

Ericks Sousa Soares

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES HIPOCAMPAIS DO
NEUROPEPTÍDEO Y NA MODULAÇÃO DA MEMÓRIA
AVALIADA NO LABIRINTO AQUÁTICO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thereza
Christina Monteiro de Lima.

Coorientador: Vagner Fagnani
Linartevichi.

Florianópolis
2019

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

Soares, Ericks Sousa

Participação dos receptores hipocâmpais do neuropeptídeo Y na modulação da memória avaliada no labirinto aquático / Ericks Sousa Soares ; orientadora, Thereza Christina Monteiro de Lima, coorientador, Vagner Fagnani Linartevischi, 2019.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

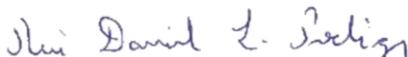
1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Neuropeptídeo Y. 4. Memória. 5. Labirinto aquático. I. de Lima, Thereza Christina Monteiro. II. Linartevischi, Vagner Fagnani. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

“Participação dos receptores hipocâmpais do neuropeptídeo Y na modulação da memória avaliada no labirinto aquático”

Por

Ericks Sousa Soares

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/2019/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr.(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Cristina Aparecida Jark Stern (Universidade Federal do Paraná)



Dr.(a) Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2019.

Dedico este trabalho à minha
mãe,
Marcicleide Sousa, e aos meus
irmãos,
Marcelle e Ronald Sousa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me ajudar e dar a motivação que eu preciso para realizar meus sonhos.

A toda a minha família por sempre me apoiar e fazer o possível e o impossível para que eu não desista.

À Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima por ter aceitado me orientar e por me receber de braços abertos no Laboratório de Neurofarmacologia. Obrigado pelo apoio, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Vagner Fagnani Linartevischi por permitir que eu desse continuidade ao seu trabalho e que, mesmo à distância, sempre foi muito solícito.

Ao Prof. Dr. Felipe Vanz por ter toda a paciência do mundo em ensinar os protocolos do laboratório. Me mostrou que ser chamado de IC é uma coisa ótima! Mais do que um colega de laboratório, é um grande irmão para a vida toda.

A todos os amigos que fiz no Laboratório de Neurofarmacologia. À Ma. Ana Claudia Jesse, à Ma. Bruna Caroline Pierone e ao Murilo Holtz de Andrade por terem me ajudado não somente dentro do laboratório mas em tudo que eu precisava e pelas aventuras durante todo este tempo.

À Danielle Priscila Martins e ao Filipe Mancilla Fernandes, que em tão pouco tempo tornaram-se amigos tão importantes e queridos, vou tê-los sempre em meu coração. Obrigado por todo apoio e motivação.

Aos colegas do PPG em Farmacologia e aos professores, servidores e técnicos do Departamento de Farmacologia, em especial à veterinária Dr^a. Luciana Aparecida Honorato pela ajuda com os animais e ao Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger por permitir a utilização da sala do labirinto aquático.

Aos professores Dr^a. Cristina Aparecida Jark Stern, Dr^a. Cristiane Ribeiro de Carvalho, Dr^a. Helena Iturvides Cimarosti e Dr. Rui Daniel Schroder Prediger por terem aceitado participar da banca de avaliação deste trabalho e contribuir com o mesmo.

À SIPG e ao LAMEB do CCB pelo exemplar apoio técnico fornecido ao longo destes dois anos.

Ao Sci-hub, em nome de Alexandra Elbakyan, pelo compartilhamento do conhecimento.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Memories warm you up from the
inside.
But they also tear you apart.”
(Haruki Murakami, 2002)

RESUMO

Memória é a capacidade de armazenar informações e posteriormente conseguir recuperá-las e utilizá-las. Dentre as várias áreas cerebrais envolvidas no processamento das memórias está o hipocampo situado nos lobos temporais do cérebro, responsável pelo processamento e armazenamento da informação, e tendo papel importante na navegação espacial. Dentre os vários transmissores que afetam as várias etapas da memória se pode citar os neuropeptídeos, amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central e com ações moduladoras, como é o caso do neuropeptídeo Y (NPY). Este possui 5 receptores conhecidos e atua diminuindo os níveis de AMPc por meio da inibição da adenilato ciclase. Sabe-se que ele é capaz de extinguir uma memória aversiva em protocolos de condicionamento aversivo contextual, mas ainda não está claro como exatamente ele faz isso ou, ainda mais importante, se ele pode modular respostas ao estresse em contextos menos aversivos, como o labirinto aquático, teste amplamente utilizado para estudos de memória não declarativa. O objetivo do presente trabalho foi investigar como o NPY do hipocampo dorsal de ratos estaria envolvido nas etapas de formação de memórias, utilizando o paradigma do labirinto aquático. Nossos resultados mostram que uma dose de apenas 1 pmol de NPY imediatamente após a sessão de treino foi capaz de gerar uma resposta amnésica nos animais e que o estresse de contenção agudo atenua os efeitos do neuropeptídeo, fazendo com que os animais não mais lembrem da situação aversiva a qual foram submetidos. Além disso, tal dose não afetaria outras etapas da memória, mas unicamente a consolidação da mesma. Neste contexto observou-se a participação dos receptores Y1 e Y2 do NPY atenuando respostas que, sem o estresse, não seriam visualizadas. Desta forma, o NPY pode se tornar uma ferramenta viável não somente para aquelas memórias extremamente aversivas, como também para contextos com um menor grau de aversividade. Tais descobertas ajudam a entender mais sobre o complexo mundo do NPY, como ele funciona frente a situações pouco ou muito estressantes e revela seu potencial como uma futura alternativa viável para o tratamento de transtornos de memória, como o transtorno do estresse pós-traumático, por exemplo.

Palavras-chave: Neuropeptídeo Y. Labirinto aquático.
Hipocampo dorsal. Consolidação da memória.

ABSTRACT

The ability to store information and then be able to retrieve and use it is known as memory. The hippocampus is one of the various brain areas involved in the processing of memory types. It is responsible for the processing and storage of information and has an important role in spatial navigation. Besides classical transmitters that affect memory, there are the neuropeptides, widely distributed in the central nervous system, such as the neuropeptide Y (NPY). NPY has 5 known receptors that inhibit adenylyl cyclase and decrease AMPc. Studies show that NPY is able to extinguish an aversive memory in contextual aversive conditioning protocols but it is unclear how it works accurately or if it can modulate stress responses in tests with less aversive contexts, such as the water maze. The aim of the study was to investigate how NPY of the dorsal hippocampus of rats would be involved in the steps of memory formation using the water maze. Our results show that 1 pmol of NPY injected immediately after the training session generated an amnesic-like effect in the animals and that the restraint stress attenuates the effects of the NPY, so the animals do not longer remember the situation they have been through. Moreover, this dose does not affect other stages of memory but only its consolidation. The participation of NPY Y1 and Y2 receptors was observed attenuating responses that, without stress, would not be visualized. Therefore, the NPY can become a viable tool for both extremely aversive memories and contexts with a lower degree of adversity. Our findings contribute to a better understanding about the complex world of NPY, how it works during stressful situations and reveals its potential as a viable future alternative for the treatment of memory disorders such as post-traumatic stress disorder.

Key-words: Neuropeptide Y. Water maze. Dorsal hippocampus. Memory consolidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da memórias.....	21
Figura 2. Transmissão da informação através do hipocampo dorsal.....	23
Figura 3. Representação da síntese, liberação e mecanismos de ação do NPY no hipocampo	26
Figura 4. Representação do tubo de PVC utilizado para o estresse de contenção.....	33
Figura 5. Desenho esquemático do labirinto aquático.....	35
Figura 6. Diagrama esquemático e fotomicrografia de um corte coronal do hipocampo dorsal de ratos.....	37
Figura 7. Desenho experimental e curva de aprendizado durante a sessão de treino no labirinto aquático.....	43
Figura 8. Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y no HD imediatamente após a sessão de treino sobre a consolidação da memória na sessão de teste do labirinto aquático.....	45
Figura 9. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y e do estresse de contenção sobre a consolidação da memória no labirinto aquático.....	47
Figura 10. Efeito da microinfusão de neuropeptídeo Y no HD sobre a consolidação da memória após o estresse de contenção.....	48
Figura 11. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y no período após a janela de consolidação da memória no labirinto aquático.....	50
Figura 12. Efeito da microinfusão tardia do neuropeptídeo Y no HD sobre a consolidação da memória.....	51
Figura 13. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y no HD sobre a aquisição da memória no labirinto aquático.....	52
Figura 14. Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y sobre a aquisição da memória.....	53
Figura 15. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y1 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304 na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	54
Figura 16. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y1 sobre a etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	56

Figura 17. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y1 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	57
Figura 18. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y1 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	59
Figura 19. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y2 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.	60
Figura 20. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y2 sobre a etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	62
Figura 21. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y2 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	63
Figura 22. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y2 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma
 μL – Microlitro
AC – Adenilato ciclase
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA – Análise de variância
BIBO – BIBO3304 - antagonista seletivo Y1
BIIE – BIIE0246 - antagonista seletivo Y2
CA – Corno de Amón
 Ca^{2+} – Cálcio
CAC – Condicionamento aversivo contextual
cm – Centímetros
EPM – Erro padrão da média
g – Gramas
GABA – Ácido γ -aminobutírico
GD – Giro denteado
GLU – Glutamato
h – Hora
HD – Hipocampo dorsal
HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo)
HV – Hipocampo ventral
icv – Intracerebroventricular
ip – Intraperitoneal
 K^+ – Potássio
Kg – Quilograma
L – Litro
LTP – Potenciação de longa duração
mg – Miligrama
MIF – Fator inibidor da liberação do hormônio melanocócito
mL – Mililitro
mm – Milímetro
N – Norte
NE – Nordeste
Nmol – Nanomol
NO – Noroeste
NPY – Neuropeptídeo Y

O – Oeste
°C – Grau Celsius
PBS – Tampão fosfato-salino
PKA – Proteína Cinase A
pmol – Picomol
PVC – Policloreto de vinila
s – Segundos
S – Sul
sc – Subcutânea
SE – Sudeste
SO – Sudoeste
TEPT – Transtorno do Estresse Pós-Traumático
VcS – Via colateral de Schaffer
VP – Via perforante
Y – Tirosina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1. A memória	21
1.2. Neuropeptídeo Y.....	24
1.3. Labirinto aquático	27
1.4. Estresse	28
1.5. Hipótese	29
1.6. Objetivos.....	30
1.6.1. Objetivo geral	30
1.6.2. Objetivos específicos.....	30
2. Material e métodos	31
2.1. Considerações éticas	31
2.2. Animais	31
2.3. Fármacos	31
2.4. Cirurgia estereotáxica	32
2.5. Estresse de contenção	33
2.6. Labirinto aquático	33
2.6.1. Memória espacial de referência.....	34
2.7. Microinjeção central	35
2.8. Histologia.....	36
2.9. Delineamento experimental	39
2.10. Análise estatística	41
3. Resultados	43
3.1. Experimento 1: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y durante a consolidação da memória	43
3.2. Experimento 2: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y sobre a consolidação da memória após o estresse de contenção.....	46
3.3. Experimento 3: Efeito da microinfusão tardia do neuropeptídeo Y sobre a consolidação da memória espacial .	49
3.4. Experimento 4: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y no HD sobre a aquisição da memória espacial	52
3.5. Experimento 5: Efeito da administração do antagonista do receptor Y1 no HD sobre a consolidação da memória	54
3.6. Experimento 6: Efeito da administração do antagonista do receptor Y1 sobre o efeito do NPY na consolidação da memória.....	56

3.7. Experimento 7: Efeito da administração do antagonista do receptor Y2 no HD sobre a consolidação da memória.....	60
3.8. Experimento 8: Efeito da administração do antagonista do receptor Y2 sobre o efeito do NPY na consolidação da memória	63
4. Discussão	67
5. Considerações finais	73
6. Perspectivas.....	73
Referências.....	75
Apêndices	85
Anexos	89

1. INTRODUÇÃO

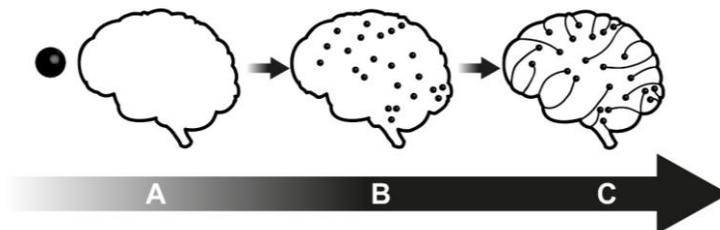
1.1. A MEMÓRIA

Memória é a capacidade de armazenar informações e posteriormente conseguir recuperá-las e utilizá-las. Tanto a memória quanto o aprendizado dependem da sinalização eletroquímica de aminoácidos, monoaminas biogênicas, neurotransmissores, e peptídeos nas redes neurais do sistema nervoso central (SNC) (ROSENZWEIG, 1998).

