by adenosine A_1 receptors in PC.

CPA at 1nM ($n = 14$), 50nM ($n = 10$), or 100 nM ($n = 8$) did not alter both STM ($p = .437$, $p = .899$, and $p = .750$, respectively) and LTM ($p = .759$, $p = .797$, and $p = .729$, respectively) (Mann-Whitney U test; Fig. 2 B; $n = 18$ for SAL). This indicates that the neuromodulatory inhibition mediated by the A_1 receptors is in its upper limit, because they are already saturated by endogenous adenosine in PC due to inhibitory avoidance training and/or these receptors have a limited power of inhibiting memory consolidation.

4. DISCUSSION

Some previous studies demonstrated that adenosine A_1 receptors modulate aversive memory (Normile and Barranco, 1991; Ohno and Watanabe, 1996; Zarrindast and Bijan, 1994), showing that their agonists can impair memory. However, in all of these studies the drugs were administered systemically, suggesting that regions other than PC (*e.g.*, hippocampus) were affected and may have contributed to the amnesiac effect. Interestingly, the adenosine antagonists were shown to facilitate the retention or prevent the amnesic effects of scopolamine on passive avoidance task (Pitsikas and Borsini, 1997).

There is increasing evidence to indicate that PC is important in mediating memory processes (Mello e Souza et al., 1999; Pereira et al., 2001; Souza et al., 2001; Maddock, 1999). PC may perform its functions and might store information by mechanisms of activity-dependent synaptic plasticity, such as LTP and LTD (Hedberg & Stanton, 1995). Adenosine modulates LTP in a way that A_1 receptor agonists and antagonists, respectively, impair and enhance LTP in hippocampal preparations (de Mendonça and Ribeiro, 1990). In fact,

DPCPX enhances hippocampal LTP by more than 100% (de Mendonça and Ribeiro, 2000), probably because it blocks A_1 receptor-mediated inhibition of excitatory neurotransmitter release and/or of protein kinase A (PKA) activity (de Mendonça et al., 1995, Constenla et al., 1999). Therefore, DPCPX may facilitate memory of inhibitory avoidance by means of facilitating LTP-like plasticity in PC. Interestingly, immediate post-training inhibition of PKA activity in PC is amnesic for both STM and LTM for inhibitory avoidance (Souza et al., 2001). Furthermore, DPCPX might also facilitate memory consolidation via an interaction between A_1 and A_2 receptors. In the hippocampus, for instance, the excitatory responses of A_2 receptors are increased in the presence of A_1 receptor antagonists (Correia-de-Sá and Ribeiro, 1994).

It is worth pointing out that there is an increase in ectonucleotidase activities in PC after inhibitory avoidance training (Pereira et al., 2001), which is indirect, but not conclusive, evidence that adenosine levels are increased at this time. As pointed out by Minor et al. (2001), adenosine may be released as a compensatory response to the high neuronal activity that occurs during stressing events, protecting the neurons against excitotoxic damage.

In summary, the present study provides support for an inhibitory modulation of A_1 receptors in PC in both STM and LTM for inhibitory avoidance learning in rats. Further studies are necessary to clarify the mechanisms by which DPCPX facilitates retention and their relevance to the understanding of memory processing.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from CNPq, PRONEX and FAPERGS, Brazil. Tadeu Mello e Souza is currently supported by CNPq at the Institut Alfred Fessard, CNRS, Gif sur Yvette, France.

REFERENCES

- Brundege, J.M., Dunwiddie, T.V., 1997. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv. Pharmacol.* 39, 353-391.
- Correia-de-Sá, P. and Ribeiro, J.A., 1994. Tonic adenosine A_{2A} receptor activation modulates nicotinic autoreceptor function at the rat neuromuscular junction. *Eur. J. Pharmacol.* 271, 349-355.

- Costenla, A.R., de Mendonça, A., Ribeiro, J.A., 1999. Adenosine modulates synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Brain Res.* 851, 228-234.
- Cunha, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors, 2001. *Neurochem. Int* 38, 107-125.
- de Mendonça A., Ribeiro, J.A., 1990. 2- Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. *Neurosci. Lett.* 118, 107-111.
- de Mendonça, A., Sebastião, A.M.Ribeiro, J.A., 1995. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A₁ receptor activation. *Neuroreport* 6, 1097-1100.
- de Mendonça A, and Ribeiro JA.,1997. Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* 60, 241-245.
- de Mendonça, A., Ribeiro, J.A., 2000. Long-term potentiation observed upon blockade adenosine A₁ receptors in rat hippocampus in N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *Neurosci. Lett.* 291, 81-84.
- Hauber, W., Bareiß, A., 2001. Facilitative effects of an adenosine A₁/A₂ receptor blockade on spatial memory performance of rats: selective enhancement of reference memory retention during the light period. *Behav. Brain Res.* 118, 43-52.
- Hedberg, T.G., & Stanton, P.K., 1995. Long-term potentiation and depression of synaptic transmission in rat posterior cingulate cortex. *Brain Res.* 670, 181-196.
- Izquierdo, I., Medina J.H., 1997. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68 (3), 285-316.
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P.K., & Medina, J.H., 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex and the posterior parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 786-793.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H., 1998a. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 395, 635-636.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Madruga, M., and Medina, J.H., 1998b. Differential Involvement of Cortical Receptor Mechanisms in Working, Short- and Long-term Memory. *Behav. Pharmacol.* 9, 421-427.

- Kopf S.R., Melani, A., Pedata, F., Pepeu, G., 1999. Adenosine and memory storage: effect of A₁ and A₂ receptor antagonist. *Psychopharmacol.* 146, 214-249.
- Maddock., 1999. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci.* 22, 310-316.
- Mello e Souza, T., Roesler, R., Madruga, M., de-Paris, F., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., Izquierdo, I., 1999. Differential effects of post-training muscimol and AP5 infusions into different regions of the cingulate cortex on retention for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 118-27.
- Minor TM, Rowe MK, Soames Job RF & Ferguson EC., 2001. Escape deficits induced by inescapable shock and metabolic stress are reversed by adenosine receptor antagonists. *Behav Brain Res* 120, 203-212.
- Normile, H.J., Barraco, R.A., 1991. N⁶-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A₁ receptors. *Brain Res. Bull.* 27, 101-104.
- Ohno, M., Watanabe, S., 1996. Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A₁ receptors in rats. *Neuroreport* 7, 3013-3016.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, second ed. Academic Press, San Diego.
- Pereira, G.S., Mello e Souza, T., Battastini A.M.O, Izquierdo I., Sarkis J.J.F., Bonan C.D., 2001. Effects of Inhibitory Avoidance Training and/or Isolated Foot-Shock on Ectonucleotidase Activities in Synaptosomes from the Anterior and Posterior Cingulate Cortex and the Medial Precentral Area (Fr2) of Adult Rats. *Behav. Brain Res.*, in press.
- Pitsikas, N., Borsini, F., 1997. The adenosine A₁ receptor antagonist BIIP 20 counteracts scopolamine-induced behavioral deficits in the passive avoidance task in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 328, 19-22.
- Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 2000. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS* 21, 341-346.
- Souza, M.M., Mello e Souza, T., Vinadé, E.R., Rodrigues, C., Choi, H.K., Dedavid e Silva, T.L., Medina, J.H., and Izquierdo, I. Effects of Post-training Treatments in the Posterior Cingulate Cortex on Short- and Long-Term Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, in press.
- Svenningsson P., Hall H., Sedvall G., Fredholm B.B., 1997. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* 27, 322-35.

