

Gilliard Lach

**ENVOLVIMENTO DO NEUROPEPTÍDEO Y NA RESILIÊNCIA  
AO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Farmacologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thereza Christina Monteiro de Lima

Florianópolis/SC  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lach, Gilliard

Envolvimento do neuropeptídeo Y na resiliência ao medo  
condicionado contextual em ratos / Gilliard Lach ;  
orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima -  
Florianópolis, SC, 2013.  
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Neuropeptídeo Y. 4.  
Memória aversiva. 5. Medo. I. de Lima, Thereza Christina  
Monteiro. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

**Folha de aprovação**



*Aos meus **Pais**,*

*Por transformarem o amor incondicional na alegria que sinto  
neste momento.*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, amigo de “casa” e que sei que poderei contar sempre que eu precisar.

Aos meus avôs, a quem devo parte de minha educação.

A Professora Thereza pela oportunidade e confiança, pelo estímulo ao livre pensar e, principalmente, por todo conhecimento passado (científico e além) ao longo desses anos. Muito mais que uma orientadora, uma mãe, uma terapeuta sempre disposta a nos ouvir.

Aos membros da banca Marcus Brandão, Raquel Fornari, Rogério Tonussi, José Eduardo e Rimenez Souza por suas valiosas contribuições, essenciais para a finalização desta tese.

Aos demais professores do Departamento de Farmacologia, sempre abertos a discussão e muito solícitos a ajudar em todos os momentos que eu tenha precisado.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia sempre muito prestativos e dispostos a facilitar o nosso dia a dia.

Aos colegas de laboratório de hoje e ontem, Alanny, Alexandre, Ana Paula, Claudini, Evelyn, Filipe, Júlia, Lígia, Marcelo, Rebeca, Renata, pela disponibilidade em sempre ajudar e pelos momentos de descontração.

Ao colega de doutorado e grande amigo Rafael pelos vários momentos em que se dispôs a ouvir meus anseios, minhas angustias e minhas alegrias.

Aos integrantes da “família Juriti 301”, Rafael, Rimenez, Murilo, Henrique, Gustavo e Marília, que desafiaram a genética para fazerem parte da minha família em Floripa. Como diria o Rafael, “irmãos que a vida me permitiu escolher” e que tornaram minha vida em Floripa muito mais estimulante.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro imprescindível para que eu pudesse desenvolver este trabalho.





Parece-me que foi agora  
Que deitei na noite anterior  
E cá estou deitado novamente.

Parece-me que um Eu nem levantou  
Apenas esperou os outros Eus  
Que voltassem a “ele” lentamente.

Parece-me o mesmo da noite anterior  
Mas só Eu sei que o Eu de hoje  
Já é um Eu completamente diferente

Rafael MarIano



## RESUMO

O neuropeptídeo Y (NPY) é o peptídeo mais abundante no sistema nervoso central (SNC), sendo encontrado em regiões envolvidas com a regulação do estresse, memória, ansiedade e medo, como o hipocampo (HPC), amígdala e córtex pré-frontal. Embora alguns trabalhos suportem o envolvimento do NPY na mediação do comportamento emocional tanto em roedores como em humanos, ainda existe uma carência de dados mostrando o papel do NPY na resiliência ao estresse. Para isso, nosso estudo buscou verificar o envolvimento do NPY exógeno e endógeno, além de investigar a participação do receptor Y1 no teste do condicionamento aversivo contextual (CAC). Primeiramente, baseado no amplo espectro de atividades fisiológicas desempenhadas pelo sistema NPY, buscou-se observar os efeitos de baixas doses de NPY e do agonista Y1 Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup>-NPY (LP-NPY) e assim minimizar a incidência de efeitos adversos ao tratamento do medo condicionado, como prejuízos cognitivos, sedação e alterações da emocionalidade. Então, verificamos que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de NPY (3 pmol) e de LP-NPY (1 pmol) inibiram a aquisição e a consolidação (imediate e tardia) da memória de medo avaliada no teste do CAC. Por sua vez, somente o NPY facilitou a extinção, além de prejudicar a reconsolidação do medo condicionado. O pré-tratamento com o antagonista Y1, BIBO3304 (BIBO) bloqueou os efeitos do NPY, indicando a importante participação do receptor Y1, embora se sugira que a extinção do medo tenha também o envolvimento do receptor Y2. Para investigar a influência do NPY endógeno, submetemos os ratos ao ambiente enriquecido (AE) por 14 dias e após, verificamos o comportamento destes ratos na extinção do CAC, além de verificar a expressão do receptor Y1 nos ratos “enriquecidos” no HPC, estrutura do SNC amplamente envolvida no condicionamento contextual. Como esperado, o AE facilitou a extinção do medo no teste do CAC, confirmando a participação do NPY. O envolvimento do NPY e do receptor Y1 foi confirmado com a detecção de níveis elevados da proteína do receptor Y1 no HPC em ratos enriquecidos. Interessantemente, esta elevação ocorreu somente nos ratos “enriquecidos” que foram submetidos ao CAC, sugerindo que o AE favorece a resiliência ao aumentar a reatividade do receptor Y1, deixando este preparado para modular as respostas fisiológicas/comportamentais quando da ocorrência de situações traumáticas. Também procuramos verificar se a extinção do medo no teste do CAC era facilitada pelo bloqueio do auto-receptor Y2 com

BIIE0246 (BIIE), já que este receptor regula a liberação de NPY. Nossos resultados mostraram que o tratamento com BIIE inibiu completamente a expressão do medo no teste do CAC, fazendo com que o comportamento dos ratos tratados comparáveis a ratos que não foram condicionados. Todavia, este efeito observado com o tratamento com BIIE permanece mesmo após a interrupção do tratamento, sugerindo que este efeito não é estado-dependente de uma atividade ansiolítica. Em adição, a participação de NPY endógeno é confirmada ao bloquear o receptor Y1 com BIBO, que reverteu os efeitos observados com o tratamento com o BIIE. De fato, mesmo quando não mais presente no organismo, o NPY continua a exercer seus efeitos, provavelmente através de mecanismo de neuroproteção, como observado em nosso experimento onde o NPY foi administrado 7 dias antes do teste do CAC, onde o NPY mas não o LP-NPY facilitou a extinção do medo. Com base no exposto acima, nossos dados mostram um efeito robusto do NPY inibindo o medo no teste do CAC, resposta essa que é mediada em parte pelo receptor Y1. Estes efeitos podem estar relacionados com o aumento da resiliência do SNC às situações traumáticas, sendo então uma abordagem de potencial terapêutico importante para o TEPT.

**Palavras-chave:** neuropeptídeo Y, condicionamento aversivo contextual, extinção, congelamento, medo condicionado, transtorno de estresse pós-traumático, ambiente enriquecido.

## ABSTRACT

Neuropeptide Y (NPY) is the most abundant peptide in the central nervous system (CNS) and it is found in brain structures related with stress regulation, memory, anxiety and fear, such as the hippocampus (HPC), amygdala and prefrontal cortex. Although some studies support the involvement of NPY in the regulation of emotional behavior both in rodents and in human beings, there is still a lack of data showing the role of NPY on stress resilience. Our aim was to verify the role of exogenous and endogenous NPY, and to investigate the involvement of the Y1 receptor using the contextual fear conditioning (CFC). First, based on the large body of evidence about physiological activities regulated by the NPY system, we aimed to observe the effects of low doses of NPY and the Y1 agonist Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup>-NPY (LP-NPY) and, thus, to minimize the incidence of side-effects of the treatments on conditioned fear such as cognitive impairment, sedation and emotional changes. We found that intracerebroventricular injection (icv) of NPY (3 pmol) and LP-NPY (1 pmol) inhibited the acquisition and consolidation (early and late phase) of fear memory assessed in CFC. On the other hand, only NPY facilitates extinction, and damaged reconsolidation of conditioned fear. Pretreatment with Y1 antagonist BIBO3304 (BIBO) blocked the effects of NPY, indicating an important role of the Y1 receptor, although at least in extinction, the involvement of Y2 receptor has been suggested. In order to investigate the role of endogenous NPY on fear extinction, we subjected rats to an enriched environment (EE) during 14 days. As expected, EE facilitates fear extinction in CFC test, confirming the participation of NPY. The involvement of NPY and Y1 receptor was also confirmed by the detection of increased levels of Y1 receptor protein in the HPC of “enriched” rats. HPC is heavily involved in contextual conditioning. Interestingly, this increase occurred only in “enriched” rats already submitted to the CFC, suggesting that the EE promotes resilience by increasing Y1 receptor reactivity, allowing the modulation of the physiological/behavioral tasks under demand, when a traumatic situation has emerged. We also determine whether the fear extinction could be facilitated by the Y2 antagonist BIIE0246 (BIIE), since this receptor can regulate NPY release. Our results show that treatment with BIIE completely inhibited the expression of fear in the CFC test, causing a freezing similar to that observed in unconditioned rats. However, this effect was observed with treatment with BIIE and remained even after drug-free session, suggesting that this action is not a state-dependent activity, caused by an anxiolytic-like effect. In addition,

the presence of endogenous NPY is confirmed by BIBO which blocked the absence of fear expression. In fact, even when no longer present in the body, NPY continues to exert its effects, probably through a neuroprotective mechanism, as observed in the experiment when NPY was administered 7 days before conditioning and NPY but not LP-NPY facilitated fear extinction. Altogether, our data show a strong effect of NPY in inhibiting fear memories, a response that is mediated in part by Y1 receptor. These effects might be related to an increased resilience to trauma in CNS, suggesting a potential therapeutic action of NPY and Y1 receptor agonists for PTSD.

**Keywords:** Neuropeptide Y, contextual fear conditioning, extinction, freezing, conditioned fear disorder, post-traumatic stress disorder, enriched environment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese e processamento do NPY.....	30
Figura 2 – Cascata de sinalização intracelular típica para os receptores do sistema NPY.....	32
Figura 3 – Mecanismos envolvendo o auto-receptor Y2 mediando a inibição da liberação de NPY .....	33
Figura 4 – Fases da formação da memória.....	41
Figura 5 – Gaiola do ambiente enriquecido .....	46
Figura 6 – Corte coronal do cérebro de rato.....	48
Figura 7 – Modelos representativos do teste do LCE (A) e CA (B) ..	50
Figura 8 – Modelo representativo do aparato utilizado no teste do condicionamento aversivo contextual .....	52
Figura 9 – Efeito da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY e LP-NPY na consolidação de ratos avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual .....	63
Figura 10 – Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do Campo Aberto ...	65
Figura 11 – Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado .....	66
Figura 12 – Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na habituação de ratos avaliados no teste do Campo aberto .....	68
Figura 13 – Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na aquisição do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual .....	69
Figura 14 – Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na consolidação do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual .....	71
Figura 15 - Efeitos da administração i.c.v. do antagonista BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual .....	73

Figura 16 – Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y2 BIIE na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.....	75
Figura 17 – Efeitos da administração i.c.v. de BIBO e BIIE na extinção do medo avaliada em ratos no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.....	77
Figura 18 – Efeitos do Ambiente Enriquecido na extinção do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual.....	78
Figura 19 - Efeitos do Ambiente Enriquecido na expressão do receptor Y1 de ratos expostos ao teste do Condicionamento Aversivo Contextual.....	80
Figura 20 – Efeito da administração do antagonista Y1 BIBO sobre a facilitação da extinção do medo no teste do Condicionamento Aversivo Contextual induzido pelo ambiente enriquecido.....	82
Figura 21 – Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na consolidação tardia do condicionamento do medo de ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual.....	83
Figura 22 – Efeitos de longo prazo da administração do NPY e LP-NPY na evocação do medo em ratos avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual.....	85
Figura 23 - Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY na reconsolidação do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual.....	86



## LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Efeitos do sistema NPY no medo condicionado ..... **Erro!**  
**Indicador não definido.**



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Ambiente Enriquecido
AMY	Amígdala
ANOVA	Análise de variância
AP	Anteroposterior
ASR	Reflexo do sobressalto acústico
BIBO	BIBO3304
BIIE	BIIE0246
BLA	Amígdala basolateral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Campo aberto
CAC	Condicionamento aversivo contextual
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DV	Dorsoventral
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
EPM	Erro padrão da média
FPS	Sobressalto potencializado pelo medo
HPC	Hipocampo
ICV	Intracerebroventricular
KO	Nocaute
LCE	Labirinto em cruz elevado
LTP	Potencialização de longo prazo
LV	Ventrículo lateral
MDZ	Midazolam
ML	Médiolateral
mRNA	RNA mensageiro
NPY	Neuropeptídeo Y
PBS	Tampão fosfato salina
PP	Polipeptídeo pancreático
PYY	Peptídeo YY
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
SC	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
VGF	Fator de crescimento vascular



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.2 Desligando o botão de alarme: o Neuropeptídeo Y .....	29
1.3 NPY, a “bola da vez” no medo condicionado .....	35
1.4 NPY, o marcador biológico do TEPT?.....	37
1.5 Instaurando o medo em animais: o condicionamento Pavloviano do medo.....	39
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivos específicos:.....	43
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Animais .....	45
3.2 Drogas .....	45
3.3 Ambiente enriquecido.....	46
3.4 Cirurgia estereotáxica.....	46
3.6 Procedimentos comportamentais .....	48
3.6.1 Labirinto em cruz elevado .....	48
3.6.2 Campo Aberto .....	49
3.6.3 Condicionamento aversivo contextual .....	50
3.7 Procedimentos bioquímicos.....	52
3.7.1 Coleta de tecidos .....	52
3.7.2 Preparação do extrato celular total .....	52
3.7.3 Determinação da concentração de proteínas .....	53
3.8 Procedimentos experimentais .....	54
3.9 Análise gráfica e estatística .....	60
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
4.1 Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY na consolidação de ratos avaliados no teste do CAC. ....	62
4.2 Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do CA.....	64
4.3 Experimento 3: Efeitos da administração i.c.v de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do LCE .....	66
4.5 Experimento 5: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na aquisição do medo em ratos avaliados no teste do CAC .....	68

4.6	Experimento 6: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na consolidação do medo em ratos avaliados no teste do CAC .....	70
4.7	Experimento 7: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na extinção do medo em ratos avaliados no teste do CAC .....	72
4.8	Experimento 8: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y2 BIII na extinção do medo em ratos avaliados no teste do CAC.	74
4.9	Experimento 9: Efeitos da administração i.c.v. de BIBO e BIII na extinção do medo avaliada em ratos no teste do CAC .....	76
4.10	Experimento 10: Efeitos do AE na extinção do medo em ratos avaliados no CAC .....	77
4.11	Experimento 11: Efeitos do Ambiente Enriquecido na expressão do receptor Y1 de ratos expostos ao teste do Condicionamento Aversivo Contextual.....	79
4.12	Experimento 12: Efeito da administração do antagonista Y1 BIBO sobre a facilitação da extinção do medo no teste do CAC induzido pelo AE .....	81
4.13	Experimento 13: Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na consolidação tardia do medo de ratos avaliados no CAC.....	83
4.14	Experimento 14: Efeitos de longo prazo da administração do NPY e LP-NPY na evocação do medo em ratos avaliados no teste do CAC.....	84
4.15	Experimento 15: Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY na reconsolidação do medo em ratos avaliados no CAC ...	85
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>







## 1 INTRODUÇÃO

“O soldado que sofre ferimentos em batalha, a mãe que se preocupa com o filho soldado, o jogador que assiste às corridas (ganhando ou perdendo), o cavalo e o jóquei em que apostou: todos estão sob estresse.” Conforme a afirmação de Hans Selye (1978) em *The Stress of Life*, todos, e a qualquer momento, são suscetíveis aos efeitos do estresse. Afinal, sem os mecanismos desencadeados numa situação estressante, possivelmente não estaríamos aqui hoje. No entanto, não somos “zebras”, em alusão ao *expert* em estresse Robert Sapolsky (1998) em seu livro *Why Zebras Don't Get Ulcers*, e sim, estamos sujeitos a desenvolver úlceras.

De fato, o aprendizado emocional adquirido em uma situação aversiva é extremamente necessário para que o indivíduo possa sobreviver, sendo que a maioria dos indivíduos lida com estas situações naturalmente. Esta habilidade de manter-se com as funções fisiológicas e psicológicas normais, mesmo após uma grande carga de estresse é chamada de resiliência (para uma análise mais detalhada, ver Yehuda, Flory *et al.*, 2006; Russo, Murrough *et al.*, 2012). A resiliência é um termo que foi emprestado da engenharia por Garmezy e Streitman (1974), enquanto procuravam por sinais que poderiam antecipar o diagnóstico da esquizofrenia. Garmezy e Streitman acreditavam que a definição de resiliência, “a habilidade de um metal absorver energia quando este é deformado elasticamente, e, ao retornar ao estágio inicial, não apresentar qualquer distorção permanente (Campbell, 2008)” era aplicável a capacidade humana em lidar com as situações adversas do dia a dia sem sofrer um dano psicopatológico relevante. Biologicamente, para entender este termo, é preciso ter em mente que a resiliência é um processo ativo e adaptativo, e não meramente uma ausência de resposta patológica do indivíduo em questão (Charney, 2004; Feder, Nestler *et al.*, 2009). Infelizmente, esta não é uma característica inata de todos os seres vivos. Desta forma, indivíduos que apresentam uma má regulação nos mecanismos de resiliência podem desenvolver um amplo espectro de psicopatologias, entre elas, a incapacidade de superar traumas, denominada de transtorno de estresse pós-traumático, o TEPT (Russo, Murrough *et al.*, 2012). Basicamente, o TEPT está associado com a incapacidade de alguns indivíduos de se recuperarem adequadamente de eventos traumáticos que não fazem parte de sua vida cotidiana, podendo ser tanto de origem natural (p.ex.: desastres ambientais), quanto podem ser provocados pela ação humana (p.ex.: guerras, violência urbana)

(para detalhes, ver Yehuda, 2004; Miller, Wolf *et al.*, 2012). Ademais, ainda que cerca de 70% da população experimente algum destes eventos traumáticos durante a vida, a prevalência de TEPT é estimada em apenas 8% da população americana (Gates, Holowka *et al.*, 2012; Kessler, Petukhova *et al.*, 2012). Já no Brasil, embora haja uma carência de dados relacionados à prevalência do TEPT, um estudo recente englobando a grande São Paulo, estimou-a em cerca de 3% da população (Viana e Andrade, 2012). Não obstante haja uma disparidade entre quem é exposto ao trauma e quem de fato desenvolve o transtorno, pacientes com TEPT, se não tratados adequadamente, comumente apresentam comorbidades psiquiátricas (p. ex.: depressão, ansiedade) e recorrências das memórias traumáticas (Miller, Wolf *et al.*, 2012), o que os torna incapazes de realizar tarefas simples (p. ex.: atravessar a rua, abastecer o automóvel), gerando grande impacto na vida social e econômica do paciente (Zahran, Peek *et al.*, 2011; Miller, Wolf *et al.*, 2012).

Sabe-se que a carga genética herdada de nossos antepassados tem seu lugar garantido na vulnerabilidade do indivíduo em desenvolver TEPT em resposta a experiências traumáticas (Yehuda, Schmeidler *et al.*, 1998; Yehuda, Bierer *et al.*, 2000; Cohen, Geva *et al.*, 2008). No entanto, assim como em outras psicopatologias, a heterogeneidade genética, penetrância incompleta, pleiotropia e fenocópia são prováveis fatores complicadores para uma melhor análise genética do TEPT (Iacono e Clementz, 1993; Faraone e Tsuang, 1994). Como sabemos, o TEPT é um distúrbio desencadeado por estímulos ambientais e a falha nos mecanismos de adaptação ao trauma pode ser devido ao meio onde o indivíduo vive e viveu anteriormente à situação traumática (McLeod, Koenen *et al.*, 2001). Estudos epidemiológicos afirmam que adversidades ocorridas durante toda a vida, como abusos físicos ou maus-tratos psicológicos são os principais fatores para o desenvolvimento do TEPT (Imanaka, Morinobu *et al.*, 2006). Por outro lado, pesquisas indicam que o exercício físico e a interação social exercem benefícios saudáveis, rendendo ao indivíduo uma maior resiliência a estressores subsequentes (Lehmann e Herkenham, 2011; Hutchinson, McLaughlin *et al.*, 2012). Estes fatores da vida cotidiana irão gerar neuroadaptações que contrabalançarão as mudanças moleculares mal adaptadas em indivíduos sensíveis a situações traumáticas e, assim, permitir um aumento das respostas naturais dos mecanismos de resiliência, de acordo com os eventos da vida cotidiana (McLeod, Koenen *et al.*, 2001; Holmes, Le Guisquet *et al.*, 2005; Hughes, 2012; Russo, Murrough *et al.*, 2012). Em suma, estes desafios

enfrentados anteriormente a um trauma, são responsáveis por melhorar o arsenal psicobiológico do indivíduo no momento de interpretar uma situação nova e ameaçadora, aumentando a probabilidade de ocorrer uma resposta comportamental e fisiológica adequada.

### **1.1 Melhorando a vida dos animais: Ambiente Enriquecido**

O aumento da prevalência de distúrbios relacionados com o estresse tem forçado a comunidade científica a procurar novas estratégias terapêuticas além do tradicional. Para isso, o foco na pesquisa nesta área tem fugido do cômodo “*what goes wrong?*”<sup>1</sup> para o instigante “*what goes right?*”<sup>2</sup> em indivíduos que não desenvolvem psicopatologias relacionadas ao estresse, os resilientes (Gutman, Yang *et al.*, 2008; Lehmann e Herkenham, 2011).

Tanto em humanos (Salmon, 2001; Southwick, Vythilingam *et al.*, 2005) como em animais (Greenwood e Fleshner, 2008; Schloesser, Lehmann *et al.*, 2010), o ambiente enriquecido (AE) vem sendo utilizado como forma de interferir positivamente em vários aspectos cognitivos, sendo sugerido como um modelo válido para a investigação da etiologia da resiliência (Lehmann e Herkenham, 2011). Comparado com uma gaiola comum, o AE experimental diferencia-se da moradia tradicional dos roedores pela introdução de diferentes estímulos físicos e/ou sensoriais como bonecos e bolas coloridas, túneis, planos inclinados e rodas giratórias, além de maior espaço, possibilitando a realização voluntária de exercícios físicos, e de movimentos acrobáticos, bem como uma maior interação social entre os animais (Roy, Belzung *et al.*, 2001; Pham, Winblad *et al.*, 2002; Will, Galani *et al.*, 2004; Lambert, Fernandez *et al.*, 2005).

Com base nestes estímulos ambientais, o AE promove vários efeitos benéficos ao sistema nervoso central (SNC), como facilitar a recuperação após lesões e isquemias cerebrais (Fischer e Peduzzi, 2007; Pereira, Arteni *et al.*, 2007; Wolff, Loukavenko *et al.*, 2008), melhorar o aprendizado e memória (Bruel-Jungerman, Laroche *et al.*, 2005; Leggio, Mandolesi *et al.*, 2005) e promover comportamentos do tipo-ansiolítico e antidepressivo (Duman, Schlesinger *et al.*, 2008).

Percebe-se também que a exposição repetida do animal ao AE o torna mais resistente a enfrentar situações de risco e ameaçadoras mesmo quando sob forte influência de estresse. Por exemplo, quando roedores foram expostos ao odor de gato, os ratos “enriquecidos”

---

<sup>1</sup> Tradução do inglês: o que está errado?

<sup>2</sup> Tradução do inglês: o que está certo?

arriscavam-se mais no aparato e apresentavam níveis de corticosterona plasmáticas reduzidos em relação àqueles “não-enriquecidos” (Klein, Lambert *et al.*, 1994; Roy, Belzung *et al.*, 2001). O mesmo aconteceu quando outros estressores, neste caso, não inatos, como o estresse de contenção ou choque nas patas, tiveram seus efeitos ansiogênicos reduzidos em animais “enriquecidos”, que apresentaram menos úlceras gástricas, menor elevação dos níveis de corticosterona e respostas comportamentais do tipo antidepressiva e ansiolítica nos testes avaliados (Rockman, Borowski *et al.*, 1986; Greenwood, Foley *et al.*, 2003; Benaroya-Milshtein, Hollander *et al.*, 2004). De fato, o AE é capaz de reverter até os efeitos provocados pelo estresse pré- e pós-natal, promovendo adequação comportamental e fisiológica destes animais (p.ex.: redução da ansiedade e do medo condicionado, controle dos níveis de hormônios de estresse) (Fernandez-Teruel, Escorihuela *et al.*, 1997; Francis, Diorio *et al.*, 2002; Imanaka, Morinobu *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a incidência de TEPT (quando adultos) em crianças submetidas a eventos traumáticos, como o holocausto e o ataque às torres gêmeas em Nova Iorque, é maior do que naquelas crianças que viviam em locais “seguros” (Yehuda, Schmeidler *et al.*, 1998; Yehuda, Bryant *et al.*, 2005; Yehuda e Hyman, 2005).

No entanto, não está claro como os vários mecanismos envolvidos no AE promovem estes efeitos protetores, supondo-se que as oportunidades que os roedores têm de estruturar e organizar o ambiente a sua volta os torna cientes da situação com mais rapidez, facilitando sua resposta (Chamove, 1989; Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000; Woodcock e Richardson, 2000a). Este senso de controle da situação parece reduzir os níveis de estresse do animal quando requisitado por uma situação estressante, através de mecanismos celulares, aumentando a neurogênese (Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Kosten, Galloway *et al.*, 2008) e estimulando a arborização dendrítica em estruturas cerebrais como o hipocampo (Rampon, Tang *et al.*, 2000; Leggio, Mandolesi *et al.*, 2005). Também, a expressão de fatores neurotróficos como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, da sigla em inglês) e do fator de crescimento vascular (VGF, da sigla em inglês) têm sua expressão aumentada em animais “enriquecidos”. Curiosamente, os efeitos neuroprotetores observados pelos animais expostos ao AE, também são encontrados quando há uma elevação da atividade do sistema neuropeptídeo Y (NPY) em estruturas como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal (para revisão, ver Eaton, Sallee *et al.*, 2007; Malva, Xapelli *et al.*, 2012). Para o BDNF, inclusive, tem sido sugerido um papel de regulador da expressão do NPY (Barnea e

Roberts, 2001). Recentemente, um trabalho observou o aumento da expressão do receptor Y1 na amígdala após os animais terem sido expostos ao AE, além do AE reverter a diminuição da expressão do receptor Y1<sup>3</sup> após um protocolo de estresse inescapável (Hendriksen, Bink *et al.*, 2012), reforçando uma série de evidências que apontam o NPY como o principal marcador neuroendócrino para a resiliência ao estresse (para mais detalhes, ver Yehuda, Flory *et al.*, 2006; Hughes, 2012; Sah e Geracioti, 2012).

## 1.2 Desligando o botão de alarme: o Neuropeptídeo Y

Os neuropeptídeos representam a recente abordagem farmacológica para o tratamento de distúrbios afetivos, como o TEPT. Dentre os vários neuropeptídeos, o hormônio liberador de corticotrofina (CHR, da sigla em inglês), a colecistoquinina e o neuropeptídeo Y são apontados como exemplos de moléculas estudadas de forma inteligente através da junção da neurociência pré-clínica e clínica em busca de substâncias altamente específicas em relação aos tratamentos atuais disponíveis.

O estudo do neuropeptídeo Y (NPY) inicia-se em 1982 quando Tatemoto e colaboradores encontraram, em amostras hipotalâmicas de porco, um peptídeo que apresentava similaridades estruturais e biológicas com os já conhecidos polipeptídeo pancreático (PP) e o peptídeo YY (PYY). No entanto, este pequeno peptídeo de 36 aminoácidos era de fato outro e foi então denominado neuropeptídeo “Y” (Tatemoto, Carlquist *et al.*, 1982).