A memória pode ser classificada de várias formas, dependendo do foco de interesse. Por exemplo, de acordo com a função, pode ser memória trabalho ou referência; de acordo com a duração, memória de curta ou longa duração; de acordo com o conteúdo, memória implícita ou explícita; e de acordo com a natureza, memória associativa ou não associativa (GRAF; SCHACTER, 1985; MARTINEZ; KESNER, 1998).

Dessa forma, ela pode passar por fases, como por exemplo as fases de aquisição e consolidação (GÖTZSCHE; WOLDBYE, 2016), como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1. Fases da memória.



A) Contato com uma nova informação. **B)** Aquisição com a informação ainda lábil. **C)** Informação já consolidada no cérebro. Adaptado de Dudai (2004).

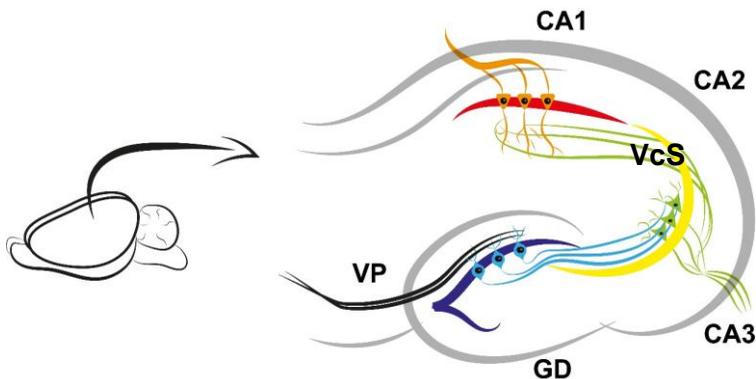
A **aquisição** acontece no momento em que há o contato com uma nova informação. Este é o início do processo, marcado por uma informação ainda lábil, isto é, passível de modificação. Para que esta seja de fato armazenada no cérebro de maneira estável, ocorre um processo denominado de **consolidação** da memória (DUDAI, 2002, 2004; NADEL et al., 2012). Este ocorre em cerca de seis horas e envolve síntese proteica, fatores de

transcrição e plasticidade neural, tornando a memória lábil em uma memória estável (AMTUL; ATTA-UR-RAHMAN, 2015; DAVIS; SQUIRE, 1984; DUDAI, 2004; GRIGOR'YAN; MARKEVICH, 2015). Uma vez consolidada, ela pode passar pelo processo de **evocação**, onde a informação pode ser mais uma vez modificada e para que ela seja armazenada no cérebro, ela precisará ser **reconsolidada** (SARA, 2000). Caso ocorra uma desestabilização, a informação poderá ser reduzida gradualmente devido a formação de novas memórias, até que seja **extinta** (BALDI; BUCHERELLI, 2015; DUDAI, 2004).

A respeito do processamento das mesmas, há o envolvimento de muitas áreas cerebrais como o córtex pré-frontal, o estriado, o córtex cerebral, a amígdala, o cerebelo e o hipocampo. Este último, localizado no lóbulo temporal do cérebro, funciona não como uma única estrutura mas, no caso de roedores, com suas regiões dorsal (HD) e ventral (HV) desempenhando diferentes tarefas, como processamento de memória e processamentos emocionais e afetivos, respectivamente (FANSELOW; DONG, 2010; MOSER; MOSER, 1998).

O HD é muito importante na navegação espacial. Ele apresenta conexões com diversas áreas cerebrais, dividindo-se nas regiões do Corno de Amon (CA1, CA2, CA3) e giro denteado (GD). Nesta rede de conexões, a informação chega ao hipocampo através de uma via perforante que parte do córtex entorrinal e se estende até o GD. A partir deste, fibras musgosas se conectam com as células piramidais de CA3 que, posteriormente, fazem a conexão com CA1 mediante a via colateral de Schaffer (NEVES et al., 2008) (Figura 2). Durante o processo de aprendizado ocorrem fenômenos de plasticidade no HD que auxiliam na formação de memórias, por meio do surgimento de novas redes neurais e fortalecimento das redes já existentes (FANSELOW; DONG, 2010).

Figura 2. Transmissão da informação através do hipocampo dorsal.



A informação chega através do córtex entorrinal pela VP até o GD (em preto), realizando a ativação hipocampal. Fibras musgosas (em azul) conectam-se com as células piramidais de CA3 (em verde) que, por sua vez, conectam-se com CA1 (em laranja) pela VcS. VP, via perforante; GD, giro dentado; CA, corno de Amon; VcS, via colateral de Schafer. Adaptado de Neves et al. (2008)

Um processo fundamental para que as memórias sejam finalmente consolidadas é chamado de potenciação de longa duração (do inglês *Long-Term Potentiation* - LTP). A consolidação ocorre por meio de alterações na estrutura das redes neurais, onde a LTP causa um aumento na eficiência sináptica de forma persistente. Isso acontece principalmente devido ao papel de neurotransmissores clássicos na LTP, tais como: acetilcolina, importante para a dinâmica de redes corticais necessária para o aprendizado de novas informações (HASSELMO; BOWER, 1993); dopamina, que modula a função hipocampal e pode melhorar a plasticidade do hipocampo por meio de sua liberação (LISMAN; GRACE, 2005); noradrenalina, liberada em momentos novos e/ou de excitação, auxiliando na plasticidade neural e formação de memórias (ASTON-JONES; BLOOM, 1981; BRANDWEIN; NGUYEN, 2019); glutamato, principal neurotransmissor excitatório com importância na transmissão sináptica e plasticidade (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003);

ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório, importante no prosseguimento das etapas de formação de memórias (HEANEY; KINNEY, 2016). Estes ocasionam síntese de novas proteínas, formação ou remodelação de sinapses e, conseqüentemente, consolidação da memória (ÖGREN et al., 2010). No entanto, os sistemas neuromoduladores também são tão importantes quanto tais mecanismos, uma vez que eles também estão envolvidos em processos sinápticos.

Como exemplo, pode-se citar os neuropeptídeos, maior grupo de neuromoduladores do sistema nervoso (DE WIED, 1997). Assim como os neurotransmissores clássicos, eles também são liberados na fenda sináptica, porém possuem uma liberação mais lenta e difusa por serem moléculas de alta densidade (GÖTZSCHE; WOLDBYE, 2016). Além de ações neuromoduladoras e tróficas, assim como um efeito direto em neurônios e propriedades fisiológicas específicas (KERSTIN et al., 1979; WIED et al., 1968), também possuem um papel importante no que diz respeito ao aprendizado e à memória (HEILIG et al., 1994; ÖGREN et al., 2010).

1.2. NEUROPEPTÍDEO Y

Pertencente à família do hormônio NPY (BERGLUND, 2003), o neuropeptídeo Y (NPY) foi primeiramente isolado a partir de cérebro suíno há mais de 30 anos, mas também é expresso em mamíferos, inclusive no ser humano (DE QUIDT, 1986; TATEMOTO, 1982). Ele possui 36 aminoácidos e tirosina (Y) em seu C terminal, de onde é derivado o seu nome.

Está envolvido na regulação de funções biológicas e fisiopatológicas, tais como: excitabilidade neuronal, comportamento alimentar, pressão sanguínea, ritmos circadianos, convulsões, secreções neuroendócrinas, neuroplasticidade e memória (BECK, 2013; BERGLUND, 2003; HANSEL, 2001; HÖKFELT et al., 2008; LOH, 2015; MAGNI, 2003; MICHALKIEWICZ et al., 2001; VEZZANI, 1999). O NPY é abundante em muitas regiões cerebrais, como septo lateral, hipotálamo, córtex, neocórtex, estriado, amígdala, tálamo e hipocampo (CABERLOTTO et al., 1998; CHANG et al., 1985; DE QUIDT; EMSON, 1986; LYNCH et al., 1989;

RAMAMOORTHY; WANG; WHIM, 2011). Além disso, pode ser detectado em astrócitos (RAMAMOORTHY; WHIM, 2008) e outros tipos de neurônios (WAHLESTEDTL; EKMAN; WIDERLOV, 1989).

O NPY age em receptores metabotrópicos, dos quais cinco já foram clonados: Y1, Y5 e o autorreceptor Y2 são os mais proeminentes (CABRELE; BECK-SICKINGER, 2000); Y4, com pouca afinidade pelo NPY, é menos expresso no SNC e muito expresso no TGI (BABILON; MÖRL; BECK-SICKINGER, 2013); e Y6, funcional apenas em coelhos e camundongos (STARBÄCK et al., 2000). O NPY se liga ao receptor acoplado à proteína G, inibindo a adenilatociclase, modulando os canais de Ca^{+2} e K^{+} e causando diminuição nos níveis de AMPc (CABRELE; BECK-SICKINGER, 2000; WAN; LAU, 1995) (Figura 3).

Figura 3. Representação da síntese, liberação e mecanismos de ação do NPY no hipocampo.

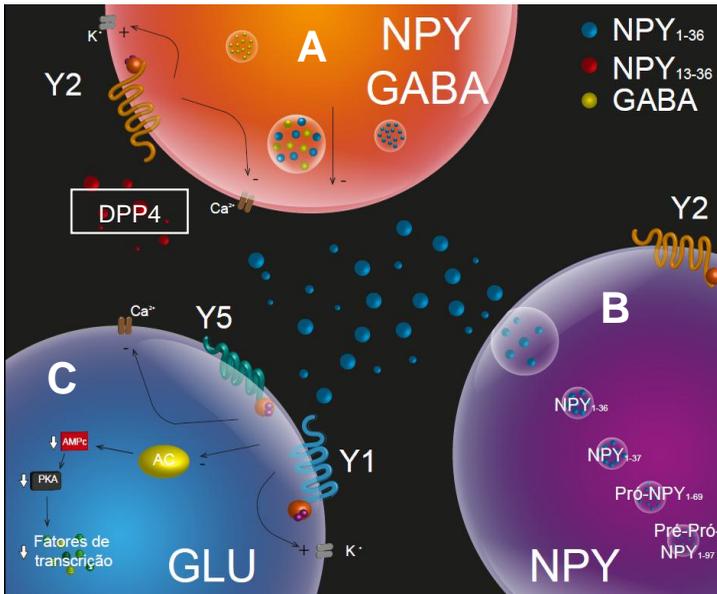


Ilustração mostrando como o NPY é sintetizado a partir de precursores, sua colocalização com outros neurotransmissores, sua liberação na fenda sináptica, sua ação nos receptores Y1, Y2 e Y5 e sua degradação. **A)** Interneurônio GABAérgico; **B)** Neurônio pré-sináptico com os precursores do NPY: Pré-Pró-NPY₁₋₉₇, Pró-NPY₁₋₆₉, NPY₁₋₃₇ e NPY₁₋₃₆; **C)** Neurônio pós-sináptico. NPY, neuropeptídeo Y; NPY₁₋₃₆, forma do neuropeptídeo Y com alta afinidade para os receptores Y1, Y4 e Y5; NPY₁₃₋₃₆, forma do neuropeptídeo Y convertida pela dipeptidilpeptidase IV (DPP4); GABA, ácido gama-aminobutírico; K⁺, potássio; Ca²⁺, cálcio; GLU, glutamato; AC, adenilato ciclase; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; PKA, proteína cinase A. Fonte: Autor.

Dados provenientes do nosso laboratório (LACH; DE LIMA, 2013; LINARTEVICH, 2017) mostram que a administração do NPY é capaz de prejudicar a consolidação e a reconsolidação da memória no teste de condicionamento aversivo contextual (CAC). Sugere-se, dessa forma, que o NPY é capaz de modular a memória por intermédio de seus receptores. E, de

forma semelhante, uma dose de 3 pmol de NPY, administrada via i.c.v., inibiu a aquisição e a consolidação de ratos expostos ao paradigma do condicionamento aversivo contextual (CAC) (LACH; DE LIMA, 2013). Em contrapartida, FLOOD et al. 1987, ao administrar 0,1 - 0,5 µg de NPY (via i.c.v.) imediatamente após o teste de esQUIVA passiva do tipo *step-down*, que avalia principalmente a memória operacional de roedores, percebeu um aumento na retenção de memória em camundongos adultos.

Logo, percebe-se que tanto efeitos inibitórios quanto excitatórios podem ser exercidos pelo NPY no processamento das memórias, o que depende do tipo e da etapa da memória, do tipo de receptor, da dose de fármaco utilizada, da região cerebral e do nível de estresse sofrido.

Alguns testes comportamentais mostram-se como excelentes ferramentas para avaliar o efeito de substâncias em protocolos experimentais que visam avaliar a memória e o aprendizado, dentre os quais pode-se destacar o teste do labirinto aquático.