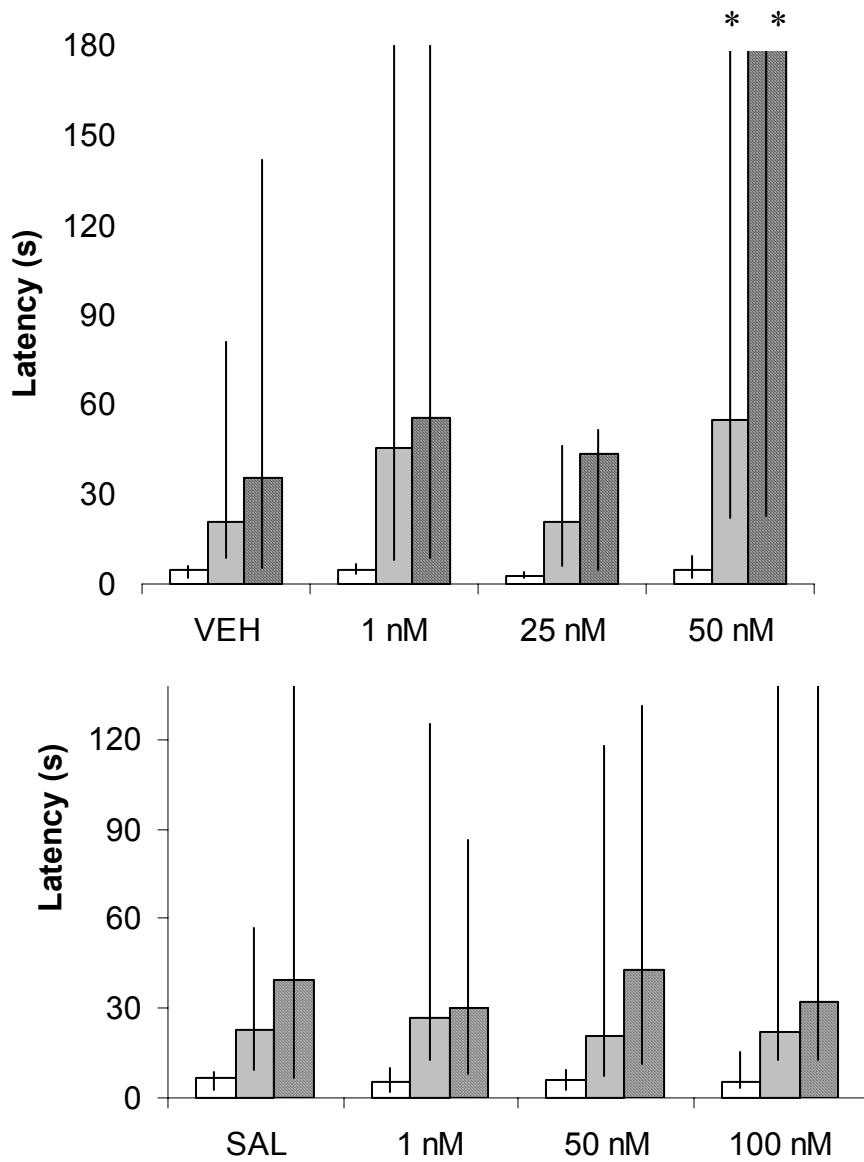
Von Lubitz, D.K., Paul, I.A., Bartus R.T., Jacobson K.A.,1993. Effects of chronic administration of adenosine A₁ receptor agonist and antagonist on spatial learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* 16, 271-280.

Zarrindast, M.R, Shafaghi, B., 1994. Effects of adenosine agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur. J. Pharmacol.* 256, 233-239.

LEGENDS TO FIGURES

FIG. 1. Schematic drawing of rat brain section at coronal plane A - 0.58 cm from the atlas of Paxinos and Watson (1986) showing (stippled) the extension of the area reached by infusions into PC. The figure illustrates a composite of all infusions given on both sides. The maximum extension reached by any individual infusion was less than 1 mm³ in the animals with correct infusion placements. Infusions were restricted to areas 29 a, b, and c (retrosplenial granular, RSG).

DCPCX



III. DISCUSSÃO

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram a participação de ectonucleotidases em hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória (BONAN et al, 1998, BONAN et al, 2000). No entanto, não haviam sido feitos estudos sobre as ectonucleotidases em outras estruturas corticais como córtex cingulado e córtex pré-frontal, embora já estivesse bem documentada a participação destas estruturas na consolidação da memória (MELLO & SOUZA et al, 1999, MELLO & SOUZA et al, 2000). Sendo assim, investigamos a participação das ectonucleotidases na memória da tarefa de esquiva inibitória em córtex cingulado e córtex pré-frontal de ratos.

No capítulo 1 desta dissertação, obtivemos resultados que demonstraram que as alterações na atividade de ectonucleotidases sinaptossomais de córtex cingulado anterior (CA), córtex cingulado posterior (CP) e área pré-central medial (FR2) podem estar relacionadas com o estresse promovido pela tarefa de esquiva inibitória. Além disso, observamos também um aumento na hidrólise de ATP e ADP dependente do aprendizado em córtex cingulado posterior e anterior de ratos, respectivamente.

Em nossos experimentos, tínhamos dois grupos de animais que recebiam choque, sendo que um dos grupos era exposto previamente ao treino na tarefa de esquiva inibitória, permanecendo alguns segundos em uma plataforma, antes de receber o choque (IA) e o outro grupo recebia somente o choque (IF). Ambos os grupos tiveram alterações nas atividades ectonucleotidásicas de córtex cingulado e FR2 quando comparados a um terceiro grupo de animais que não recebeu qualquer tipo de choque ou treino (naïve). Sendo assim, este efeito muito provavelmente não está associado à consolidação da memória, mas a mudanças neuroquímicas e neurohumorais induzidas pelo estresse promovido pelo choque.

Quando os animais são expostos à tarefa de esquiva inibitória são acionados dois componentes importantes, os estímulos condicionados (CS, do inglês *conditioned stimulus*), promovidos pela estada do animal na plataforma e a posterior aplicação do choque, e os estímulos incondicionados (US, do inglês *unconditioned stimulus*), promovidos somente pelo choque. Considerando que as mudanças enzimáticas observadas em IA e IF não foram observadas no grupo naïve parece que o componente responsável por estas alterações é o US, já que IA e IF receberam choque.

No entanto, é pouco provável que as alterações encontradas neste estudo correspondam ao aprendizado por medo contextual, pois são necessários no mínimo três a cinco choques de 0.4-0.5 mA para detectar tal condicionamento (ALONSO et al, *in press*).

De fato, a modulação da memória por mudanças neurohumorais em IA está relacionada ao estresse causado por estímulos incondicionados, como tem sido previamente descrito (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). Isto indica que um choque médio (3.0 s, 0.4 mA), é suficiente para promover mudanças específicas na hidrólise de ATP e ADP em CA, CP e FR2.

Fortes evidências têm demonstrado que o estresse aumenta a atividade de uma variedade de neurotransmissores modulatórios em várias regiões cerebrais (ENRICO et al., 1998; HEINSBROEK et al., 1990; ISHIZUKA et al., 2000, JEDEMA & MOGHDDAM, 1997; MARK et al., 1996). Interessantemente, um estresse médio como, por exemplo, a manipulação por 30 segundos, injeções de salina, compressão do rabo do animal (ADELL et al., 1997) ou um choque médio como o utilizado neste trabalho, são suficientes para alterar a neuroquímica do córtex pré-frontal de ratos.

Desde que o CA está envolvido na cognição da nocicepção (na antecipação à dor, por exemplo) (KOYAMA et al., 1998), nós não podemos descartar a possibilidade de que as mudanças na hidrólise de ATP em CA, mas não em FR2, possa ter ocorrido devido ao processamento da dor, mais do que a um efeito específico do estresse.

Interessantemente, foi proposto por BURNSTOCK (1996) e revisado por HAMILTON & McMAHON (2000) que o ATP pode ser considerado um mediador da dor, ou seja, a liberação de ATP por diferentes tipos de células está relacionada com o início da dor devido a sua ação nos purinoreceptores localizados em terminais nervosos sensoriais. Sendo assim poderíamos inferir que o aumento na hidrólise de ATP em CA poderia ser um mecanismo de desativação desta molécula, a qual estaria envolvida no processamento da dor.