A forma biologicamente ativa do NPY é derivada do precursor inativo prepro-NPY com 97 aminoácidos (Figura 1), através de pelo menos quatro eventos enzimáticos pós-translacionais (Pedrazzini, Pralong *et al.*, 2003). O prepro-NPY contém dois fragmentos que são clivados durante o processo de maturação pós-translacional. Inicialmente, pela ação da peptidase sinal, ocorre a remoção do peptídeo sinal de 28 aminoácidos, resultando no pro-NPY. O pro-NPY com 69 aminoácidos é formado pelo NPY<sub>1-39</sub> e pelo peptídeo C-PON (peptídeo flanqueador do NPY no terminal carboxílico) (Mintz, Bloom *et al.*, 1984). A seguir, a pro-hormônio convertase e a enzima catepsina L clivam a ligação C-PON. A cadeia peptídica NPY<sub>1-39</sub> poderá sofrer a ação da enzima carboxipeptidase originando o NPY<sub>1-37</sub>, que por sua vez será o substrato da enzima peptidil-glicina  $\alpha$ -amidante monoxigenase

---

<sup>3</sup> Principal receptor do NPY e candidato a principal envolvido na resiliência (Heilig, 2004; Bowers, Choi *et al.*, 2012; Cohen, Liu *et al.*, 2012)

(PAM), resultando no peptídeo biologicamente ativo  $\text{NPY}_{1-36}$ , ou simplesmente NPY. O NPY poderá ser truncado a  $\text{NPY}_{2-36}$  ou  $\text{NPY}_{3-36}$  pelas enzimas amino peptidase P e dipeptidil peptidase 4, respectivamente (Hopsu-Havu e Glenner, 1966; Pedrazzini, Pralong *et al.*, 2003). Os fragmentos  $\text{NPY}_{3-36}$  e  $\text{NPY}_{2-36}$  apresentam uma afinidade reduzida para o receptor Y1, mas mantêm a capacidade de ligação para os receptores Y2 e Y5 (Grandt, Dahms *et al.*, 1993; Medeiros e Turner, 1994).

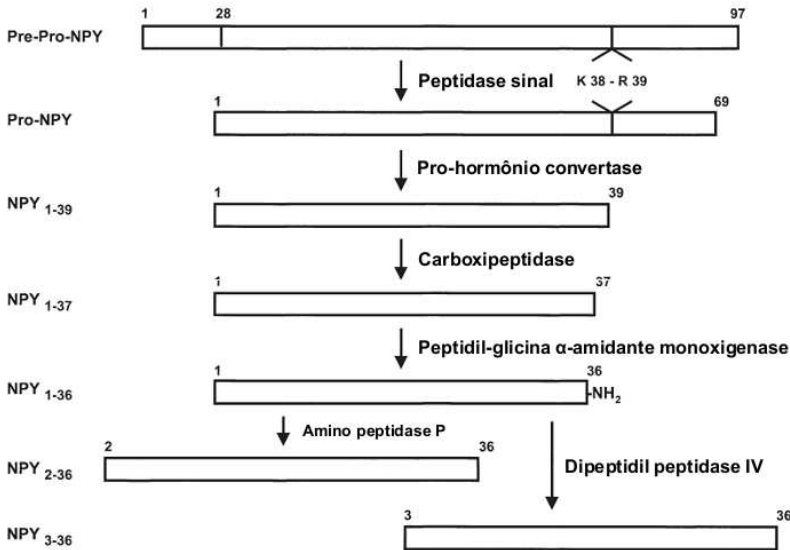


Figura 1 – Síntese e processamento do NPY. Adaptado de Pedrazzini, Pralong *et al.* (2003).

Junto com o NPY, o PP e o PYY são considerados da mesma família de peptídeos pancreáticos. Naturalmente, o NPY compartilha com seus “primos” próximos (PP e PYY) alto nível de homologia, além de serem muito conservados na cadeia evolutiva ao longo de 400 milhões de anos (mais de 92%) (Larhammar, Söderberg *et al.*, 1993). O PYY compartilha homologia de 75% com o NPY, sendo capaz de ativar os mesmos receptores que o NPY, variando, obviamente, na seletividade para cada subtipo do receptor (Larhammar, Söderberg *et al.*, 1993).

Hoje se sabe que o NPY é o peptídeo mais expresso no SNC, superando os níveis de colecistocinina (Gutman, 2009). Seus efeitos são

modulados através da ativação de quatro subtipos funcionais de receptores acoplados à proteína  $G_{i/o}$ : Y1, Y2, Y4 e Y5, sendo os subtipos Y1 e Y2 de maior interesse para o estudo do medo condicionado (Dumont, Jacques *et al.*, 1998) (mais detalhes na Figura 22). O subtipo Y1, particularmente, é localizado em estruturas intimamente ligadas à emocionalidade como o córtex, hipocampo, hipotálamo, amígdala e tronco cerebral, fato que coloca este receptor como o principal candidato à modular as conseqüências da exposição ao estresse, atuando como um tampão através da potencialização do sistema de resiliência no SNC (Sajdyk, Vandergriff *et al.*, 1999; Primeaux, Wilson *et al.*, 2005; Gutman, Yang *et al.*, 2008; Cohen, Liu *et al.*, 2012). O subtipo Y2, diferentemente dos demais receptores NPY, está localizado em neurônios pré-sinápticos (Figura 33), exercendo então o papel de auto-receptor, que através de sua ativação, inibe a liberação de NPY e também de outros neurotransmissores como GABA e glutamato (Dumont, Jacques *et al.*, 1998).

Com esta multiplicidade de receptores e ligantes, e a sua localização no sistema nervoso, tanto central como periférico, não seria surpresa que, após 30 anos de estudos, uma ampla gama de atividades fosse atribuída ao sistema NPYérgico, como a regulação do comportamento alimentar (Beck, 2006), ritmo circadiano (Yannielli e Harrington, 2001), dependência às drogas (Thorsell, Repunte-Canonigo *et al.*, 2007), reprodução (Kalra e Kalra, 2004), regulação imunológica (Groneberg, Folkerts *et al.*, 2004), ansiedade (Heilig, 2004) e neuroproteção (Malva, Xapelli *et al.*, 2012). Em particular, devido à alta expressão de NPY e seus receptores na área cortico-límbica, sugere-se a sua participação na modulação do medo condicionado (Gutman, Yang *et al.*, 2008; Fendt, Burki *et al.*, 2009; Pickens, Adams-Deutsch *et al.*, 2009; Rasmusson, Schnurr *et al.*, 2010; Bowers, Choi *et al.*, 2012; Cohen, Liu *et al.*, 2012; Verma, Tasan *et al.*, 2012).

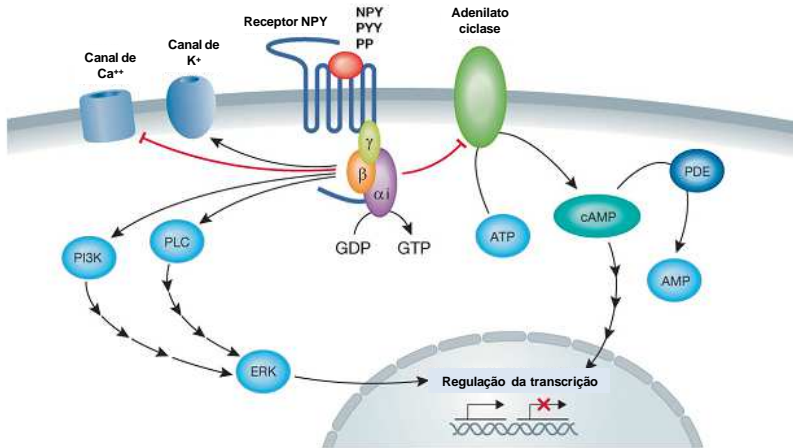


Figura 2 – Cascata de sinalização intracelular típica para os receptores do sistema NPY. Todos os receptores para o NPY atuam inibindo a proteína  $G_{i/o}$  quando a subunidade  $\alpha$  inativa a adenilato ciclase. A subunidade  $\beta\gamma$  ativa várias cascatas de quinases. A ativação do complexo da proteína G pode também deprimir o canal de  $Ca^{2+}$  internamente retificando o canal de  $K^+$ . O início da sinalização celular provoca vários efeitos como a transcrição, estimulação ou inibição da liberação de hormônios e/ou neurotransmissores e por fim, os efeitos fisiológicos do NPY. Adaptado de Brothers e Wahlestedt (2010).

Evidências moleculares suportam o papel do NPY na ansiedade e distúrbios relacionados ao estresse, já que é colocalizado em 80% dos neurônios GABAérgicos da amígdala basolateral (BLA) (McDonald e Pearson, 1989). Posteriormente, um estudo farmacológico observou que o tratamento crônico com drogas benzodiazepínicas induzia aumento da expressão do receptor Y1 na amígdala (Oberto, Panzica *et al.*, 2000). Em adição, as principais projeções neuronais na BLA são glutamatérgicas, e, provavelmente, atuam sob controle da atividade inibitória do NPY (Gutman, 2009). Além disso, o NPY atua controlando a atividade da noradrenalina e do hormônio liberador de corticotrofina (CRH, da sigla em inglês), reduzindo a excitabilidade em áreas do cérebro relacionadas com a resposta ao estresse (Pavia, Hastings *et al.*, 1995; Rasmusson, Hauger *et al.*, 2000; Hastings, Morris *et al.*, 2004; Heilig, 2004; Sah e Geracioti, 2012). Ainda, segundo Heilig (2004), o balanço entre CRH e NPY na amígdala é determinante para os estados de ansiedade/medo de um animal.



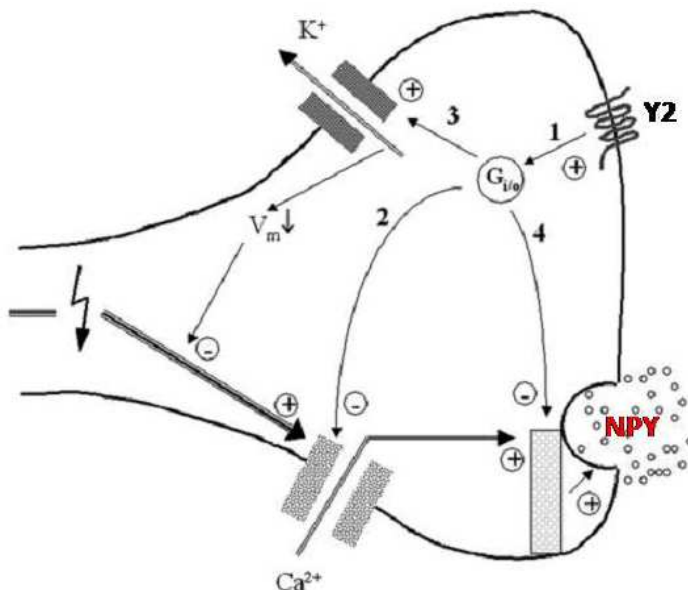


Figura 3 – Mecanismos envolvendo o auto-receptor Y2 mediando a inibição da liberação de NPY. Após a ativação do receptor Y2 acoplado à proteína Gi (1), três vias de sinalização são possíveis: inibição dos canais voltagem-dependente de Ca<sup>2+</sup> (2); abertura dos canais de K<sup>+</sup> (3); efeito inibitório direto na vesícula de liberação de NPY (4). Legenda: (+) efeito estimulatório; (-) efeito inibitório; V<sub>m</sub> = potencial de membrana. Adaptado de Schlicker e Kathmann (2008).

Vários estudos confirmam a influência do NPY no controle das respostas ao estresse. Por exemplo, o estresse de contenção agudo reduz a expressão de mRNA de NPY na amígdala em um primeiro momento, retornando ao normal após 4 h (Thorsell, Svensson *et al.*, 1998) e aumenta a expressão de NPY no núcleo arqueado e hipocampo (Conrad e Mcewen, 2000). Ainda, o estresse de contenção por 10 dias promove aumento da expressão de NPY na amígdala, indicando um mecanismo compensatório para lidar com o estresse crônico (Thorsell, Carlsson *et al.*, 1999). Ratos transgênicos, que têm expressão elevada de NPY no hipocampo têm os efeitos ansiogênicos provocados pelo estresse de imobilização crônica, reduzidos (Thorsell, Michalkiewicz *et al.*, 2000). A administração de vetor viral induzindo aumento da expressão de NPY na amígdala também reduz o comportamento de ansiedade (Primeaux, Wilson *et al.*, 2005). Em contrapartida, um fenótipo ansiogênico é observado em camundongos nocautes (KO, da sigla em inglês) para

NPY (Bannon, Seda *et al.*, 2000). Em adição, camundongos KO para o receptor Y2 têm a ansiedade reduzida, corroborando com a função de auto-receptor caracterizada para o subtipo Y2 (Redrobe, Dumont *et al.*, 2003; Tschenett, Singewald *et al.*, 2003). Farmacologicamente, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de NPY aumenta a resposta punida no teste de conflito operante (Heilig, Mcleod *et al.*, 1992). Além disso, a infusão de NPY e do agonista Y1 Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup>-NPY (LP-NPY) na amígdala promove um perfil ansiolítico em vários protocolos experimentais para ansiedade (Heilig, 1995; Sajdyk, Vandergriff *et al.*, 1999; Kokare, Dandekar *et al.*, 2005). Além dos efeitos de agonistas Y1, a participação deste receptor nos estados de ansiedade dos animais é sustentada pelo uso de antagonistas Y1 como o BIBO3304 (BIBO) e o BIBP3226, que bloqueiam a atividade ansiolítica do NPY nos protocolos testados (Sajdyk, Vandergriff *et al.*, 1999; Primeaux, Wilson *et al.*, 2005).

Em humanos, uma variedade de dados mostra uma associação entre os níveis de NPY e alterações dos estados emocionais. Foi demonstrado que indivíduos que tentaram suicídio apresentam diminuição dos níveis plasmáticos de NPY quando comparados com pacientes que nunca tiveram a intenção de tirar a própria vida (Westrin, Engstrom *et al.*, 1998; Westrin, Ekman *et al.*, 1999). Em um estudo *post mortem* de vítimas de suicídio, as amostras indicaram uma redução de NPY em estruturas como o córtex frontal e núcleo caudado em comparação com amostras de indivíduos saudáveis (Widdowson, Ordway *et al.*, 1992). Em adição, Widdowson, Ordway *et al.* (1992) e Westrin, Engstrom *et al.* (1998) ainda correlacionam os baixos níveis de NPY no SNC com o histórico de depressão dos pacientes. De fato, pacientes com depressão unipolar apresentam uma redução significativa dos níveis de NPY no líquido cefalorraquidiano (LCR), o mesmo sendo observado em amostras *post mortem* (Heilig, 2004; Eaton, Sallee *et al.*, 2007). A confiabilidade dos dados acima é confirmada pela ausência de fatores geradores de confusão, como a idade do paciente e o uso de medicação, parâmetros que foram controlados em todos os estudos. Acredita-se que uma falha na expressão ou na liberação seja a causa da redução de NPY nestes pacientes (Heilig, Zachrisson *et al.*, 2004). Assim, o comprometimento do sistema NPY pode ser responsável pelo aumento da atividade de efetores pró-estresse e pró-ansiedade, como o CRH (Widerlov, Lindstrom *et al.*, 1988; Eaton, Sallee *et al.*, 2007).

Como vimos, estudos clínicos e pré-clínicos durante as últimas três décadas suportam que há uma má regulação do sistema NPY em várias psicopatologias. A este respeito, o NPY tem sido proposto como

o principal fator neuroquímico para a resiliência pós-trauma em humanos (Yehuda, Flory *et al.*, 2006), como já citado.

### 1.3 NPY, a “bola da vez” no medo condicionado

Vários estudos têm mostrado que a elevação dos níveis centrais de NPY tem um papel fundamental na regulação de distúrbios ligados ao estresse, como o TEPT (Morgan, Wang *et al.*, 2000; Heilig, 2004; Yehuda, Flory *et al.*, 2006; Eaton, Sallee *et al.*, 2007; Gutman, Yang *et al.*, 2008; Cohen, Liu *et al.*, 2012; Hirsch e Zukowska, 2012; Verma, Tasan *et al.*, 2012).

Embora poucos estudos tenham investigado anteriormente o NPY em testes que envolvem o condicionamento emocional (Flood, Hernandez *et al.*, 1987; Morley e Flood, 1990), o primeiro trabalho a investigar o papel do NPY no medo condicionado, ainda que de forma despreziosa, foi realizado por Broqua, Wettstein *et al.* (1995), que ao cruzar dados de testes condicionados e incondicionados, verificaram que a administração i.c.v. de NPY e dos agonistas Y1 NPY<sub>2-36</sub>, PYY e LP-NPY inibiam a aquisição do sobressalto potencializado pelo medo (FPS, da sigla em inglês) em ratos, da mesma forma que apresentavam uma atividade do tipo ansiolítica no labirinto em cruz elevado (LCE), em doses similares.

Passada quase uma década, as atenções ao NPY e sua relação com o medo condicionado retornaram devido a estudos clínicos patrocinados pelo Departamento de Defesa americano que objetivavam encontrar marcadores de resiliência para fins militares (Morgan, Wang *et al.*, 2000; Rasmusson, Hauger *et al.*, 2000). Desde então, um número significativo de estudos têm evidenciado o papel do NPY nas respostas ao medo condicionado, uma abordagem experimental para o TEPT.

Karlsson, Holmes *et al.* (2005) observaram que o NPY atuava prejudicando a aquisição do medo condicionado contextual em camundongos simultaneamente à atividade ansiolítica no LCE e na caixa claro-escuro, além de induzir hiperlocomoção. Em um estudo para verificar o controle cardiovascular exercido pelo NPY em animais sob estresse, observou-se que a administração i.c.v. deste peptídeo normalizou a taquicardia apresentada pelos ratos após a exposição ao medo condicionado (Tovote, Meyer *et al.*, 2004). Tovote, Meyer *et al.* (2004) demonstraram ainda que a bradicardia apresentada pela administração de NPY era promovida primariamente pela ativação do receptor Y1.

Em um modelo de medo incubado, onde o medo persiste ao menos por 30 dias, Pickens, Adams-Deutsch *et al.* (2009) observaram

que o NPY atenuou a expressão do medo condicionado incubado. Com o propósito de diminuir a transmissão de NPY através do bloqueio do receptor Y1, uma situação capaz de induzir ansiedade incondicionada (Kask e Harro, 2000), Pickens, Adams-Deutsch *et al.* (2009) administraram o antagonista Y1 BIBO, que não alterou a expressão do medo condicionado nos ratos testados. A administração i.c.v. de NPY também facilitou a extinção do medo condicionado em ratos (Gutman, Yang *et al.*, 2008). Gutman, Yang *et al.* (2008) também mostraram que a injeção de NPY diretamente na amígdala basolateral (BLA) reduziu a expressão e facilitou a extinção do medo no FPS em ratos, a qual se acredita serem moduladas pelo receptor Y1. O mesmo estudo confirmou esta hipótese, já que a infusão de antagonista Y1 na BLA promoveu um profundo déficit na extinção. Interessantemente, a infusão intra-amígdala do agonista Y1 não reduziu a expressão do medo no FPS em camundongos e a co-administração de um antagonista Y1 não bloqueou os efeitos do NPY (Fendt, Burki *et al.*, 2009). Recentemente, o papel do receptor Y1 parece ter sido elucidado pela equipe de Verma, Tasan *et al.* (2012), que, usando camundongos com diferentes genes do sistema NPY silenciados, mostraram que camundongos KO NPY tiveram a aquisição e a expressão do medo facilitada no medo condicionado, enquanto a extinção ficou prejudicada nestes animais. Somente camundongos KO Y1/Y2 reproduziram o perfil comportamental dos camundongos KO NPY. Camundongos KO Y1 apresentaram um rápido condicionamento, mas tiveram um atraso na extinção do medo e KO Y2 foram comportamentalmente similares aos camundongos selvagens utilizados como controle. Desta forma, embora se saiba do papel chave do receptor Y1 na aquisição e extinção do medo condicionado, a extinção do medo parece ser mantida graças ao receptor Y2, sendo necessária uma ação conjunta de ambos os receptores para uma extinção do medo eficaz e duradoura (Tasan, Nguyen *et al.*, 2010; Zambello, Zanetti *et al.*, 2011; Verma, Tasan *et al.*, 2012).

Embora as evidências acima mostrem a importância do NPY no controle das respostas de medo, ainda não existe um consenso sobre qual a faixa de dose ideal para uma resposta eficaz do NPY. A ampla gama de funções fisiológicas mantidas pelo NPY deve ser contabilizada quando pensamos de modo translacional. Para embasar esta informação, o Quadro 1 ilustra as diferentes doses de NPY e agonistas Y1 utilizadas em testes de medo condicionado.

#### **1.4 NPY, o marcador biológico do TEPT?**

O Departamento de Veteranos de Guerra dos EUA é um dos principais interessados na pesquisa de soluções terapêuticas contra psicopatologias relacionadas ao estresse, como o TEPT. Estima-se que mais de 40% dos soldados enviados para as recentes guerras ao terror (Iraque e Afeganistão) retornam para casa com algum tipo de transtorno mental (Callahan, 2010). As chamadas “feridas invisíveis da guerra” consumiram mais de 600 bilhões de dólares em tratamentos médicos desde o fatídico dia 11 de Setembro de 2001 (Callahan, 2010). Há uma ausência de soluções terapêuticas farmacológicas e não-farmacológicas aprovadas (são aceitos apenas o propranolol e a terapia de exposição, respectivamente) para tratar pacientes com TEPT (Yamada, Zushida *et al.*, 2009). Sendo assim, a busca por formas de aumentar a resiliência nos soldados tem sido um dos principais desafios da comunidade científica internacional (Callahan, 2010).

Quadro 1: Efeitos do sistema NPY no medo condicionado

Druga	Dose	Via	Protocolo	Efeito	Referência (ano)
NPY/ PY/	0.23-2.3 nmol	icv	FPS	Inibiu o FPS	Broqua et al., 1995
NPY <sup>2,36</sup>					
LP-NPY	2.3-13.2 nmol	icv	FPS	Inibiu o FPS	Broqua et al., 1995
NPY*	118-470 nmol	icv	FPS	Bradicardia	Tovote et al., 2004
NPY	0.5-1 nmol	icv	Medo contextual	Inibiu o congelamento	Karlsson et al., 2005
NPY*	488.45 µmol	icv	FPS e ASR	Inibiu o FPS e ASR	Gutman et al., 2008
NPY*	488.45 µmol	icv	FPS	Facilitou a extinção no FPS	Gutman et al., 2008
NPY*	488.45 µmol	icv	Medo contextual	Inibiu o congelamento	Gutman et al., 2008
NPY	10 pmol	BLA	FPS	Inibiu o FPS	Gutman et al., 2008
NPY*	97.54 µmol	Amy	FPS	Inibiu o FPS	Fendt et al., 2009
NPY*	390 µmol	Amy	Condicionamento por dicas	Inibiu o congelamento	Fendt et al., 2009
NPY*	97.54-185 µmol	Amy	Condicionamento por dicas	Sem efeito no congelamento	Fendt et al., 2009
Y-28*	2.9-116 µmol	Amy	Condicionamento por dicas	Sem efeito no congelamento	Fendt et al., 2009
NPY*	1.17-2.34 mmol	icv	Medo incubado	Inibiu a expressão do medo	Pickens et al., 2009
NPY*	1.17-2.34 mmol	dHPC	ASR com estresse prévio	Inibiu o ASR	Cohen et al., 2012
NPY*	1.17-2.34 mmol	dHPC	Medo contextual	Inibiu o congelamento	Cohen et al., 2012
NPY*	1.17-2.34 mmol	dHPC	ASR sem estresse prévio	Sem efeito no ASR	Cohen et al., 2012

\* as doses foram calculadas usando as informações fornecidas pelo autor. Legenda: Amy= amígdala, ASR= reflexo do sobressalto acústico; BLA= amígdala basolateral; dHPC= hipocampo dorsal; FPS= sobressalto potencializado pelo medo; icv= intracerebroventricular.

Uma série de estudos comparando soldados de forças especiais (*Rangers*) com soldados sem treinamento especial suporta a noção de que o aumento dos níveis de NPY está associado com a resiliência contra o desenvolvimento de distúrbios relacionados ao estresse em humanos. Tentando entender o que torna um indivíduo resiliente, Morgan, Wang *et al.* (2000) compararam os níveis de NPY em dois grupos militares (forças especiais e soldados normais) durante um treinamento de sobrevivência. Uma maior elevação de NPY e um retorno mais rápido ao basal foram observados nos soldados das forças especiais (Morgan, Wang *et al.*, 2000; Morgan, Wang *et al.*, 2001; Morgan, Rasmusson *et al.*, 2002). Posteriormente, Morgan, Rasmusson *et al.* (2003) e Yehuda, Brand *et al.* (2006) confirmaram que uma redução basal dos níveis de NPY plasmático era observada em pacientes que desenvolveram TEPT. No entanto, a presença de NPY plasmático pode não refletir a ocorrência de NPY central (Dotsch, Adelman *et al.*, 1997), e a associação entre o NPY e o TEPT continua sendo investigada em estudos pré-clínicos (Eaton, Sallee *et al.*, 2007) e clínicos (Hughes, 2012; Sah e Geraciotti, 2012). Uma forma de se estudar o TEPT em animais é a partir do uso de paradigmas baseados no medo condicionado, descrito inicialmente por Pavlov (1927).

### **1.5 Instaurando o medo em animais: o condicionamento Pavloviano do medo**

Medo, talvez a emoção básica mais bem compreendida no reino animal, é um sistema ideal para ter uma compreensão mais profunda do aprendizado emocional e a sua relação com psicopatologias. Estudos que empregam o desenvolvimento do medo, a partir do condicionamento Pavloviano (ou condicionamento clássico) têm um potencial único para desvendar as bases moleculares, anatômicas e comportamentais dos distúrbios psiquiátricos em humanos, apresentando alto grau de translação (Rudy, Huff *et al.*, 2004; Mahan e Ressler, 2012).

Uma das poucas alternativas terapêuticas para o tratamento do TEPT é a terapia de exposição (Nemeroff, Bremner *et al.*, 2006). Nessa terapia, exposições repetidas do indivíduo aos componentes associados ao trauma original (p.ex.: contexto, odor, ruído) promovem, gradualmente, um novo aprendizado no indivíduo, tornando os componentes associados ao trauma, inofensivos. Em outras palavras, ocorre a “extinção” da memória aversiva. Essa extinção não é meramente um esquecimento, mas uma atualização dos componentes associados ao trauma com o trauma em si (Nemeroff, Bremner *et al.*,

2006; Myers e Davis, 2007; Quirk e Mueller, 2008). Conceitualmente, o TEPT é considerado uma patologia de memória, onde as respostas se tornam amplificadas e, portanto, debilitantes. Estudos em seres humanos e animais sugerem que ocorra, na neurobiologia do TEPT, processos patológicos ligados à aquisição e à consolidação, mas também à expressão e à extinção de memórias de medo (Rauch, Shin *et al.*, 2006; Quirk e Mueller, 2008; Jovanovic, Norrholm, Blanding, Davis *et al.*, 2010; Jovanovic, Norrholm, Blanding, Phifer *et al.*, 2010; Norrholm e Jovanovic, 2010; Norrholm, Jovanovic *et al.*, 2011). Para acessar em um mesmo protocolo experimental a ansiedade, o medo e a formação de memória, um dos testes mais utilizados é o condicionamento clássico de medo (Pavlov, 1927; Fanselow, 2000). Neste protocolo, um estímulo condicionado (EC) neutro (contexto, som, cheiro ou luz) é pareado a um estímulo aversivo incondicionado (EI), tipicamente um choque nas patas, levando ao aprendizado aversivo. Após uma, ou algumas associações, a apresentação do EC passa por si só a desencadear comportamentos de defesa, que incluem imobilidade e, quando existe a possibilidade, esquiva da fonte aversiva. Assim, o medo aprendido não apenas gera respostas de defesa, mas permite que estímulos ambientais associados também o façam. As respostas evocadas pelo EC são frequentemente medidas em sessões posteriores à aquisição do pareamento EC-EI. A aquisição é o aprendizado inicial, ou a associação entre EC e EI, em uma sessão geralmente chamada de treino ou condicionamento. A evocação, ou teste, é uma sessão utilizada para verificar a associação entre EC-EI, e é feita pela apresentação apenas do EC. O intervalo entre as sessões de treino e teste podem variar, dependendo do tipo de memória que se queira avaliar (normalmente 24 h, já considerada uma memória de longo prazo). Sessões de teste também podem ser chamadas de reativação (reconsolidação), que ocorre com uma breve exposição ao EC, e são usadas para induzir um estado de labilidade, no qual ocorre sempre que memórias são evocadas, podendo estas então serem modificadas ou reforçadas. Em um processo denominado extinção, que envolve sucessivas e longas reexposições ao EC, ocorre o desdobraimento entre EC e EI e este, por sua vez, envolve um novo aprendizado, uma vez que os estímulos já não possuem qualquer associação. A Figura 44 ilustra de forma esquemática, as diferentes fases da memória.