1.3. LABIRINTO AQUÁTICO

O labirinto aquático, do inglês *water maze* (MORRIS et al., 1982), é um teste com um grau de aversividade menor em comparação com outros testes que avaliam aprendizado e memória, como o CAC por exemplo, sendo possível avaliar diferentes tipos de memória, como a memória operacional (realização de tarefas diárias) (MIYOSHI et al., 2002), a memória de procedimento (aquisição, armazenamento e uso do conhecimento) (MIYOSHI et al., 2002) e a memória espacial (PREDIGER et al., 2005).

A memória espacial expressa a capacidade de armazenar informações sobre uma situação específica em função do contexto espacial e lembrar posteriormente destas informações através da configuração espacial (dicas ambientais) (ROSENBAUM et al., 2012). O hipocampo teria papel indispensável neste tipo de memória, uma vez que ele é o responsável pela consolidação da mesma, fazendo com os animais relembrem uma situação anterior e explorem áreas

importantes para eles e não percam tempo e energia em áreas sem benefício ou já exploradas (ROBERTS; DEMBER; BRODWICK, 1962; SANDERSON; BANNERMAN, 2012)

O primeiro estudo utilizando o paradigma do labirinto aquático e o NPY, realizado por Thorsell et al. (2000), demonstrou que, por meio da inibição pré-sináptica mediada pelo receptor Y2, ratos transgênicos que superexpressavam NPY no hipocampo tiveram prejuízo na aquisição e na retenção de memórias espaciais. Neste estudo foi sugerido que o estresse foi diminuído pelo NPY, porém não se sabe como ele poderia estar fazendo isso e se esta mesma ação poderia ser vista em protocolos que envolvam uma memória espacial.

O NPY prejudica a consolidação de uma memória aversiva contextual forte (LACH; DE LIMA, 2013), o que pode ter uma importância clínica uma vez que se faz necessário o desenvolvimento de fármacos que sejam direcionados para memórias extremamente aversivas (patológicas), mas não para aquelas memórias de menor grau de aversividade (memórias adaptativas). No entanto, ainda não está claro se o efeito mediado pelo NPY também pode ser reproduzido em um protocolo de aprendizado que envolva um menor grau de aversividade e se ele exige um determinado nível de estresse. Aliás, o que seria estresse?

1.4. ESTRESSE

A palavra estresse vem do latim *distringere* (*dis* = afastar, *stringere* = apertar). De acordo com o dicionário Cambridge, estresse seria uma “grande preocupação causada por uma situação difícil ou algo que cause esta condição” (tradução livre), e não por menos já que ele era definido como um sequestro legal de bens para pagar indenizações, ou seja, algo que causava sofrimento para a pessoa acometida. Do ponto de vista biológico, o estresse também causaria sofrimento/dano ao organismo que por sua vez sofre alterações ao nível celular e molecular em resposta a esta situação para atingir novamente a homeostase corporal, isto é, o estado de equilíbrio (SELYE, 1936; YARIBEYGI et al., 2017).

Esta resposta inclui, por exemplo, alterações no estado de alerta, atenção e vigilância e também atinge o sistema endócrino, ativa o eixo HPA e libera vários hormônios, como cortisol, corticosterona, catecolaminas, vasopressina e gonadotropinas (RANABIR; REETU, 2011). Devido a isto, muitos associam estresse com uma piora no desempenho. Óbvio que suas alterações e consequências podem trazer prejuízo (DE KLOET; JOÉLS; HOLSBOER, 2005), mas o contrário também é possível. Corbett et al. (2017), por exemplo, demonstraram por um teste de imagens (*Montreal Imaging Stress Task* - MIST) com humanos que um estresse agudo não é capaz de afetar a memória. Já em ratos, Vales et al. (2014) mostraram que o estresse de imobilização realizado 24 h antes do teste do labirinto aquático melhorou o desempenho dos animais, mostrando um efeito protetor.

Tais respostas variam muito de organismo para organismo e, principalmente, dependem do nível de estresse e do estímulo estressor, fazendo com que o comportamento reflita o tamanho da resposta durante a ativação do eixo HPA. O comportamento sexual, por exemplo, libera mais corticosterona do que o protocolo de choque nas patas de ratos (KOOLHAAS et al., 2011).

Dentre os protocolos que mais liberam o hormônio tem-se o estresse de contenção (KOOLHAAS et al., 2011). O ato de restringir o espaço e movimento de animais é capaz de atenuar respostas comportamentais. Atualmente existem diversas formas de utilizar este protocolo, sendo que um estresse agudo com poucas horas de duração já é capaz de promover alterações na ativação do sistema nervoso sendo possível serem visualizadas ao nível comportamental (PARÉ; GLAVIN, 1986; SELYE, 1936).

1.5. HIPÓTESE

O recrutamento do sistema do NPY, por meio da ativação dos receptores Y1 e Y2 e do estresse, prejudica a consolidação da memória no labirinto aquático.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo geral

Investigar o envolvimento do NPY nas etapas de aquisição e consolidação da memória espacial, utilizando o paradigma do labirinto aquático.

1.6.2. Objetivos específicos

- Verificar os efeitos da administração intra HD de NPY na aquisição da memória espacial avaliada no teste do labirinto aquático;
- Analisar se o NPY também possui efeitos na etapa de consolidação da memória;
- Avaliar se há diferenças no recrutamento do sistema do NPY para o processamento mnemônico mediante o protocolo do estresse de contenção;
- Investigar os efeitos obtidos com a administração de antagonistas seletivos dos receptores Y1 e Y2 do NPY no HD sobre a etapa de consolidação da memória.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina - CEUA (nº 9771250417) (Anexo 1 e 2). O tamanho da amostra foi calculado para o uso mínimo de animais suficiente para a obtenção de análises estatísticas fidedignas, seguindo os princípios dos 3Rs: Substituição, Redução e Refinamento (do inglês *Replacement, Reduction, Refinement*) e as diretrizes ARRIVE (do inglês *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*).

2.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, com três meses de idade e peso entre 270 e 350 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Eles foram alojados no biotério do Laboratório de Neurofarmacologia (CCB – UFSC) em gaiolas plásticas padrão (36 x 30 x 15 cm), com cinco (*naïve*) ou três (operados) animais por gaiola, e mantidos em condições padronizadas de temperatura (22 ± 1 °C), ciclo de luz claro/escuro de 12 h e água e comida *ad libitum*. Os animais foram manipulados de forma a evitar estresse desnecessário.

2.3. FÁRMACOS

Para a realização deste estudo foram utilizados os seguintes fármacos diluídos em tampão fosfato-salino (PBS): o agonista dos receptores Y do NPY (Bachem, Torrance, EUA) (1, 3, 10 pmol), o antagonista seletivo Y1 BIBO3304 (BIBO - Tocris, Minneapolis, EUA) (60, 200 e 600 pmol) e o antagonista seletivo Y2 BIIE0246 (BIIE - Tocris, Minneapolis, EUA) (0,3, 1 e 2 nmol). Como veículo foi utilizado PBS. As doses usadas foram baseadas na literatura e em trabalhos anteriores do Laboratório de Neurofarmacologia – UFSC (LACH; DE LIMA, 2013; LINARTEVICH, 2017).

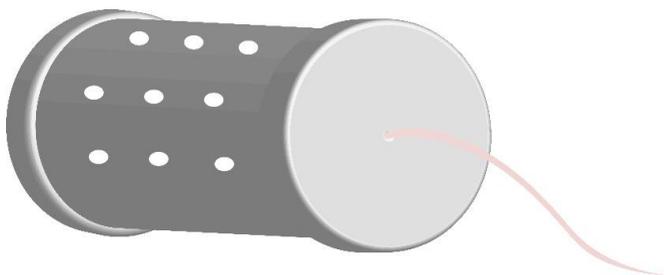
2.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) com uma associação de xilazina (10 mg/mL/kg; Xilazin[®], Syntec Ltda., Brasil) e cetamina (100 mg/mL/kg; Cetamin[®], Syntec Ltda., Brasil). Após a perda dos reflexos, cada animal foi posicionado no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA) com o auxílio de duas barras auriculares. A assepsia do campo cirúrgico foi feita com uma solução de álcool iodado (2%) e posteriormente os animais receberam uma injeção de solução anestésica de lidocaína 3% com adrenalina 1:50.000 (Lidostesim[®], Dentsply Pharmaceutical, Brasil) por via subcutânea (s.c.), no local da incisão. Uma pequena área ovalada de pele do campo cirúrgico foi então retirada, permitindo a raspagem do periósteo para a exposição do crânio e das suturas lambdóide e coronal. Após perfuração com uma broca odontológica, dois parafusos de aço inoxidável foram fixados ao crânio para suporte à prótese de acrílico utilizada posteriormente. Duas cânulas-guia (11 mm), confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (22G; 25,0 x 7,0 mm), foram implantadas bilateralmente no HD de acordo com as coordenadas do atlas do cérebro de Paxinos e Watson (2009): 3,6 mm anterior ao *bregma*, \pm 2,4 mm relativo ao eixo lateral e 2,1 mm relativo ao eixo dorsoventral. Feito isto, a calota craniana foi coberta com acrílico odontológico auto-polimerizante de secagem rápida (Vipi Flash, VIPI[®]; Pirassununga, SP, Brasil) para fixar todas as peças em uma prótese sólida presa ao crânio. Como tratamento pós-operatório, cada animal recebeu uma injeção (s.c.) de flunixin meglumina (2,5 mg/kg; Schering-Plough, Brasil) e todos permaneceram em cama aquecida até retornarem do plano anestésico. Após isso, os animais voltaram ao biotério do Laboratório de Neurofarmacologia onde permaneceram em um período de recuperação de 7 a 10 dias até o início dos experimentos.

2.5. ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Para avaliar se uma determinada situação estressante resulta em um maior efeito do NPY e seus receptores, os animais foram transferidos para uma sala de experimentação e gentilmente colocados em tubos plásticos com tamanho similar ao corpo do animal e com pequenos furos que permitiam sua respiração. Somente a cauda permanecia para fora do tubo (MANZANARES et al., 2005) (Figura 4). Os animais permaneceram na sala por 30 ou 60 min, a depender da sessão do experimento. Animais controle também foram levados para a sala de experimentação em suas gaiolas, porém não foram submetidos ao estresse. Ao término do protocolo, eles retornaram para o biotério.

Figura 4. Representação do tubo de PVC utilizado para o estresse de contenção.



O tubo possui pequenos furos para possibilitar a respiração do animal e um pequeno furo na parte traseira para que a cauda do animal permaneça do lado de fora. Fonte: Autor.

2.6. LABIRINTO AQUÁTICO

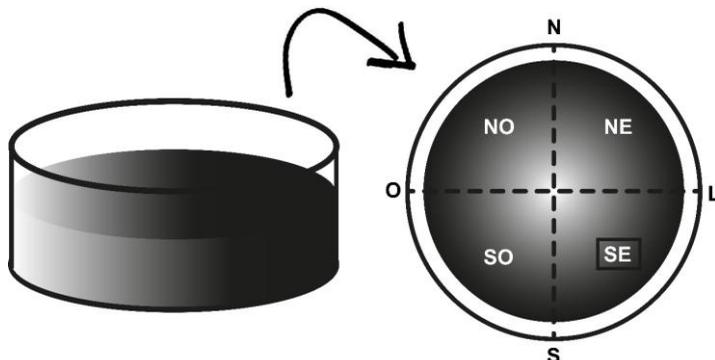
O labirinto aquático é formado por um tanque circular de cor preta (70 cm de diâmetro x 60 cm de altura) localizado no interior de uma sala (Figura 5). O tanque foi preenchido com

água, a uma temperatura constante ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Foram estabelecidas 4 posições de partida (norte, sul, leste e oeste) que dividiram a superfície do labirinto em 4 quadrantes (nordeste, noroeste, sudeste e sudoeste). Uma plataforma de acrílico transparente (10 x 10 cm) foi posicionada no quadrante sudoeste, ficando submersa a 1 cm da superfície da água. Durante os experimentos, um sistema de câmera de vídeo captou as imagens do labirinto aquático.

2.6.1. Memória espacial de referência

Durante o treinamento (dia 1 - sessão de aquisição da memória), os animais foram liberados para nadar de forma pseudoaleatória até encontrar a plataforma num tempo máximo de 60 s. Caso não a encontrassem, cada animal era conduzido manualmente até esta, onde deveria permanecer por 10 s. Após este tempo, o animal era retirado do labirinto e colocado em uma caixa por 20 s, sendo então posicionado no próximo ponto de partida. Este procedimento foi realizado 6 vezes na sessão de treinamento, sendo que o animal era liberado sempre de pontos diferentes a cada tentativa e a plataforma submersa sempre permaneceu no quadrante sudeste durante as tentativas (Figura 5). Na sessão de teste (dia 2), realizada 24 h após a sessão de treinamento, a plataforma foi removida e os animais liberados para nadar apenas uma vez, por 60 s, a partir da posição norte. Foram avaliados os seguintes parâmetros: o número de entradas no quadrante oposto ao da plataforma e no quadrante da plataforma, o tempo gasto em ambos os quadrantes, a latência para encontrar o local onde a plataforma estava na sessão de aquisição da memória e o número de cruzamentos neste local. Somente animais que aprenderam a tarefa no dia 1 foram incluídos na análise estatística, isto é, apresentaram redução na latência para encontrar a plataforma.