Além disso, foi também observado no capítulo 1 que as ectonucleotidases estão envolvidas, pelo menos em parte, na consolidação da memória para esQUIVA inibitória em córtex cingulado de ratos. Nós observamos que a hidrólise de ATP e ADP foi significativamente aumentada, imediatamente após a sessão de treino em esQUIVA inibitória, em córtex cingulado posterior (CP) e anterior (CA), respectivamente.

Crescentes evidências têm indicado que o CP é um importante mediador dos processos envolvidos na memória em várias espécies de mamíferos tais como ratos (MELLO & SOUZA et al., 1999), coelhos (GABRIEL et al., 1988) e humanos (MADDOCK, 1999). Interessantemente, a ligação de [³H]DPCPX, um antagonista de receptores A₁ de adenosina, é mais intensa na parte inferior do CP (SVENNINGSSON et al., 1997), justamente onde a LTP e a LTD são observadas (HEDBERG & STANTON, 1995).

Existem evidências mostrando que o CA está envolvido na consolidação da memória (RIEKKINEN et al., 1995). Similarmente ao CP, a ligação de [³H]DPCPX aos receptores A₁ é mais intensa na parte mais inferior do CA (SVENNINGSSON et al., 1997), onde a LTP é observada (GOLD, 1986).

Em hipocampo, estimulações com alta, mas não com baixa frequência das fibras de Schaffer (LTP) liberam ATP, o qual é degradado até adenosina (CUNHA et al., 1996b). O ATP age como um neurotransmissor e/ou como substrato para a fosforilação de ecto-proteínas, produzindo mudanças na plasticidade sináptica (WIERASZKO & EHRLICH, 1994). A remoção do ATP poderia prevenir a modificação de um grande número de sinapses, permitindo que somente sinapses adequadas fossem modificadas por mecanismos do tipo LTD e LTP.

Está bem demonstrado na literatura que a adenosina atenua a LTD e inibe a LTP através dos receptores A₁ (de MENDONÇA, 1997). Nossos resultados sugerem um aumento nos níveis de adenosina após o treino em esquivas inibitórias. Por esta razão, os receptores A₁ em CP poderiam ser ativados com o objetivo de modular este processo.

Além disso, os estudos dos efeitos do ATP incluem os efeitos de seus metabólitos tais como a adenosina. Na transmissão glutamatérgica o estudo dos efeitos do ATP são difíceis já que há uma rápida conversão do ATP em adenosina (DUNWIDDIE et al., 1997; CUNHA et al., 1996a; CUNHA et al., 1998), a qual causa uma intensa inibição da transmissão sináptica em diferentes áreas do sistema nervoso central (CUNHA & RIBEIRO, 2000). Isto leva à conclusão de que se o ATP tem qualquer efeito sobre a transmissão glutamatérgica, este efeito é mediado pela adenosina e pode não envolver a ativação dos receptores P₂, já que este neurotransmissor é rapidamente metabolizado até adenosina (CUNHA et al., 1996a; CUNHA et al., 1998; LEE et al., 1981; STONE & CUSACK, 1989; MENDONZA-FERNANDEZ et al., 2000). Assim, existe uma proposta de que os efeitos do ATP sobre o fenômeno da plasticidade sináptica na transmissão glutamatérgica possam ser responsáveis pela atividade de uma ecto-proteína quinase (EHRLICH & KORNECKI, 1999). Além disso, a adenosina pode exercer seus efeitos inibitórios na transmissão sináptica pela inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (de MENDONÇA & RIBEIRO, 1997). A concomitante ativação dos receptores NMDA e bloqueio dos receptores A₁ induzem LTP em hipocampo de ratos (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000). Em contraste, a LTD observada na presença do bloqueio dos receptores A₁ não é dependente da ativação dos receptores NMDA (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000).

Além da transmissão glutamatérgica, outros sistemas de transmissão podem envolver a participação de ATP. A infusão de muscimol, agonista de receptores GABA_A, em cíngulo posterior, imediatamente e 90 minutos após a sessão de treino em esquiva inibitória, teve um efeito amnésico sobre a consolidação da memória de ratos (MELLO & SOUZA et al, 1999). Isto indica que o CP é sensível ao sistema GABAérgico. Sabe-se que o ATP aumenta a transmissão gabaérgica em culturas de neurônios hipocámpais de ratos (INOUE et al., 1999). Poderíamos então supor que o aumento na hidrólise de ATP em sinaptossomas de CP poderia ser um mecanismo de remoção rápida deste neurotransmissor, impossibilitando sua ação sobre o sistema GABAérgico, o qual, sendo ativado, promoveria um efeito amnésico na consolidação da memória para esquiva inibitória.

No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para confirmar se (1) a hidrólise aumentada de ATP em CP proporciona níveis de adenosina suficientes para modular os eventos da consolidação da memória e se (2) o aumento da hidrólise de ATP promoveria sua indisponibilidade na fenda sináptica, o que poderia prevenir sua ação excitatória por si só ou sua influência sobre os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos, a qual estaria diminuída.

Curiosamente, as atividades ectonucleotídicas de córtex cíngulo de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória têm uma resposta oposta a das atividades encontradas em hipocampo e córtex entorrinal, nas quais a hidrólise de ATP e ADP foi diminuída (BONAN et al, 1998; BONAN et al., 2000).

Um outro aspecto relevante é o fato de existir uma co-expressão de uma ecto-ATPase e de uma ecto-ATP difosfohidrolase (ectoapirase) em cérebro de ratos (KEGEL et al., 1997). Estudos complementares têm demonstrado que a ecto-ATPase e a ecto-apirase podem ser diferentemente distribuídas com funções especializadas e diferenciadas em distintas regiões de um mesmo tecido (LEWIS-CARL & KIRLEY, 1997). As diferenças observadas na hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas de CP e CA sugerem que as duas enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares podem estar envolvidas nos efeitos encontrados. O aumento na hidrólise de ATP em sinaptossomas de CP pode envolver uma ecto-ATPase, enquanto o aumento na hidrólise de ADP em sinaptossomas de CA pode corresponder à atividade de uma ecto-apirase. Estes resultados podem indicar uma compartimentalização funcional da hidrólise de nucleotídeos e sugerem que estas enzimas podem estar diferentemente envolvidas em distintas regiões do córtex cíngulo.

Considerando os resultados obtidos no capítulo 1 onde houve o aumento na hidrólise de ATP e ADP em sinaptossomas de CP e CA, sugerindo um possível aumento na concentração de adenosina nestas regiões,

verificamos a influência de agonistas e antagonistas de receptores de adenosina nas memórias de curta (STM) e de longa (LTM) duração na tarefa de esquivas inibitória.

O CP, por possuir uma posição estratégica no circuito Papez, intermediando a sinalização entre o hipocampo e o isocórtex, deve conferir grande importância nos processos mnemônicos. Por sinal, o isocórtex como um todo recebe informações do hipocampo apenas por dois locais, o córtex pré-frontal ou o córtex cingulado posterior (BEAR et al., 1995). Já que os nossos resultados referentes ao aprendizado foram observados apenas em CA e CP, e tendo em conta que o CP parece ser o mais requisitado nos processos mnemônicos, utilizamos esta área como alvo de nossos próximos estudos.

Além disso, optamos por estudar os receptores A_1 , já que existem resultados demonstrando que há uma alta marcação para receptores A_1 em CP (SVENINGSSON et al., 1997).

Então, neste estudo procedemos a injeções de análogos de adenosina em CP, imediatamente após o treino em esquivas inibitórias.

Os resultados obtidos no capítulo 2 demonstraram que a injeção de DPCPX, um antagonista de receptores A_1 , em CP, na concentração de 50 nM, aumentou significativamente a retenção da tarefa em ambas, STM e LTM.