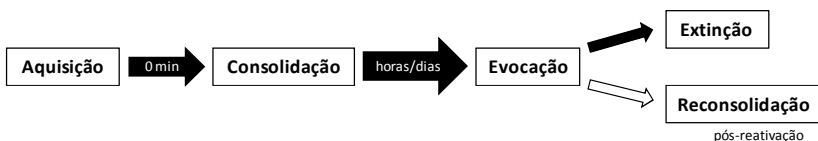


Figura 4 – Fases da formação da memória (aquisição/consolidação), evocação e duas possíveis fases pós-reativação (extinção ou reconsolidação). Adaptado de Quillfeldt (2010).

Respostas condicionadas de medo também podem ser observadas expondo o animal ao mesmo ambiente onde o EI foi previamente pareado. Deste modo, as respostas não são provocadas por um estímulo explicitamente pareado com o EI, tendo com este uma relação temporal específica, mas por uma combinação dos vários estímulos ditos “contextuais” que estavam presentes no ambiente onde o choque nas patas ocorreu e continuam presentes no momento em que o animal é reexposto nesse ambiente. Essas respostas podem ser consideradas como condicionadas a dicas estáticas, ou contextuais (Blanchard e Blanchard, 1969; Phillips e Ledoux, 1992). Aliás, segundo Phillips & LeDoux (1992), embora estes dois tipos de estímulos condicionados, por dica (som, luz, etc) e contexto, provoquem respostas emocionais similares (congelamento, defecação, etc), algumas diferenças importantes são observadas no condicionamento contextual, como o fato do EC não ser restrito a uma simples modalidade sensorial; de estarem continuamente presentes, não sendo apresentados de maneira precisa ao animal nem temporalmente relacionados com o EI; de predizerem uma situação geral na qual o EI pode provavelmente ocorrer, mas não predizerem o início de nenhum EI específico.

Tendo em vista todas as informações aqui descritas sobre o envolvimento do NPY na resiliência ao estresse, e seu potencial para o tratamento de psicopatologias relacionadas ao estresse, como o caso do TEPT, e o amplo espectro de funções fisiológicas que o NPY pode influenciar, além da ampla variabilidade de doses (de *picomol* a *micromol*) (tabela 1), ficam em aberto algumas questões: 1) Será possível isolar os efeitos mnemônicos e do tipo ansiolítico do NPY, da redução das respostas de medo desde a sua aquisição até a facilitação da extinção desta memória? 2) O NPY agiria bloqueando as respostas de medo desde a sua aquisição até a facilitação da extinção desta memória? 3) Qual seria a real participação do receptor Y1 no condicionamento contextual? 4) É possível desenvolver uma terapia não farmacológica para tornar o indivíduo mais resiliente? 5) Qual o papel do NPY endógeno na resiliência?

Com o intuito de esclarecer estas questões, conduzimos o presente trabalho. Para este fim, nos propusemos a avaliar a participação do sistema NPY no condicionamento aversivo contextual (CAC). Para um melhor esclarecimento desta questão lançamos mão de abordagens comportamentais, como o teste do CAC em ratos, o ambiente enriquecido e ensaios de imunodeteção de proteínas do receptor Y1 no hipocampo. Entender melhor como o sistema NPY funciona durante o processo traumático pode ser um grande passo na busca por compostos capazes de interferir positivamente neste processo e, assim, fornecer mais alternativas terapêuticas que possam ser utilizadas como adjuvantes no tratamento de transtornos relacionados à revivência de eventos traumáticos.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho pretende investigar o envolvimento do NPY como um agente promotor de resiliência nas respostas de medo de ratos testados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual (CAC).

### 2.1 Objetivos específicos:

- ✓ Construir uma curva dose-resposta de baixa dosagem de NPY eficaz na redução do CAC;
- ✓ Descartar a influência do NPY em parâmetros não relacionados ao medo, como a memória, a ansiedade e a atividade locomotora;
- ✓ Investigar o papel do receptor Y1 através do uso de um agonista Y1 (LP-NPY) e do antagonista Y1 (BIBO) em diferentes estágios no teste do CAC;
- ✓ Verificar o papel do ambiente enriquecido (AE) na facilitação da extinção no teste do CAC;
- ✓ Investigar a participação do sistema NPY na resiliência promovida pelo AE através de abordagens farmacológicas e de imunodeteção de proteínas;
- ✓ Investigar se a indução da liberação da NPY endógeno produz efeitos similares aos do NPY exógeno na extinção do CAC;



### 3 MATERIAL E METÓDOS

#### 3.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre 90 e 110 dias e peso corpóreo entre 280 e 330 gramas. Estes ratos foram criados no Biotério Central da UFSC e lá permaneceram até o período de desmame (21 dias). Após isto, os animais foram encaminhados para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. Uma semana antes do início dos procedimentos experimentais, os ratos foram levados ao Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia, onde permaneceram em gaiolas com 4-5 animais dentro de estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, Brasil) com controle de luz (12/12 h, luz acesa às 7 h) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Comida e água foram disponibilizadas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período compreendido entre 8:00 e 13:00 h e em total acordo com os padrões internacionais de cuidados animais, conforme recomendação da lei nº 11.794, de 08/10/2008. Todos os protocolos experimentais utilizados nesta tese foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais institucional (CEUA-UFSC), protocolo nº 23080.019000/2009-82.

#### 3.2 Drogas

Para a realização dos experimentos, as seguintes drogas foram utilizadas: o agonista dos receptores Y neuropeptídeo Y (NPY) (Bachem, Torrance, EUA), o agonista seletivo do receptor Y1 Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup>-NPY (LP-NPY) (Bachem, Torrance, EUA), o antagonista seletivo para o receptor Y1 BIBO3304 (Tocris, Minneapolis, EUA), o antagonista seletivo para o receptor Y2 BIIE0246 (Tocris, Minneapolis). Todas as drogas acima foram dissolvidas em tampão fosfato salina 0,01M (PBS, da sigla em inglês) (Sigma, St. Louis, EUA). Após preparadas, as soluções foram mantidas congeladas em tubos Eppendorf® siliconizados até o uso. Também foi usado o potencializador da atividade GABAérgica midazolam (MDZ) (Cristália, Itapira, Brasil) que foi dissolvido em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Bustos, Maldonado *et al.*, 2006). As doses utilizadas foram escolhidas de acordo com dados prévios da literatura (Bacchi, Mathe *et al.*, 2006; Gutman, Yang *et al.*, 2008) e estudos piloto desenvolvidos em nosso laboratório.

### 3.3 Ambiente enriquecido

O sistema de ambiente enriquecido (AE) foi baseado no descrito na literatura (Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000; De Carvalho, Pandolfo *et al.*, 2010) e consistiu em duas gaiolas de polietileno idênticas (50 X 35 X 30 cm) com maravalha, interconectadas por um tundo de PVC (Figura 55). Dentro do AE foram disponibilizados uma variedade de estímulos sensoriais, por exemplo: uma roda giratória, um túnel contorcido, escadas, bolinhas coloridas e objetos de diferentes formas e cores. Estes objetos eram lavados e alternados de posição, ou trocados por outros, mudando a configuração espacial do AE e a composição dos objetos duas vezes por semana. O período que os ratos permaneceram no AE foi de 14 dias, além do período adicional em que os ratos estavam sendo experimentados.

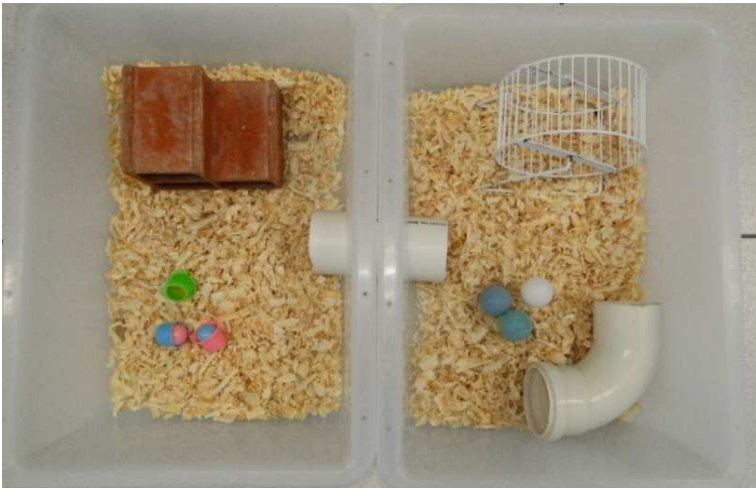


Figura 5 – Gaiola do ambiente enriquecido utilizado neste trabalho.

### 3.4 Cirurgia estereotáxica

Os ratos foram anestesiados com uma mistura 1:1 de quetamina (75 mg/kg) (Sespo, Paulínia, Brasil) e xilazina (15 mg/kg) (Sespo, Paulínia, Brasil) e colocados no aparelho estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, EUA), com o *bregma* e o *lambda* mantidos no mesmo plano. Em seguida, fez-se a tricotomia acima da calota craniana seguida da administração via subcutânea (s.c.) de 0,2 mL de uma solução anestésica e vasoconstritora local (cloridrato de lidocaína 3% com noradrenalina 1:50.000, Probem, Catanduva, Brasil). Através de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm na direção ântero-posterior, a calota

craniana foi exposta. O periósteo foi retirado e a calota craniana limpa com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10%. Com o auxílio de uma broca ortodôntica (n° 6) foram feitos dois furos na calota craniana para fixação de parafusos. Posteriormente, um terceiro furo foi feito para implantação de uma cânula guia no ventrículo lateral (direito ou esquerdo, aleatória e balanceadamente), sendo o posicionamento da mesma calculado por meio de estimativas em relação ao *bregma* (ponto de encontro entre as suturas sagital e lambdóide utilizado como referencial anatômico). As coordenadas utilizadas (AP= -0,8 mm; ML= ±1,6 mm; e DV= -3,6 mm) foram baseadas no Atlas de Estereotaxia em ratos de Paxinos e Watson (2002), conforme apresentado na Figura 66.

Uma cânula de aço inoxidável de 15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo, previamente confeccionada a partir de agulhas 0,7 x 25 mm (Becton Dickinson, São Paulo, Brasil), foi introduzida randomicamente no ventrículo lateral direito ou esquerdo. Após implantação, a cânula e os parafusos foram fixados ao crânio com resina acrílica auto-polimerizável. Mandris de aço inox n° 26 de 0,35 mm de diâmetro (Comercial Rio Verde, Guarulhos, Brasil) foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas durante o período de recuperação dos ratos. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e então transferidos para as suas caixas moradias onde permaneceram por 5 a 7 dias antes das sessões experimentais.

### 3.5 Procedimentos de infusão

Uma agulha injetora de 16 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro foi fixada a cânula guia e a administração intracerebroventricular (i.c.v.) foi realizada através de uma microseringa de 10 µl (Hamilton, Reno, EUA) conectada à agulha injetora por um tubo de polietileno P10 (10 mm de diâmetro). As drogas foram injetadas com o auxílio de uma bomba de infusão automática (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) num volume de 1 µl, a uma taxa de 2 µl/min. Um período adicional de 30 s foi adotado como tempo necessário para a completa difusão da solução dentro do ventrículo e posterior retirada da agulha injetora. Por fim, um tempo de 5 min foi adotado entre a administração da solução e a exposição ao protocolo experimental, exceto no caso do BIIE0246, onde se adotou um tempo de 10 min, conforme descrito na literatura (Bacchi, Mathe *et al.*, 2006). Durante esse período, todos os ratos permaneceram em gaiolas individuais até que fossem usados nos testes.





protegidos por paredes de 40 cm de altura e denominados de braços fechados, os outros dois, denominados de braços abertos, possuem apenas uma pequena proteção de 1 cm. Os quatro braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm). A sala de experimento foi levemente iluminada por uma luz vermelha, resultando em uma luminosidade ambiental de cerca de 1 lux. Cada animal foi colocado na plataforma central do LCE, com a cabeça voltada para um dos braços abertos e tiveram os seus respectivos comportamentos avaliados e registrados por um período de 5 min. As entradas nos braços, abertos ou fechados, foram registradas apenas quando o animal se encontrava com as quatro patas em um dos respectivos braços. A porcentagem de entradas nos braços abertos (número de entradas nos braços abertos divididos pelo número total de entrada nos braços) e a porcentagem de tempo nos braços abertos (tempo de permanência nos braços abertos divididos pelo tempo de permanência nos braços) foram utilizadas como índices comportamentais de ansiedade, e o número de entradas nos braços fechados foi utilizado como índice de locomoção geral (Cruz, Frei *et al.*, 1994).

### **3.6.2 Campo Aberto**

Foram utilizados dois aparelhos de Campo Aberto (CA) diferentes. Para investigar a atividade locomotora e o comportamento do tipo ansiolítico/ansio gênico foi utilizado o aparelho previamente descrito por Izidio, Lopes *et al.* (2005). Este consiste em uma arena de acrílico branco opaco (Acril, São José, Brasil) com paredes de 40 cm de altura. O chão (100 x 100 cm) foi dividido em 25 quadrantes (20 x 20 cm) demarcados com linhas pretas (Figura 77B). Cada rato foi colocado no centro do CA e o cruzamento com as quatro patas de um quadrante para outro foi anotado, conforme a localização do rato, por 5 min consecutivos. O número de transições da região central (não adjacente às paredes) foi considerado como uma medida do comportamento ansiolítico/ansio gênico e a soma de todas as transições foi tomada como medida de locomoção (Ramos e Mormede, 1998).

Para o protocolo de habituação ao CA, foi utilizado um aparato menor, que consistia em uma arena de acrílico (Acril, São José, Brasil) com paredes transparentes com 40 cm de altura e chão cinza (50 x 50 cm). O protocolo de habituação ao CA foi realizado em dois dias. Em ambos os dias, os ratos foram colocados no centro do CA e permaneceram por 3 min no aparelho. O programa de computador Anymaze (Stoelting, Wood Dale, EUA) foi usado para analisar a distância percorrida em ambos os dias. Uma redução na distância

percorrida no segundo dia comparado com o primeiro é um indicativo de que houve habituação dos animais, um sinal de aprendizagem (De Oliveira Alvares, De Oliveira *et al.*, 2005; Quillfeldt, 2010).

A iluminação da sala de experimento foi de 1 *lux* no centro da arena em ambos os protocolos.

**A)**



**B)**

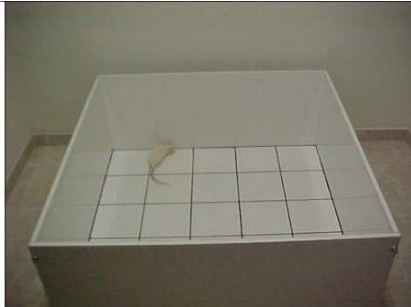


Figura 7 – Modelos representativos do teste do LCE (A) e CA (B). Retirado de <http://insightltda.com.br> (A) e <http://www.ccb.ufsc.br/~andre/> (B).

### 3.6.3 Condicionamento aversivo contextual

Os experimentos de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC) foram realizados em uma caixa de esquiva passiva (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) dotada de chão gradeado conectado a um gerador de choques elétricos, devidamente configurados às condições experimentais, conforme ilustrado na Figura 8. O mesmo compartimento da gaiola de condicionamento (22 x 22 x 25 cm) foi utilizado em todos os procedimentos experimentais. A iluminação da sala de experimento foi de 10 *lux* no centro da gaiola. Neste modelo, os animais foram colocados na gaiola de condicionamento e após 3 min receberam um choque elétrico nas patas (1,5 mA/1 s). Após o choque, os animais permaneceram por mais 1 min na gaiola de condicionamento antes de serem retirados, sendo levados para uma nova gaiola até que todo o experimento fosse concluído, conforme previamente descrito por Pamplona e Takahashi (2006). Quando reexpostos à gaiola os animais expressam respostas autonômicas e comportamentos defensivos, como congelamento, piloereção, aumento da frequência cardíaca e liberação de hormônios de estresse, que indicam uma resposta de medo no animal (Blanchard e Blanchard, 1969; Fanselow, 1980). O congelamento, definido como a imobilidade em uma posição estereotipada de

agachamento com exceção dos movimentos necessários para a respiração, foi caracterizado como um comportamento condicionado por Fanselow (1980), sendo registrado e utilizado como índice de memória de medo durante a reexposição ao contexto na ausência do choque. A investigação do CAC ocorreu em diferentes estágios da memória de medo, como: (1) *aquisição*: o tratamento ocorreu 5 min antes da sessão de condicionamento (Zurita, Martijena *et al.*, 2000). Vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, os animais foram expostos à gaiola de condicionamento e o comportamento de congelamento foi quantificado por 5 min; (2) *consolidação*: os ratos foram tratados imediatamente após serem retirados da sessão de condicionamento (Zurita, Martijena *et al.*, 2000). Vinte e quatro horas depois, os animais foram novamente expostos ao aparato e o comportamento de congelamento foi quantificado por 5 min; (3) *consolidação tardia*: os ratos foram tratados 3 h após serem retirados da sessão de condicionamento (Bekinschtein, Cammarota *et al.*, 2007). Vinte e quatro horas depois, os animais foram novamente expostos ao aparato e o comportamento de congelamento foi quantificado por 5 min; (4) *reconsolidação*: vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, os animais foram expostos brevemente ao aparato por 3 min (sessão de reativação). Imediatamente após a sessão de reativação, os animais foram tratados (Stern, Gazarini *et al.*, 2012). No dia seguinte, uma nova exposição ao contexto, agora de 5 min (sessão teste) foi realizada. O comportamento de congelamento foi avaliado em ambas as sessões, reativação e teste; (5) *extinção*: vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram expostos ao aparato e o comportamento de congelamento foi quantificado por 9 min. Este procedimento, denominado sessão de extinção, foi repetido três vezes com intervalos de 24 h para induzir a extinção da memória de medo contextual (Pamplona e Takahashi, 2006; Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). O tratamento farmacológico ocorreu 5 min antes de cada sessão de extinção, exceto no tratamento com BIIE que sempre ocorreu 10 min antes. Uma sessão sem tratamento, de 3 min foi realizada 24 h após a última sessão de extinção para investigar se o efeito observado durante a sessão de extinção foi droga-dependente ou se provocou efeitos persistentes.

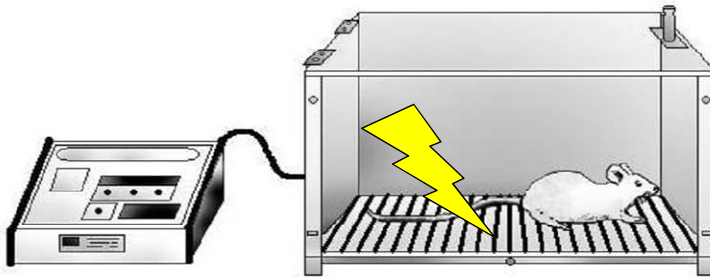


Figura 8 – Modelo representativo do aparato utilizado no teste do condicionamento aversivo contextual. Adaptado de Kroon e Carobrez (2009).

### 3.7 Procedimentos bioquímicos

#### 3.7.1 Coleta de tecidos

Após o experimento comportamental, os ratos foram sacrificados por decapitação e seus cérebros removidos e lavados com solução fisiológica (NaCl) 0,9% à 4° C. Em seguida, os cérebros foram dissecados sobre uma placa de Petri mantida em gelo seco. Os hipocampus foram dissecados e armazenados em *freezer* a -80° C até momento do uso.

#### 3.7.2 Preparação do extrato celular total

As amostras de hipocampo foram retiradas do *freezer* a -80° C, descongeladas e homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA gelado composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina A 20 µg/ml e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e em seguida centrifugadas (10.000 g, 4°C, durante 10 min). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Os extratos celulares totais foram armazenados em *freezer* a -70° C até o momento do uso.

### 3.7.3 Determinação da concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada com o auxílio de um espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Fisher, Waltham, EUA) acoplado a um computador com o *software* de quantificação Nanodrop ND1000 v.3.3.0, conforme descrito pelo fabricante (Desjardins, Hansen *et al.*, 2009). Brevemente, as amostras de tecido previamente preparadas, conforme 3.6.2 foram rapidamente homogeneizadas e o volume de 1 µl da amostra foi pipetado na região sensível do aparelho. Utilizou-se o comprimento de onda de 280 λ, um dos padrões de absorvância para a dosagem de proteínas, oferecidos pelo *software*. Após a calibração do aparelho com uma amostra de água destilada (branco), as amostras foram pipetadas e a quantidade de proteína mensurada, conforme descrito pelo fabricante (Thermo Fisher, Waltham, EUA). O local de inserção da amostra foi higienizado entre uma amostra e outra para evitar uma possível contaminação.

### 3.7.4 Ensaio de imunodeteção por *Western blot*

Os extratos dos tecidos previamente preparados foram diluídos de modo a apresentar a mesma concentração de proteína (4 mg/ml), foram misturadas em volumes iguais ao tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β-mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 min a 100°C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS 15%. A próxima etapa consistiu na transferência das proteínas contidas no gel para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, EUA) sob as seguintes condições: 100 V e 30 mA durante 1 h. Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T (Tris 1,2 g; NaCl 8,76 g e tween 0,05% em água destilada) contendo leite desnatado (5 %) por no mínimo 1 h, à temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS-T (4 X), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para o anticorpo primário contra a proteína do receptor Y1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (1:1000). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS- T (4 X) e incubadas com anticorpo secundário específico de coelho conjugado a peroxidase (1:25.000) (Cell Signaling Technology, Danvers, EUA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Os imuno-complexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, SuperSignal West Femto (Thermo Fischer Scientific, Rockford, EUA) e filme radiográfico (Hyperfilm ECL) (GE Healthcare, São Paulo, Brasil), segundo

recomendações do fabricante. Os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas para a anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz, Dallas, EUA) (1:500). Sendo que tanto o anti-NPY1R e a anti- $\beta$ -actina apresentavam peso molecular similares (43 kDa), foi necessário lavar a membrana para retirar todo o anticorpo primário e incubar a membrana novamente, agora com anti- $\beta$ -actina. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa *NIH ImageJ* 1.36b (NIH, Bethesda, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação à  $\beta$ -actina.

### 3.8 Procedimentos experimentais

*Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY na consolidação de ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.*

Nesta primeira etapa do trabalho, buscou-se encontrar a menor dose capaz de provocar um prejuízo na consolidação da memória de medo no teste do CAC. Para tanto, foram utilizados 99 ratos. Para avaliar o perfil da administração i.c.v. de NPY, quatro grupos experimentais foram utilizados: PBS (n=12), NPY 1 pmol (n=10), NPY 3 pmol (n=10) e NPY 10 pmol (n=9). Para avaliar o perfil da injeção i.c.v. de LP-NPY, cinco grupos experimentais foram utilizados: PBS (n=13), LP-NPY 0,1 pmol (n=7), LP-NPY 1 pmol (n=10), LP-NPY 3 pmol (n=11) e LP-NPY 10 pmol (n=7). Estes ratos foram condicionados no teste do CAC e imediatamente após, foram tratados randomicamente, conforme especificado acima. Uma nova exposição ao contexto (5 min) foi realizada 24 h após o condicionamento para investigar os efeitos das drogas na consolidação de memórias aversivas, através da quantificação do comportamento de congelamento dos ratos (ver esquema na Figura 99A).

*Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do Campo Aberto*

Para descartar qualquer influência da atividade locomotora dos animais (Heilig e Murison, 1987; Heilig, Vecsei *et al.*, 1989; Sorensen, Lindberg *et al.*, 2004), o teste do CA foi realizado nas mesmas doses utilizadas no experimento 1. Um total de 89 ratos foi utilizado neste experimento. Para avaliar a atividade locomotora do tratamento i.c.v. com NPY, quatro grupos experimentais foram utilizados: PBS (n=11),

NPY 1 pmol (n=6), NPY 3 pmol (n=9) e NPY 10 pmol (n=8). Para avaliar o perfil da injeção i.c.v. de LP-NPY, cinco grupos experimentais foram utilizados: PBS (n=10), LP-NPY 0,1 pmol (n=8), LP-NPY 1 pmol (n=9), LP-NPY 3 pmol (n=9) e LP-NPY 10 pmol (n=9). Neste experimento os animais foram tratados e após 5 min, foram submetidos ao teste do CA. Durante os 5 min no CA foram anotados o número de quadrantes totais e centrais cruzados pelos ratos (ver esquema na Figura 10A).

*Experimento 3: Efeitos da administração i.c.v de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do Labirinto em Cruz Elevado*

Como já vimos, o sistema NPY está muito relacionado com a ansiedade (Broqua, Wettstein *et al.*, 1995; Bannon, Seda *et al.*, 2000; Kask, Harro *et al.*, 2002; Karlsson, Choe *et al.*, 2008). Para verificar o perfil do tipo-ansiolítico nas doses de NPY e LP-NPY escolhidas conforme os experimentos 1 e 2, o teste do LCE foi realizado. Um total de 30 ratos foram utilizados neste experimento, divididos em 3 grupos experimentais: PBS (n=10), NPY 3 pmol (n=9) e LP-NPY 1 pmol (n=11). Os animais foram tratados 5 min antes de serem submetidos ao teste do LCE. No LCE, os animais foram avaliados por 5 min quanto à exploração dos braços abertos (número de entradas e tempo permanecido) e fechados (número de entradas) (ver esquema na Figura 111A).

*Experimento 4: Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na habituação de ratos avaliados no teste do Campo aberto.*

Evidências indicam a participação do sistema NPY no aprendizado e memória não emocional (Morley e Flood, 1990; Rangani, Upadhyya *et al.*, 2012). Para isso, a memória foi acessada utilizando o teste de habituação ao CA. Um total de 35 ratos foram utilizados neste experimento, divididos em 3 grupos experimentais: PBS (n=11), NPY 3 pmol (n=12) e LP-NPY 1 pmol (n=12). Para este experimento os animais foram colocados no CA e permaneceram lá por 3 min. Imediatamente após, os animais foram tratados por via i.c.v. e 24 h após, expostos novamente ao CA por mais 3 min. A distância percorrida pelos animais nos dois dias foram tomadas como medida de locomoção. A redução da locomoção no 2º dia, em comparação com o 1º, é indicativa de que os animais habituaram (aprenderam) (ver esquema na Figura 122A).