Figura 5. Desenho esquemático do labirinto aquático.



O labirinto aquático é composto por um tanque circular preenchido com água, dividido em quatro pontos (N, S, L e O) e subdividido em quatro quadrantes (NO, NE, SO e SE). A plataforma permanece sempre no quadrante SE durante a etapa de aquisição da memória (dia 1). N, norte; S, sul; L, leste, O, oeste; NO, noroeste; NE, nordeste; SO, sudoeste; SE, sudeste. Fonte: Autor.

2.7. MICROINJEÇÃO CENTRAL

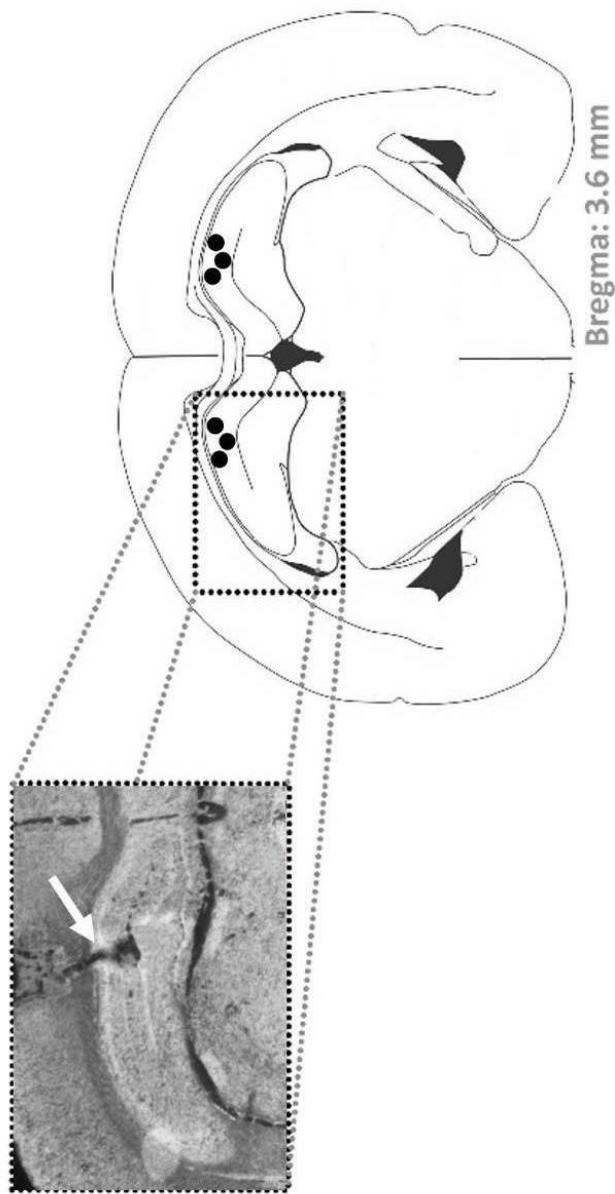
A microinjeção bilateral na região CA1 do HD foi executada por meio de agulhas (12,4 mm) confeccionadas a partir de agulhas gengivais (30G curta). Estas eram conectadas a um tubo de polietileno (PE10; Clay Adams, EUA) acoplado a uma microseringa (Hamilton, EUA) preenchida com água destilada, deixando uma bolha de ar interposta à solução a ser injetada. Os animais foram corretamente imobilizados e as cânulas desobstruídas com o auxílio de limas odontológicas (K-FILE Colorinox® A012D, Dentsply Ind. Com. Ltda., Brasil) de 11,0 mm. As agulhas eram introduzidas nas cânulas e, com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), cada animal recebia 0,5 µL das soluções, por hemisfério, infundida durante 60 s.

2.8. HISTOLOGIA

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados como já descrito, e receberam uma microinjeção de azul de Evans ($0,2 \mu\text{l/hemisfério}$). Após a decapitação, os encéfalos eram retirados e conservados em solução de formalina 10% por, pelo menos, 24 h e, posteriormente, transferidos para solução de sacarose 30%, por no mínimo 48 h antes da realização dos cortes histológicos. Cortes coronais ($50 \mu\text{m}$) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) a -20°C .

As imagens histológicas foram fotografadas em um microscópio estereoscópico SZX16 (Olympus, Japão) e comparadas com os diagramas do cérebro de ratos (PAXINOS, WATSON, 2009) (Figura 6). Somente animais com histologia bilateral para o HD (Figura 1) foram incluídos na análise estatística.

Figura 6. Diagrama esquemático e fotomicrografia de um corte coronal do hipocampo dorsal de ratos.



O diagrama destaca o hipocampo e mostra os três principais locais de microinfusão (círculos preenchidos). O sítio de infusão dos fármacos está indicado pela seta na fotomicrografia.

2.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.9.1. Experimento 1: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y durante a consolidação da memória

Para analisar o efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y imediatamente após a sessão de treino sobre a consolidação da memória na sessão de teste do labirinto aquático, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: veículo, NPY 0,3 pmol, NPY 1 pmol e NPY 3 pmol. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 7 A**.

2.9.2. Experimento 2: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y sobre a consolidação da memória após o estresse de contenção

Para se avaliar o efeito da microinfusão de neuropeptídeo Y sobre a consolidação da memória após o estresse de contenção no labirinto aquático, 60 ratos foram divididos em seis grupos: veículo e NPY 1 pmol sem contenção, veículo e NPY 1 pmol com 30 min de contenção e veículo e NPY 1 pmol com 60 min de contenção. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 9 A**.

2.9.3. Experimento 3: Efeito da microinfusão tardia do neuropeptídeo Y sobre a consolidação da memória espacial

Para verificar se o NPY estaria exercendo efeitos de forma tardia sobre a consolidação da memória realizou-se a microinfusão do mesmo seis horas após o treino no labirinto aquático, 16 ratos foram divididos em grupo veículo e grupo NPY 1 pmol. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 11 A**.

2.9.4. Experimento 4: Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y no HD sobre a aquisição da memória espacial

Para a análise do efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y sobre a aquisição da memória no labirinto aquático, 16 ratos

foram divididos em grupo veículo e grupo NPY 1 pmol. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 13 A**.

2.9.5. Experimento 5: Efeito da administração do antagonista do receptor Y1 no HD sobre a consolidação da memória

Para se analisar o efeito do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304 na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: veículo, BIBO 60 pmol, BIBO 200 pmol e BIBO 600 pmol. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 15 A**.

2.9.6. Experimento 6: Efeito da administração do antagonista do receptor Y1 sobre o efeito do NPY na consolidação da memória

Para análise do efeito do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: PBS+PBS, PBS+NPY, PBS+BIBO, NPY+BIBO. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 17 A**.

2.9.7. Experimento 7: Efeito da administração do antagonista do receptor Y2 no HD sobre a consolidação da memória

Para avaliar o efeito do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: veículo, BIIE 0,3 nmol, BIIE 1 nmol e BIIE 2 nmol. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 19 A**.

2.9.8. Experimento 8: Efeito da administração do antagonista do receptor Y2 sobre o efeito do NPY na consolidação da memória

Para avaliar o efeito do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da

memória no labirinto aquático, 32 ratos foram divididos em quatro grupos: PBS+PBS, PBS+NPY, PBS+BIII, NPY+BIII. O desenho experimental está esquematizado na **Figura 21 A**.

2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

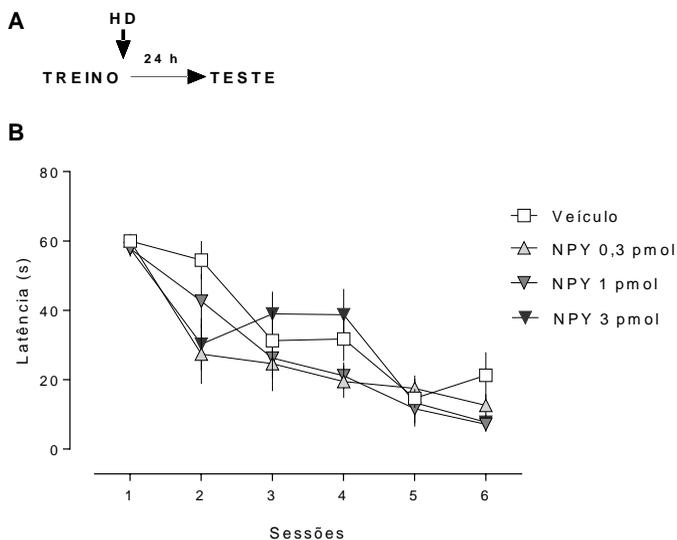
Após verificar a normalidade e homogeneidade de variância pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, de acordo com o protocolo experimental utilizado. Quando apropriado, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls foi utilizado. Para comparação de dois grupos independentes foi utilizado o teste *t* de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos para todas as análises. Os resultados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo programa GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA MICROINFUSÃO DO NEUROPEPTÍDEO Y DURANTE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Foi realizada uma curva dose-resposta para padronização da dose a ser utilizada nos experimentos seguintes. Para isto, com base em estudos prévios do laboratório, foram testadas as doses de 0,3, 1 e 3 pmol de NPY (Figura 7). A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou não haver diferenças significativas na curva de aprendizado ($F_{15, 68}=1,587, p=0,08$) (Figura 7 B). A microinfusão intra HD foi feita imediatamente após a etapa de treino do labirinto aquático e somente animais que tiveram redução na latência para encontrar a plataforma ao longo das sessões foram testados.

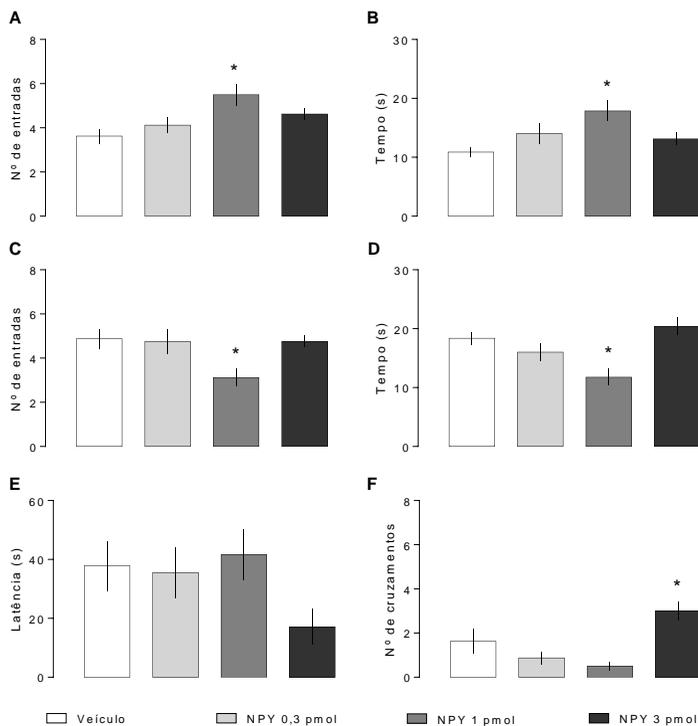
Figura 7. Desenho experimental e curva de aprendizado durante a sessão de treino no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas.

A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do fator tratamento nas doses de NPY utilizadas, onde a dose de 1 pmol aumentou o número de entradas ($F_{3,21}=4,68, p=0,01$) e o tempo ($F_{3,21}=5,03, p=0,008$) dos animais no quadrante oposto ao quadrante da plataforma (Figura 8 A e B, respectivamente) e diminuiu o número de entradas ($F_{3,21}=3,63, p=0,02$) e o tempo ($F_{3,21}=7,97, p = 0,001$) no quadrante correto (Figura 8 C e D, respectivamente). A dose de 1 pmol também mostrou uma tendência para que os animais tivessem o número de cruzamentos no local da plataforma reduzido, porém sem diferenças significativas. A dose de 3 pmol mostrou um efeito contrário, melhorando o desempenho dos animais. Dessa forma, a dose de 1 pmol foi escolhida para os demais experimentos.

Figura 8. Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y no HD imediatamente após a sessão de treino sobre a consolidação da memória na sessão de teste do labirinto aquático.