Além disso, a administração de CPA, um agonista de receptores A_1 de adenosina, não alterou ambas, STM e LTM, em nenhuma das concentrações testadas. É importante salientar que DPCPX e CPA foram utilizados em doses específicas para receptores A_1 , desde que eles são, respectivamente, 727 e 680 vezes mais potentes no bloqueio ou ativação de receptores A_1 do que receptores A_2 , indicando que nossas doses não foram suficientes para afetar os receptores A_2 .

De fato, alguns trabalhos demonstraram que os receptores A_1 modulam a memória aversiva (NORMILE & BARRACO, 1991; OHNO & WATANABE, 1996; ZARRINDAST & BIJAM, 1994), mostrando que seus agonistas podem prejudicar a memória. No entanto, em alguns destes trabalhos, não é possível descartar a hipótese de que a aquisição da memória não foi afetada já que as drogas foram aplicadas antes do treino. Além disso, em todos estes estudos as drogas foram administradas sistemicamente, sugerindo que outras regiões além do CP (por exemplo, o hipocampo) foram afetadas e podem ter contribuído para o efeito amnésico. Interessantemente, os antagonistas de adenosina facilitaram a retenção ou preveniram os efeitos amnésicos da escopolamina na tarefa de esquivas passivas (PITSIKAS & BORSINI, 1997).

O CP pode armazenar informações através de mecanismos dependentes de plasticidade sináptica, tais como LTD e LTP (HEDBERG & STANTON, 1995). A adenosina modula a LTP, sendo que agonistas e

antagonistas de receptores A_1 diminuem e aumentam a LTP em preparações hipocâmpais, respectivamente (ARAI et al., 1990; de MENDONÇA & RIBEIRO, 1990). A presença de DPCPX em fatias hipocâmpais aumenta a LTP em 100% (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000), provavelmente porque há o bloqueio da inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios mediada por receptores A_1 . Além disso, o efeito sobre a LTP do bloqueio dos receptores A_1 foi completamente prevenido pela adição de um seletivo antagonista de receptor competitivo de NMDA, o AP5 (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000). Subentende-se então que, a LTP, a qual é inibida por adenosina endógena agindo sobre os receptores A_1 , mas que é observada na presença de DPCPX, é em grande parte dependente da ativação de receptores NMDA (de MENDONÇA & RIBEIRO, 2000).

A estimulação pós-sináptica de receptores A_1 causa hiperpolarização de neurônios piramidais hipocâmpais por ativação de canais de K^+ , levando à inibição das respostas sinápticas mediadas por NMDA (de MENDONÇA & RIBEIRO, 1993). Então, o efeito inibitório sobre a transmissão glutamatérgica excitatória via NMDA seria a explicação para os mecanismos pelos quais a estimulação dos receptores de adenosina A_1 suprime a indução da LTP hipocâmpal (de MENDONÇA & RIBEIRO, 1990).

Além disso, a inibição da fosforilação pela proteína quinase A (PKA) dos receptores NMDA pode ser o mecanismo pelo qual os receptores A_1 inibem a ativação dos receptores NMDA (de MENDONÇA et al., 1995, CONSTENLA et al., 1999). O bloqueio dos receptores A_1 em CP pode interferir na tarefa de esquiiva inibitória como resultado das interações funcionais entre a neurotransmissão via NMDA e receptores A_1 . Interessantemente, imediatamente pós-treino a inibição da atividade de PKA em CP é amnésica para ambas STM e LTM em esquiiva inibitória (SOUZA et al., 2001), mostrando que esta enzima é importante para a consolidação da memória em CP na tarefa de esquiiva inibitória.

Entretanto, o DPCPX pode também facilitar a consolidação da memória via uma interação entre os receptores A_1 e A_{2A} , já que estes receptores são co-localizados em vários tecidos (SEBASTIÃO & RIBEIRO, 2000). No hipocampo, as respostas excitatórias dos receptores A_{2A} são aumentadas na presença de antagonistas de receptores A_1 (CORREIA-DE-SÁ & RIBEIRO, 1994).

Também é interessante lembrar que existe um aumento da atividade de ectonucleotidases em CP após o treino em esquiiva inibitória, o qual é uma indireta, embora não conclusiva evidência de que os níveis de adenosina são aumentados após o treino em esquiiva inibitória. Sendo assim, na intrafusão de CPA, os receptores A_1 poderiam estar saturados por este agonista e pela adenosina endógena. Por este motivo não observamos alterações na memória destes animais. Já na intrafusão de DPCPX, obtivemos a facilitação da

memória dos ratos submetidos à tarefa de esquiwa inibitória possivelmente devido ao fato do DPCPX ser mais lentamente removido dos tecidos onde ele é administrado (TÜMMLER & DUNWIDDIE, 2000). O DPCPX tem afinidade subnanomolar pelos receptores A₁ e é removido do tecido lentamente. Em estudos onde foram aplicadas estimulações persistentes em fatias hipocâmpais de ratos, não foi observada a reversão do efeito do DPCPX, que é a de induzir estimulação persistente, provavelmente pelo fato deste antagonista de receptores A₁ ser altamente solúvel em lipídios (TÜMMLER & DUNWIDDIE, 2000).

Diante destas evidências, estudos futuros contribuirão para possíveis confirmações destas hipóteses que tentam explicar o envolvimento das ectonucleotidases, da adenosina e de seus receptores na modulação da memória em CP, CA e FR2 de ratos submetidos à tarefa de esquiwa inibitória em ratos.

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar que o sistema purinérgico está envolvido no processamento da memória para esquiwa inibitória em córtex cingulado anterior (CA), posterior (CP) e área pré-central medial (FR2) de ratos submetidos a esta tarefa. Esta conclusão está evidenciada nos resultados que demonstraram alterações nas ectonucleotidases sinaptossomais de CA e CP após o treino na esquiwa inibitória e na facilitação da memória promovida pela administração de DPCPX, antagonista de receptores A₁ em CP. Além disso, nossos resultados demonstraram que as ectonucleotidases podem participar de eventos relacionados ao estresse promovido pela tarefa já que elas apresentam-se alteradas em CA, CP e FR2 de ratos submetidos ao choque. Portanto, nossos resultados permitem que apresentemos as seguintes conclusões:

1. A tarefa de esquiwa inibitória foi capaz de promover alterações nas hidrólises de ATP e ADP em CP e CA, respectivamente, demonstrando que o sistema de remoção destes nucleotídeos, possivelmente está envolvido no processamento da memória nestas regiões.
2. O choque por si só foi capaz de alterar a hidrólise de ATP nas regiões do CA e do FR2 e a hidrólise de ADP em CP e FR2, demonstrando assim que as ectonucleotidases podem estar alteradas sob situações de estresse promovidas pelo choque.

3. O agonista de receptores A₁, CPA, não foi capaz de alterar as memórias de curta e de longa duração em CP nas concentrações testadas possivelmente pelo fato destes receptores estarem saturados pela adenosina endógena.
4. O antagonista de receptores A₁, DPCPX, facilitou a memória de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória quando na concentração de 50 nM. Este efeito facilitatório pode estar relacionado ao fato de a presença deste antagonista impedir que os efeitos inibitórios dos receptores A₁ se manifestem.

V. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos nesta dissertação de mestrado, pretendemos dar continuidade deste estudo, no doutorado, tendo como objetivos iniciais:

1. Avaliar se o efeito do DPCPX, antagonista de receptores A₁, na facilitação da memória em cingulado posterior de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória é via receptores NMDA. Para isto, pretendemos administrar intrafusões de AP5, antagonista competitivo de receptores NMDA,

- pré-treino. Assim poderemos avaliar se irá ocorrer ou não uma reversão do efeito facilitatório do DPCPX sobre a memória.
2. Investigar as possíveis fontes de adenosina além da proveniente da hidrólise de nucleotídeos pelas ectonucleotidasas. Para isso, administraremos inibidores de adenosina deaminase, responsável pela metabolização de adenosina e bloqueadores de transportadores de adenosina. Além disso pretendemos utilizar um inibidor de ecto-5' nucleotidase, outra enzima chave para a geração de adenosina a partir de AMP.
 3. Iniciar estudos com os receptores A_{2A} e A_3 , utilizando análogos destes receptores.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA & Cattabeni F (1995a). G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A_3 receptors in rat brain. *Molec. Pharmacol.* **48**: 1038-1045.
- Abbracchio MP, Ceruti S, Burnstock G & Cattabeni F (1995b). Purinoreceptors on glial cells of the central nervous system: Functional and pathological implications. In: *Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology*, Belardinelli L & Pelleg A (Eds.). Kluwer Academic Press, Norwell, pp. 271-280.
- Adell A, Casanovas JM & Artigas F (1997). Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacol.* **36**: 735-741.