*Experimento 5: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na aquisição do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.*

Para verificar o papel do sistema NPY na aquisição da memória de medo, foram utilizados um total de 57 ratos neste experimento, divididos em 6 grupos experimentais: PBS+PBS (n=10), PBS+NPY 3 pmol (n=11), PBS+LP-NPY 1 pmol (n=10), BIBO+PBS (n=8), BIBO+NPY (n=9) e BIBO+LP-NPY (n=9). Então, os animais foram pré-tratados i.c.v. com BIBO ou PBS e 5 min após, tratados com PBS, NPY ou LP-NPY. Passados mais 5 min, os animais foram colocados na gaiola de condicionamento, onde permaneceram por 3 min, levaram um choque nas patas de 1,5 mA/1 s e permaneceram por mais um minuto adicional. Os ratos foram então reexpostos à gaiola por 5 min, 24 h após, e o comportamento de congelamento foi anotado (ver esquema Figura 133A).

*Experimento 6: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na consolidação do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual*

Para verificar o papel do sistema NPY na consolidação da memória de medo, foram utilizados um total de 61 ratos neste experimento, divididos em 6 grupos experimentais: PBS+PBS (n=11), PBS+NPY 3 pmol (n=10), PBS+LP-NPY 1 pmol (n=9), BIBO 200 pmol+PBS (n=10), BIBO+NPY (n=11) e BIBO+LP-NPY (n=10). Os animais foram condicionados e imediatamente após, foram pré-tratados i.c.v. com BIBO ou PBS e 5 min após, tratados com PBS, NPY ou LP-NPY. Os ratos foram então reexpostos à gaiola por 5 min, 24 h após, e o comportamento de congelamento foi anotado (ver esquema na Figura 144A).

*Experimento 7: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.*

Para verificar o papel do sistema NPY na extinção da memória de medo, foram utilizados um total de 75 ratos, divididos em 6 grupos experimentais: PBS+PBS (n=15), PBS+NPY 3 pmol (n=13), PBS+LP-NPY 1 pmol (n=12), BIBO+PBS (n=11), BIBO+NPY (n=12) e BIBO+LP-NPY (n=12). Para este experimento os animais foram



condicionados e 24 h após, foram pré-tratados com BIBO ou PBS. Cinco minutos depois, foram tratados com PBS, NPY ou LP-NPY antes de cada sessão de extinção de 9 min, com intervalo de 24 h entre cada sessão, por 3 dias. Um teste adicional de 3 min, na ausência de tratamento farmacológico, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (p.ex.: dependente de droga) ou duradouros mesmo na ausência de tratamento (ver esquema na Figura 155A).

*Experimento 8: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y2 BIIE sobre a ação do NPY endógeno na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual*

O receptor Y2 atua como auto-receptor, inibindo a liberação endógena de NPY (Gehlert, Beavers *et al.*, 1996; Sainsbury, Schwarzer *et al.*, 2002). Para tanto, buscou-se verificar o papel do NPY endógeno através do bloqueio do receptor Y2 com o uso do antagonista BIIE. Inicialmente, uma curva dose-resposta, com base em dados da literatura, foi realizada (Bacchi, Mathe *et al.*, 2006). Para isso, foram utilizados um total de 29 ratos, divididos em 3 grupos experimentais: PBS (n=10), BIIE 0,3 nmol (n=10) e BIIE 1 nmol (n=9). Para este experimento os animais foram condicionados e 24 h após, foram tratados com PBS, BIIE 0,3 nmol ou BIIE 1 nmol antes de cada sessão de extinção de 9 min, com intervalo de 24 h entre cada sessão, por 3 dias. Um teste adicional de 3 min, na ausência de tratamento farmacológico foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (isto é, dependentes da droga) ou duradouros mesmo na ausência de tratamento (ver esquema na Figura 166A).

*Experimento 9: Efeitos da administração i.c.v. de BIBO e BIIE sobre a ação do NPY endógeno na extinção do medo avaliada em ratos no teste do Condicionamento Aversivo Contextual.*

Com base nos dados do experimento 8, foi escolhida a dose de BIIE 0,3 nmol por esta não apresentar atividade ansiolítica, conforme descrito na literatura (Bacchi, Mathe *et al.*, 2006). Com o objetivo de verificar a função do receptor Y1 na extinção do medo condicionado, utilizados um pré-tratamento com o antagonista Y1 BIBO. Um total de 27 ratos foi experimentado, divididos em 3 grupos: PBS+PBS (n=9), PBS+BIIE (n=8) e BIBO+BIIE (n=10). Para este experimento os

animais foram condicionados e 24 h após, foram pré-tratados com BIBO ou PBS e 5 min após, tratados com BIIE ou PBS antes de cada sessão de extinção de 9 min, com intervalo de 24 h entre cada sessão, por 3 dias. Um teste de 3 min, na ausência de tratamento farmacológico, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (isto é, dependentes da droga) ou duradouros mesmo na ausência de tratamento (ver esquema na Figura 177A).

*Experimento 10: Efeitos do Ambiente Enriquecido na extinção do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual.*

Para investigar o papel do AE na extinção da memória de medo, foram utilizados 20 ratos divididos em 2 grupos experimentais: que permaneceram na gaiola padrão (CTRL), n=10, e que permaneceram por 14 dias no AE (n=10). Então, os ratos foram condicionados e 24 h após (e pelos próximos 3 dias), os animais foram reexpostos ao contexto por 9 min (intervalo de 24 h entre cada sessão de extinção) (ver esquema na Figura 188A). Os animais do grupo AE retornavam para o ambiente enriquecido após cada sessão de extinção.

*Experimento 11: Efeitos do Ambiente Enriquecido na expressão do receptor Y1 hipocampal de ratos condicionados no teste do CAC*

Para investigar os efeitos do AE na expressão do receptor Y1 hipocampal em ratos condicionados, um experimento de imunodeteção de proteínas por *Western blot* foi realizado. Para tanto, foram utilizados 18 ratos divididos em 4 grupos experimentais: CTRL sem condicionamento (n=4), AE sem condicionamento (n=5), CTRL condicionados (n=4) e AE condicionados (n=5). Protocolo consistia em condicionar os ratos e 24 h após, expor os ratos novamente ao contexto por 5 min. Os ratos sem condicionamentos foram expostos à gaiola de condicionamento, mas não levaram o choque nas patas. Imediatamente após o término dos experimentos, os ratos foram sacrificados e os hipocampos dissecados e congelados (-80°C) até a análise bioquímica do mesmo (ver esquema na Figura 199A). Os animais do grupo AE retornavam para o ambiente enriquecido após cada sessão.

*Experimento 12: Efeito da administração do antagonista Y1 BIBO sobre a facilitação da extinção do medo no teste do Condicionamento Aversivo Contextual induzido pelo ambiente enriquecido*

Com base nos dados do experimento 11, que mostraram uma elevação dos níveis do receptor Y1 no hipocampo de ratos “enriquecidos” condicionados, optamos por tentar bloquear a facilitação da extinção com o uso i.c.v. do antagonista Y1 BIBO3304. Um total de 43 ratos foram usados, divididos em 4 grupos: CTRL+PBS (n=10), CTRL+BIBIO (n=12), AE+PBS (n=10) e AE+BIBO (n=11). Para este experimento, parte dos ratos permaneceu por 14 dias no AE e, após este período, foram condicionados no teste do CAC. Vinte e quatro horas depois e pelos próximos 3 dias, os ratos foram tratados com BIBO ou PBS e 5 min depois, reexpostos à sessão de extinção por 9 min, com intervalo de 24 h entre cada sessão, por 3 dias. Um teste de 3 min, na ausência de tratamento farmacológico, foi realizado 24 h após a última sessão de extinção para investigar se os efeitos das drogas na extinção de memórias aversivas foram agudos (isto é, dependente da droga) ou duradouros mesmo na ausência de tratamento (ver esquema na Figura 2020A). Os animais do grupo AE retornavam para o ambiente enriquecido após cada sessão de extinção.

*Experimento 13: Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na consolidação tardia do medo de ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual.*

Alguns experimentos complementares, com o objetivo de verificar o perfil do NPY e LP-NPY nas doses utilizadas em outros parâmetros relacionados à memória de medo foram feitos. Para este experimento foram utilizados 30 ratos divididos em 3 grupos experimentais: PBS (n=10), NPY 3 pmol (n=9) e LP-NPY 1 pmol (n=11). Os ratos foram condicionados e 3 h após o condicionamento, foram tratados com NPY, LP-NPY ou PBS. Vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram expostos novamente ao contexto do dia anterior por 5 min e o tempo de congelamento foi anotado (ver esquema na Figura 2121A).

*Experimento 14: Efeitos de longo prazo da administração do NPY e LP-NPY na evocação do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual*

Como o NPY apresenta efeito de longo prazo, sem que haja a presença do peptídeo no organismo, objetivamos verificar o efeito das

doses utilizadas em nosso trabalho em um protocolo de longo prazo no teste do CAC. Neste experimento foram utilizados 31 ratos divididos em 3 grupos experimentais: PBS (n=11), NPY 3 pmol (n=10) e LP-NPY 1 pmol (n=10). Os ratos foram tratados e 7 dias após, condicionados no teste do CAC. Vinte e quatro horas após o condicionamento, os animais foram expostos novamente ao contexto por 5 min, onde tiveram o tempo de congelamento quantificado. Vinte e quatro horas após a 1ª sessão de reexposição, os ratos foram expostos ao contexto novamente por mais 5 min, tendo o tempo de congelamento quantificado (ver esquema na Figura 222A).

*Experimento 15: Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY na reconsolidação do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual*

No protocolo da reconsolidação do medo, foram utilizados 39 ratos divididos em 4 grupos experimentais: PBS (n=10), NPY 3 pmol (n=10), LP-NPY 1 pmol (n=10) e MDZ 1,5 mg/kg como controle positivo. Os animais foram inicialmente condicionados e após 24h, foram brevemente reexpostos ao contexto (sessão de reativação) por 3 min. Imediatamente após a sessão de reativação, os animais foram tratados com NPY, LP-NPY, MDZ ou PBS. Vinte e quatro horas após, os animais foram novamente expostos ao contexto (sessão teste), agora por 5 min, conforme esquema ilustrado na Figura 233A. O tempo de congelamento foi anotado tanto na sessão de reativação como na sessão teste.

### **3.9 Análise gráfica e estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A confecção dos gráficos foi feita utilizando-se o programa *Graph Pad Prism® 5.0* (Graph Pad Software, San Diego, EUA). As análises estatísticas foram feitas no programa *Statistica® 7.0* (Statsoft, Tulsa, EUA).

A análise de variância (um ou duas vias) foi utilizada em todos os experimentos, exceto na habituação ao campo aberto e na extinção. Quando necessário, o teste *post hoc* de Dunnett foi utilizado para detectar diferenças entre os grupos.

A ANOVA (um ou duas vias) para medidas repetidas seguidas de teste *post hoc* Newman-Keuls ou Dunnett (dependendo do protocolo) foi utilizada para detectar diferenças no tempo de congelamento durante as sessões de extinção e de reconsolidação. Nos resultados referentes aos experimentos do teste sem droga, realizados para demonstrar os

efeitos persistentes ou não das drogas testadas sobre a extinção foi usada a ANOVA (uma ou duas vias), seguido do teste *post hoc* de Dunnett.

O teste “t” de *Student* pareado foi utilizado para verificar se houve diferenças entre os as sessões de habituação ao campo aberto.

O nível de significância considerado para todos os testes foi de  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 *Experimento 1: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY na consolidação de ratos avaliados no teste do CAC.*

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 99A. Os efeitos da administração i.c.v. de NPY (1; 3 ou 10 pmol) ou LP-NPY (0,1; 1; 3 ou 10 pmol) sobre a consolidação do medo no teste do CAC estão representados nas Figura 99A e 9B, respectivamente. O teste de análise de variância de uma via revelou um efeito significativo para o fator dose do NPY [ $F_{(3,37)}=9,42$ ;  $p=0,00009$ ]. A análise *post hoc* de Dunnett mostrou que as doses de NPY 3 e 10 pmol causaram uma diminuição no tempo de congelamento se comparadas ao grupo controle PBS ( $p<0,05$  e  $p<0,0001$ , respectivamente). O teste de análise de variância de uma via também mostrou um efeito significativo para o fator dose do LP-NPY [ $F_{(4,43)}=3,47$ ;  $p<0,05$ ]. A análise subsequente utilizando o teste *post hoc* de Dunnett mostrou que as doses de LP-NPY 1, 3 e 10 pmol causaram uma diminuição no tempo de congelamento se comparadas ao grupo controle PBS ( $p<0,05$  para todos os tratamentos).

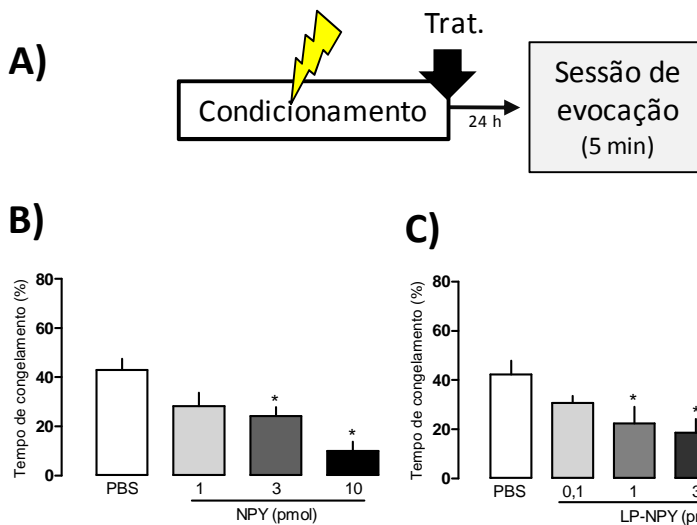


Figura 9 – Efeito da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY e LP-NPY na consolidação de ratos avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 1. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais tratados com NPY e submetidos à gaiola de condicionamento por 5 min. PBS/n=12; NPY 1 pmol/n=10; NPY 3 pmol/n=10; NPY 10 pmol/n=9. C) Tempo de congelamento expresso pelos animais tratados com LP-NPY e submetidos à gaiola de condicionamento por 5 min. PBS/n=13; LP-NPY 0,1 pmol/n=7; LP-NPY 1 pmol/n=10; LP-NPY 3 pmol/n=11; LP-NPY 10 pmol/n=7. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma dose. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS).

#### 4.2 Experimento 2: Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do CA

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 1010A. Os efeitos do NPY (1; 3 ou 10 pmol) ou LP-NPY (0,1; 1; 3 ou 10 pmol) sobre a locomoção no teste do CA estão representados nas Figura 1010B/D e 10C/E, respectivamente. O teste de análise de variância de uma via revelou um efeito significativo para o fator dose do NPY na locomoção total dos ratos [ $F_{(3,30)}=29,67$ ,  $p<0,0001$ ]. A análise subsequente utilizando o teste *post hoc* de Dunnett revelou que a dose de NPY 10 pmol provocou redução da locomoção total dos ratos em relação ao controle PBS ( $p<0,0001$ ). Conforme observado na Figura 1010D, no parâmetro de locomoção central, o teste de análise de variância de uma via também revelou um efeito significativo do fator dose  $F_{(3,30)}=13,83$ ,  $p<0,0001$ ), sendo que a análise subsequente utilizando o teste de *post hoc* de Dunnett, revelou que a dose de NPY 10 pmol provocou uma redução significativa da locomoção central dos ratos testados em relação ao controle PBS ( $p<0,0001$ ).

Com relação ao LP-NPY (Figura 1010C), a análise de variância de uma via revelou um efeito do fator dose na locomoção total dos ratos testados [ $F_{(4,40)}=8,31$ ,  $p<0,0001$ ]. A análise subsequente utilizando o teste *post hoc* de Dunnett indicou que as doses de LP-NPY 3 e 10 pmol apresentaram uma redução da locomoção total dos ratos quando comparadas ao controle PBS ( $p<0,01$  e  $p<0,001$ , respectivamente). No parâmetro locomoção central Figura 1010E, a análise de variância de uma via também revelou um efeito do fator dose [ $F_{(4,40)}=4,39$ ,  $p<0,01$ ], sendo que a análise subsequente utilizando o teste de *post hoc* de Dunnett demonstrou que a dose de LP-NPY 10 pmol reduziu a locomoção central dos ratos tratados quando comparados ao grupo controle PBS ( $p<0,05$ ).



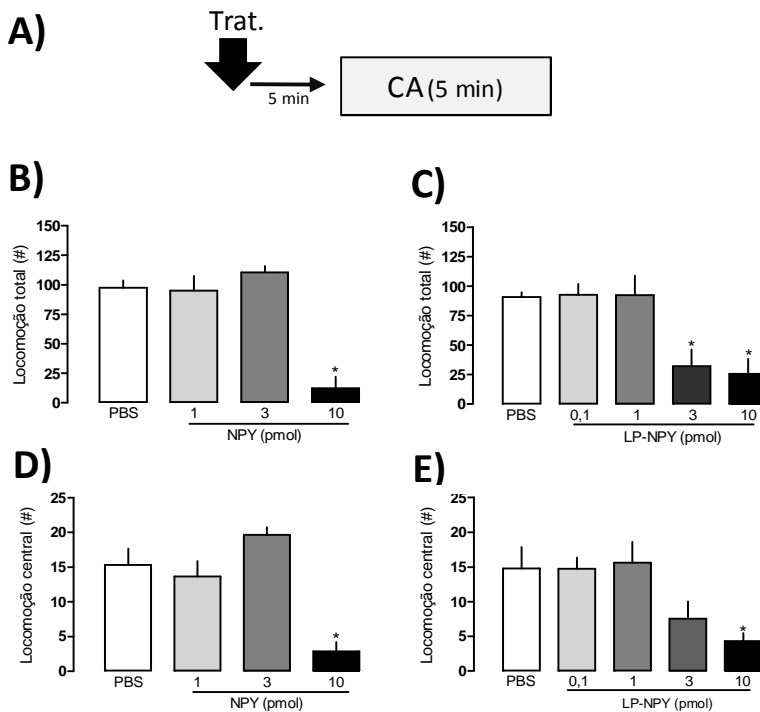


Figura 10 – Efeitos da administração i.c.v. de diferentes doses de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do Campo Aberto A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 2. B) Número total de quadrados cruzados no campo aberto em animais tratados com NPY e avaliados por 5 min. C) Número total de quadrados cruzados no campo aberto em animais tratados com LP-NPY e avaliados por 5 min. D) Número de quadrados cruzados na área central do campo aberto em animais tratados com NPY e avaliados por 5 min. E) Número de quadrados cruzados na área central do campo aberto em animais tratados com NPY e avaliados por 5 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma dose. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). B e D) PBS/n=11; NPY 1 pmol/n=6; NPY 3 pmol/n=9; NPY 10 pmol/n=8. C e E) PBS/n=10; LP-NPY 0,1 pmol/n=8; LP-NPY 1 pmol/n=9; LP-NPY 3 pmol/n=9; LP-NPY 10 pmol/n=9.

### 4.3 Experimento 3: Efeitos da administração i.c.v de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do LCE

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 11A. Os efeitos do NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol sobre a entrada nos braços do LCE estão representados nas Figura 11B e 11C. O teste de análise de variância de uma via não indicou efeito significativo para o fator tratamento, tanto no parâmetro tempo gasto como nas entradas nos braços abertos do LCE [ $F_{(2,32)}=0,04$ ;  $p=0,95$  e  $F_{(2,32)}=0,03$ ;  $p=0,96$ , respectivamente]. Também, o número de entradas nos braços fechados não mostrou diferenças significativas entre os grupos avaliados, conforme analisado pelo teste de análise de variância de uma via [ $F_{(2,32)}=1,53$ ;  $p=0,23$ ].

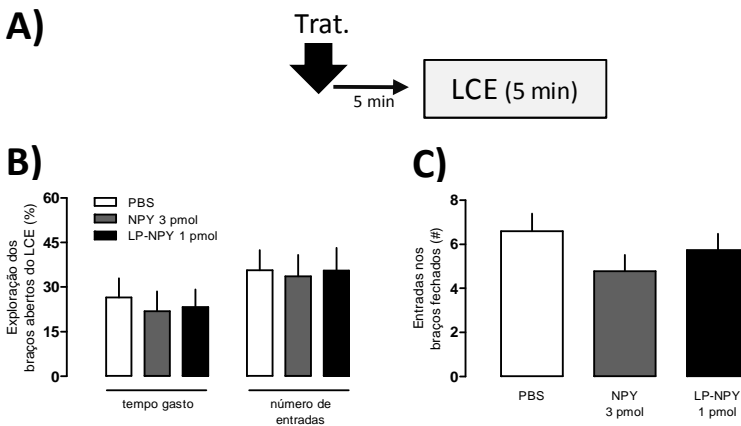
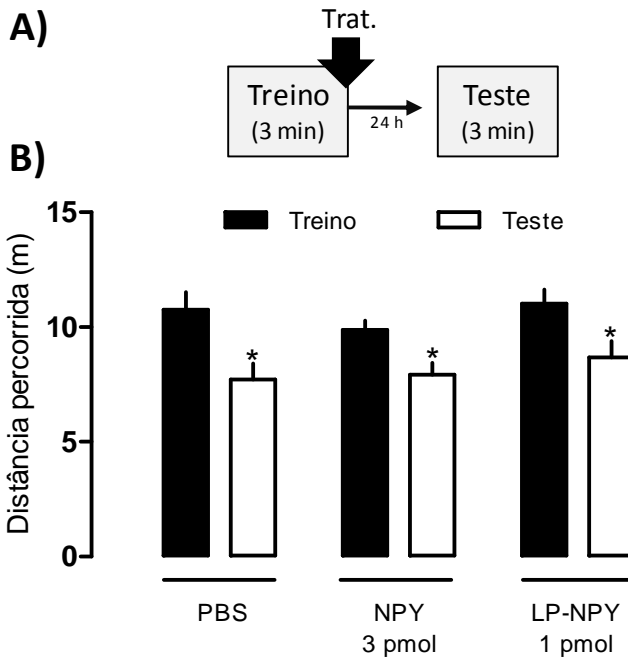


Figura 11 - Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 3. B) Entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado dos animais tratados com NPY ou LP-NPY e avaliados por 5 min. C) Número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado dos animais tratados com NPY ou LP-NPY e avaliados por 5 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma dose. PBS/n=10; NPY/n=9 e LP-NPY/n=11.

#### 4.4 Experimento 4: Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na habituação de ratos avaliados no teste do CA

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 122A. Os efeitos do NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol na habituação ao CA estão representados nas Figura 122B, respectivamente. Inicialmente, foi conduzido o teste de análise de variância de uma via entre os diferentes grupos de tratamento para verificar a atividade locomotora dos animais avaliados (sessão treino). Nenhuma diferença significativa foi observada na distância percorrida entre os ratos tratados com PBS, NPY e LP-NPY [ $F_{(3,38)}=0,521$ ;  $p=0,67$ ]. Para verificar se ocorreu uma diminuição da distância percorrida (habituação) nos ratos testados durante a segunda exposição (sessão teste), o teste “t” de *student* foi conduzido dentro de cada grupo de tratamento (sessão treino x sessão teste), revelando uma diminuição da distância percorrida na sessão teste em comparação com a sessão treino [PBS ( $t=5,40$ ;  $p=0,001$ )], [NPY ( $t=3,15$ ;  $p=0,01$ )] e [LP-NPY( $t=2,99$ ;  $p=0,01$ )].



**Figura 12** - Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na habituação de ratos avaliados no teste do Campo aberto. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 4. B) Distância percorrida pelos animais tratados com NPY ou LP-NPY e avaliados em duas exposições de 3 min com 24 h de intervalo, no campo aberto (cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo treino do dentro do respectivo grupo de tratamento. PBS/n=11; NPY/n=12 e LP-NPY/n=12.

#### 4.5 Experimento 5: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na aquisição do medo em ratos avaliados no teste do CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 133A. Os efeitos do pré-tratamento i.c.v. com o antagonista Y1 BIBO 200 pmol, e do tratamento i.c.v. com NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol sobre a aquisição do medo no teste do CAC estão representados na Figura 133B. O teste de análise de variância de duas vias (pré-tratamento x tratamento) revelou uma diferença significativa do fator tratamento [ $F_{(2,51)}=6,52$ ;  $p=0,01$ ], mas não do fator pré-tratamento [ $F_{(1,51)}=0,66$ ;  $p=0,41$ ] e da interação dos

fatores pré-tratamento e tratamento [ $F_{(2,51)}=1,46$ ;  $p=0,24$ ]. A análise com o teste *post hoc* de Newman-Keuls revelou uma redução do tempo de congelamento em ratos tratados com PBS+NPY e PBS+LP-NPY quando comparado com ratos controle PBS+PBS ( $p<0,05$  e  $p<0,01$ , respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os demais grupos.

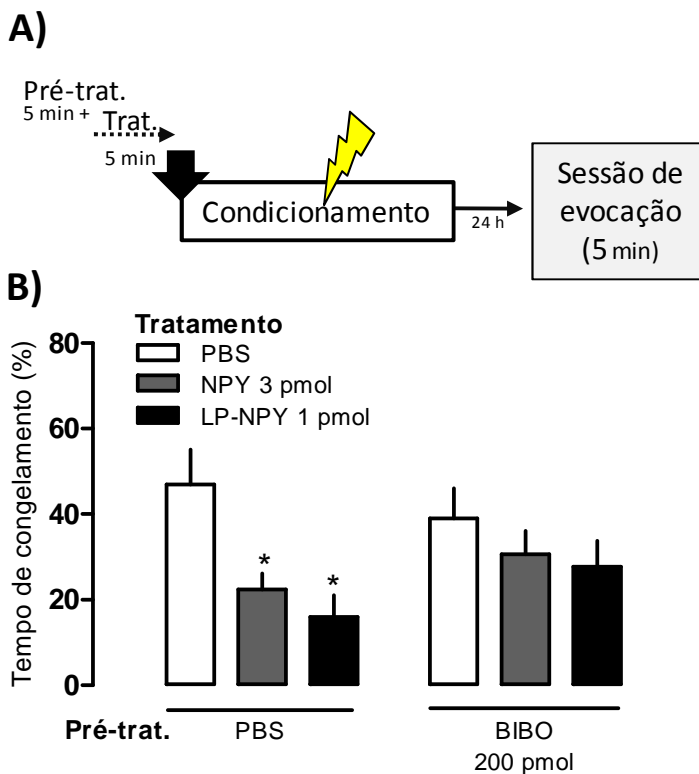


Figura 13 - Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na aquisição do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 5. B) Tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com BIBO e tratados com NPY ou LP-NPY avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual por 5 min (cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de um tratamento). \* $p<0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). PBS+PBS/ $n=10$ ; PBS+NPY/ $n=11$ ; PBS+LP-NPY/ $n=10$ ; BIBO+PBS/ $n=8$ ; BIBO/NPY/ $n=9$  e BIBO/LP-NPY/ $n=9$ .

4.6 *Experimento 6: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na consolidação do medo em ratos avaliados no teste do CAC*

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 144A. A Figura 144B mostra os efeitos do pré-tratamento i.c.v com PBS ou BIBO 200 pmol seguido de tratamento com PBS, NPY (3 pmol) ou LP-NPY (1 pmol) na consolidação do CAC. O teste de análise de variância de duas vias (pré-tratamento x tratamento) mostrou uma diferença significativa no fator tratamento [ $F_{(1,55)}=9,54$ ;  $p<0,01$ ] além de uma interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [ $F_{(2,55)}=3,79$ ;  $p<0,05$ ]. Não houve diferenças significativas no fator tratamento [ $F_{(2,55)}=2,77$ ;  $p=0,07$ ]. A análise subsequente com o teste *post hoc* de Newman-Keuls mostrou uma redução do tempo de congelamento em ratos tratados com PBS+NPY e PBS+LP-NPY comparados com o controle PBS+PBS ( $p<0,05$  e  $p<0,05$ , respectivamente). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os demais grupos.