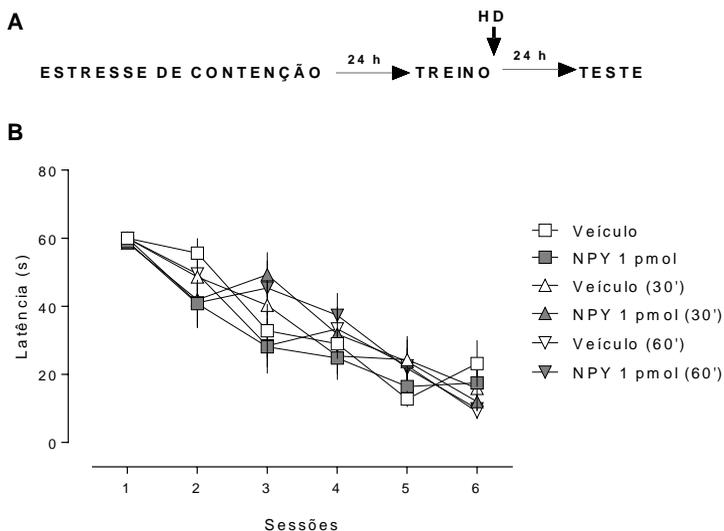


Doses de 0,3, 1 e 3 pmol foram testadas sobre a consolidação da memória. **A)** Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=8/\text{grupo}$). ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

3.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DA MICROINFUSÃO DO NEUROPEPTÍDEO Y SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA APÓS O ESTRESSE DE CONTENÇÃO

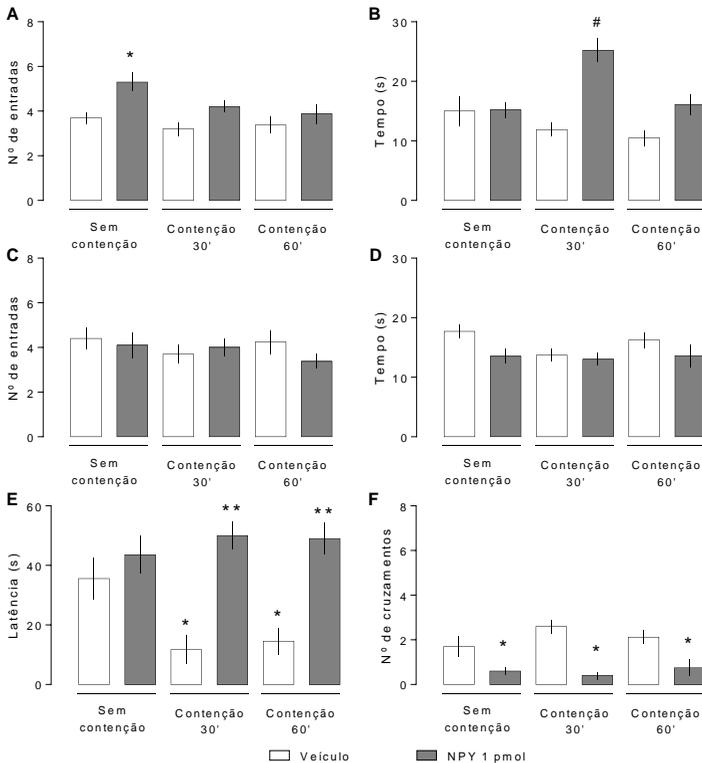
Todos os animais aprenderam a tarefa, onde a ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou não haver diferenças significativas no aprendizado dos animais durante o treino ($F_{25,300}=1,05$, $p=0,38$) (Figura 9 B). Como mostrado na figura 10, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeitos significativos do tratamento tanto para animais que passaram por 30 min de contenção quanto por 60 min nos parâmetros de número de entradas ($F_{5,50}=5,13$, $p=0,0007$) e tempo gasto no quadrante oposto ($F_{5,50}=8,76$, $p=0,0001$) (Figura 10 A e B, respectivamente) assim como a latência ($F_{5,50}=9,08$, $p=0,0001$) e cruzamentos para o local da plataforma ($F_{5,50}=8,97$, $p=0,0001$) (Figura 10 E e F, respectivamente).

Figura 9. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y e do estresse de contenção sobre a consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático (n=8 animais por grupo, ANOVA de uma via com medidas repetidas).

Figura 10. Efeito da microinfusão de neuropeptídeo Y no HD sobre a consolidação da memória após o estresse de contensão.



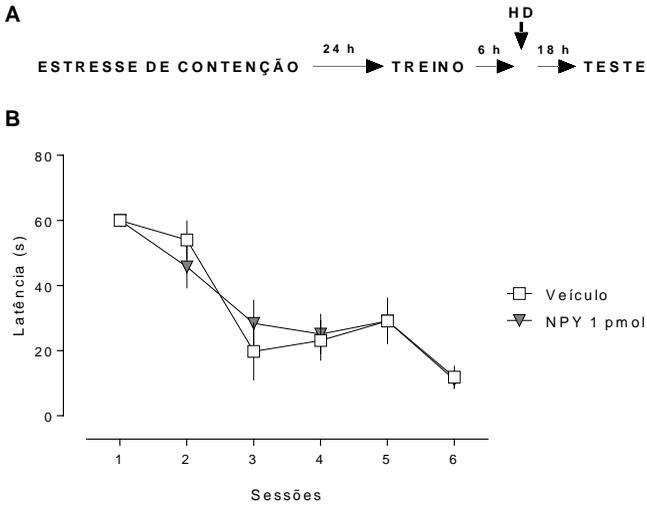
A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM (n=10/grupo). ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo; ** $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contensão; # $P < 0,05$ quando comparado com todos os grupos.

Em vista de tais achados, e para evitar estresse desnecessário, para todos os seguintes experimentos os animais foram submetidos ao estresse de contenção de 30 min antes das microinfusões e da exposição ao labirinto aquático.

3.3. EXPERIMENTO 3: EFEITO DA MICROINFUSÃO TARDIA DO NEUROPEPTÍDEO Y SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Aqui, o NPY foi injetado no HD 6 h após a sessão de treino (Figura 11 A). Como pode ser visto na figura 11 B, o teste t de Student não mostrou nenhuma diferença significativa no aprendizado dos animais quando comparado com o grupo veículo ($t_{(10)}=0,02, p=0,98$).

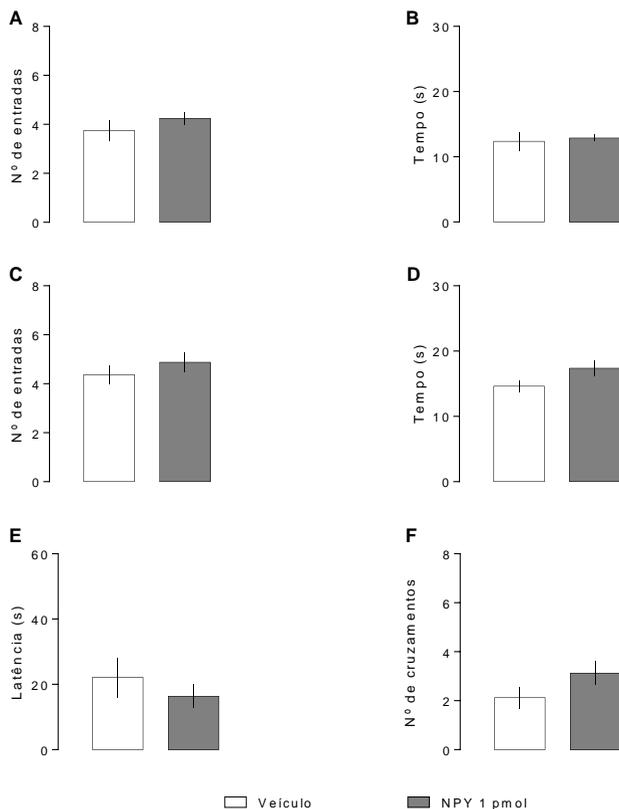
Figura 11. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y no período após a janela de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático (n=8 animais por grupo).

Como mostra a figura 12, para todos os parâmetros analisados na sessão de teste do labirinto aquático o teste *t* de Student não apresentou diferenças significativas, ou seja, o tratamento não possuiu efeitos na memória dos animais 6 h após o treino.

Figura 12. Efeito da microinfusão tardia do neuropeptídeo Y no HD sobre a consolidação da memória.

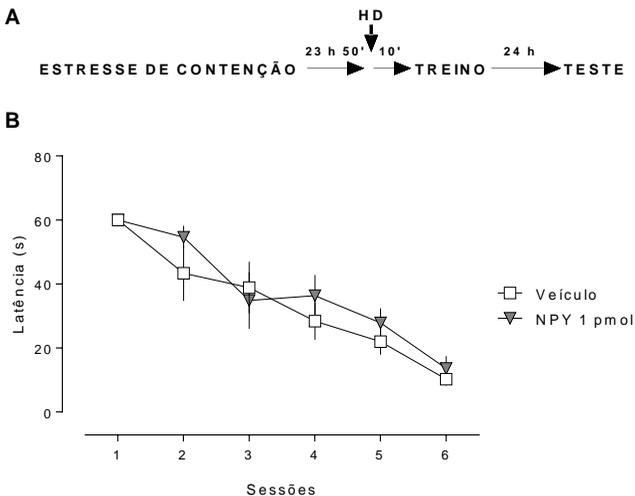


A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=8$ /grupo). Teste t de Student.

3.4. EXPERIMENTO 4: EFEITO DA MICROINFUSÃO DO NEUROPEPTÍDEO Y NO HD SOBRE A AQUISIÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL

Para análise de possíveis efeitos do NPY na etapa de aquisição da memória, todos os animais apresentaram uma diminuição da latência na sessão de treino do labirinto aquático, sem apresentar diferenças estatísticas de acordo com o teste *t* de Student ($t_{(10)}=0,40$, $p=0,69$) (Figura 13 B).

Figura 13. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do neuropeptídeo Y no HD sobre a aquisição da memória no labirinto aquático.

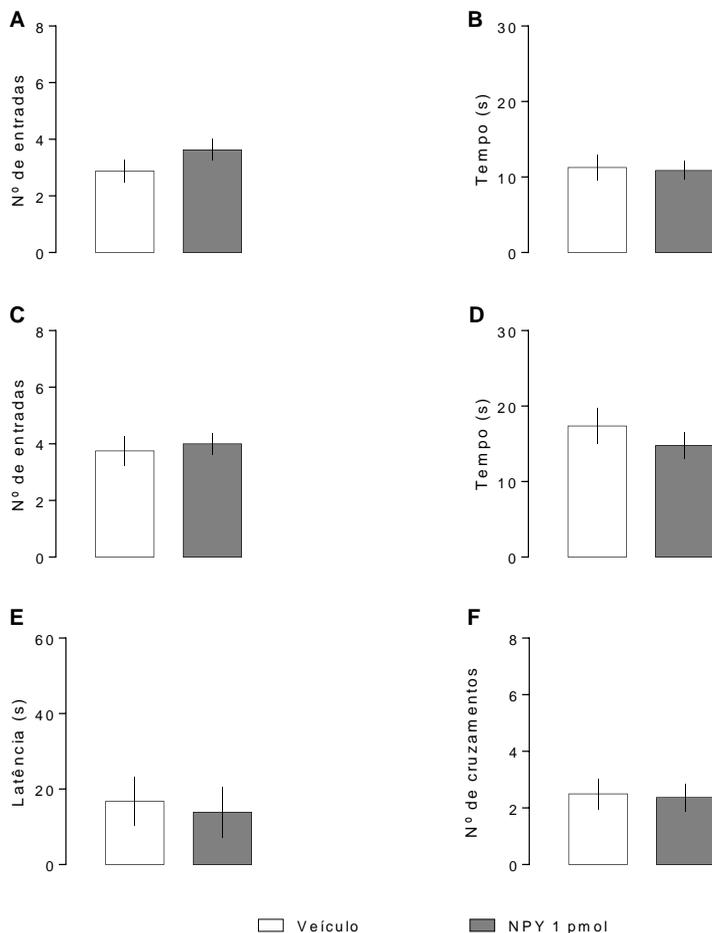


A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo). Teste *t* de Student.

O teste *t* de Student também mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos que receberam o NPY 10

min antes do protocolo do labirinto aquático, em todos os parâmetros (Figura 14).

Figura 14. Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y sobre a aquisição da memória.

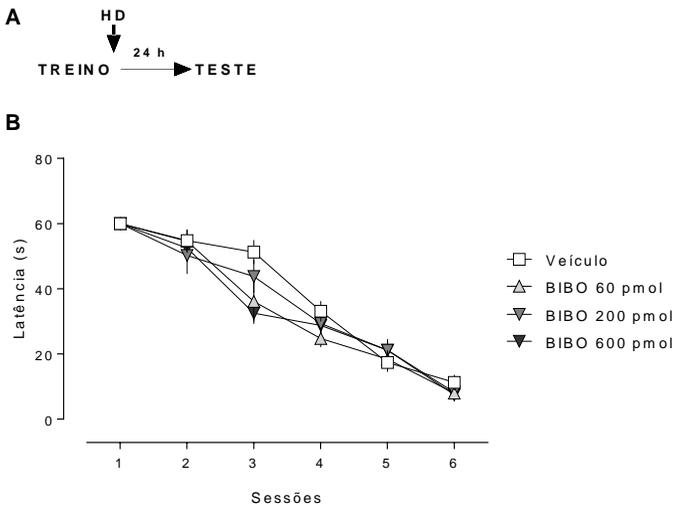


A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM (n=8/grupo). Teste *t* de Student.