- Agranoff BW, Cotman CW & Uhler MD. (1998). Learning and Memory. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 6th Ed., Siegel GJ, Agranoff BW, Alberts RW, Fischer SK, Uhler MD (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp 1027-1052.
- Akbar M, Okajima F, Tomura H, Shimegi S & Kondo Y (1994). A single species of A₁ receptor expressed in chinese hamster ovary cells not only inhibits cAMP accumulation but also stimulates phospholipase C and arachidonate release. *Mol. Pharmacol.* **45**: 1036-1042.
- Alonso M, Viola H, Izquierdo I & Medina JH. Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **in press**.
- Ambrósio AF, Malva JO, Carvalho AP & Carvalho AM (1997). Inhibition of N-, P/Q- and other types of Ca²⁺ channels in rat hippocampal nerve terminals by adenosine A₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **340**: 301-310.
- Arai A, Kessler M & Lynch G (1990). The effects of adenosine on the development of long-term potentiation. *Neurosci Lett.* **119**(1): 41-44.
- Arch JRS & Newsholme EA (1978). The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem.* **14**: 88-123.
- Asano T, Shinohara H, Morishita R, Norota I, Kato K & Endoh M (1995). The G-protein G₀ in mammalian cardiac muscle: localization and coupling to A₁ adenosine receptors. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**: 183-189.
- Au Lois NC, Niquet J, Ben-Ari Y & Represa A (1997). Cellular plasticity. In: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, Jr. Engel J, Pedley TA (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp. 387-396.
- Baddeley AD (1986). *Working memory*, Oxford: Clarendon Press.
- Bardenheuer H & Schrader J (1986). Supply-to-demand ratio for oxygen determinates formation of adenosine by the heart. *Am. J. Physiol.* **250**: H173-H180.
- Bear MF, Connors BW & Paradiso, MA (1995). *Neuroscience: Exploring the Brain*. Baltimore: Willians & Wilkins, pp. 386-390.
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schimitz P, Bianchin M, Izquierdo I & Medina JH (1997) Involvement of hippocampal D1/D5 receptor-cAMP signalling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7041-7046.

- Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinky D & Medina JH (1995). Learning-specific, time-dependent increase in ^3H -phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of rat brain. *Brain Res.* **685**: 163-168.
- Bernabeu R, Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I & Medina JH (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of an inhibitory avoidance learning. *NeuroReport* **7**: 585-588.
- Bliss TPV & Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term-potential in the hippocampus. *Nature (London)* **361**: 31-39.
- Bohus B (1994). Humoral modulation of learning and memory process: physiological significance of brain and peripheral mechanisms. In: *The memory Systems of the Brain*. Delacour J (Ed). Singapore: World Scientific, pp. 337-364.
- Bonan CD, Dias MM, Battastini AMO, Dias RD, Sarkis JJF (1998). Inhibitory avoidance learning inhibits ectonucleotidase activities in hippocampal synaptosomes of adult rats. *Neurochemical Research* **23**: 979-984.
- Bonan CD, Roesler R, Quevedo J, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF (2000). Learning-specific decrease of ATP diphosphohydrolase from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Research* **854**: 253-256.
- Bonan CD, Schetinger MRC, Battastini AMO, Sarkis JJF (2001). Ectonucleotidases and synaptic plasticity: implications in physiological and pathological conditions. *Drug Development Research* **52**: 57-65.
- Braun N, Brendel P & Zimmermann H (1995). Distribution of 5'-nucleotidase in the developing mouse retina. *Dev. Brain Res.* **88**: 79-86.
- Braunewell KH & Manahan-Vaughans (2001). Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.* **12**: 121-140.
- Broersen LM, Heinsbroek RPW, de Bruin JPC, Joosten RNJMA, van Hest A & Olivier B (1994). Effects of local application of dopaminergic drugs into the dorsal part of the medial prefrontal cortex of rats in a delayed matching to position task: Comparison with local cholinergic blockade. *Brain Res.* **645**: 113-122.

- Broersen LM, Heinsbroek RPW, de Bruin JPC, Uylings HBNM, van Hest A & Olivier B (1995). The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: Further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms. *Brain Res.* **674**: 221-229.
- Burnstock G (1996). A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* **347**: 1604-1605.
- Cahill L & McGaugh JL (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosci.* **21**: 294-299.
- Cammarota M, Bernabeu R, Izquierdo I & Medina JH (1996). Reversible changes in hippocampal [³H]AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **66**: 85-88.
- Cammarota M, Paratcha G, Levi de Stein M, Bernabeu R, Izquierdo I & Medina JH (1997). B50/GAP43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance learning. *Neurochem Res*, **22**: 499-505.
- Cascalheira JF & Sebastião AM (1998). Adenosine A₁ receptor activation inhibits basal accumulation of inositol phosphates in rat hippocampus. *Pharmacol. Toxicol.* **82**: 189-192.
- Caviness VS, Jr. (1975). Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *Journal of Comparative Neurology* **164**: 247-264.
- Caviness VS, Jr. & Frost DO (1981). Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *Journal of Comparative Neurobiology* **194**: 335-367.
- Correia-de-Sá, P & Ribeiro, JA (1994). Tonic adenosine A_{2A} receptor activation modulates nicotinic autoreceptor function at the rat neuromuscular junction. *Eur. J. Pharmacol.* **271**: 349-355.
- Costenla, AR, de Mendonça A, Ribeiro JÁ (1999). Adenosine modulates synaptic plasticity in hippocampal slices from aged rats. *Brain Res.* **851**: 228-234.
- Cotman CW (1998). Axonal sprouting. In: *Basic neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects*, 6th Ed.. Siegel, GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer SK, Uhler MD (Eds.). Lippincott-Raven Publishers, pp 589-612.
- Cunha RA (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. International* **38**: 107-125.

- Cunha RA, Constantino MD & Ribeiro JA (1999). G-protein coupling of CGS21680 binding sites in the rat hippocampus and cortex is different from that adenosine A₁ and striatal A_{2A} receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **359**: 295-302.
- Cunha RA, Correia-de-Sá P, Sebastião AM & Ribeiro JA (1996a) Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 253-260.
- Cunha RA, Johansson B, van der Ploeg I, Sebastião AM, Ribeiro JÁ & Fredholm BB (1994). Evidence for functionally important adenosine A_{2A} receptors in rat hippocampus. *Brain Res.* **649**: 208-216.
- Cunha RA & Ribeiro JA (2000). ATP as a presynaptic modulator. *Life Sciences* **68**: 119-137.
- Cunha RA, Sebastião AM & Ribeiro JÁ (1998). Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A₁ receptors. *J. Neurosci.* **18**: 1987-1995.
- Cunha RA, Vizi ES, Sebastião AM & Ribeiro JA (1996b). 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**: 2180-2187.
- Daisley JN & Rose SPR (1999). Adenosine-amino acid interactions in the chick brain: a role in passive avoidance learning. *Brain Res.* **847**: 149-156.
- Damásio AR (1996). *O Erro de Descartes: Emoção, Razão e o Cérebro Humano*. São Paulo: Companhia das Letras.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (1990). 2- Chloroadenosine decreases long-term potentiation in the hippocampal CA1 area of the rat. *Neurosci. Lett.* **118**: 107-111.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (1993) Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. *Brain Res.* **606**: 351-356.
- de Mendonça A & Ribeiro JÁ (1997). Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sci.* **60**: 241-245.
- de Mendonça A & Ribeiro JA (2000). Long-term potentiation observed upon blockade adenosine A₁ receptors in rat hippocampus in *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-dependent. *Neurosci. Lett.* **291**: 81-84.
- de Mendonça A & Ribeiro JÁ (2001). Adenosine and synaptic plasticity. *Drug Develop. Res.* **52**: 283-290.