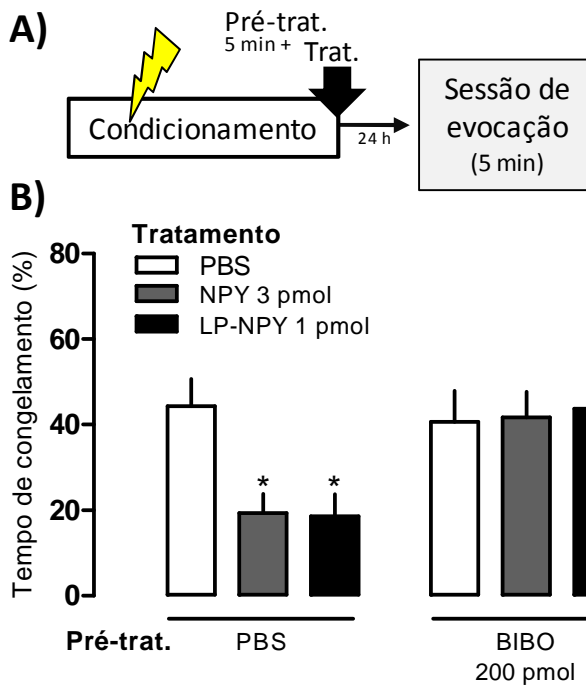


Figura 14 – Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y1 BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na consolidação do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 6. B) Tempo de congelamento expressa pelos animais pré-tratados com BIBO e tratados com NPY ou LP-NPY avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual por 5 min (cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de um tratamento). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). PBS+PBS/n=11; PBS+NPY/n=10; PBS+LP-NPY/n=9; BIBO+PBS/n=10; BIBO/NPY/n=11 e BIBO/LP-NPY/n=10.

#### 4.7 Experimento 7: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista BIBO sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na extinção do medo em ratos avaliados no teste do CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 155A. A Figura 155B mostra os efeitos do pré-tratamento i.c.v com PBS ou BIBO 200 pmol seguido de tratamento com PBS, NPY (3 pmol) ou LP-NPY (1 pmol) na extinção do medo no teste do CAC. O teste de análise de variância de duas vias (pré-tratamento e tratamento) com medidas repetidas (sessão de extinção) revelou um efeito significativo dos fatores tratamento [ $F_{(2,69)}=7,77$ ;  $p=0,001$ ], interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F_{(2,69)}=13,48$ ;  $p=0,0001$ ], sessão de extinção [ $F_{(2,138)}=56,33$ ;  $p=0,0001$ ] e interação entre a sessão de extinção e pré-tratamento [ $F_{(2,138)}=5,29$ ;  $p=0,01$ ]. Nenhuma diferença significativa foi observada no fator pré-tratamento [ $F_{(1,69)}=2,16$ ;  $p=0,14$ ] e nas interações entre a sessão de extinção e tratamento [ $F_{(4,138)}=1,25$ ;  $p=0,29$ ] e sessão de tratamento, pré-tratamento e tratamento [ $F_{(4,138)}=2,04$ ;  $p=0,09$ ]. Em uma análise subsequente destes dados, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento PBS+NPY diminuiu o tempo de congelamento na 2ª e na 3ª sessão comparadas com a 1ª sessão ( $p=0,001$  e  $p=0,0001$ , respectivamente), além de também diminuir significativamente o tempo de congelamento nas 2ª e 3ª sessões quando comparadas com as 2ª e 3ª sessões do grupo controle ( $p<0,05$  e  $p<0,05$ , respectivamente). Os ratos tratados com PBS+LP-NPY também tiveram o tempo de congelamento reduzido nas 2ª e 3ª sessões se comparadas à 1ª sessão ( $p<0,01$  e  $p<0,0001$ , respectivamente), mas o tratamento não foi capaz de promover diferenças significativas no tempo de congelamento quando comparamos as 2ª e 3ª sessões com as mesmas sessões do grupo controle ( $p=0,23$  e  $p=0,21$ , respectivamente). Os ratos tratados com PBS+PBS, BIBO+PBS e BIBO+LP-NPY somente mostraram redução do tempo de congelamento na 3ª sessão comparada com a 1ª sessão ( $p<0,01$ ;  $p<0,01$  e  $p<0,01$ ). Em adição, para verificar a influência do tratamento na expressão do medo no teste do CAC, teste *post hoc* de Newman-Keuls não encontrou diferenças entre os grupos tratados comparados com controle (PBS+NPY  $p=0,62$ ; PBS+LP-NPY  $p=0,57$ ; BIBO+PBS  $p=0,61$ ; BIBO+NPY  $p=0,60$ ; BIBO+LP-NPY  $p=0,86$ ).

A ANOVA de uma via para a sessão sem droga (Figura 155C) mostrou uma interação significativa entre os fatores pré-tratamento e tratamento [ $F_{(2,69)}=12,13$ ;  $p<0,0001$ ] mas não nos fatores pré-tratamento [ $F_{(1,69)}=0,003$ ;  $p=0,95$ ] e tratamento [ $F_{(2,69)}=2,81$ ;  $p=0,06$ ]. O teste *post hoc* de Dunnett revelou que houve uma diminuição do tempo de



congelamento nos grupos tratados com PBS+NPY, PBS+LP-NPY, BIBO+PBS e BIBO+NPY comparado com o grupo controle na sessão sem droga ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente).

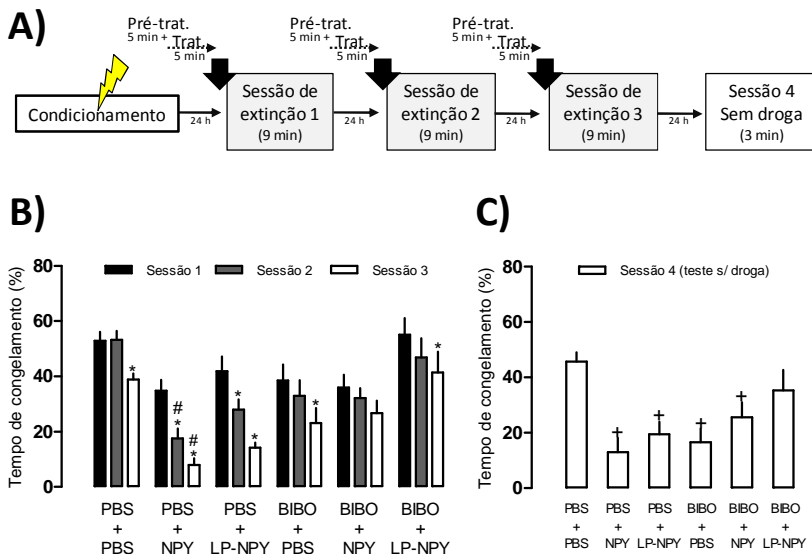


Figura 15 - Efeitos da administração i.c.v. do antagonista BIBO3304 sobre a resposta do NPY ou LP-NPY na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 7. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais pré-tratados com BIBO e tratados com NPY ou LP-NPY e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento aversivo contextual, com intervalo de 24h. C) Tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante a única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão. \* $p < 0,05$  comparado à primeira sessão de extinção do respectivo grupo de tratamento. # $p < 0,05$  comparado com a mesma sessão de extinção do grupo controle (PBS). + $p < 0,05$  comparado ao grupo controle da sessão sem droga. PBS+PBS/n=15; PBS+NPY/n=13; PBS+LP-NPY/n=12; BIBO+PBS/n=11; BIBO/NPY/n=12 e BIBO/LP-NPY/n=12.

#### 4.8 Experimento 8: Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y2 BIIE na extinção do medo em ratos avaliados no teste do CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 166A. A Figura 166B mostra os efeitos do tratamento com diferentes doses (0,3 e 1 nmol) do antagonista Y2 BIIE na extinção do medo no teste do CAC. O teste de análise de variância de um via de medidas repetidas revelou diferenças significativas nos fatores tratamento [ $F_{(2,23)}=36,53$ ;  $p<0,0001$ ] e sessão de extinção [ $F_{(2,46)}=6,55$ ;  $p<0,01$ ] mas não a interação entre tratamento e as sessões de extinção [ $F_{(4,46)}=93,79$ ;  $p=0,37$ ]. O teste *post hoc* de Neuman-Keuls indicou que os grupos tratados com BIIE não tiveram o tempo de congelamento alterado nas sessões 2 e 3 quando comparadas com a 1ª sessão. Todavia, os ratos tratados com BIIE, em ambas as doses, diferiram do grupo controle PBS em todas as sessões (BIIE 0,3 nmol,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$  e  $p<0,001$ , sessões 1, 2 e 3, respectivamente) e (BIIE 1 nmol,  $p<0,0001$ ,  $p<0,001$  e  $p<0,001$ ).

Na sessão de extinção sem droga (Figura 166C), a ANOVA de uma via revelou que o fator tratamento apresentou diferenças significativas [ $F_{(2,23)}=15,45$ ;  $p<0,0001$ ]. A análise *post hoc* com o teste de Dunnett mostrou que tanto os animais tratados com o BIIE 0,3 nmol quanto os ratos tratados administrados com BIIE 1 nmol apresentaram redução do tempo de congelamento em comparação com o grupo controle PBS ( $p<0,001$  e  $p<0,001$ , BIIE 0,3 e 1 nmol, respectivamente).

A Figura 166D mostra a comparação entre os minutos iniciais e finais da sessão de extinção 1. O teste “t” de *student* pareado foi realizado dentro de cada grupo para verificar a existência de extinção dentro da sessão. Nenhum dos grupos avaliados (PBS, BIIE 0,3 e 1 nmol) apresentou diferença estatisticamente significativa entre o período inicial e final durante a sessão 1.

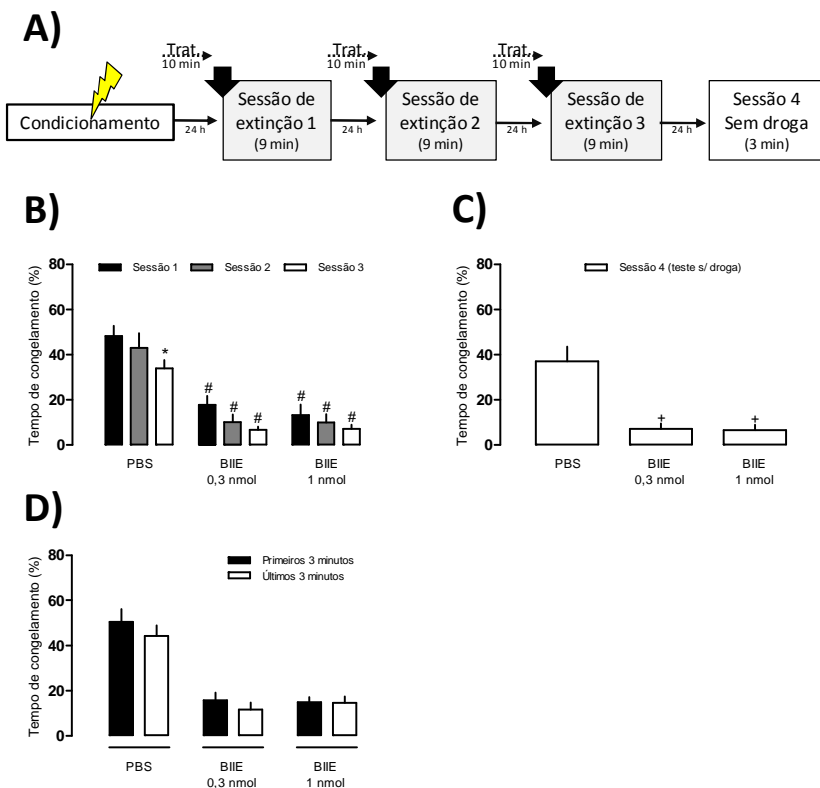


Figura 16 – Efeitos da administração i.c.v. do antagonista Y2 BIIE na extinção do medo em ratos avaliados no teste do Condicionado Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 8. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais tratados com BIIE e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento aversivo contextual, com intervalo de 24 h. C) Tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. D) Tempo de congelamento inicial e final da sessão de extinção 1. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de cada sessão. \* $p < 0,05$  comparado à primeira sessão de extinção do respectivo grupo de tratamento. # $p < 0,05$  comparado com a mesma sessão de extinção do grupo controle (PBS). + $p < 0,05$  comparado ao grupo controle da sessão sem droga. PBS/n=9; BIIE 0,3 nmol/n=8; BIIE 1 nmol/n=10.

#### 4.9 Experimento 9: Efeitos da administração i.c.v. de BIBO e BIIE na extinção do medo avaliada em ratos no teste do CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 177A. A Figura 177B mostra os efeitos do pré-tratamento com BIBO 200 pmol e do tratamento com o BIIE 0,3 nmol na extinção do medo no teste do CAC. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou que houve um efeito estatisticamente significativo nos fatores pré-tratamento e tratamento, além da interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F_{(1,35)}=8,21$ ;  $p<0,01$ ], [ $F_{(1,35)}=13,47$ ;  $p<0,001$ ] e [ $F_{(1,35)}=32,51$ ;  $p=0,0001$ , respectivamente]. A ANOVA também indicou diferenças significativas no fator sessão de extinção [ $F_{(2,70)}=10,77$ ;  $p=0,0001$ ]. Uma análise subsequente com o teste *pos hoc* de Newman-Keuls revelou que houve redução do tempo de congelamento dos ratos tratados com PBS+BIIE em todas as sessões em relação ao grupo controle PBS (sessão 1,  $p<0,05$ ; sessão 2,  $p<0,001$  e sessão 3,  $p<0,001$ ). Também se observou que o grupo tratado com BIBO+BIIE se diferenciou estatisticamente do grupo PBS+BIIE, mostrando um tempo que congelamento maior em todas as sessões de extinção (sessão 1,  $p<0,05$ ; sessão 2,  $p<0,01$  e sessão 3,  $p<0,05$ ).

Na sessão de extinção sem droga (Figura 177C) a ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa na interação do pré-tratamento e o tratamento [ $F_{(1,35)}=6,39$ ;  $p<0,01$ ]. A análise *post hoc* com o teste de Dunnett mostrou que os animais tratados com o PBS+BIIE 0,3 nmol apresentaram redução do tempo de congelamento em comparação com o grupo controle PBS ( $p<0,05$ ).

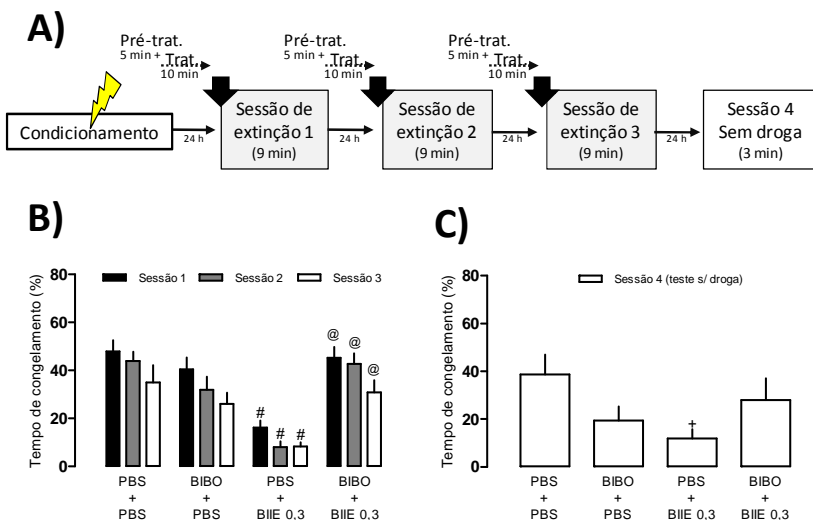


Figura 17 – Efeitos da administração i.c.v. de BIBO e BIIE na extinção do medo avaliada em ratos no teste do Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 9. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais pré-tratados com BIBO e tratados com BIIE e submetidos a 3 exposições de 9 min à gaiola de condicionamento aversivo contextual, com intervalo de 24 h. C) Tempo de congelamento expressa pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. à gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24 h após a última sessão de extinção. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão. # $p < 0,05$  comparado com a mesma sessão de extinção do grupo controle (PBS). @ $p < 0,05$  comparado com a respectiva sessão do grupo PBS+BIBO. + $p < 0,05$  comparado ao grupo controle da sessão sem droga. PBS+PBS/ $n=10$ ; BIBO+PBS/ $n=10$ ; PBS+BIIE/ $n=10$ ; BIBO+BIIE/ $n=9$ .

#### 4.10 Experimento 10: Efeitos do AE na extinção do medo em ratos avaliados no CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 188A. A Figura 188B mostra os efeitos do AE na extinção do medo de ratos avaliados no CAC. A ANOVA de uma via de medidas repetidas revelou haver uma diferença estatística nos fatores moradia (AE ou padrão), repetições (sessão de extinção) e na interação entre a moradia e as sessões de extinção [ $F_{(1,18)}=10,82$ ;  $p < 0,01$ ], [ $F_{(2,36)}=34,22$ ;  $p < 0,0001$ ] e [ $F_{(2,36)}=7,86$ ;  $p < 0,01$ ], respectivamente. Em uma análise subsequente, o teste *post hoc*

de Newman-Keuls demonstrou que os animais que foram submetidos ao AE apresentaram uma redução significativa do tempo de congelamento nas sessões 2 e 3 quando comparadas com a 1ª sessão de extinção ( $p < 0,001$ ). Além disso, a 2ª sessão dos ratos “enriquecidos” teve um tempo de congelamento significativamente menor do que o grupo PBS da mesma sessão ( $p < 0,05$ ). Por sua vez, os ratos do grupo PBS tiveram uma redução significativa do tempo de congelamento apenas na 3ª sessão quando comparada com a 1ª sessão de extinção ( $p < 0,001$ ).

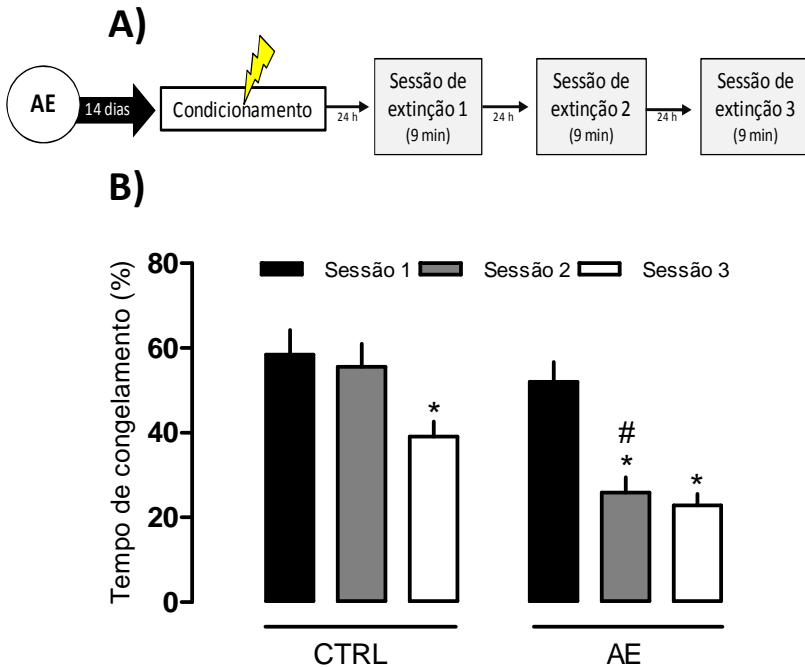


Figura 18 – Efeitos do Ambiente Enriquecido na extinção do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 10. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais que foram hospedados no ambiente enriquecido e submetidos a 3 exposições de 9 min, ao condicionamento aversivo contextual, com intervalo de 24 h. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão. \* $p < 0,05$  comparado com a primeira sessão do respectivo grupo. # $p < 0,05$  comparado a respectiva sessão do grupo controle (CTRL). CTRL/n=10 e AE/n=10.

*4.11 Experimento 11: Efeitos do Ambiente Enriquecido na expressão do receptor Y1 de ratos expostos ao teste do Condicionamento Aversivo Contextual.*

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 19A. A Figura 19B mostra os efeitos do AE e do teste do CAC na expressão do receptor Y1 no hipocampo de ratos. A ANOVA de duas vias revelou um efeito de condicionamento e uma interação do condicionamento com a moradia dos animais [ $F_{(1,50)}=7,45$ ;  $p<0,01$  e  $F_{(1,50)}=10,35$ ;  $p<0,01$ , respectivamente)]. Não foi observado um efeito de moradia [ $F_{(1,50)}=3,27$ ;  $p=0,07$ ]. Em análise posterior, o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o grupo submetido ao AE e ao teste do CAC se diferenciou de todos os outros grupos experimentais (padrão+sem CAC,  $p<0,01$ ; padrão+CAC,  $p<0,01$  e AE+sem CAC,  $p<0,001$ ).

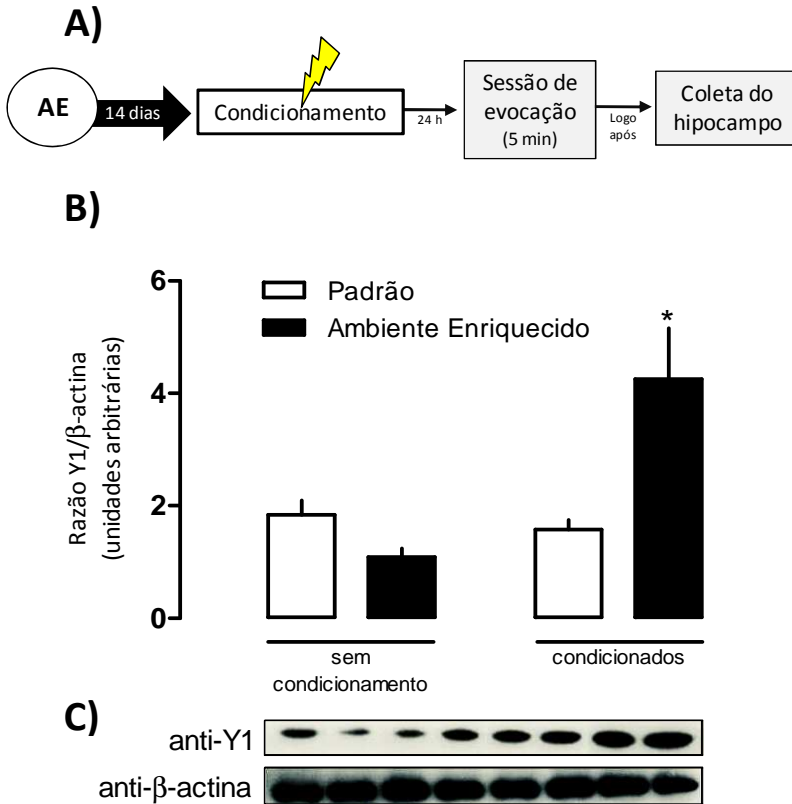


Figura 19 - Efeitos do Ambiente Enriquecido na expressão do receptor Y1 de ratos expostos ao teste do Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 11. B) Média  $\pm$  E.P.M da representação da razão entre valores médios de três quantificações distintas, expressos em unidades arbitrárias, do *Western blot* para o receptor Y1, corrigidos pelo valor do controle genômico  $\beta$ -actina. C) Imagens ilustrativas das bandas obtidas por *Western blot* para o receptor Y1 (43 kDa) e para o controle genômico  $\beta$ -actina (43 kDa), sendo 2 bandas para cada grupo, conforme ordem das barras do gráfico. (N=4-5/grupo). \* $p < 0,05$ ; quando comparado aos outros grupos.



#### 4.12 Experimento 12: Efeito da administração do antagonista Y1 BIBO sobre a facilitação da extinção do medo no teste do CAC induzido pelo AE

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrado na Figura 2020A. A Figura 2020B mostra os efeitos da administração do antagonista Y1 BIBO nas repostas do AE na extinção do medo de ratos avaliados no CAC. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou um efeito significativo dos fatores moradia (AE e padrão) e das repetições (sessão de extinção). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou uma diferença significativa nos fatores moradia e repetição [ $F_{(1,39)}=6,17$ ;  $p<0,05$ ] e repetições [ $F_{(2,78)}=23,89$ ;  $p<0,0001$ ] mas não nos fatores tratamento [ $F_{(1,39)}=0,05$ ;  $p=0,82$ ] e nas interações moradia e tratamento [ $F_{(1,39)}=2,99$ ;  $p=0,09$ ], repetições e moradia [ $F_{(2,78)}=0,67$ ;  $p=0,51$ ], repetições e tratamento [ $F_{(2,78)}=2,51$ ;  $p=0,08$ ] e repetições, moradia e tratamento [ $F_{(2,78)}=1,59$ ;  $p=0,20$ ]. A análise subsequente com o teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que o AE facilitou a extinção do medo através da redução do tempo de congelamento nas sessões 2 e 3, comparadas com a 1ª sessão ( $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente). Por sua vez, o grupo submetido ao AE e tratado com o BIBO apresentou redução do congelamento somente na 3ª sessão, se comparada com a 1ª sessão.

A ANOVA de duas vias para a sessão sem droga Figura 2020C mostrou uma diferença significativa no fator moradia [ $F_{(1,39)}=10,22$ ;  $p<0,01$ ], mas não no fator tratamento [ $F_{(1,39)}=0,68$ ,  $p=0,41$ ] e na interação moradia e tratamento [ $F_{(1,39)}=3,74$ ;  $p=0,06$ ]. O teste *post hoc* de Dunnett revelou que houve uma diminuição do tempo de congelamento em ambos os grupos submetidos ao AE ( $p<0,01$  e  $p<0,05$ , para o tratamento PBS e BIBO, respectivamente).

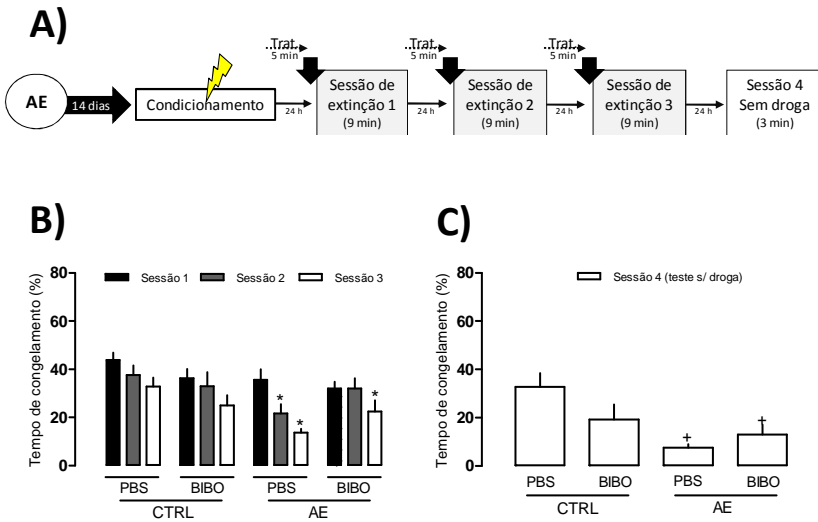


Figura 20 – Efeito da administração do antagonista Y1 BIBO sobre a facilitação da extinção do medo no teste do Condicionamento Aversivo Contextual induzido pelo ambiente enriquecido. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 12. B) Tempo de congelamento expressa pelos animais que foram hospedados no ambiente enriquecido, tratados com BIBO e submetidos a 3 exposições de 9 min, ao condicionamento aversivo contextual, com intervalo de 24 h. C) Tempo de congelamento expresso pelos mesmos grupos de animais durante uma única exposição de 3 min. À gaiola de condicionamento, na ausência de tratamento farmacológico, 24h após a última sessão de extinção. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão \* $p < 0,05$  comparado com a primeira sessão do respectivo grupo. + $p < 0,05$  comparado com o grupo controle da sessão sem droga (CTRL). CTRL/ $n=10$  e AE/ $n=10$ .