3.5. EXPERIMENTO 5: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR Y1 NO HD SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Inicialmente, os animais foram avaliados no labirinto aquático para observação da dose efetiva do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304. A ANOVA de uma via com medidas repetidas não mostrou diferenças significativas na curva de aprendizado ($F_{15,168}=1,97, p=0,27$) (Figura 15 B).

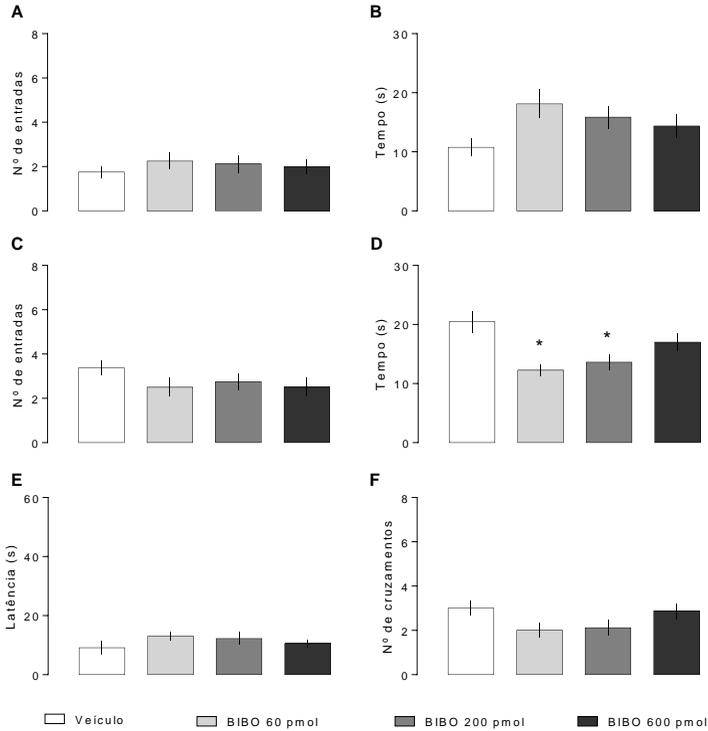
Figura 15. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y1 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y1 BIBO3304 na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas.

A ANOVA de duas vias mostrou haver diferenças estatísticas significativas no tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma ($F_{3,21}=6,60$, $p=0,002$) (Figura 16 D), onde o grupo que recebeu o antagonista BIBO3304 na dose de 600 pmol exibiu uma tendência a permanecer semelhante ao grupo veículo nos parâmetros de tempo no quadrante oposto ao da plataforma (Figura 16 B), latência para o local da plataforma (Figura 16 E) e número de cruzamentos (Figura 16 F), porém sem diferenças significativas.

Figura 16. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y1 sobre a etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.

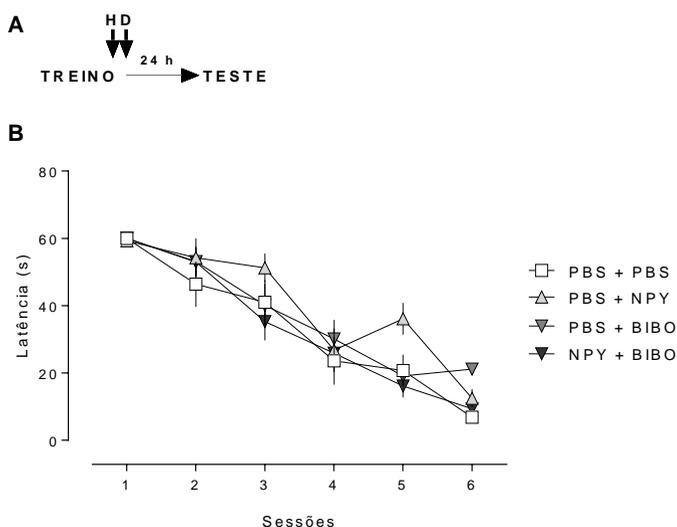


A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM (n=8/grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

3.6. EXPERIMENTO 6: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR Y1 SOBRE O EFEITO DO NPY NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Com base nos achados e em estudos prévios, a dose de 200 pmol de BIBO3304 foi testada juntamente com NPY exógeno. A ANOVA de uma via com medidas repetidas não mostrou diferenças significativas na sessão de treino do labirinto aquático ($F_{15,168}=1,19$, $p=0,27$) (Figura 17 B). Logo, estes animais que aprenderam a tarefa no dia 1 receberam os tratamentos logo imediatamente após o treino.

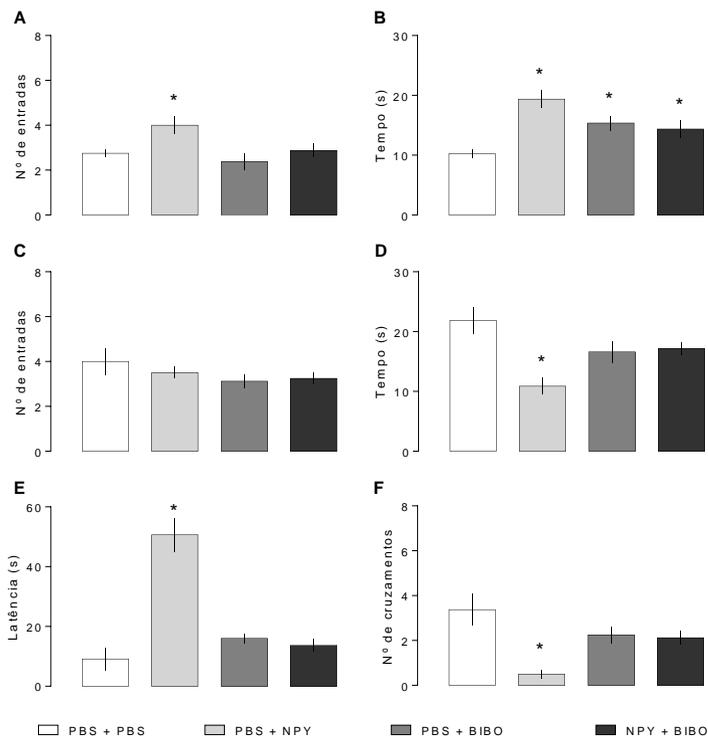
Figura 17. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y1 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y2 BIBO3304 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas.

Conforme a figura 18 mostra, a ANOVA de duas vias apresentou diferenças significativas entre os animais que receberam NPY+BIIE e aqueles que receberam PBS+NPY no número de entradas no quadrante oposto ($F_{3,21}=6,45$, $p=0,002$) e tempo neste quadrante ($F_{3,21}=9,05$, $p=0,0005$), tempo no quadrante da plataforma ($F_{3,21}=7,10$, $p=0,0018$), latência para o local da plataforma ($F_{3,21}=32,98$, $p=0,0001$) e número de cruzamentos neste local ($F_{3,21}=7,16$, $p=0,0017$). Exceto em no parâmetro de tempo no quadrante oposto o grupo que recebeu NPY e BIBO não se comportou de forma semelhante ao grupo veículo ($F_{3,21}=0,87$, $p=0,46$) (Figura 18 B).

Figura 18. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y1 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.

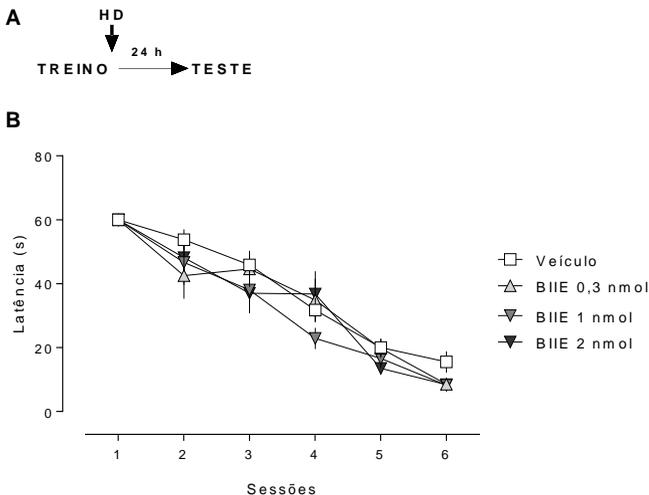


A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=8$ /grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P<0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

3.7. EXPERIMENTO 7: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR Y2 NO HD SOBRE A CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Para avaliação do efeito do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 os animais aprenderam a tarefa no teste do labirinto aquático (Figura 19 B), onde a ANOVA de uma via com medidas repetidas não mostrou diferenças significativas ($F_{15,168}=0,79$, $p=0,68$). Imediatamente após o treino os animais receberam a infusão com o antagonista nas doses de 0,3, 1 e 2 nmol de BIIE0246.

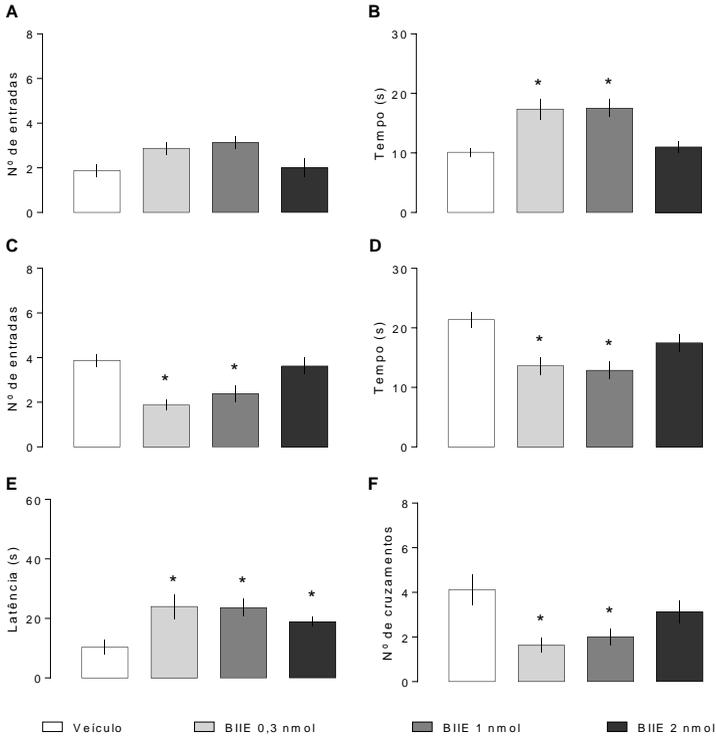
Figura 19. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y2 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas

A ANOVA de duas vias mostrou um efeito semelhante entre animais do grupo BIIE 1 nmol e animais do grupo veículo (Figura 20), com diferenças estatisticamente significativas no tempo no quadrante oposto ($F_{3,21}=9,38$, $P=0,0004$), número de entradas ($F_{3,21}=7,78$, $p=0,0011$) e tempo no quadrante da plataforma ($F_{3,21}=7,422$, $p=0,0014$), assim como na latência para o local da plataforma ($F_{3,21}=5,52$, $p=0,0059$) e cruzamentos neste local ($F_{3,21}=5,03$, $p=0,0088$). Com base em estudos prévios, a dose de 1 nmol foi escolhida como a dose para ser testada junto com o NPY.

Figura 20. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y2 sobre a etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.

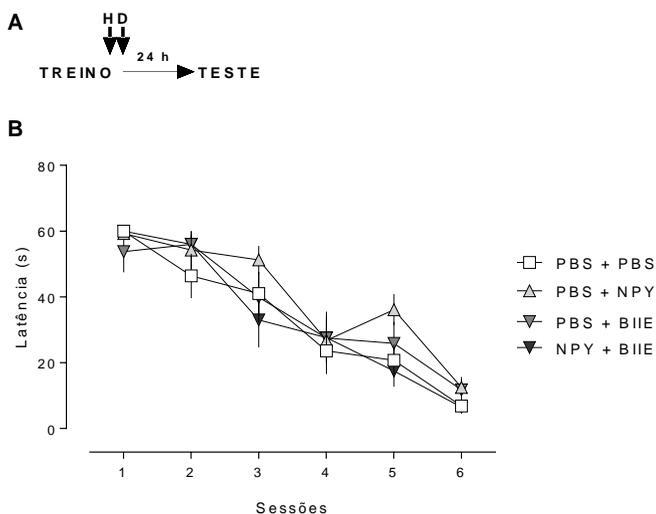


A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=8$ /grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

3.8. EXPERIMENTO 8: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR Y2 SOBRE O EFEITO DO NPY NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Os animais foram mais uma vez treinados no labirinto aquático (Figura 21 B), sem diferenças significativas pela ANOVA de uma via com medidas repetidas ($F_{15,168}=0,76$, $p=0,71$). Imediatamente após o treino, eles receberam os tratamentos.