- de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA (1995). Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A₁ receptor activation. *Neuroreport* **6**: 1097-1100.
- Dunwiddie TV & Hoffer BJ (1980). Adenine nucleotides and synaptic transmission in vitro rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* **69**: 59-68.
- Dunwiddie TV (1995). The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* **27**: 63-139.
- Dunwiddie TV, Diao L & Proctor WR (1997). Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**: 7673-7682.
- Dunwiddie TV & Fredholm BB (1989). Adenosine A₁ receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**: 31-37.
- Ehrlich YH & Kornecki E. (1999) Ecto-protein kinases as mediators for the action of secreted ATP in the brain. *Prog. Brain Res.* **120**: 411-426.
- Enrico P, Bouma M, de Vries JB & Westerink BH (1998). The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Res.* **779**: 205-213.
- Fiedler JL, Pollard HB & Rojas E (1992). Quantitative analysis of depolarisation-induced ATP release from mouse brain synaptosomes: external calcium dependent and independent process. *J. Memb. Biol.* **127**(1): 21-33.
- Freeman JH Jr., Cuppernell C, Flanery K & Gabriel M (1996). Context-specific multi-site cingulate cortical, limbic thalamic, and hippocampal neuronal activity during concurrent discriminative approach and avoidance training in rabbits. *J. Neurosci.* **16** (4): 1538-1549
- Fujii S, Kato H & Kuroda Y (1999). Extracellular adenosine 5'-triphosphate plus activation of glutamatergic receptors induces long-term potentiation in CA1 neurons of guinea pig hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **276**: 21-24.
- Gabriel M, Kubota Y & Shenker J (1988). Limbic circuit interactions during learning. In: *Information processing by the brain*. Markowitsh H (Ed.). Toronto: Hans Huber, pp. 445-57.

- Gold PE (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.* **46**: 87-98.
- Gold PE (1991). An integrate memory regulation system: From blood to brain. In: *Peripheral signalling of the brain*. Fredrickson RCA, McGaugh JL & Felten DL (Eds.). Toronto: Hogrefe & Huber, pp. 391-419.
- Gold PE (1995). Modulation of emotional and nonemotional memories: Same pharmacological systems, different neuroanatomical systems. In: *Brain and memory: Modulation and mediation of neural plasticity*. McGaugh JL, Weinberg N & Lynch G (Eds.). New York: Oxford University Press, pp. 41-74.
- Gold PE & McCarty RC (1995). Stress regulation of memory process. Role of peripheral catecholamines and glucose. In: *Neurobiological and clinical consequences of stress*. Friedman MJ, Charney DS, Deutch AY (Eds.). Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 151-162.
- Goldman-Rakic P (1996). Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 13473-13480.
- Greene RW & Haas HL (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **36**: 329-341.
- Grigoryan G, Hodges H, Mitchell S, Sinden JD & Gray JR (1996). 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens accentuate memory deficits in animals with lesions to the forebrain cholinergic projection system: Effects of nicotine administration on learning and memory of the water maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* **65**: 135-153.
- Groenewegen HJ (1988). Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neurosci.* **24**: 379-431.
- Hamilton SG & McMahon SB (2000). ATP as a peripheral mediator of pain. *J. Autonomic Nervous System* **187**: 187-194.
- Handa M & Guidotti G (1996). Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**: 916-923.
- Hedberg TG, Simpson GV & Stanton PK (1993). Microcircuitry of posterior cingulate cortex in vitro: Electrophysiology and laminar analysis using the current source density method. *Brain Res.* **632**: 239-248.
- Hedberg TG & Stanton PK (1995). Long-term potentiation and depression of synaptic transmission in rat posterior cingulate cortex. *Brain Research* **670**: 181-196.

- Heine P, Braun N & Zimmermann H (1999). Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur. J. Biochem.* **262**: 102-107.
- Heinsbroek RP, Van Haaren F, Feenstra MG, VanGalen H, Boer G & Van de Poll NE (1990). Sex differences in the effects of inescapable footshock on central catecholaminergic and serotonergic activity. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **37**: 539-550.
- Hicks RR & Huerta MF (1991). Differential thalamic connectivity of rostral and caudal parts of cortical areas Fr2 in rats. *Brain Res.* **568**: 325-329.
- Holton P (1969). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation sensory nerves. *J. Physiol. (London)* **145**: 494-504.
- Horikawa K, Kinjo N, Stanley LC & Powell (1988). Topographic organization and collateralisation of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in rat. *Neurosci. Res.* **6**: 31-44.
- Hyman BT, van Hoesen GW & Damasio AR (1990). Memory-related neural system in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* **40**: 1721-1730.
- Inoue K & Koizume S (2001). Mechanism of the inhibitory action of ATP in rat hippocampus. *Drug Develop. Res.* **52**: 95-103.
- Inoue K (1998). ATP receptors for the protection of hippocampal functions. *Jpn. J. Pharmacol.* **78**: 405-410.
- Ishizuka Y, Ishida Y, Jin Q, Kato K, Kunitake T, Mitsuyama Y & Kannan H (2000). Differential profiles of nitric oxide and norepinephrine releases in the paraventricular nucleus region in response to mild footshock in rats. *Brain Res.* **862**: 17-25.
- Ito I, Hidaka H & Sugiyama, H (1991). Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **121**: 119-121.
- Izquierdo I (1989). Different forms of post-training memory processing. *Beh. Neural Biol.* **51**: 171-202.
- Izquierdo I (1992). The Neurobiology of Memory Consolidation. *Neurosci.* **18**: 1-11.
- Izquierdo I (1994) Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *J. FASEB* **8**: 1139-1145.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA & Medina JH (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* **18**; 393(6686): 635-636.

- Izquierdo I & McGaugh JL (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Beh. Pharmacol.* **11**: 517-534.
- Izquierdo I & Medina JH (1995a). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and pharmacology of memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**: 19-32.
- Izquierdo I & Medina JH (1995b). Long-term potentiation and neuromodulator- and hormone-dependent process play a role in declarative memory. In: *Brain processes and memory*. McGaugh JL & Ishikawa K (Eds.). Amsterdam: Elsevier, North-Holland, pp. 25-38.
- Izquierdo I & Medina JH (1997a). Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* **68**: 285-316.
- Izquierdo I & Medina JH (1997b). The biochemistry of memory and its regulation by modulatory processes. *Psychobiology* **25**: 1-9.
- Jacobson KA, Nikodijevic O, Shi D, Gallo-Rodriguez C, Olah ME, Stiles GL & Daly JW (1993). A role for central A₃-adenosine receptors: mediation of behavioural depressant effects. *FEBS Lett.* **336**: 57-60.
- Jedema HP & Moghddam B (1994). Glutamatergic control of dopamine release during stress in the rat prefrontal cortex. *J. Neurochem.* **63**: 785-788.
- Jeffery KJ (1997). LTP and spatial learning – where to next? *Hippocampus* **7**: 95-110.
- Jockers R, Linder ME, Hohenegger M, Nanoff C, Bertin B, Strosberg AD, Marullo S & Freissmuth M (1994). Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A₁-adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**: 32077-32084.
- Johansson B, Georgiev V, Parkinson FE & Fredholm BB (1993). The binding of the adenosine A₂ selective agonist [³H]CGS21680 to rat cortex differs from its binding to rat striatum. *Eu. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* **247**: 103-110.
- Jonides J, Smith EE, Koeppe RA, Awh E, Minoshima S & Mintun MA (1993). Spatial working memory in humans as revealed by PET. *Nature* **363**: 623-625.
- Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH & Robson SC (1996). Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**: 33116-33122.

- Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR & Zimmermann H (1997). An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* **36**: 1189-1200.
- Kemp N & Bashir ZI (1997). A role for adenosine in the regulation of long-term depression in the adult rat hippocampus in vitro. *Neurosci. Lett.* **225**: 189-192.
- Kirk IP & Richardson PJ (1995). Inhibition of striatal GABA release by the adenosine A_{2A} receptors is not mediate by increases in cyclic AMP. *J. Neurochem.* **64**: 2801-2809.
- Kirley TL (1997). Complementary DNA cloning and sequence of the chicken muscle ecto-ATPase – homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* **272**: 1076-1081.
- Koyama T, Tanaka YZ & Mikami A (1998). Nociceptive neurons in the macaque anterior cingulate activate during anticipation of pain. *Neuroreport* **9**: 2663-2667.
- Kubota Y & Gabriel M (1995). Studies of the limbic comparator: Limbic circuit training-induced unit activity and avoidance behaviour in rabbits with anterior dorsal thalamic lesions. *Behav. Neurosc.* **109**: 258-277.
- Lee KS, Schubert P, Emmert H & Kreutzberg GW (1981). Effect of adenosine versus adenine nucleotides on evoked potentials in a rat hippocampal slice preparation. *Neurosci. Lett.* **23**(3): 309-314.
- Leung LW & Borst JGG (1987). Electrical activity of the cingulate cortex. I. Generating mechanisms and relation to behaviour. *Brain Res.* **407**: 68-80.
- Lewis-Carl S & Kirley TL (1997). Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. Purification and N-terminal sequence of the stomach ecto-apyrase. *J Biol Chem.* **272**: 23645-23652.
- Linden DJ (1994). Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* **12**: 457-472.
- Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA (1999). Interaction between adenosine A₁ and A_{2A} receptors in the control of neurotransmitter release. In: *Recent Research Developments in Neurochemistry*, vol.2, part II, Pandalai SJ (Ed.). Trivandrum: Research Signpost, pp. 463-472.
- Maddock RJ (1999). The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends in Neurosci.* **22**: 310-316.
- Malenka RC & Nicoll RA (1999). Long-term potentiation – a decade of progress? *Science* **285**: 1870-1874.

- Maren S & Baudry M (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationship to learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**: 1-18.
- Mark GP, Rada PV & Shors TJ (1996). Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neurosci.* **74**: 767-774.
- Martin JH (1996). *Neuroanatomy: Text and Atlas* (2^o ed., p.475) Stamford: Appleton & Lange.
- Mateo J, Harden TK & Boyer JL (1999). Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br. J. Pharmacol.* **128**: 396-402.
- McGaugh JL (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience* **12**: 255-287.
- McGaugh JL (1996). Time-dependent process in memory storage. *Science* **153**: 1351-1358.
- McGaugh JL (2000). Memory – a Century of Consolidation. *Science* **287**: 248-251.
- McGaugh JL, Cahill L, Parent MB, Mesches MH, Coleman-Mesches K & Salina JA (1995). Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In: *Plasticity in the central nervous system: Learning and Memory*. McGaugh JL, Bermúdez-Rattoni F & Prado-Alcalá RA (Eds.). Mahwah, NJ: Erlbaum, pp. 17-39.
- Mellwain H (1979). Adenosine and its mononucleotides as regulatory and adaptative signals in the brain. In: *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*. Baer HP, Drummond GI (Eds.). Raven press, New York, pp. 361-376.
- Meghji P, Tuttle JB & Rubio R (1989). Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture. *J. Neurochem.* **53**: 1852-1860.
- Mello e Souza T, Roesler R, Madruga M, de-Paris F, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Medina JH & Izquierdo I (1999). *Neurobiol. of Learn. and Memory* **72**: 118-127.
- Mello e Souza T, Vianna MRC, Rodrigues C, Quevedo J, Moleta BA & Izquierdo I (2000). *Pharmacol. Biochem. Behav.* **66**: 615-622.
- Mendonza-Fernandez V, Andrew RD & Barajas-Lopez C (2000). ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P_{2Y} receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **293** (1): 172-179.

- Meyerhof W, Müller-Brechlin R & Richter D (1991). Molecular cloning of a novel putative G-protein coupled receptor expressed during rat spermiogenesis. *FEBS Lett.* **284**: 155-160.
- Nanoff C, Mitteraeur T, Roka F, Hohenegger M, Freissmuth M (1995). Species differences in A₁ adenosine receptor/G protein coupling: identification of a membrane protein that stabilizes the association of the receptor/G protein complex. *Mol. Pharmacol.* **48**: 806-817.
- Newby AC (1984). Adenosine and concept of retaliatory metabolites. *Trends Biochem. Sci.* **9**: 42-44.
- Nishimura S, Mohri M, Okada Y & Mori M (1990). Excitatory and Inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. *Brain Res.* **525**: 165-169.
- Normile HJ & Barraco RA (1991). N⁶-cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A₁ receptors. *Brain Res. Bull.* **27**(1): 101-104.
- Nordström CH, Rehncrona S, Siesjö BK & Westerberg E (1977). Adenosine in rat cerebral cortex: its determination, normal values, and correlation to AMP and cyclic AMP during shortlasting ischemia. *Acta Physiol. Scand.* **101**: 63-71.
- Norenberg W, Wirknerk K, Assmann H, Richter M & Illes P (1998). Adenosine A_{2A} receptors inhibit the conductance of NMDA receptor channels in rat neostriatal neurons. *Amino Acids* **14**: 33-39.
- Ohno M & Watanabe S (1996). Working memory failure by stimulation of hippocampal adenosine A₁ receptors in rats. *Neuroreport* **7**: 3013-3016.
- Olah ME (1997). Identification of A_{2A} adenosine receptor domains involved in selective coupling to G_s. *J. Biol. Chem.* **272**: 337-344.
- Phillis JW & Wu PH (1981). The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* **16**: 187-239.
- Pitsikas N & Borsini F (1997). The adenosine A₁ receptor antagonist BIIP 20 counteracts scopolamine-induced behavioural deficits in the passive avoidance task in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **328**: 19-22.
- Pontecorvo MJ, Clissold DB, White MF & Ferkany JW (1991). N-methyl-D-aspartate antagonists and working memory performance: comparison with the effects of scopolamine, propranolol, diazepam, and phenylisopropyladenosine. *Behav. Neurosci.* **105**: 521-535.
- Proctor WR & Dunwiddir TV (1987). Pre- and post-synaptic actions of adenosine in the in vitro hippocampus. *Brain Res.* **426**: 187-190.

- Quillfeldt JA (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.
- Ralevic V & Burnstock B (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rew.* **50**: 413-492.
- Richardson PJ & Brown SJ (1987). ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals. *J. Neurochem.* **48** (2): 622-630.
- Riedel G (1996). Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurol. Sci.* **19**: 219-224.
- Riekkinen P Jr, Kuitunen J & Riekkinen M (1995). Effect of scopolamine infusions into anterior and posterior cingulate on passive avoidance and water maze navigation. *Brain Res.* **685**: 46-54.
- Sah P & Nicoll RA (1991). Mechanisms underlying potentiation of synaptic transmission in rat anterior cingulate cortex in vivo. *J. Physiol.* **433**: 615-630.
- Salmon E, van der Linden M, Collete F, Delfiore G, Maquete P, Delguedre C, Luxen A & Frank G (1996) Regional brain activity during working memory tasks. *Brain* **119**: 1617-1625.
- Salvatore CA, Jacobson KA, Taylor HE, Linden J & Johnson RG (1993). Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences USA* **90**: 10365-10369.
- Santos PF, Caramelo OL, Carvalho AP & Duarte CB (1998). Modulation of [³H]acetylcholine release from cultures amacrine-like neurons by adenosine A₁ receptors. *J. Neurochem.* **71**: 1086-1094.
- Schoen SW & Kreutzberg GW (1994). Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult dentate gyrus. *Uxp. Neurol.* **127**: 106-118.
- Seamans JK, Floresço SB & Philips AG (1995). Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav. Neurosci.* **109**: 1063-1076.
- Sebastião AM & Ribeiro JA (1996). A₂ receptor mediated excitatory actions of adenosine in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **48**: 167-189.
- Sebastião AM & Ribeiro JA (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TiPS* **21**: 341-345.
- Shadmehr R & Holcomb HH (1997). Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* **277**: 821-825.