#### 4.13 Experimento 13: Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na consolidação tardia do medo de ratos avaliados no CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 211A. A Figura 211B mostra os efeitos do tratamento com NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol realizados 3 h após a aquisição do medo em ratos avaliados no teste do CAC. A ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa no fator tratamento [ $F_{(2,27)}=6,18$ ;  $p<0,01$ ]. O teste *post hoc* de Dunnett revelou que houve uma redução do tempo de congelamento nos ratos tratados com NPY e LP-NPY se comparados com o controle PBS ( $p<0,05$  e  $p<0,01$ , respectivamente).

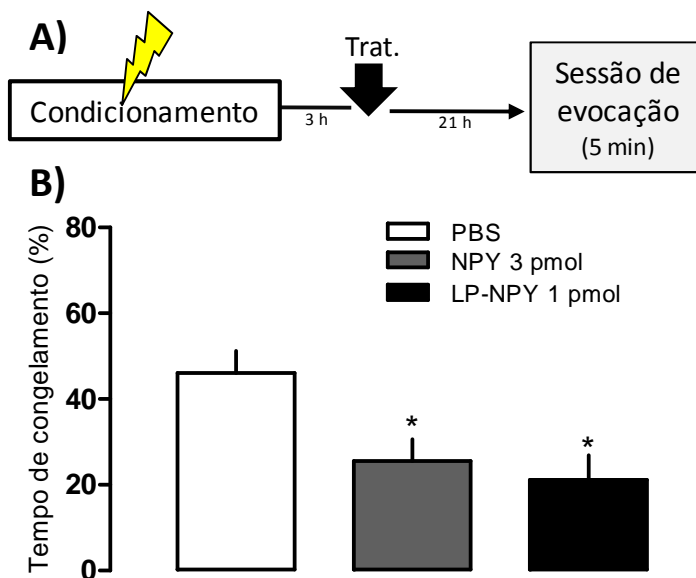


Figura 21 – Efeitos da administração i.c.v. do NPY ou LP-NPY na consolidação tardia do condicionamento do medo de ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 13. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais tratados com NPY ou LP-NPY e submetidos ao condicionamento aversivo contextual

por 5 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de um tratamento. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (PBS). PBS/n=10; NPY/n=9; LP-NPY/n=11.

#### 4.14 Experimento 14: Efeitos de longo prazo da administração do NPY e LP-NPY na evocação do medo em ratos avaliados no teste do CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 222A. A Figura 222B mostra os efeitos do tratamento com NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol realizados 7 dias antes da aquisição do medo em ratos avaliados no teste do CAC. A aplicação da ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou haver um efeito significativo no fator tratamento [ $F_{(2,28)}=5,27$ ;  $p < 0,01$ ] e sessão (1 e 2) [ $F_{(2,28)}=17,15$ ;  $p < 0,001$ ]. No entanto, não houve diferença significativa na interação entre os fatores tratamento e repetição [ $F_{(2,28)}=2,57$ ;  $p=0,09$ ]. Uma análise subsequente utilizando o teste *post hoc* Newman-Keuls revelou que os grupos NPY e LP-NPY da 2ª sessão apresentaram redução do tempo de congelamento em relação à 1ª sessão dos respectivos grupos ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Além disso, os ratos tratados com NPY apresentaram tempo de congelamento reduzido em relação ao grupo PBS, quando comparados durante a 2ª sessão ( $p < 0,03$ ).

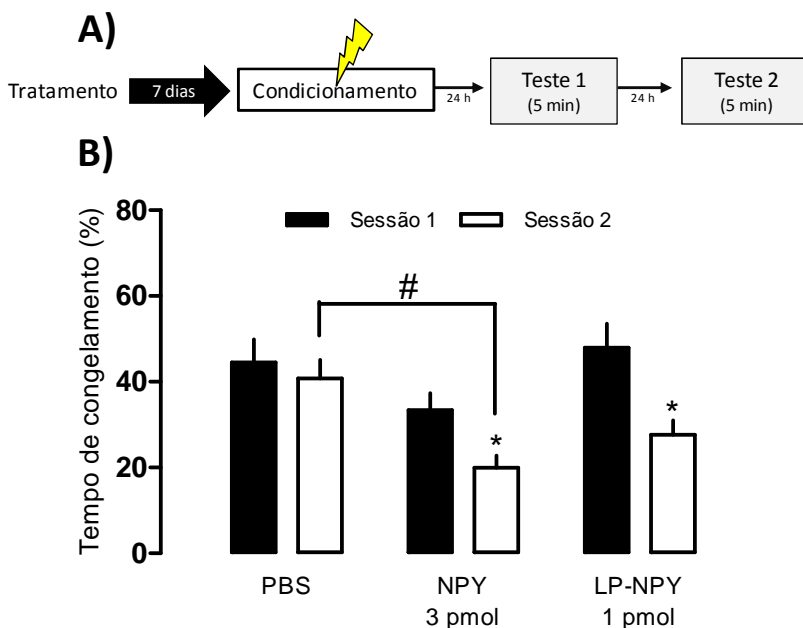


Figura 22 – Efeitos de longo prazo da administração do NPY e LP-NPY na evocação do medo em ratos avaliados no teste do condicionamento aversivo contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 14. B) Tempo de congelamento expresso pelos animais tratados com NPY ou LP-NPY e submetidos, 7 dias depois, ao condicionamento aversivo contextual por 5 min e re-exposto 24 h após. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão. \* $p < 0,05$  comparado à sessão 1 do respectivo grupo. # $p < 0,05$  comparado com a mesma sessão do grupo controle (PBS). PBS/n=11; NPY/n=11; LP-NPY/n=10.

#### 4.15 Experimento 15: Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY na reconsolidação do medo em ratos avaliados no CAC

A representação esquemática do procedimento utilizado neste experimento encontra-se ilustrada na Figura 233A. A Figura 233B mostra os efeitos do tratamento com NPY 3 pmol ou LP-NPY 1 pmol na reconsolidação do medo em ratos avaliados no teste do CAC. Um grupo adicional, tratado com midazolam 1,5 mg/kg foi utilizado como controle

positivo. A ANOVA de uma via de medidas repetidas revelou um efeito significativo no fator repetição (reativação e teste) além de uma interação entre os fatores tratamento e repetição [ $F_{(3,34)}=11,33$ ;  $p<0,001$  e  $F_{(3,34)}=4,04$ ;  $p<0,05$ , respectivamente]. Não houve diferença estatística no fator tratamento [ $F_{(3,34)}=1,55$ ;  $p=0,21$ ]. O teste *post hoc* de Newman-Keuls indicou que houve redução do tempo de congelamento nos ratos tratados com NPY ou MDZ na sessão de teste quando comparado com a sessão de reativação ( $p<0,05$  em ambos). Um teste adicional de Dunnett na sessão de teste indicou que os animais tratados com NPY e MDZ apresentaram redução do tempo de congelamento quando comparados com os ratos PBS da mesma sessão de teste ( $p<0,05$  em ambos). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos na sessão de reativação.

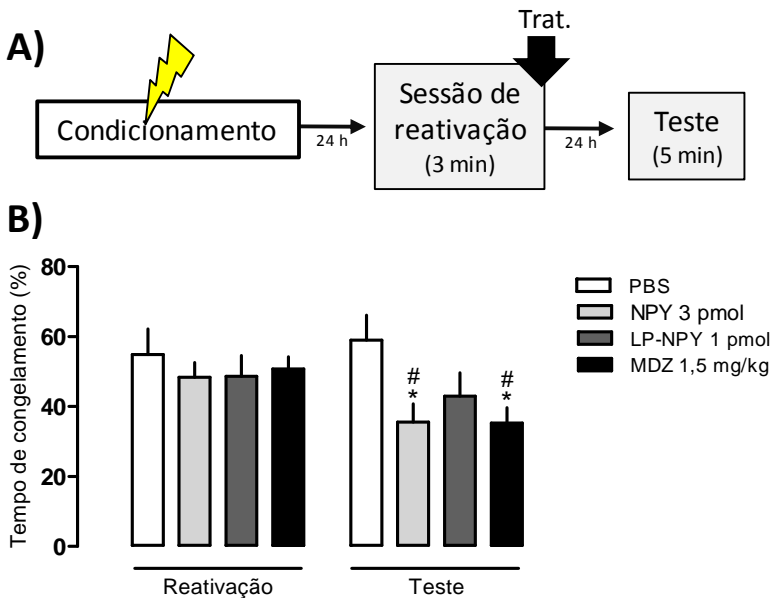


Figura 23 - Efeitos da administração i.c.v. de NPY ou LP-NPY na reconsolidação do medo em ratos avaliados no Condicionamento Aversivo Contextual. A) Representação esquemática do protocolo utilizado no experimento 15. B) Tempo de congelamento expressa pelos animais tratados com NPY ou LP-NPY e submetidos ao protocolo de reconsolidação do medo, composta por duas exposições ao contexto com intervalo de 24 h (3 min na reativação e 5 min no teste). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. dos dados de uma sessão). \* $p<0,05$  comparado ao grupo controle (PBS) dentro da sessão

teste. # $p < 0,05$  comparada com o mesmo grupo na sessão de reativação. PBS/n=10; NPY/n=10; LP-NPY/n=10.

## 5 DISCUSSÃO

A principal hipótese do presente trabalho foi identificar se o neuropeptídeo Y é um agente promotor de resiliência nas respostas de medo de ratos. Para este propósito lançamos mão do teste comportamental do condicionamento aversivo contextual e de técnicas de imunodeteção da proteína do receptor Y1 no hipocampo. Os resultados obtidos a partir destas abordagens reafirmam achados da literatura os quais mostram uma participação importante do sistema NPY nas respostas ao estresse, como observado em todos os testes comportamentais testados neste estudo e vai além ao mostrar a importância do receptor Y1 na promoção da resiliência ao estresse através da facilitação da extinção do medo condicionado, observado em diferentes aspectos em nosso estudo, como 1) bloqueando a ação da injeção central de NPY e de NPY endógeno com o uso de antagonista Y1 e, 2) através do aumento da expressão do receptor Y1 no hipocampo em ratos submetidos ao ambiente enriquecido e a situações traumáticas. Tais achados reforçam o papel chave do NPY na formação e gerenciamento de memórias aversivas, sugerindo que o NPY, exógeno ou endógeno, possa atuar como estratégia terapêutica em pacientes com psicopatologias decorrentes de memórias aversivas.

### *Testando a eficácia de baixas doses de NPY e LP-NPY no teste do CAC*

Nem sempre é dada a devida atenção à influência da atividade locomotora em paradigmas envolvendo comportamentos de congelamento ou sobressalto (Gutman, Yang *et al.*, 2008; Fendt, Burki *et al.*, 2009). Sabe-se, no entanto que o NPY e seus receptores exercem um importante papel na atividade locomotora dos animais, sendo que dependendo da dose utilizada, a manipulação do sistema NPY pode promover hipolocomoção (Sorensen, Lindberg *et al.*, 2004; Karl, Duffy *et al.*, 2008) ou sedação (Sorensen, Lindberg *et al.*, 2004), à atividade normal (Redrobe, Dumont *et al.*, 2003; Sorensen, Lindberg *et al.*, 2004; Thorsell, Repunte-Canonigo *et al.*, 2007) e hiperlocomoção (Sorensen, Lindberg *et al.*, 2004). Para evitar esse viés, analisamos previamente a atividade locomotora das doses que pretendíamos utilizar, sendo que a dose escolhida não apresentou mudanças no número total de quadrantes cruzados no CA, nem no número de entradas nos braços fechados do

LCE, já que tanto a hipo- como a hiperlocomoção poderia levar a um resultado falso positivo com relação ao comportamento de congelamento.

Embora a ansiedade e o medo caminhem relativamente juntos, compartilhando de múltiplas vias em comum, drogas ansiolíticas clássicas como os benzodiazepínicos falham tanto em promover melhora nas respostas de medo, como em prejudicar a aquisição ou facilitar a extinção das memórias de medo (Haller, 2001; Pamplona, Bitencourt *et al.*, 2008; Pego, Morgado *et al.*, 2008). De acordo com o conhecimento sobre o perfil ansiolítico do NPY e de agonistas do receptor Y1 (Kask, Harro *et al.*, 2002; Zhou, Zhu *et al.*, 2008; Rotzinger, Lovejoy *et al.*, 2010), os efeitos do NPY na emocionalidade são usualmente relacionados com a dose usada, promovendo um efeito dependente da dose (Nakajima, Inui *et al.*, 1998). Nakajima, Inui *et al.* (1998) utilizando doses na faixa do *picomolar* por via *i.c.v.* de NPY e LP-NPY, encontraram uma curva dose-resposta em sino no LCE (NPY 7 pmol, ansiogênico; 70 pmol, sem efeito; 700 pmol, ansiolítico – LP-NPY 7 pmol e 700 pmol, sem efeito; 70 pmol, ansiogênico). Outros estudos também evidenciaram a ausência de efeito ansiolítico na manipulação do NPY. A administração intra-amígdala (NPY 5 nmol; LP-NPY 1 nmol) ou intra-septo lateral (NPY 0.35 nmol) não promoveram mudanças na exploração dos braços abertos do LCE em ratos (Kokare, Dandekar *et al.*, 2005; Trent e Menard, 2011), corroborando com nossos achados sobre a ausência de ação do NPY e do LP-NPY em promover comportamentos do tipo ansiolítico no LCE e CA.

Embora alguns estudos sugeriram um papel facilitador do NPY com relação aos processos de memória e aprendizado (Morley e Flood, 1990; Redrobe, Dumont *et al.*, 1999; Redrobe, Dumont *et al.*, 2004), outros têm mostrado um padrão mais complexo para o papel do NPY na cognição, indicando que a manipulação do sistema NPY promove atenuação ou ausência da consolidação da memória em tarefas dependentes do hipocampo, acompanhadas por um prejuízo na indução de potencialização de longo prazo (LTP, da sigla em inglês) e diminuição da liberação de glutamato em estudos farmacológicos e genéticos (Bannon, Seda *et al.*, 2000; Carvajal, Vercauteren *et al.*, 2004; Sorensen, Kanter-Schlifke, Carli *et al.*, 2008; Sorensen, Kanter-Schlifke, Lin *et al.*, 2008; Sorensen, Nikitidou *et al.*, 2009). Nosso estudo está em acordo com a literatura citada acima e indica um papel específico nas respostas de medo avaliadas no teste do CAC.



### *A injeção de NPY e a participação do receptor Y1 no teste do CAC*

Os ratos tratados com NPY e LP-NPY em nosso estudo, tiveram redução do tempo de congelamento no condicionamento aversivo contextual (CAC), caracterizando um prejuízo na aquisição e consolidação do medo condicionado (Broqua, Wettstein *et al.*, 1995; Gutman, Yang *et al.*, 2008; Fendt, Burki *et al.*, 2009; Bowers, Choi *et al.*, 2012). De modo similar, em ambas as fases da memória, aquisição e consolidação, nossos resultados mostraram que a redução do tempo de congelamento observada nos animais tratados com NPY ou LP-NPY, foi bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista Y1 BIBO, indicando a participação do receptor Y1 nestes processos, indo de acordo com estudos utilizando animais nocautes (KO) para receptor Y1, que apresentam altos níveis de congelamento em protocolos similares de medo condicionado (Fendt, Burki *et al.*, 2009; Verma, Tasan *et al.*, 2012). Além disso, a administração de BIBO não aumentou a aquisição e consolidação do medo *per se*, corroborando com dados farmacológicos obtidos por Cohen, Liu *et al.* (2012) nos paradigmas como o sobressalto acústico e condicionamento contextual. Além disso, o NPY e o LP-NPY não parecem atuar exclusivamente na memória, mas em um conjunto de ações para o controle da resposta emocional à situação aversiva, como observado em nosso experimento que procurou “pular” a fase primordial para a consolidação de memórias, que ocorre nas 3 primeiras horas após o aprendizado (Igaz, Vianna *et al.*, 2002; Medina, Bekinschtein *et al.*, 2008), corroborando com algumas evidências que já indicavam que o NPY poderia atuar horas após o aprendizado (Flood, Hernandez *et al.*, 1987; Cohen, Kozlovsky *et al.*, 2012) e reforçando a ideia de que o NPY e o LP-NPY nas doses utilizadas no presente trabalho pode não ser um efeito amnésico.

Nossos dados do NPY e do LP-NPY prejudicando a consolidação do medo corroboram com estudos em humanos e suportam a participação do NPY na atenuação da consolidação da memória de medo (Morgan, Wang *et al.*, 2000; Rasmusson, Hauger *et al.*, 2000). Rasmusson, Hauger *et al.* (2000) mostraram que pacientes com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) tinham níveis basais menores de NPY plasmático comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, altos níveis de NPY foram encontrados em indivíduos que passaram por uma situação traumática, mas que não desenvolveram o TEPT (Yehuda, Brand *et al.*, 2006). Juntos, estes achados indicam que o NPY pode ter um papel crítico para normalizar o controle da resposta emocional, já que o aumento de NPY após o estímulo estressante pode

tornar o indivíduo resiliente ao estímulo contextual, reduzindo a carga emocional do evento aversivo.

A administração i.c.v. de NPY facilitou a extinção entre sessões do CAC, em concordância com estudos prévios que mostraram que o NPY em altas doses facilitaria a extinção do medo através da redução do FPS (Gutman, Yang *et al.*, 2008) ou por manipulações genéticas, com camundongos KO NPY apresentando prejuízo em extinguir o condicionamento por pistas (Verma, Tasan *et al.*, 2012). Em adição, observamos que a administração central do antagonista Y1 BIBO bloqueou a facilitação da extinção induzida pelo NPY. Nossos resultados contrastam com o único estudo que compara o efeito do NPY com o efeito do BIBO+NPY de Fendt, Burki *et al.* (2009). Fendt demonstrou não haver diferenças entre BIBO+NPY e NPY, injetados por via intra-amigdalár, no medo condicionado em camundongos. Descartando as possíveis diferenças em razão das doses utilizadas, espécie animal e protocolos, a metodologia empregada por Fendt, Burki *et al.* (2009), conforme o próprio autor afirma, não foi otimizada para testar a extinção do medo, o que poderia gerar resultados inconsistentes. Por outro lado, nosso protocolo de condicionamento aversivo contextual tem sido utilizado como um protocolo de extinção do medo (Pamplona, Prediger *et al.*, 2006; Pamplona e Takahashi, 2006; Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008; De Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2013), apresentando, portanto, confiabilidade comprovada.

A administração central do agonista Y1 LP-NPY promoveu a extinção entre as sessões do condicionamento aversivo contextual, indicado pela redução do tempo de congelamento dos ratos. No entanto, esta facilitação da extinção foi fraca e de certa forma, atrasada, se comparada com o grupo tratado com NPY e PBS, sugerindo então uma facilitação parcial da extinção exercida pelo LP-NPY no teste do CAC. Esta facilitação atrasada corrobora com os dados observados pelo LP-NPY na reconsolidação do medo condicionado, onde ao contrário do NPY, este agonista Y1 não prejudicou a reconsolidação da memória. Embora a reconsolidação e a extinção sejam processos independentes, elas apresentam mecanismos moleculares em comum como a participação de receptores NMDA e  $\beta$ -adrenérgicos estão envolvidos em ambos os processos (Myers e Davis, 2007; Tronson e Taylor, 2007). Além disso, esta facilitação atrasada da extinção pode ser devido à ausência da ativação do receptor Y2. Um estudo recente usando camundongos KO mostrou que para uma resposta completa da extinção do medo condicionado, o recrutamento de ambos os receptores, Y1 e Y2, são necessários (Verma, Tasan *et al.*, 2012). Ainda, o LP-NPY é um

agonista que prefere o receptor Y1 em uma proporção 10.000 vezes maior que o receptor Y2 (Pronchuk, Beck-Sickinger *et al.*, 2002). Por outro lado, análises de potência de ligação ao receptor Y1 têm demonstrado que LP-NPY apresenta potência de ligação similar ao NPY (Cabrele e Beck-Sickinger, 2000; Pedrazzini, Pralong *et al.*, 2003), dados que suportam as doses utilizadas em nosso estudo. Sendo assim, nossos resultados confirmam o envolvimento majoritário do receptor Y1, mas também sugerem a participação complementar do receptor Y2, ao menos na fase de extinção, corroborando com a recente hipótese levantada por Verma, Tasan *et al.* (2012).

A consistência da facilitação da extinção promovida pelo NPY foi demonstrada por uma sessão adicional sem tratamento farmacológico. O mesmo efeito foi observado em ratos tratados com o LP-NPY, confirmando o seu efeito atrasado. Embora o bloqueio do receptor Y1 tenha revertido os efeitos do NPY e LP-NPY na extinção do medo, o efeito do tratamento com BIBO na sessão sem droga não foi de todo uma surpresa. Evidências sugerem que a redução do congelamento em ratos tratados com BIBO na sessão sem tratamento pode ocorrer através do aumento da expressão do receptor Y1 (durante a sessão sem tratamento) que, aliado à elevação de NPY liberado durante as sessões de extinção (da primeira sessão até a última) (Thorsell, Carlsson *et al.*, 1999; Krysiak, Obuchowicz *et al.*, 2000), promoveria a redução do tempo de congelamento na sessão sem tratamento. Por trás deste aumento da liberação de NPY, podemos sugerir que há um aumento da sensibilidade do receptor Y1 em situações de estresse moderado, a mesma que acreditamos ocorrer na exposição ao contexto durante a sessão sem droga, provavelmente por um mecanismo compensatório causado pelo bloqueio dos efeitos atribuídos ao receptor Y1 durante a administração de BIBO (Mele, Oberto *et al.*, 2004). A este respeito, foi demonstrado que o aumento da expressão do receptor Y1 induz um efeito ansiolítico moderado (Lin, Lin *et al.*, 2010), estando de acordo com os nossos resultados. Nossa hipótese é também suportada por outros sistemas envolvidos na memória de medo, como o canabinóide (CB). Sabe-se que a administração prolongada de um antagonista seletivo do receptor CB1 induz aumento da expressão do receptor CB1 no córtex pré-frontal e estriado (Tambaro, Tomasi *et al.*, 2013). É relatado que o antagonista CB1 aumenta a resposta de medo, incluindo a dificuldade em extinguir memórias aversivas (Reich, Mohammadi *et al.*, 2008). Em condições aversivas, há recrutamento tanto de endocanabinóides como de NPY endógeno, sendo ambos mediadores cruciais na adaptação adequada do indivíduo após eventos traumáticos.

*O NPY endógeno: da regulação natural ao controle farmacológico*

O receptor Y2 está localizado em neurônios pré-sinápticos do SNC (Caberlotto, Fuxe *et al.*, 2000). Devido a sua localização, o receptor Y2 exerce importante papel na regulação da liberação do NPY endógeno e de outros neurotransmissores como o glutamato e o GABA (Colmers, Klapstein *et al.*, 1991). De fato, várias evidências sugerem que o bloqueio/inativação do receptor Y2 aumenta a expressão de NPY, promovendo alterações comportamentais em diferentes testes comportamentais (Redrobe, Dumont *et al.*, 2003; Tschennett, Singewald *et al.*, 2003; Bacchi, Mathe *et al.*, 2006). Dadas as evidências da regulação do NPY pelo bloqueio do receptor Y2, existe uma carência de dados que ainda deixa o papel desta manipulação farmacológica sem resposta no medo condicionado. Para o nosso conhecimento, apenas um trabalho, de Pickens, Adams-Deutsch *et al.* (2009) testou o BIIE em um protocolo de medo, observando ausência de efeito no medo incubado. Desta forma, nosso trabalho procurou verificar se o BIIE era capaz de facilitar a extinção do medo e, de forma inesperada, observamos um prejuízo na expressão da memória de medo condicionado, o que inviabilizou o processo de extinção em nosso modelo uma vez que o tempo de congelamento dos animais tratados com BIIE foi similar ao de ratos que não recebem choque. O nosso resultado poderia sugerir um efeito ansiolítico estado-dependente, característico de ansiolíticos clássicos como os benzodiazepínicos (Bitencourt, Pamplona *et al.*, 2008). No entanto, na sessão sem tratamento (4ª sessão de extinção), os ratos que foram tratados com BIIE continuaram apresentando o tempo de congelamento reduzido, sinalizando que o BIIE não está promovendo um efeito do tipo-ansiolítico, conforme já havia sido sugerido em testes como o LCE (Bacchi, Mathe *et al.*, 2006). Além disso, Thorsell, Rimondini *et al.* (2002) verificou que o BIIE também não promove alterações da atividade locomotora, tanto horizontal como vertical. Como vimos anteriormente, um estudo de Verma, Tasan *et al.* (2012) investigou o comportamento de camundongos KO Y2 no medo condicionado, sem observar alterações tanto na expressão como na extinção do medo. Também não foi observada nenhuma alteração de camundongos KO Y2 em testes de memória de trabalho e de referência (Karl, Chesworth *et al.*, 2010). Outro estudo com camundongos KO Y2 sugere o envolvimento deste receptor nos processos mnemônicos

(Redrobe, Dumont *et al.*, 2004). Redrobe, Dumont *et al.* (2003) observou um déficit nos camundongos KO Y2 em aprender as tarefas do teste do labirinto aquático de Morris e do teste de reconhecimento de objetivos. É certo afirmar que os efeitos da supressão total dos genes observado em camundongos KO devem ser vistos com certa precaução, já que as alterações no desenvolvimento podem produzir um fenótipo complexo, limitando conclusões absolutas. Entre os mecanismos compensatórios, podemos destacar o controle da liberação do NPY endógeno por outras vias, pois a desregulação da liberação de NPY por um longo período sem demanda fisiológica, não seria benéfico para o indivíduo. A hipótese de que tenha ocorrido à elevação do NPY endógeno pelo BIIE é evidenciada pelos nossos dados com o antagonista Y1 BIBO, que bloqueou completamente a ação do BIIE no teste do CAC. Ainda assim, como já observado na literatura, o aumento exagerado do NPY endógeno, principalmente no hipocampo reduz a formação de LPT, prejudicando o aprendizado espacial no labirinto aquático (Sorensen, Kanter-Schlifke, Carli *et al.*, 2008; Sorensen, Kanter-Schlifke, Lin *et al.*, 2008; Sorensen, Nikitidou *et al.*, 2009). Desta forma, não podemos descartar por completo um perfil amnésico, embora pouco provável, em nosso experimento.

Aumentar o controle perante uma situação de estresse aversiva, reduzindo os níveis de estresse do indivíduo, parece ser uma característica comum tanto do NPY como do ambiente enriquecido (Lehmann e Herkenham, 2011; Sah e Geraciotti, 2012). Esta característica de aumentar a resiliência é desenvolvida, com certeza, por vários “atores” moleculares (Van Praag, Kempermann *et al.*, 2000; Simpson e Kelly, 2011) e, provavelmente, com o NPY e seus receptores como “estrelas”. Embora essa cooperação do NPY no desenvolvimento da resiliência ao estresse promovido pelo AE seja praticamente certa, ainda há uma carência muito grande de estudos sobre este tema. De fato, apenas um estudo, de Hendriksen, Bink *et al.* (2012), investigou a participação do sistema NPY no AE. Nele, embora não tenham sido encontradas alterações nos níveis de NPY na BLA, o receptor Y1 teve sua expressão aumentada após os animais serem submetidos a 15 dias de AE, independente de terem sido submetidos ao protocolo de estresse.