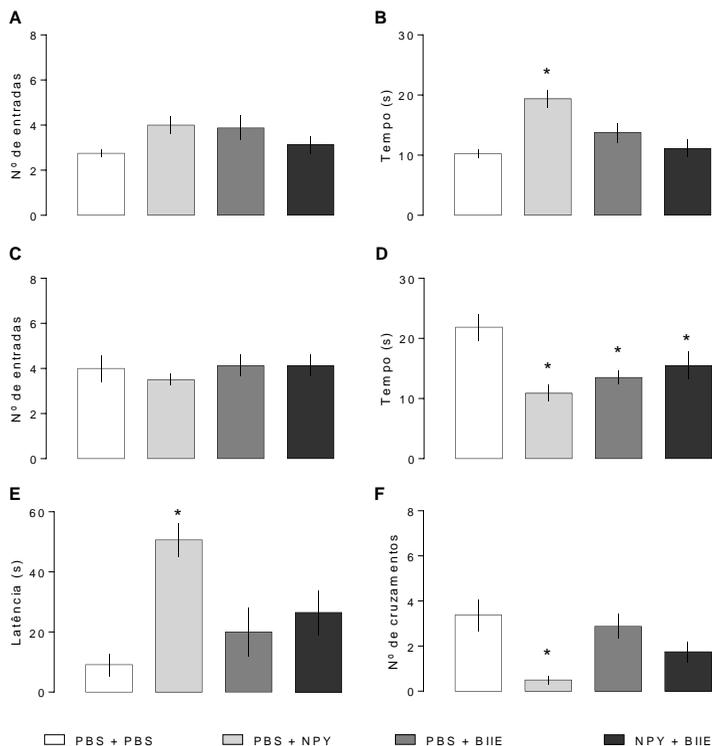
Figura 21. Desenho experimental e curva de aprendizado dos animais para análise do efeito do bloqueio dos receptores Y2 no HD por meio do antagonista seletivo do receptor Y2 BIIE0246 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Esquema do protocolo comportamental utilizado; a seta indica o local e o momento do tratamento. **B)** Curva de aprendizado; as linhas horizontais representam a média \pm EPM da latência gasta pelos animais para encontrar a plataforma submersa durante o treinamento no labirinto aquático ($n=8$ animais por grupo).

Como pode ser visto na figura 22, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças em relação aos animais que receberam apenas NPY nos parâmetros de tempo no quadrante oposto ($F_{3,21}=10,87, p=0,0002$) (Figura 22 B), tempo no quadrante correto ($F_{3,21}=6,06, p=0,0039$) (Figura 22 D), latência para encontrar o local da plataforma ($F_{3,21}=6,27, p=0,0033$) (Figura 22 E) e cruzamentos neste local ($F_{3,21}=5,30, p=0,007$) (Figura 22 F). Animais que receberam tanto o antagonista BIIIE0246 quanto o NPY permaneceram semelhantes ao grupo veículo.

Figura 22. Efeito do bloqueio seletivo dos receptores Y2 sobre o efeito do NPY na etapa de consolidação da memória no labirinto aquático.



A) Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo gasto pelos animais no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo gasto pelos animais no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=8$ /grupo). ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que receptores hipocampais do neuropeptídeo Y possuem papel importante na modulação de memórias em paradigmas que requerem a utilização da memória espacial, como o teste do labirinto aquático.

Pioneiro na utilização do NPY em conjunto com o labirinto aquático, Thorsell et al. (2000) sugeriram que a substância seria importante para respostas adaptativas ao estresse e indispensável para os processos de aprendizado e memória. Porém, quais seriam os processos que estariam contribuindo para que haja essa participação do NPY e como os receptores seriam recrutados?

Receptores de NPY são largamente encontrados ao longo do sistema nervoso central, inclusive no hipocampo (WAHLESTEDTL; EKMAN; WIDERLOV, 1989). Dessa forma, toda informação que passa pelo hipocampo pode sofrer influência deste neuropeptídeo e, por conseguinte, sofrer algum tipo de modificação (FLOOD; SMITH; MORLEY, 1987). Sabe-se que, a depender da dose utilizada, o NPY pode ocasionar diferentes efeitos. Logo, foram testadas aqui doses baixas para evitar qualquer viés e analisar se alguma delas poderia causar prejuízos à memória espacial dos animais. Lach e De Lima (2013) demonstraram previamente que as doses de 1, 3 e 10 pmol de NPY não são capazes de alterar a atividade locomotora de ratos nos testes do campo aberto e labirinto em cruz elevado, por isso essa faixa de doses foi escolhida para ser testada no labirinto aquático.

Em nossos achados, 1 pmol de NPY apresentou diferenças significativas em quatro dos seis parâmetros analisados no teste (exceto na latência para o local da plataforma e nos cruzamentos no local da plataforma) (Figura 8). Essa mesma dose foi testada em um protocolo utilizando peixe-dourado (*Carassius auratus*) e foi capaz de aumentar a regulação do comportamento alimentar, um dos vários papéis do NPY (KOJIMA et al., 2009). No único trabalho a adotar tal dose em um protocolo de aprendizado e memória, ela não se mostrou efetiva mas sim uma dose de 3 pmol (LACH; DE LIMA, 2013). Logo, pela primeira vez, uma dose ainda menor de 1 pmol de NPY foi capaz de prejudicar a consolidação da memória. Além disso, este mesmo trabalho já demonstrou previamente que todas estas doses utilizadas não

alteram parâmetros comportamentais nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto.

Aumentando a dose se aumenta o efeito, correto? Não necessariamente (KASTIN et al., 1984). Com algumas substâncias, em especial os peptídeos, pode ocorrer o contrário. Curvas dose-resposta tendem a sofrer um comportamento bifásico onde, a depender da dose, a resposta poderá ser inibitória ou excitatória. A este processo dá-se o nome de hormese ou curva em “U” invertido. De acordo com Calabrese e Baldwin (2002), este fenômeno seria caracterizado por uma estimulação quando a dose for menor e uma inibição quando a dose for maior e vice-versa. Vários trabalhos corroboram esta ideia, tal como Plotnikoff et al. (1971) que observaram o efeito em camundongos, Plotnikoff et al. (1973) em experimentos com macacos e Ehrensing e Kastin (1974) em experiências com seres humanos, utilizando MIF (Pro-Leu-Gly-NH₂), um peptídeo que responde a endotoxinas liberado pela glândula pituitária.

No protocolo aqui utilizado, pode-se observar este efeito na dose de 3 pmol de NPY. Enquanto as demais doses seguiam um padrão inibitório, ela seguia um caminho oposto, evidenciando o efeito do tipo hormese nesta dose em específico. Ainda mais importante, a dose de 1 pmol se mostrou eficaz para alterar a consolidação da memória, o que é de grande valia já que uma dose mínima já foi capaz de alterar a consolidação da memória.

Memórias traumáticas ou aversivas fazem parte da vida da maioria dos seres vivos. Ao vivenciar uma situação inesperada ou desconfortável, o cérebro ativa uma resposta como forma de se defender desta situação. A forma como cada um reage ao estresse muda e os efeitos tanto em relação ao estresse quanto à memória podem afetar um ao outro, de modo a ter ou não uma atenuação na resposta observada pelo comportamento (THORSELL et al., 2000). Dessa forma, situações novas e imprevisíveis podem fornecer uma melhor observação do estresse, tornando-o mais confiável (MASON, 1968), como é o caso da natação em um tanque.

O NPY alterou os comportamentos induzido pelo estresse. Animais que passaram por este estresse prévio e receberam NPY tiveram um tempo maior gasto no quadrante oposto ao da plataforma, uma maior latência para alcançar o local da plataforma e menos cruzamentos no local da plataforma (Figura

10). Uma situação estressora prévia é capaz de facilitar a formação de uma memória aversiva (MANZANARES et al., 2005), o que pode ser visto pela diminuição do tempo e do número de entradas no quadrante oposto ao da plataforma e, ainda mais evidente, por uma menor latência e um maior número de cruzamentos pelos animais que não receberam NPY, mas que também passaram pelo mesmo estresse prévio (Figura 10).

O hipocampo possui papel importante na LTP e várias substâncias são capazes de fazer a regulação deste processo, logo, tal estrutura cerebral também é afetada e produz respostas frente a situações estressantes. Schoenfeld et al. (2018), por exemplo, utilizando um protocolo crônico de estresse de contenção em ratos observou uma diminuição no volume hipocampal em quatro semanas, o que afetaria todo o funcionamento cerebral, inclusive os processos de aprendizado e memória. Aqui, o tempo desempenhou um papel importante, onde um estresse muito curto gerou um tipo de resposta e um estresse mais prolongado uma resposta totalmente contrária (JOELS et al., 2006), o que confirma nossos achados já que 30 min foram suficientes para causar um prejuízo ainda maior na consolidação da memória de ratos tratados com NPY.

Em situações de estresse, o hipocampo também é responsável pela regulação negativa do eixo HPA (KIM; PELLMAN; KIM, 2015). O período aqui utilizado foi suficiente para ativar este eixo e, conseqüentemente, realizar esta regulação, e ativar o sistema nervoso simpático (DESLAURIERS et al., 2018), fornecendo uma estratégia evolutiva para que os indivíduos possam se adaptar ao estresse. Além disso, o NPY teria uma ação anti-estresse (THORSELL et al., 2000), observada por meio do aumento do tempo no quadrante oposto e da latência e também pela diminuição no número de cruzamentos no local da plataforma. Isto é, o estresse atenuou a resposta, porém o NPY fez provavelmente com que os animais considerassem o paradigma como algo novo. Considerando que traumas podem afetar negativamente a circuitaria cerebral, o NPY estaria atuando de modo inibitório, fazendo a regulação de memórias que sejam aversivas.

A depender da dose utilizada, a região cerebral, o tempo e vários outros fatores, o NPY pode afetar diferentes fases da memória (GÖTZSCHE; WOLDBYE, 2016). A maior parte dos autores estabelece uma janela para a fase de consolidação, que

teria cerca de seis horas de duração. Durante este tempo as informações sobre determinado contexto estariam sendo armazenadas e poderiam ser manipuladas (Figura 1) (BUSTOS; MALDONADO; MOLINA, 2006). Nossos dados confirmam tal afirmação, uma vez que a infusão de 1 pmol de NPY seis horas após o treino no labirinto aquático não causou quaisquer prejuízos na memória espacial dos animais, mas igualou o desempenho destes com os animais do grupo veículo (Figura 12), mostrando que o mesmo estaria agindo dentro da fase de consolidação da memória e não possui efeitos após esta janela (DUDAI, 2004).

Além disso, o NPY também poderia estar afetando a fase de aquisição da memória (GØTZSCHE; WOLDBYE, 2016; LACH; DE LIMA, 2013). Em alguns trabalhos, sobretudo utilizando camundongos, o NPY não afetou a aquisição da memória dos animais. Na verdade, ele seria um modulador de memórias que, dependendo da dose, poderia afetá-las de forma diferente (FLOOD; HERNANDEZ; MORLEY, 1987; INUI; BABA, 1990; KORNHUBER; ZOICAS, 2017). Corroborando estes estudos, nossos dados mostram que a dose aqui utilizada também não afeta a aquisição da memória no teste do labirinto aquático, onde os animais dos grupos NPY e veículo exibiram comportamentos semelhantes (Figura 14), fazendo com que esta dose específica tenha possivelmente um alvo certo: a consolidação da memória.

Dentre os receptores com maior afinidade para o NPY está o receptor Y1. Em nosso trabalho foi possível avaliar sua participação no protocolo de memória espacial mediante o antagonista seletivo Y1 BIBO3304. Com base em estudos prévios do laboratório, foram testadas as doses de 60, 200 e 600 pmol e, seguindo dados prévios (GUTMAN et al., 2009; LACH; DE LIMA, 2013), a dose de 200 pmol foi escolhida para ser testada junto ao NPY (Figura 16).

A interação da dose de BIBO3304 com o NPY exógeno de 1 pmol foi capaz de bloquear os efeitos inibitórios do neuropeptídeo nos parâmetros de entradas no quadrante oposto, tempo no quadrante da plataforma, latência no local da plataforma e cruzamentos no local da plataforma (Figura 18), resultados que mais uma vez confirmam o que Lach e De Lima (2013) observaram pela análise de memórias aversivas no CAC. Por meio disso, evidencia-se o papel importante dos receptores

Y1 na modulação das memórias e a importância da sua ativação em contextos aversivos em que se deseja que ocorra inibição da consolidação da memória, tornando-a lábil. Pela lógica também seria importante estudar não só o principal alvo como também a produção ou controle deste neuropeptídeo.