- Shibata H (1993). Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to cingulate cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **330**: 533-542.
- Smith EE & Jonides J (1995). Working memory in humans: Neuropsychological evidence. In: *The Cognitive Neuroscience*. Gazzaniga MS (Ed.). Cambridge MA: MIT Press, pp. 1009-1020.
- Smith TM & Kirley TL (1998). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPase and CD39 ecto-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**: 65-78.
- Souza MM, Mello e Souza T, Vinadé ER, Rodrigues C, Choi HK, Dedavid e Silva TL, Medina JH & Izquierdo I (2001). Effects of Post-training Treatments in the Posterior Cingulate Cortex on Short- and Long-Term Memory for Inhibitory Avoidance in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, **in press**.
- Stone TW & Cusack NJ (1989). Absence of P₂-purinoreceptors in hippocampal pathways. *Br. J. Pharmacol.* **97**: 631-635.
- Sutherland RJ & Hoising JM (1993) Posterior cingulate cortex and spatial memory: A microlimnology analysis. In: *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: A comprehensive treatise*. Vogt BA & Gabriel M (Eds.), Boston: Birkhauser.
- Suzuki F, Shimada J, Shiozaki S, Ichikawa S, Ischii A, Nakamura J, Nonaka H, Kobayashi H & Fuse E (1993). Adenosine-A₁ antagonists III. Structure-activity relationships on amelioration against scopolamine or N⁶-(R)-phenylisopropyladenosine-induced cognitive disturbance. *J. Med. Chem.* **36**: 2508-2518.
- Svenningsson P & Fredholm BB (1997). Glucocorticoids regulate the expression of adenosine A₁ but not A_{2A} receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**: 1094-1101.
- Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB (1997). Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* **27**: 322-335.
- Thompson SM, Hass HL & Gahwiler BH (1992). Comparison of the actions of adenosine at pre- and post-synaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol* **451**: 347-363.
- Thümmler S & Dunwiddie T (2000). Adenosine receptor antagonists induce persistent bursting in the rat hippocampal CA3 region via an NMDA receptor-dependent mechanism. *J Neurophysiol.* **83**: 1787-1795.
- Uylings HBM & van Eden CG (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex

- in rat and in primates, including humans. In: *The prefrontal cortex: Its structure, function and pathology*. Uylings HBW, van Eden CG, de Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP (Eds.). Amsterdam: Elsevier, pp. 31-62.
- Van Eden CG, Lammed VAF & Uylings HBM (1992). Heterotopic cortical afferents to the medial prefrontal cortex in the rat: A combined retrograde and anterograde tracer study. *Eur. J. Neurosci.* **4**: 77-97.
- Vogt BA, Rosene DL & Peters A (1991). Synaptic termination of thalamic and callosal afferents in cingulate cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **201**: 265-283.
- Von Lubitz DKJE, Paul IA, Bartus RT & Jacobson KA (1993). Effects of chronic administration of adenosine A₁ receptor agonist and antagonist on spacial learning and memory. *Eur.J.Pharmacol.* **249**: 271-280.
- Wang TF & Guidotti G (1996). CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-apyrase. *J. Biol. Chem.* **271**: 9898-9901.
- Watanabe M, Kodama T & Hikosaka, K (1997). Increase of extracellular dopamine in primate prefrontal cortex during a working memory task. *J. Neurophysiol.* **78**: 2795-2798.
- Weber RG, Jones CR, Lohse MJ & Palacios JM (1990). Autoradiographic visualization of A₁ adenosine receptors in rat brain with [³H]8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. *J. Neurochem.* **54**: 1344-1353.
- Wieraszko A & Ehrlich YH (1994). On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Neurochem.* **63**: 356-359.
- Wieraszko A & Seyfried TN (1989). ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain Res.* **491**: 356-359.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH & Lohman A (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol.* **33**: 161-253.
- Wolfman C, Da Cunha C, Jerusalinsky D & Levi de Stein M (1991). Habituation and inhibitory avoidance training alter brain regional levels of benzodiazepine-like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjection. *Brain Res.* **548**: 74-80.
- Wu LG & Saggau P (1994). Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. *J. Neurosci.* **14**(9): 5613-5622.
- Yawo H & Chuhma N (1993). Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca²⁺ channels by adenosine autoreceptors. *Nature* **365** (6443): 256-258.

- Zarrindast MR & Shafaghi B (1994). Effects of adenosine agonists and antagonists on acquisition of passive avoidance learning. *Eur. J. Pharmacol.* **256**: 233-239.
- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL & Civelli O (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **89**: 7432-7436.
- Zilles K & Wree A (1995). Cortex: Areal and laminar structure. In: *The rat nervous system*. Paxinos G (Ed.). San Diego: Academic press.
- Zimmerman H (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **49**: 589-618.
- Zimmermann H (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Develop. Res.* **52**: 44-56.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel & Heine P (1998). New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* **32**: 421-425.
- Zornetzer SF (1978). Neurotransmitter modulation and memory: A new pharmacological phenology? In: *Psychopharmacology: A generation of progress*. Lipton MA, DiMascio A & Killam KF (Eds.). New York: Raven, pp. 637-649.

V. ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS OU EM PREPARAÇÃO NO PERÍODO VIGENTE DO MESTRADO.

1. Pereira GS, Walz R, Bonan CD, Battastini AMO, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR Sarkis JFF (2001). Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neuroscience letters* **23, 301 (1)** 72-74.
2. Pereira GS, Bonan CD, Souza MM, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JFF. Chronic and acute effects of ethanol on ectonucleotidases and cAMP-dependent protein kinase activities from rat brain. *Em preparação*.

2. Bonan CD, Roesler R, Pereira GS, Battastini AMO, Izquierdo I & Sarkis JJF (2000). Learning-specific decrease in synaptosomal ATP diphosphohydrolase activity from hippocampus and entorhinal cortex of adult rats. *Brain Res.* Jan 31; **854**(1-2):253-6.4.
3. Bonan CD, Walz R, Pereira GS, Worm PV, Battastini AMO, Cavalheiro EA, Izquierdo I, Sarkis JJF (2000). Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* May; **39**(3):229-38.
4. Rossato ER, da Silva LB, Pereira GS, Bonan CD, Battastini AMO, Ribeiro JP, Sarkis JJF (2001). ATP-diphosphohydrolase in human platelets from patients with coronary arteries hearts disease. Submetido ao Thrombosis Research.

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS NO PERÍODO VIGENTE DO MESTRADO.

1. Bonan CD, Pereira GS, Mello e Souza T., Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF. Learning-specific increase in synaptosomal ATP hydrolisis from rat posterior cingulate cortex. *XVI Congresso Latinoamericano de Farmacologia – Águas de Lindóia/SP, 2000.*
2. Pereira GS, Bonan CD, Souza MM, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF. Chronic and acute effects of ethanol on ectonucleotidases and cAMP-dependent protein kinase activities from rat brain. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – Caxambu/MG, 2000.*
3. Bonan CD, Pereira GS, Walz R, Battastini AMO, Izquierdo I, Sarkis JJF, Martins VR, Brentani RR (2001). Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *18th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and 32nd Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry - Buenos Aires, Argentina.*