Partindo da ideia de que eventos prévios da vida pudessem prevenir a geração de traumas a partir de situações futuras de estresse, nosso estudo procurou verificar se o AE seria capaz de promover um estado latente de resiliência, estado que seria ativado apenas sob demanda de uma situação aversiva/traumática, capaz de promover algum dano, como o TEPT. No primeiro experimento verificamos que o

AE era realmente capaz de promover redução da reatividade ao estresse, observada através da facilitação da extinção do medo, dados estes que vão de acordo com o trabalho de Hendriksen, Bink *et al.* (2012) e outros (Woodcock e Richardson, 2000a; Barbelivien, Herbeaux *et al.*, 2006; Imanaka, Morinobu *et al.*, 2006; Mitra e Sapolsky, 2009). Como sabemos, o AE promove significantes alterações neurais (p.ex.: neurogênese, expressão de fatores neurotróficos), que resultam em respostas comportamentais positivas com relação à cognição e ao estresse, como já mencionado. Com respeito ao comportamento evidenciado no teste do CAC, um teste que afeta um conjunto de respostas emocionais como a resposta à uma situação estressante, processos mnemônicos e de emocionalidade, é possível sugerir que a resposta observada em nosso estudo, somados a outros trabalhos da literatura, que a diminuição do congelamento observado nos ratos “enriquecidos” entre as sessões de extinção é devida à capacidade que estes animais têm em discriminar com maior rapidez do que os ratos “normais”, que o ambiente antes aversivo, já não apresenta mais perigo. Em outras palavras, o processo cognitivo torna-se mais importante e mais rápido do que a memória aversiva, através da aceleração do processamento das informações sinápticas, reduzindo o tempo de tomada de decisão (Mailloux, Edwards *et al.*, 1974; Woodcock e Richardson, 2000a; b; Leggio, Mandolesi *et al.*, 2005).

No entanto, a dúvida sobre se o NPY participa na facilitação da extinção do medo promovida pelo AE permanecia. Para responder esta questão, primeiramente resolvemos verificar a expressão do receptor Y1 em ratos “enriquecidos”. A escolha do receptor Y1, como visto acima, se deu por este ser o principal receptor do sistema NPY envolvido na resiliência às respostas de medo (Cohen, Liu *et al.*, 2012; Hendriksen, Bink *et al.*, 2012). Por sua vez, o hipocampo foi escolhido pela proximidade do NPY com funções comportamentais que dependem do hipocampo íntegro, de estudos *in vitro* mostrando o efeito do NPY na neuroproteção e proliferação de precursores neurais e da relação do hipocampo com o processamento da informação contextual de medo, importante tanto para a aquisição como para a extinção do medo (Redrobe, Dumont *et al.*, 1999; Howell, Silva *et al.*, 2007; Myers e Davis, 2007; Decressac, Wright *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostram que houve uma elevação da expressão do receptor Y1 no hipocampo dos animais “enriquecidos”, mas apenas os ratos “enriquecidos” submetidos ao teste do CAC apresentaram esta elevação, sugerindo que sistema NPY deve atuar como um fator “tampão” em situações de estresse capazes de gerar

trauma, permanecendo latente até o momento de sua ativação/atuação, corroborando com vasta literatura (Morgan, Wang *et al.*, 2000; Morgan, Rasmusson *et al.*, 2002; Heilig, 2004). O AE, por sua vez, pode ter sua ação resiliente através da promoção de uma maior sensibilidade do receptor Y1, facilitando a expressão deste receptor assim que determinadas situações traumáticas se tornam eminentes. Em adição, a importância deste receptor é confirmada ao usarmos o antagonista Y1 BIBO, que reverteu a facilitação da extinção exercida pelo AE (Cohen, Liu *et al.*, 2012; Hendriksen, Bink *et al.*, 2012).

A administração de NPY está associada com a elevação da expressão do receptor Y1 e também de BDNF, que é outro indicativo de resiliência (Cohen, Liu *et al.*, 2012). É proposto que o BDNF possa atuar como um regulador funcional e morfológico da expressão de NPY (Nawa, Bessho *et al.*, 1993; Jones, Farinas *et al.*, 1994; Nawa, Pelleymounter *et al.*, 1994; Barnea e Roberts, 2001; Xapelli, Bernardino *et al.*, 2008). Como sabemos, o BDNF aumenta a plasticidade e estabiliza a conectividade sináptica no SNC, características celulares necessárias para promover a resiliência a psicopatologias. (Shieh e Ghosh, 1999; Mamounas, Altar *et al.*, 2000; Thoenen, 2000; Huang e Reichardt, 2001; Poo, 2001). Além disso, o BDNF é extremamente importante no medo aprendido e na extinção do medo (Andero e Ressler, 2012) sendo que o medo condicionado promove o aumento dos níveis de BDNF e de seus precursores em várias estruturas, como o hipocampo (Bredy, Wu *et al.*, 2007; Ou e Gean, 2007). O BDNF também pode estar envolvido nos efeitos de longo prazo promovidos pelo NPY, além de que uma elevação endógena de NPY pode ocorrer pela injeção exógena deste peptídeo (Cohen, Liu *et al.*, 2012). De fato, nossos experimentos mostraram um efeito de longo prazo do NPY facilitando a extinção do medo. Sabe-se que a atividade de peptidases ou a presença de mecanismos de difusão e captação do NPY no SNC são inexistentes, portanto, estes efeitos ocorrem por via indireta, provavelmente pela ativação da produção de fatores neuroprotetores endógenos como o BDNF, concomitantemente com a indução endógena de NPY (Thoenen, 2000; Naert, Ixart *et al.*, 2011; Cohen, Liu *et al.*, 2012).

Analisando nossos resultados, podemos considerar a habilidade do NPY em controlar de forma positiva as respostas do indivíduo quando expostos a situações traumáticas. Estes efeitos benéficos são observados de diferentes formas, seja por administração exógena deste peptídeo ou pela ativação de sua expressão endógena. É interessante

notar que o organismo apresenta condições para o aumento da atividade do sistema NPY, bastando apenas que este seja estimulado por alguma situação traumática. Os mecanismos envolvidos neste efeito protetor podem ocorrer através da interação com fatores neurotróficos que agem de forma redundante com todo o sistema NPY, servindo de suporte para que um organismo sob condições de estresse tenha condições de reestabelecer a homeostase mais rapidamente possível.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nossos resultados mostraram que:

- ✓ A administração de baixas doses de NPY prejudicou a aquisição, a consolidação e a reconsolidação de memórias aversivas, além de facilitar a extinção do medo condicionado contextual enquanto que o LP-NPY foi eficaz na redução do medo apenas na aquisição e consolidação;
- ✓ As doses utilizadas não afetaram fatores não relacionados com o medo condicionado, como a ansiedade, atividade locomotora e a memória não emocional;
- ✓ O ambiente enriquecido favoreceu a expressão do receptor Y1 no hipocampo da mesma forma que facilitou a extinção;
- ✓ A indução da liberação de NPY endógeno pela administração de BIIIÉ inibe completamente as respostas de medo;
- ✓ O uso do antagonista Y1 bloqueia qualquer efeito promovido pelo NPY, LP-NPY ou BIIIÉ.

Como conclusão, o presente trabalho mostrou que o NPY, independente de sua origem (exógena – ambiente enriquecido – ou endógena – injetado centralmente), promove resiliência ao estresse nos ratos, reduzindo o congelamento quando submetidos ao condicionamento aversivo contextual. Fica evidente que a participação do NPY nestas respostas se dá pela interação com o receptor Y1, embora não possamos descartar a influência do receptor Y2, principalmente em tarefas mais complexas como a extinção e a reconsolidação do medo condicionado contextual.

Todas estas evidências, somadas às outras existentes na literatura reforçam o papel do NPY dificultando o desenvolvimento de psicopatologias relacionadas ao estresse, como o TEPT, indicando que a manipulação do sistema NPY apresenta um grande potencial terapêutico nestes casos.

## 7 GLOSSÁRIO

**Benzodiazepínico:** são fármacos ansiolíticos utilizados como sedativos, hipnóticos, relaxantes musculares, para amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante. Atuam sobre os receptores GABAA, tornando-os mais sensíveis à ativação pelo próprio GABA, através da abertura dos canais de cloro, hiperpolarizando o neurônio e inibindo a geração de potencial de ação.

**Camundongos nocautes:** que não expressam determinada proteína.

**Condicionamento Pavloviano/Clássico:** procedimento pelo qual um estímulo inicialmente neutro (p.e.: som, odor, contexto) incapaz de gerar resposta condicionada, se torna biologicamente relevante após o pareamento com um estímulo condicionado (p.ex.: choque).

**Consolidação:** processo pelo qual as memórias são armazenadas após um novo aprendizado.

**Efeitos mnemônicos:** conjunto de técnicas utilizadas pelo indivíduo para auxiliar o processo de memorização.

**Emocionalidade:** é o estado de ser emocional, que consiste de um grupo de reações orgânicas, experienciais e expressivas, denotando um aumento geral ou uma condição excitada do animal. Diferente do termo emoção, que é descrito para designar uma experiência que resulta de uma estimulação emocional, emocionalidade é meramente um conceito conveniente para descrever um complexo de fatores.

**Extinção:** quando há sobreposição do aprendizado de um estímulo previamente associado por um aprendizado oposto, o que leva a uma redução da resposta ao estímulo inicial, sem que ocorra o seu apagamento.

**Fenocópia:** quando um fenótipo, produzido pelo ambiente, simula o efeito de uma conhecida mutação, só que ao contrário da mutação, fenocópias não são hereditárias.

**Medo incubado:** procedimento em que o medo condicionado aumenta com o passar do tempo.

**Penetrância incompleta:** incapacidade de um gene presente no organismo se manifestar fenotipicamente.

**Pleiotropia:** quando um único gene controla diversas características do fenótipo que muitas vezes não estão relacionadas, ou seja, quando um par de alelos condiciona mais de um caráter.

**Potencialização de longo prazo (LTP):** é uma melhoria duradoura na transmissão do sinal entre dois neurônios, contribuindo para plasticidade sináptica. A LTP é considerada um dos principais mecanismos celulares envolvidos no aprendizado e memória.

**Plasticidade sináptica:** capacidade das sinapses químicas de mudar sua potência.

**Reativação:** também chamada de evocação, é o retorno de memórias previamente estabelecidas para um estado consciente, resultando em labilização da memória.

**Reconsolidação:** processo pelo qual uma memória previamente consolidada se atualiza e se estabiliza após cada reativação.

**Resiliência:** capacidade do indivíduo de se adaptar positivamente e de se superar diante de adversidades relacionadas ao estresse.

**Síntese protéica:** responsável por transformar a nova informação adquirida em uma modificação sináptica duradoura, através da transcrição e tradução da proteína.

**Terapia de exposição:** é o confronto direto e graduado aos objetos ou situações ameaçadoras, e, na maioria das vezes não se utiliza uma técnica de relaxamento. A exposição é realizada conforme uma lista hierárquica de situações aversiva, ordenada de acordo com a quantidade de ansiedade que eliciam, ou seja, do estímulo que causa menos ansiedade ao que causa mais ansiedade e desconforto.

**Translação:** transposição de descobertas da pesquisa básica (pré-clínica) para aplicação clínica, incluindo a validação científica dos resultados experimentais.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERO, R.; RESSLER, K. J. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. **Genes Brain Behav**, 11 (5), 503-12, 2012.

BACCHI, F.; MATHE, A. A.; JIMENEZ, P.; STASI, L.; ARBAN, R.; GERRARD, P.; CABERLOTTO, L. Anxiolytic-like effect of the selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist BIIE0246 in the elevated plus-maze. **Peptides**, 27 (12), 3202-7, 2006.

BANNON, A. W.; SEDA, J.; CARMOUCHE, M.; FRANCIS, J. M.; NORMAN, M. H.; KARBON, B.; MCCALED, M. L. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. **Brain Res**, 868 (1), 79-87, 2000.

BARBELIVIEN, A.; HERBEAUX, K.; OBERLING, P.; KELCHE, C.; GALANI, R.; MAJCHRZAK, M. Environmental enrichment increases responding to contextual cues but decreases overall conditioned fear in the rat. **Behav Brain Res**, 169 (2), 231-8, 2006.

BARNEA, A.; ROBERTS, J. Induction of functional and morphological expression of neuropeptide Y (NPY) in cortical cultures by brain-derived neurotrophic factor (BDNF): evidence for a requirement for extracellular-regulated kinase (ERK)-dependent and ERK-independent mechanisms. **Brain Res**, 919 (1), 57-69, 2001.

BECK, B. Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 361 (1471), 1159-85, 2006.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L. M.; BEVILAQUA, L. R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53 (2), 261-77, 2007.

BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress

responses and enhances natural killer cell activity. **Eur J Neurosci**, 20 (5), 1341-7, 2004.

BITENCOURT, R. M.; PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, 18 (12), 849-59, 2008.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Crouching as an index of fear. **J Comp Physiol Psychol**, 67 (3), 370-5, 1969.

BOWERS, M. E.; CHOI, D. C.; RESSLER, K. J. Neuropeptide regulation of fear and anxiety: Implications of cholecystokinin, endogenous opioids, and neuropeptide Y. **Physiol Behav**, 107 (5), 699-710, 2012.

BREDY, T. W.; WU, H.; CREGO, C.; ZELHOFER, J.; SUN, Y. E.; BARAD, M. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learn Mem**, 14 (4), 268-76, 2007.

BROQUA, P.; WETTSTEIN, J. G.; ROCHER, M. N.; GAUTHIER-MARTIN, B.; JUNIEN, J. L. Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures. **Behav Pharmacol**, 6 (3), 215-222, 1995.

BROTHERS, S. P.; WAHLESTEDT, C. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. **EMBO Mol Med**, 2 (11), 429-39, 2010.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **Eur J Neurosci**, 21 (2), 513-21, 2005.

BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. **Neuroscience**, 139 (3), 831-42, 2006.

CABERLOTTO, L.; FUXE, K.; HURD, Y. L. Characterization of NPY mRNA-expressing cells in the human brain: co-localization with Y2 but not Y1 mRNA in the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and striatum. **J Chem Neuroanat**, 20 (3-4), 327-37, 2000.

CABRELE, C.; BECK-SICKINGER, A. G. Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. **J Pept Sci**, 6 (3), 97-122, 2000.

CALLAHAN, D. J. Combat-related mental health disorders: the case for resiliency in the long war. **J Am Osteopath Assoc**, 110 (9), 520-7, 2010.

CAMPBELL, F. C. **Elements of Metallurgy and Engineering Alloys**. ASM International, 2008. 350.

CARVAJAL, C. C.; VERCAUTEREN, F.; DUMONT, Y.; MICHALKIEWICZ, M.; QUIRION, R. Aged neuropeptide Y transgenic rats are resistant to acute stress but maintain spatial and non-spatial learning. **Behav Brain Res**, 153 (2), 471-80, 2004.

CHAMOVE, A. S. Cage design reduces emotionality in mice. **Lab Anim**, 23 (3), 215-9, 1989.

CHARNEY, D. S. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. **Am J Psychiatry**, 161 (2), 195-216, 2004.

COHEN, H.; GEVA, A. B.; MATAR, M. A.; ZOHAR, J.; KAPLAN, Z. Post-traumatic stress behavioural responses in inbred mouse strains: can genetic predisposition explain phenotypic vulnerability? **Int J Neuropsychopharmacol**, 11 (3), 331-49, 2008.

COHEN, H.; KOZLOVSKY, N.; ALONA, C.; MATAR, M. A.; JOSEPH, Z. Animal model for PTSD: from clinical concept to translational research. **Neuropharmacology**, 62 (2), 715-24, 2012.

COHEN, H.; LIU, T.; KOZLOVSKY, N.; KAPLAN, Z.; ZOHAR, J.; MATHE, A. A. The neuropeptide Y (NPY)-ergic system is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, 37 (2), 350-63, 2012.

COLMERS, W. F.; KLAPSTEIN, G. J.; FOURNIER, A.; ST-PIERRE, S.; TREHERNE, K. A. Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor. **Br J Pharmacol**, 102 (1), 41-4, 1991.

CONRAD, C. D.; MCEWEN, B. S. Acute stress increases neuropeptide Y mRNA within the arcuate nucleus and hilus of the dentate gyrus. **Brain Res Mol Brain Res**, 79 (1-2), 102-9, 2000.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, 49 (1), 171-6, 1994.

DE BITENCOURT, R. M.; PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. A current overview of cannabinoids and glucocorticoids in facilitating extinction of aversive memories: potential extinction enhancers. **Neuropharmacology**, 64, 389-95, 2013.

DE CARVALHO, C. R.; PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Res**, 208 (1), 231-6, 2010.

DE OLIVEIRA ALVARES, L.; DE OLIVEIRA, L. F.; CAMBOIM, C.; DIEHL, F.; GENRO, B. P.; LANZIOTTI, V. B.; QUILLFELDT, J. A. Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 83 (2), 119-24, 2005.

DECRESSAC, M.; WRIGHT, B.; DAVID, B.; TYERS, P.; JABER, M.; BARKER, R. A.; GAILLARD, A. Exogenous neuropeptide Y promotes in vivo hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, 21 (3), 233-8, 2011.

DESJARDINS, P.; HANSEN, J. B.; ALLEN, M. Microvolume spectrophotometric and fluorometric determination of protein concentration. **Curr Protoc Protein Sci**, Chapter 3, Unit 3 10, 2009.

DOTSCH, J.; ADELMANN, M.; ENGLARO, P.; DOTSCH, A.; HANZE, J.; BLUM, W. F.; KIESS, W.; RASCHER, W. Relation of leptin and neuropeptide Y in human blood and cerebrospinal fluid. **J Neurol Sci**, 151 (2), 185-8, 1997.

DUMAN, C. H.; SCHLESINGER, L.; RUSSELL, D. S.; DUMAN, R. S. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res**, 1199, 148-58, 2008.

DUMONT, Y.; JACQUES, D.; BOUCHARD, P.; QUIRION, R. Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains. **J Comp Neurol**, 402 (3), 372-84, 1998.

EATON, K.; SALLEE, F. R.; SAH, R. Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. **Curr Top Med Chem**, 7 (17), 1645-59, 2007.



FANSELOW, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, 15 (4), 177-82, 1980.

\_\_\_\_\_. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**, 110 (1-2), 73-81, 2000.

FARAONE, S. V.; TSUANG, M. T. Measuring diagnostic accuracy in the absence of a "gold standard". **Am J Psychiatry**, 151 (5), 650-7, 1994.

FEDER, A.; NESTLER, E. J.; CHARNEY, D. S. Psychobiology and molecular genetics of resilience. **Nat Rev Neurosci**, 10 (6), 446-57, 2009.

FENDT, M.; BURKI, H.; IMOBERSTEG, S.; LINGENHOHL, K.; MCALLISTER, K. H.; ORAIN, D.; UZUNOV, D. P.; CHAPERON, F. Fear-reducing effects of intra-amygdala neuropeptide Y infusion in animal models of conditioned fear: an NPY Y1 receptor independent effect. **Psychopharmacology (Berl)**, 206 (2), 291-301, 2009.

FERNANDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUELA, R. M.; CASTELLANO, B.; GONZALEZ, B.; TOBENA, A. Neonatal handling and environmental enrichment effects on emotionality, novelty/reward seeking, and age-related cognitive and hippocampal impairments: focus on the Roman rat lines. **Behav Genet**, 27 (6), 513-26, 1997.

FISCHER, F. R.; PEDUZZI, J. D. Functional recovery in rats with chronic spinal cord injuries after exposure to an enriched environment. **J Spinal Cord Med**, 30 (2), 147-55, 2007.

FLOOD, J. F.; HERNANDEZ, E. N.; MORLEY, J. E. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. **Brain Res**, 421 (1-2), 280-90, 1987.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **J Neurosci**, 22 (18), 7840-3, 2002.

GARMEZY, N.; STREITMAN, S. Children at risk: the search for the antecedents of schizophrenia. Part I. Conceptual models and research methods. **Schizophr Bull**, (8), 14-90, 1974.

GATES, M. A.; HOLOWKA, D. W.; VASTERLING, J. J.; KEANE, T. M.; MARX, B. P.; ROSEN, R. C. Posttraumatic stress disorder in veterans and military personnel: epidemiology, screening, and case recognition. **Psychol Serv**, 9 (4), 361-82, 2012.

GEHLERT, D. R.; BEAVERS, L. S.; JOHNSON, D.; GACKENHEIMER, S. L.; SCHOBER, D. A.; GADSKI, R. A. Expression cloning of a human brain neuropeptide Y Y2 receptor. **Mol Pharmacol**, 49 (2), 224-8, 1996.

GRANDT, D.; DAHMS, P.; SCHIMICZEK, M.; EYSSELEIN, V. E.; REEVE, J. R., JR.; MENTLEIN, R. [Proteolytic processing by dipeptidyl aminopeptidase IV generates receptor selectivity for peptide YY (PYY)]. **Med Klin (Munich)**, 88 (3), 143-5, 1993.

GREENWOOD, B. N.; FLESHNER, M. Exercise, learned helplessness, and the stress-resistant brain. **Neuromolecular Med**, 10 (2), 81-98, 2008.

GREENWOOD, B. N.; FOLEY, T. E.; DAY, H. E.; CAMPISI, J.; HAMMACK, S. H.; CAMPEAU, S.; MAIER, S. F.; FLESHNER, M. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. **J Neurosci**, 23 (7), 2889-98, 2003.

GRONEBERG, D. A.; FOLKERTS, G.; PEISER, C.; CHUNG, K. F.; FISCHER, A. Neuropeptide Y (NPY). **Pulm Pharmacol Ther**, 17 (4), 173-80, 2004.

GUTMAN, A. R. **Neuropeptide Y and Cholecystokinin Modulation of the Expression and Extinction of Fear-Potentiated Startle**. 2009. (Doctor of Philosophy). Graduate Division of Biological and Biomedical Sciences Neuroscience, Emory University, EUA.

GUTMAN, A. R.; YANG, Y.; RESSLER, K. J.; DAVIS, M. The role of neuropeptide Y in the expression and extinction of fear-potentiated startle. **J Neurosci**, 28 (48), 12682-90, 2008.

HALLER, J. The link between stress and the efficacy of anxiolytics. A new avenue of research. **Physiol Behav**, 73 (3), 337-42, 2001.

HASTINGS, J. A.; MORRIS, M. J.; LAMBERT, G.; LAMBERT, E.; ESLER, M. NPY and NPY Y1 receptor effects on noradrenaline overflow from the rat brain in vitro. **Regul Pept**, 120 (1-3), 107-12, 2004.

HEILIG, M. Antisense inhibition of neuropeptide Y (NPY)-Y1 receptor expression blocks the anxiolytic-like action of NPY in amygdala and paradoxically increases feeding. **Regul Pept**, 59 (2), 201-5, 1995.

\_\_\_\_\_. The NPY system in stress, anxiety and depression. **Neuropeptides**, 38 (4), 213-24, 2004.

HEILIG, M.; MCLEOD, S.; KOOB, G. K.; BRITTON, K. T. Anxiolytic-like effect of neuropeptide Y (NPY), but not other peptides in an operant conflict test. **Regul Pept**, 41 (1), 61-9, 1992.

HEILIG, M.; MURISON, R. Intracerebroventricular neuropeptide Y suppresses open field and home cage activity in the rat. **Regul Pept**, 19 (3-4), 221-31, 1987.

HEILIG, M.; VECSEI, L.; WIDERLOV, E. Opposite effects of centrally administered neuropeptide Y (NPY) on locomotor activity of spontaneously hypertensive (SH) and normal rats. **Acta Physiol Scand**, 137 (2), 243-8, 1989.

HEILIG, M.; ZACHRISSON, O.; THORSELL, A.; EHNVAL, A.; MOTTAGUI-TABAR, S.; SJOGREN, M.; ASBERG, M.; EKMAN, R.; WAHLESTEDT, C.; AGREN, H. Decreased cerebrospinal fluid neuropeptide Y (NPY) in patients with treatment refractory unipolar major depression: preliminary evidence for association with preproNPY gene polymorphism. **J Psychiatr Res**, 38 (2), 113-21, 2004.

HENDRIKSEN, H.; BINK, D. I.; DANIELS, E. G.; PANDIT, R.; PIRIOU, C.; SLIEKER, R.; WESTPHAL, K. G.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. Re-exposure and environmental enrichment reveal NPY-Y1 as a possible target for post-traumatic stress disorder. **Neuropharmacology**, 63 (4), 733-42, 2012.

HIRSCH, D.; ZUKOWSKA, Z. NPY and Stress 30 Years Later: The Peripheral View. **Cell Mol Neurobiol**, 2012.

HOLMES, A.; LE GUIQUET, A. M.; VOGEL, E.; MILLSTEIN, R. A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**, 29 (8), 1335-46, 2005.

HOPUSU-HAVU, V. K.; GLENNER, G. G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. **Histochemie**, 7 (3), 197-201, 1966.

HOWELL, O. W.; SILVA, S.; SCHARFMAN, H. E.; SOSUNOV, A. A.; ZABEN, M.; SHATYA, A.; MCKHANN, G., 2ND; HERZOG, H.; LASKOWSKI, A.; GRAY, W. P. Neuropeptide Y is important for basal

and seizure-induced precursor cell proliferation in the hippocampus. **Neurobiol Dis**, 26 (1), 174-88, 2007.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci**, 24, 677-736, 2001.

HUGHES, V. The Roots of Resilience. **Nature**, 490, 3, 2012.

HUTCHINSON, K. M.; MCLAUGHLIN, K. J.; WRIGHT, R. L.; BRYCE ORTIZ, J.; ANOUTI, D. P.; MIKA, A.; DIAMOND, D. M.; CONRAD, C. D. Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. **Neurobiol Learn Mem**, 97 (2), 250-60, 2012.

IACONO, W. G.; CLEMENTZ, B. A. A strategy for elucidating genetic influences on complex psychopathological syndromes (with special reference to ocular motor functioning and schizophrenia). **Prog Exp Pers Psychopathol Res**, 16, 11-65, 1993.

IGAZ, L. M.; VIANNA, M. R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. **J Neurosci**, 22 (15), 6781-9, 2002.

IMANAKA, A.; MORINOBU, S.; TOKI, S.; YAMAWAKI, S. Importance of early environment in the development of post-traumatic stress disorder-like behaviors. **Behav Brain Res**, 173 (1), 129-37, 2006.

IZIDIO, G. S.; LOPES, D. M.; SPRICIGO, L., JR.; RAMOS, A. Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes Brain Behav**, 4 (7), 412-9, 2005.

JONES, K. R.; FARINAS, I.; BACKUS, C.; REICHARDT, L. F. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. **Cell**, 76 (6), 989-99, 1994.

JOVANOVIC, T.; NORRHOLM, S. D.; BLANDING, N. Q.; DAVIS, M.; DUNCAN, E.; BRADLEY, B.; RESSLER, K. J. Impaired fear inhibition is a biomarker of PTSD but not depression. **Depress Anxiety**, 27 (3), 244-51, 2010.

JOVANOVIC, T.; NORRHOLM, S. D.; BLANDING, N. Q.; PHIFER, J. E.; WEISS, T.; DAVIS, M.; DUNCAN, E.; BRADLEY, B.; RESSLER, K. Fear potentiation is associated with hypothalamic-

pituitary-adrenal axis function in PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, 35 (6), 846-57, 2010.

KALRA, S. P.; KALRA, P. S. NPY--an endearing journey in search of a neurochemical on/off switch for appetite, sex and reproduction. **Peptides**, 25 (3), 465-71, 2004.

KARL, T.; CHESWORTH, R.; DUFFY, L.; HERZOG, H. Schizophrenia-relevant behaviours in a genetic mouse model for Y2 deficiency. **Behav Brain Res**, 207 (2), 434-40, 2010.

KARL, T.; DUFFY, L.; HERZOG, H. Behavioural profile of a new mouse model for NPY deficiency. **Eur J Neurosci**, 28 (1), 173-80, 2008.

KARLSSON, R. M.; CHOE, J. S.; CAMERON, H. A.; THORSELL, A.; CRAWLEY, J. N.; HOLMES, A.; HEILIG, M. The neuropeptide Y Y1 receptor subtype is necessary for the anxiolytic-like effects of neuropeptide Y, but not the antidepressant-like effects of fluoxetine, in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, 195 (4), 547-57, 2008.

KARLSSON, R. M.; HOLMES, A.; HEILIG, M.; CRAWLEY, J. N. Anxiolytic-like actions of centrally-administered neuropeptide Y, but not galanin, in C57BL/6J mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 80 (3), 427-36, 2005.

KASK, A.; HARRO, J. Inhibition of amphetamine- and apomorphine-induced behavioural effects by neuropeptide Y Y(1) receptor antagonist BIBO 3304. **Neuropharmacology**, 39 (7), 1292-302, 2000.

KASK, A.; HARRO, J.; VON HORSTEN, S.; REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. **Neurosci Biobehav Rev**, 26 (3), 259-83, 2002.

KESSLER, R. C.; PETUKHOVA, M.; SAMPSON, N. A.; ZASLAVSKY, A. M.; WITTCHEN, H. U. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, 21 (3), 169-84, 2012.

KLEIN, S. L.; LAMBERT, K. G.; DURR, D.; SCHAEFER, T.; WARING, R. E. Influence of environmental enrichment and sex on predator stress response in rats. **Physiol Behav**, 56 (2), 291-7, 1994.

KOKARE, D. M.; DANDEKAR, M. P.; CHOPDE, C. T.; SUBHEDAR, N. Interaction between neuropeptide Y and alpha-melanocyte

stimulating hormone in amygdala regulates anxiety in rats. **Brain Res**, 1043 (1-2), 107-14, 2005.

KOSTEN, T. A.; GALLOWAY, M. P.; DUMAN, R. S.; RUSSELL, D. S.; D'SA, C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. **Neuropsychopharmacology**, 33 (7), 1545-58, 2008.

KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiol Learn Mem**, 91 (1), 32-40, 2009.

KRYSIAK, R.; OBUCHOWICZ, E.; HERMAN, Z. S. Conditioned fear-induced changes in neuropeptide Y-like immunoreactivity in rats: the effect of diazepam and buspirone. **Neuropeptides**, 34 (3-4), 148-57, 2000.

LAMBERT, T. J.; FERNANDEZ, S. M.; FRICK, K. M. Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. **Neurobiol Learn Mem**, 83 (3), 206-16, 2005.

LARHAMMAR, D.; SÖDERBERG, C.; BLOMQVIST, A. G. **The biology of neuropeptide Y and related peptides**. Totowa: Humana Press, 1993. 564.

LEGGIO, M. G.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F.; SPIRITO, F.; RICCI, B.; GELFO, F.; PETROSINI, L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behav Brain Res**, 163 (1), 78-90, 2005.

LEHMANN, M. L.; HERKENHAM, M. Environmental enrichment confers stress resiliency to social defeat through an infralimbic cortex-dependent neuroanatomical pathway. **J Neurosci**, 31 (16), 6159-73, 2011.

LIN, E. J.; LIN, S.; ALJANOVA, A.; DURING, M. J.; HERZOG, H. Adult-onset hippocampal-specific neuropeptide Y overexpression confers mild anxiolytic effect in mice. **Eur Neuropsychopharmacol**, 20 (3), 164-75, 2010.

MAHAN, A. L.; RESSLER, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends Neurosci**, 35 (1), 24-35, 2012.

- MAILLOUX, J. G.; EDWARDS, H. P.; BARRY, W. F.; ROWSELL, H. C.; ACHORN, E. G. Effects of differential rearing on cortical evoked potentials of the albino rat. **J Comp Physiol Psychol**, 87 (3), 475-80, 1974.
- MALVA, J. O.; XAPELLI, S.; BAPTISTA, S.; VALERO, J.; AGASSE, F.; FERREIRA, R.; SILVA, A. P. Multifaces of neuropeptide Y in the brain - Neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. **Neuropeptides**, 46 (6), 299-308, 2012.
- MAMOUNAS, L. A.; ALTAR, C. A.; BLUE, M. E.; KAPLAN, D. R.; TESSAROLLO, L.; LYONS, W. E. BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. **J Neurosci**, 20 (2), 771-82, 2000.
- MCDONALD, A. J.; PEARSON, J. C. Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. **Neurosci Lett**, 100 (1-3), 53-8, 1989.
- MCLEOD, D. S.; KOENEN, K. C.; MEYER, J. M.; LYONS, M. J.; EISEN, S.; TRUE, W.; GOLDBERG, J. Genetic and environmental influences on the relationship among combat exposure, posttraumatic stress disorder symptoms, and alcohol use. **J Trauma Stress**, 14 (2), 259-75, 2001.
- MEDEIROS, M. D.; TURNER, A. J. Processing and metabolism of peptide-YY: pivotal roles of dipeptidylpeptidase-IV, aminopeptidase-P, and endopeptidase-24.11. **Endocrinology**, 134 (5), 2088-94, 1994.
- MEDINA, J. H.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behav Brain Res**, 192 (1), 61-9, 2008.
- MELE, P.; OBERTO, A.; SERRA, M.; PISU, M. G.; FLORIS, I.; BIGGIO, G.; EVA, C. Increased expression of the gene for the Y1 receptor of neuropeptide Y in the amygdala and paraventricular nucleus of Y1R/LacZ transgenic mice in response to restraint stress. **J Neurochem**, 89 (6), 1471-8, 2004.
- MILLER, M. W.; WOLF, E. J.; KILPATRICK, D.; RESNICK, H.; MARX, B. P.; HOLOWKA, D. W.; KEANE, T. M.; ROSEN, R. C.; FRIEDMAN, M. J. The Prevalence and Latent Structure of Proposed DSM-5 Posttraumatic Stress Disorder Symptoms in U.S. National and Veteran Samples. **Psychological Trauma: Theory, Research, Practice, and Policy** 12, 2012.

MINTH, C. D.; BLOOM, S. R.; POLAK, J. M.; DIXON, J. E. Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81 (14), 4577-81, 1984.

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M. Effects of enrichment predominate over those of chronic stress on fear-related behavior in male rats. **Stress**, 12 (4), 305-12, 2009.

MORGAN, C. A., 3RD; RASMUSSEN, A. M.; WANG, S.; HOYT, G.; HAUGER, R. L.; HAZLETT, G. Neuropeptide-Y, cortisol, and subjective distress in humans exposed to acute stress: replication and extension of previous report. **Biol Psychiatry**, 52 (2), 136-42, 2002.

MORGAN, C. A., 3RD; RASMUSSEN, A. M.; WINTERS, B.; HAUGER, R. L.; MORGAN, J.; HAZLETT, G.; SOUTHWICK, S. Trauma exposure rather than posttraumatic stress disorder is associated with reduced baseline plasma neuropeptide-Y levels. **Biol Psychiatry**, 54 (10), 1087-91, 2003.

MORGAN, C. A., 3RD; WANG, S.; RASMUSSEN, A.; HAZLETT, G.; ANDERSON, G.; CHARNEY, D. S. Relationship among plasma cortisol, catecholamines, neuropeptide Y, and human performance during exposure to uncontrollable stress. **Psychosom Med**, 63 (3), 412-22, 2001.

MORGAN, C. A., 3RD; WANG, S.; SOUTHWICK, S. M.; RASMUSSEN, A.; HAZLETT, G.; HAUGER, R. L.; CHARNEY, D. S. Plasma neuropeptide-Y concentrations in humans exposed to military survival training. **Biol Psychiatry**, 47 (10), 902-9, 2000.

MORLEY, J. E.; FLOOD, J. F. Neuropeptide Y and memory processing. **Ann N Y Acad Sci**, 611, 226-31, 1990.

MYERS, K. M.; DAVIS, M. Mechanisms of fear extinction. **Mol Psychiatry**, 12 (2), 120-50, 2007.

NAERT, G.; IXART, G.; MAURICE, T.; TAPIA-ARANCIBIA, L.; GIVALOIS, L. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. **Mol Cell Neurosci**, 46 (1), 55-66, 2011.



- NAKAJIMA, M.; INUI, A.; ASAKAWA, A.; MOMOSE, K.; UENO, N.; TERANISHI, A.; BABA, S.; KASUGA, M. Neuropeptide Y produces anxiety via Y2-type receptors. **Peptides**, 19 (2), 359-63, 1998.
- NAWA, H.; BESSHO, Y.; CARNAHAN, J.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, K. Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. **J Neurochem**, 60 (2), 772-5, 1993.
- NAWA, H.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CARNAHAN, J. Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. **J Neurosci**, 14 (6), 3751-65, 1994.
- NEMEROFF, C. B.; BREMNER, J. D.; FOA, E. B.; MAYBERG, H. S.; NORTH, C. S.; STEIN, M. B. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. **J Psychiatr Res**, 40 (1), 1-21, 2006.
- NORRHOLM, S. D.; JOVANOVIĆ, T. Tailoring therapeutic strategies for treating posttraumatic stress disorder symptom clusters. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 6, 517-32, 2010.
- NORRHOLM, S. D.; JOVANOVIĆ, T.; OLIN, I. W.; SANDS, L. A.; KARAPANOU, I.; BRADLEY, B.; RESSLER, K. J. Fear extinction in traumatized civilians with posttraumatic stress disorder: relation to symptom severity. **Biol Psychiatry**, 69 (6), 556-63, 2011.
- OBERTO, A.; PANZICA, G.; ALTRUDA, F.; EVA, C. Chronic modulation of the GABA(A) receptor complex regulates Y1 receptor gene expression in the medial amygdala of transgenic mice. **Neuropharmacology**, 39 (2), 227-34, 2000.
- OU, L. C.; GEAN, P. W. Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. **Mol Pharmacol**, 72 (2), 350-8, 2007.
- PAMPLONA, F. A.; BITENCOURT, R. M.; TAKAHASHI, R. N. Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 90 (1), 290-3, 2008.
- PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D.; PANDOLFO, P.; TAKAHASHI, R. N. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 188 (4), 641-9, 2006.

PAMPLONA, F. A.; TAKAHASHI, R. N. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Neurosci Lett**, 397 (1-2), 88-92, 2006.

PAVIA, J. M.; HASTINGS, J. A.; MORRIS, M. J. Neuropeptide Y potentiation of potassium-induced noradrenaline release in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat in vivo. **Brain Res**, 690 (1), 108-11, 1995.

PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex**. London: Oxford University Press, 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press 2002.

PEDRAZZINI, T.; PRALONG, F.; GROUZMANN, E. Neuropeptide Y: the universal soldier. **Cell Mol Life Sci**, 60 (2), 350-77, 2003.

PEGO, J. M.; MORGADO, P.; PINTO, L. G.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F.; SOUSA, N. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. **Eur J Neurosci**, 27 (6), 1503-16, 2008.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, 14 (3), 149-67, 1985.

PEREIRA, L. O.; ARTENI, N. S.; PETERSEN, R. C.; DA ROCHA, A. P.; ACHAVAL, M.; NETTO, C. A. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, 87 (1), 101-8, 2007.

PHAM, T. M.; WINBLAD, B.; GRANHOLM, A. C.; MOHAMMED, A. H. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 73 (1), 167-75, 2002.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav Neurosci**, 106 (2), 274-85, 1992.

PICKENS, C. L.; ADAMS-DEUTSCH, T.; NAIR, S. G.; NAVARRE, B. M.; HEILIG, M.; SHAHAM, Y. Effect of pharmacological manipulations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor

- neurotransmission on incubation of conditioned fear. **Neuroscience**, 164 (4), 1398-406, 2009.
- POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci**, 2 (1), 24-32, 2001.
- PRIMEAUX, S. D.; WILSON, S. P.; CUSICK, M. C.; YORK, D. A.; WILSON, M. A. Effects of altered amygdalar neuro peptide Y expression on anxiety-related behaviors. **Neuropsychopharmacology**, 30 (9), 1589-97, 2005.
- PRONCHUK, N.; BECK-SICKINGER, A. G.; COLMERS, W. F. Multiple NPY receptors Inhibit GABA(A) synaptic responses of rat medial parvocellular effector neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, 143 (2), 535-43, 2002.
- QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In: ANDERSEN, M. L. e TUFIK, S. (Ed.). **Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research**. São Paulo: Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia, 2010. cap. 20, p.227-269.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33 (1), 56-72, 2008.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neurosci Biobehav Rev**, 22 (1), 33-57, 1998.
- RAMPON, C.; TANG, Y. P.; GOODHOUSE, J.; SHIMIZU, E.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat Neurosci**, 3 (3), 238-44, 2000.
- RANGANI, R. J.; UPADHYA, M. A.; NAKHATE, K. T.; KOKARE, D. M.; SUBHEDAR, N. K. Nicotine evoked improvement in learning and memory is mediated through NPY Y1 receptors in rat model of Alzheimer's disease. **Peptides**, 33 (2), 317-28, 2012.
- RASMUSSEN, A. M.; HAUGER, R. L.; MORGAN, C. A.; BREMNER, J. D.; CHARNEY, D. S.; SOUTHWICK, S. M. Low baseline and yohimbine-stimulated plasma neuro peptide Y (NPY) levels in combat-related PTSD. **Biol Psychiatry**, 47 (6), 526-39, 2000.

RASMUSSEN, A. M.; SCHNURR, P. P.; ZUKOWSKA, Z.; SCIOLI, E.; FORMAN, D. E. Adaptation to extreme stress: post-traumatic stress disorder, neuropeptide Y and metabolic syndrome. **Exp Biol Med (Maywood)**, 235 (10), 1150-62, 2010.

RAUCH, S. L.; SHIN, L. M.; PHELPS, E. A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging research--past, present, and future. **Biol Psychiatry**, 60 (4), 376-82, 2006.

REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; HERZOG, H.; QUIRION, R. Neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors mediate behaviour in two animal models of anxiety: evidence from Y2 receptor knockout mice. **Behav Brain Res**, 141 (2), 251-5, 2003.

\_\_\_\_\_. Characterization of neuropeptide Y, Y(2) receptor knockout mice in two animal models of learning and memory processing. **J Mol Neurosci**, 22 (3), 159-66, 2004.

REDROBE, J. P.; DUMONT, Y.; ST-PIERRE, J. A.; QUIRION, R. Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizures and cognition. **Brain Res**, 848 (1-2), 153-66, 1999.

REICH, C. G.; MOHAMMADI, M. H.; ALGER, B. E. Endocannabinoid modulation of fear responses: learning and state-dependent performance effects. **J Psychopharmacol**, 22 (7), 769-77, 2008.

ROCKMAN, G. E.; BOROWSKI, T. B.; GLAVIN, G. B. The effects of environmental enrichment on voluntary ethanol consumption and stress ulcer formation in rats. **Alcohol**, 3 (5), 299-302, 1986.

ROTZINGER, S.; LOVEJOY, D. A.; TAN, L. A. Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. **Peptides**, 31 (4), 736-56, 2010.

ROY, V.; BELZUNG, C.; DELARUE, C.; CHAPILLON, P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol Behav**, 74 (3), 313-20, 2001.

RUDY, J. W.; HUFF, N. C.; MATUS-AMAT, P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. **Neurosci Biobehav Rev**, 28 (7), 675-85, 2004.

- RUSSO, S. J.; MURROUGH, J. W.; HAN, M. H.; CHARNEY, D. S.; NESTLER, E. J. Neurobiology of resilience. **Nat Neurosci**, 15 (11), 1475-84, 2012.
- SAH, R.; GERACIOTI, T. D. Neuropeptide Y and posttraumatic stress disorder. **Mol Psychiatry**, 10.1038/mp.2012.101., 2012.
- SAINSBURY, A.; SCHWARZER, C.; COUZENS, M.; FETISSOV, S.; FURTINGER, S.; JENKINS, A.; COX, H. M.; SPERK, G.; HOKFELT, T.; HERZOG, H. Important role of hypothalamic Y2 receptors in body weight regulation revealed in conditional knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99 (13), 8938-43, 2002.
- SAJDYK, T. J.; VANDERGRIFF, M. G.; GEHLERT, D. R. Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. **Eur J Pharmacol**, 368 (2-3), 143-7, 1999.
- SALMON, P. Effects of physical exercise on anxiety, depression, and sensitivity to stress: a unifying theory. **Clin Psychol Rev**, 21 (1), 33-61, 2001.
- SAPOLSKY, R. M. **Why zebras don't get ulcers**. 2.ed. New York: W. H. Freeman, 1998. 434.
- SCHLICKER, E.; KATHMANN, M. Presynaptic Neuropeptide Receptor. In: SÜDHOF, T. C. e STARKE, K. (Ed.). **Pharmacology of Neurotransmitter Release**. Berlin: Springer, v.184, 2008.
- SCHLOESSER, R. J.; LEHMANN, M.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H. K.; HERKENHAM, M. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Mol Psychiatry**, 15 (12), 1152-63, 2010.
- SELYE, H. **The stress of life**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1978. 516.
- SHIEH, P. B.; GHOSH, A. Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. **J Neurobiol**, 41 (1), 127-34, 1999.
- SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behav Brain Res**, 222 (1), 246-64, 2011.

SORENSEN, A. T.; KANTER-SCHLIFKE, I.; CARLI, M.; BALDUCCI, C.; NOE, F.; DURING, M. J.; VEZZANI, A.; KOKAIA, M. NPY gene transfer in the hippocampus attenuates synaptic plasticity and learning. **Hippocampus**, 18 (6), 564-74, 2008.

SORENSEN, A. T.; KANTER-SCHLIFKE, I.; LIN, E. J.; DURING, M. J.; KOKAIA, M. Activity-dependent volume transmission by transgene NPY attenuates glutamate release and LTP in the subiculum. **Mol Cell Neurosci**, 39 (2), 229-37, 2008.

SORENSEN, A. T.; NIKITIDOU, L.; LEDRI, M.; LIN, E. J.; DURING, M. J.; KANTER-SCHLIFKE, I.; KOKAIA, M. Hippocampal NPY gene transfer attenuates seizures without affecting epilepsy-induced impairment of LTP. **Exp Neurol**, 215 (2), 328-33, 2009.

SORENSEN, G.; LINDBERG, C.; WORTWEIN, G.; BOLWIG, T. G.; WOLDBYE, D. P. Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation. **J Neurosci Res**, 77 (5), 723-9, 2004.

SOUTHWICK, S. M.; VYTHILINGAM, M.; CHARNEY, D. S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annu Rev Clin Psychol**, 1, 255-91, 2005.

STERN, C. A.; GAZARINI, L.; TAKAHASHI, R. N.; GUIMARAES, F. S.; BERTOGLIO, L. J. On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment. **Neuropsychopharmacology**, 37 (9), 2132-42, 2012.

TAMBARO, S.; TOMASI, M. L.; BORTOLATO, M. Long-term CB1 receptor blockade enhances vulnerability to anxiogenic-like effects of cannabinoids. **Neuropharmacology**, 10.1016/j.neuropharm.2013.02.009., 2013.

TASAN, R. O.; NGUYEN, N. K.; WEGER, S.; SARTORI, S. B.; SINGEWALD, N.; HEILBRONN, R.; HERZOG, H.; SPERK, G. The central and basolateral amygdala are critical sites of neuropeptide Y/Y2 receptor-mediated regulation of anxiety and depression. **J Neurosci**, 30 (18), 6282-90, 2010.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. **Nature**, 296 (5858), 659-60, 1982.

THOENEN, H. Neurotrophins and activity-dependent plasticity. **Prog Brain Res**, 128, 183-91, 2000.

THORSELL, A.; CARLSSON, K.; EKMAN, R.; HEILIG, M. Behavioral and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. **Neuroreport**, 10 (14), 3003-7, 1999.

THORSELL, A.; MICHALKIEWICZ, M.; DUMONT, Y.; QUIRION, R.; CABERLOTTO, L.; RIMONDINI, R.; MATHE, A. A.; HEILIG, M. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97 (23), 12852-7, 2000.

THORSELL, A.; REPUNTE-CANONIGO, V.; O'DELL, L. E.; CHEN, S. A.; KING, A. R.; LEKIC, D.; KOOB, G. F.; SANNA, P. P. Viral vector-induced amygdala NPY overexpression reverses increased alcohol intake caused by repeated deprivations in Wistar rats. **Brain**, 130 (Pt 5), 1330-7, 2007.

THORSELL, A.; RIMONDINI, R.; HEILIG, M. Blockade of central neuropeptide Y (NPY) Y2 receptors reduces ethanol self-administration in rats. **Neurosci Lett**, 332 (1), 1-4, 2002.

THORSELL, A.; SVENSSON, P.; WIKLUND, L.; SOMMER, W.; EKMAN, R.; HEILIG, M. Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. **Regul Pept**, 75-76, 247-54, 1998.

TOVOTE, P.; MEYER, M.; BECK-SICKINGER, A. G.; VON HORSTEN, S.; OVE OGREN, S.; SPIESS, J.; STIEDL, O. Central NPY receptor-mediated alteration of heart rate dynamics in mice during expression of fear conditioned to an auditory cue. **Regul Pept**, 120 (1-3), 205-14, 2004.

TRENT, N. L.; MENARD, J. L. Infusions of neuropeptide Y into the lateral septum reduce anxiety-related behaviors in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, 99 (4), 580-90, 2011.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**, 8 (4), 262-75, 2007.

TSCHENETT, A.; SINGEWALD, N.; CARLI, M.; BALDUCCI, C.; SALCHNER, P.; VEZZANI, A.; HERZOG, H.; SPERK, G. Reduced anxiety and improved stress coping ability in mice lacking NPY-Y2 receptors. **Eur J Neurosci**, 18 (1), 143-8, 2003.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, 2 (3), 266-70, 1999.

\_\_\_\_\_. Neural consequences of environmental enrichment. **Nat Rev Neurosci**, 1 (3), 191-8, 2000.

VERMA, D.; TASAN, R.; HERZOG, H.; SPERK, G. NPY controls fear conditioning and fear extinction by combined action on Y(1) and Y(2) receptors. **Br J Pharmacol**, 166 (4), 1461-73, 2012.

VIANA, M. C.; ANDRADE, L. H. Lifetime Prevalence, Age and Gender Distribution and Age-of-Onset of Psychiatric Disorders in the São Paulo Metropolitan Area, Brazil: Results from the São Paulo Megacity Mental Health Survey. **Rev Bras Psiquiatr**, 34, 11, 2012.

WESTRIN, A.; EKMAN, R.; TRASKMAN-BENDZ, L. Alterations of corticotropin releasing hormone (CRH) and neuropeptide Y (NPY) plasma levels in mood disorder patients with a recent suicide attempt. **Eur Neuropsychopharmacol**, 9 (3), 205-11, 1999.

WESTRIN, A.; ENGSTOM, G.; EKMAN, R.; TRASKMAN-BENDZ, L. Correlations between plasma-neuropeptides and temperament dimensions differ between suicidal patients and healthy controls. **J Affect Disord**, 49 (1), 45-54, 1998.

WIDDOWSON, P. S.; ORDWAY, G. A.; HALARIS, A. E. Reduced neuropeptide Y concentrations in suicide brain. **J Neurochem**, 59 (1), 73-80, 1992.

WIDERLOV, E.; LINDSTROM, L. H.; WAHLESTEDT, C.; EKMAN, R. Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively. **J Psychiatr Res**, 22 (1), 69-79, 1988.

WILL, B.; GALANI, R.; KELCHE, C.; ROSENZWEIG, M. R. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). **Prog Neurobiol**, 72 (3), 167-82, 2004.

WOLFF, M.; LOUKAVENKO, E. A.; WILL, B. E.; DALRYMPLE-ALFORD, J. C. The extended hippocampal-diencephalic memory system: enriched housing promotes recovery of the flexible use of spatial representations after anterior thalamic lesions. **Hippocampus**, 18 (10), 996-1007, 2008.



WOODCOCK, E. A.; RICHARDSON, R. Effects of environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats. **Neurobiol Learn Mem**, 73 (1), 1-10, 2000a.

\_\_\_\_\_. Effects of multisensory environmental stimulation on contextual conditioning in the developing rat. **Neurobiol Learn Mem**, 74 (2), 89-104, 2000b.

XAPELLI, S.; BERNARDINO, L.; FERREIRA, R.; GRADE, S.; SILVA, A. P.; SALGADO, J. R.; CAVADAS, C.; GROUZMANN, E.; POULSEN, F. R.; JAKOBSEN, B.; OLIVEIRA, C. R.; ZIMMER, J.; MALVA, J. O. Interaction between neuropeptide Y (NPY) and brain-derived neurotrophic factor in NPY-mediated neuroprotection against excitotoxicity: a role for microglia. **Eur J Neurosci**, 27 (8), 2089-102, 2008.

YAMADA, D.; ZUSHIDA, K.; WADA, K.; SEKIGUCHI, M. Pharmacological discrimination of extinction and reconsolidation of contextual fear memory by a potentiator of AMPA receptors. **Neuropsychopharmacology**, 34 (12), 2574-84, 2009.

YANNIELLI, P. C.; HARRINGTON, M. E. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. **Peptides**, 22 (3), 547-56, 2001.

YEHUDA, R. Risk and resilience in posttraumatic stress disorder. **J Clin Psychiatry**, 65 Suppl 1, 29-36, 2004.

YEHUDA, R.; BIERER, L. M.; SCHMEIDLER, J.; AFERIAT, D. H.; BRESLAU, I.; DOLAN, S. Low cortisol and risk for PTSD in adult offspring of holocaust survivors. **Am J Psychiatry**, 157 (8), 1252-9, 2000.

YEHUDA, R.; BRAND, S.; YANG, R. K. Plasma neuropeptide Y concentrations in combat exposed veterans: relationship to trauma exposure, recovery from PTSD, and coping. **Biol Psychiatry**, 59 (7), 660-3, 2006.

YEHUDA, R.; BRYANT, R.; MARMAR, C.; ZOHAR, J. Pathological responses to terrorism. **Neuropsychopharmacology**, 30 (10), 1793-805, 2005.

YEHUDA, R.; FLORY, J. D.; SOUTHWICK, S.; CHARNEY, D. S. Developing an agenda for translational studies of resilience and

vulnerability following trauma exposure. **Ann N Y Acad Sci**, 1071, 379-96, 2006.

YEHUDA, R.; HYMAN, S. E. The impact of terrorism on brain, and behavior: what we know and what we need to know. **Neuropsychopharmacology**, 30 (10), 1773-80, 2005.

YEHUDA, R.; SCHMEIDLER, J.; WAINBERG, M.; BINDER-BRYNES, K.; DUVDEVANI, T. Vulnerability to posttraumatic stress disorder in adult offspring of Holocaust survivors. **Am J Psychiatry**, 155 (9), 1163-71, 1998.

ZAHRAN, S.; PEEK, L.; SNODGRASS, J. G.; WEILER, S.; HEMPEL, L. Economics of disaster risk, social vulnerability, and mental health resilience. **Risk Anal**, 31 (7), 1107-19, 2011.

ZAMBELLO, E.; ZANETTI, L.; HEDOU, G. F.; ANGELICI, O.; ARBAN, R.; TASAN, R. O.; SPERK, G.; CABERLOTTO, L. Neuropeptide Y-Y2 receptor knockout mice: influence of genetic background on anxiety-related behaviors. **Neuroscience**, 176, 420-30, 2011.

ZHOU, Z.; ZHU, G.; HARIRI, A. R.; ENOCH, M. A.; SCOTT, D.; SINHA, R.; VIRKKUNEN, M.; MASH, D. C.; LIPSKY, R. H.; HU, X. Z.; HODGKINSON, C. A.; XU, K.; BUZAS, B.; YUAN, Q.; SHEN, P. H.; FERRELL, R. E.; MANUCK, S. B.; BROWN, S. M.; HAUGER, R. L.; STOHLER, C. S.; ZUBIETA, J. K.; GOLDMAN, D. Genetic variation in human NPY expression affects stress response and emotion. **Nature**, 452 (7190), 997-1001, 2008.

ZURITA, A.; MARTIJENA, I.; CUADRA, G.; BRANDAO, M. L.; MOLINA, V. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behav Brain Res**, 117 (1-2), 163-71, 2000.



*Depois da tempestade sempre vem a bonança.*