O receptor Y2 tem recebido bastante atenção ao longo dos anos devido as várias descobertas relacionadas ao NPY. Como está localizado em neurônios pré-sinápticos, ele participa da regulação do NPY na fenda sináptica. Para testar sua participação fizemos uso do antagonista seletivo Y2 BIIIE0246 nas doses de 0,3, 1 e 2 nmol (Figura 20) e para evitar efeitos indesejados e prejudiciais em relação à ansiedade, vigilância e alerta, utilizamos a dose de 1 nmol junto ao NPY, dose esta muito utilizada para se estudar a ativação do receptor Y2 (ABBOTT et al., 2005; BACCHI et al., 2006). Animais que receberam NPY+BIIIE passaram um tempo semelhante aos animais do grupo veículo no quadrante oposto ao da plataforma, assim como tiveram uma latência e número de cruzamentos também semelhantes (Figura 22). Por meio destes resultados sugere-se uma participação importante deste receptor de modo a aumentar a liberação de NPY em situações que envolvam algum grau de estresse. Vale salientar também a importância das *place cells*, que são neurônios hipocámpais ativados quando o animal está numa determinada área de um ambiente já conhecido. Como auxiliam o animal a se localizar e estão presentes na região CA1 do hipocampo, elas poderiam estar facilmente envolvidas na modulação da memória frente os efeitos do NPY (O'Keefe; Dostrovsky, 1971).

É crescente o interesse por estudos que correlacionem NPY com o Transtorno do Estresse Pós-Traumático (TEPT), uma vez que a substância pode ser encontrada em níveis muito baixos em pessoas com o transtorno. Morgan III et al. (2000), ao analisar 75 soldados perceberam que os níveis séricos de NPY eram baixos em alguns dos participantes do estudos. Estes apresentavam um desempenho menor nas Forças Armadas em comparação com os soldados com níveis maiores de NPY, reforçando o papel do neuropeptídeo nas respostas ao estresse diário. De forma semelhante, Linarteovich 2017 demonstrou que o NPY é capaz de alterar a consolidação da memória de animais expostos ao CAC, em um protocolo com um alto grau de aversividade. Porém, nem toda memória é tão traumática. No presente trabalho demonstramos que, além das memórias

altamente aversivas, o NPY também é capaz de modular memórias no labirinto aquático, que não são tão traumáticas quanto o CAC mas não são tão neutras.

Ter uma noção de quais doses são efetivas, de quais receptores podem ser ativados e/ou inativados e como o NPY vai afetar a memória são pequenas respostas que, juntas, podem contribuir para um melhor entendimento de como as memórias podem ser alteradas terapeuticamente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, nossos resultados mostram que a microinfusão no hipocampo dorsal de NPY, na dose de 1 pmol, foi capaz de provocar alterações na memória de ratos, sobretudo na etapa de consolidação da memória, não tendo efeitos sobre a aquisição da mesma.

Nesta modulação, o estresse desempenha função importante, pois atenuou respostas comportamentais, resultando numa melhora no desempenho dos animais veículo na tarefa do labirinto aquático e um déficit nos animais tratados com NPY exógeno. Nisto, sugere-se o envolvimento direto dos receptores Y1 e Y2, que podem ser responsáveis pelos efeitos promovidos pelo NPY, ao regular a quantidade da substância e serem mais ou menos recrutados, a depender do nível de estresse

Portanto, propomos que o NPY pode se tornar uma ferramenta viável não somente para aquelas memórias extremamente aversivas, como também para contextos com um menor grau de aversividade, como o modelo aqui utilizado.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a expressão dos receptores Y1 e Y2 no HD por meio de *Western blotting*;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas nos processos de aprendizado e memória, como *Arc*, *BDNF* e *Egr1/Zif268*, no protocolo do labirinto aquático;
- Analisar as *place cells* e espinhas dendríticas no HD frente aos efeitos do NPY;
- Investigar se a manipulação farmacológica com o NPY antes ou imediatamente após o estresse de contenção altera os parâmetros observados no labirinto aquático.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. R. et al. Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY (3–36) on food intake. *Brain Research*, v. 1043, p. 139–144, 2005.

AMTUL, Z.; ATTA-UR-RAHMAN. Neural plasticity and memory: Molecular mechanism. *Reviews in the Neurosciences*, v. 26, n. 3, p. 253–268, 2015.

ASTON-JONES, G.; BLOOM, F. E. Norepinephrine-containing locus coeruleus in behaving rats exhibit pronounced responses to non-noxious environmental stimuli. *The Journal of Neuroscience*, v. 1, n. 8, p. 887–900, 1981.

BABILON, S.; MÖRL, K.; BECK-SICKINGER, A. G. Towards improved receptor targeting: Anterograde transport, internalization and postendocytic trafficking of neuropeptide y receptors. *Biological Chemistry*, v. 394, n. 8, p. 921–936, 2013.

BACCHI, F. et al. Anxiolytic-like effect of the selective Neuropeptide Y Y2 receptor antagonist BIIE0246 in the elevated plus-maze. *Peptides*, v. 27, p. 3202–3207, 2006.

BALDI, E.; BUCHERELLI, C. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 53, p. 160–190, 2015.

BECK, B.; POURIÉ, G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the Hippocampus: Role in learning and memory. *Nutrition Reviews*, v. 71, n. 8, p. 541–561, 2013.

BERGLUND, M. M.; HIPSKIND, P. A.; GEHLERT, D. R. Recent Developments in Our Understanding of the Physiological Role of PP-Fold Peptide Receptor Subtypes. *Experimental Biology and Medicine*, v. 228, n. 3, p. 217–244, 2003.

BRANDWEIN, N. J.; NGUYEN, P. V. Noradrenergic

stabilization of heterosynaptic LTP requires activation of Epac in the hippocampus. *Learning & Memory*, v. 26, p. 31–38, 2019.

BUSTOS, S. G.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience*, v. 139, p. 831–842, 2006.

CABERLOTTO, L. et al. Regional distribution of neuropeptide Y Y2 receptor messenger RNA in the human post mortem brain. *Neuroscience*, v. 86, n. 1, p. 167–178, 1998.

CABRELE, C.; BECK-SICKINGER, A. G. Molecular Characterization of the Ligand – Receptor Interaction of the Neuropeptide Y Family. *Journal of Peptide Science*, v. 6, p. 97–122, 2000.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, v. 21, p. 91–97, 2002.

CHANG, R. S. L. et al. Neuropeptide Y (NPY) binding sites in rat brain labeled with 125I-bolton-hunter NPY: comparative potencies of various polypeptides on brain NPY binding and biological responses in the rat vas deferens. *Life Sciences*, v. 37, p. 2111–2122, 1985.

CORBETT, B.; WEINBERG, L.; DUARTE, A. The effect of mild acute stress during memory consolidation on emotional recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 145, p. 34–44, 2017.

DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein Synthesis and Memory : A Review. *Psychological Bulletin*, v. 96, n. 3, p. 518–559, 1984.

DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 6, p. 463–475, 2005.

DE QUIDT, M. E.; EMSON, P. C. Distribution of Neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system-I. Radioimmunoassay and chromatographic characterisation. *Neuroscience*, v. 18, n. 3, p. 527–543, 1986.

DE WIED, D. Neuropeptides in learning and memory processes. *Behavioural Brain Research*, v. 83, n. 1–2, p. 83–90, 1997.

DESLAURIERS, J. et al. Current Status of Animal Models of Posttraumatic Stress Disorder: Behavioral and Biological Phenotypes, and Future Challenges in Improving Translation. *Biological Psychiatry*, v. 83, n. 10, p. 895–907, 2018.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 211–216, 2002.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, v. 55, n. 1, p. 51–86, 2004.

EHRENSING, R. H.; KASTIN, A. J. Melanocyte-Stimulating Hormone-Release Inhibiting Hormone as an Antidepressant. *Archives of General Psychiatry*, v. 30, p. 63–65, 1974.

FANSELOW, M.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures. *Neuron*, v. 65, n. 1, p. 1–25, 2010.

FLOOD, J. F.; HERNANDEZ, E. N.; MORLEY, J. E. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Research*, v. 421, p. 280–290, 1987.

FLOOD, J. F.; SMITH, G. E.; MORLEY, J. E. Modulation of memory processing by cholecystokinin: dependence on the vagus nerve. *Science*, v. 236, n. 4803, p. 832–834, 1987.

GØTZSCHE, C. R.; WOLDBYE, D. P. D. The role of NPY in learning and memory. *Neuropeptides*, v. 55, p. 79–89, 2016.

GRAF, P.; SCHACTER, D. L. Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic subjects. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, v. 11, n. 3, p. 501–518, 1985.

GRIGOR'YAN, G. A.; MARKEVICH, V. A. Consolidation, Reactivation, and Reconsolidation of Memory. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, v. 45, n. 9, p. 1019–1028, 2015.

GUTMAN, A. R. et al. The Role of Neuropeptide Y in the Expression and Extinction of Fear-Potentiated Startle. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 48, p. 12682–12690, 2009.

HANSEL, D. E.; EIPPER, B. A.; RONNETT, G. V. Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, v. 410, n. 6831, p. 940–944, 2001.

Hasselmo, M. E.; Bower, J. M. Acetylcholine and memory. *Trends in Neurosciences*, v. 16, p. 218–222, 1993.

HEANEY, C. F.; KINNEY, J. W. Role of GABAB Receptors in Learning and Memory and Neuropsychological Disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 63, p. 1–28, 2016.

HEILIG, M. et al. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration. *Trends in neurosciences*, v. 2, p. 80–85, 1994.

HÖKFELT, T. et al. NPY and its involvement in axon guidance, neurogenesis, and feeding. *Nutrition*, v. 24, n. 9, p. 860–868, 2008.

INUI, A.; BABA, S. Gastrointestinal Peptide Binding and Function in the Brain: Emphasis on Peptide YY. In: MÜLLER, E. E.; MACLEOD, R. M. (Eds.). *Neuroendocrine Perspectives*. 1. ed. New York, USA: Springer-Verlag, v. 8, p. 181, 1990.

JOELS, M. et al. Learning under stress: how does it work? *TRENDS in Cognitive Sciences*, v. 10, n. 4, p. 152–158, 2006.

KASTIN, A. J. et al. Misleading Concepts in the Field of Brain Peptides. *Peptides*, v. 5, p. 249–253, 1984.

KERSTIN, A. J. et al. CNS effects of peripherally administered brain peptides. *Life Sciences*, v. 25, n. 4, p. 401–414, 1979.

KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: a critical review. *Learning & Memory*, p. 411–416, 2015.

KOJIMA, K. et al. Neuronal relationship between orexin-A- and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides*, v. 43, n. 2, p. 63–71, 2009.

KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, 2011.

KORNHUBER, J.; ZOICAS, I. Neuropeptide Y prolongs non-social memory and differentially affects acquisition, consolidation, and retrieval of non-social and social memory in male mice. *Scientific Reports*, n. July, p. 1–9, 2017.

LACH, G.; DE LIMA, T. C. M. Role of NPY Y1 receptor on acquisition, consolidation and extinction on contextual fear conditioning: Dissociation between anxiety, locomotion and non-emotional memory behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 103, p. 26–33, 2013.

LINARTEVICHI, V. F. Participação dos receptores hipocâmpais do neuropeptídeo Y na consolidação e reconsolidação de uma memória aversiva. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron*, v. 46, p. 703–713, 2005.

LOH, K.; HERZOG, H.; SHI, Y.-C. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 26, n. 3, p. 125–135, 2015.

LYNCH, D. et al. Neuropeptide Y Receptor Binding Sites in Rat Brain: Differential Autoradiographic Localizations with ¹²⁵I-Peptide YY and ¹²⁵I-Neuropeptide Y Imply Receptor Heterogeneity. *The Journal of Neuroscience*, v. 9, n. 8, p. 2607–2619, 1989.

M. MOSER, E. M. Functional Differentiation in the Hippocampus. *Hippocampus*, v. 8, p. 608–619, 1998.

MAGNI, P. Hormonal control of the neuropeptide Y system. *Current Protein and Peptide Science*, v. 4, n. 1, p. 45–57, 2003.

MANZANARES, P. A. R. et al. Previous Stress Facilitates Fear Memory , Attenuates GABAergic Inhibition, and Increases Synaptic Plasticity in the Rat Basolateral Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 38, p. 8725–8734, 2005.

MARTINEZ, J. L. J.; KESNER, R. P. *Neurobiology of Learning and Memory*. New York, USA: Academic Press, 1998.

MASON, J. W. A Review of Psychoendocrine Research on the Pituitary-Adrenal Cortical System. *Psychosomatic Medicine*, v. 5, p. 576–607, 1968.

MICHALKIEWICZ, M. et al. Increased blood pressure responses in neuropeptide Y transgenic rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 281, n. 2, p. R417–26., 2001.

MIYOSHI, E. et al. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Research Bulletin*, v. 58, n. 1, p. 41–47, 2002.

MORGAN III, C. A. et al. Plasma Neuropeptide-Y Concentrations in Humans Exposed to Military Survival Training. *Biological Psychiatry*, v. 3223, n. 99, 2000.

MORRIS, R. G. M. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, v. 297, n. 5868, p. 681–683, 1982.

NADEL, L. et al. Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 36, p. 1640–1645, 2012.

NEVES, G. et al. Synaptic plasticity , memory and the

hippocampus : a neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, p. 65–75, 2008.

ÖGREN, S. O. et al. Neuropeptides in learning and memory processes with focus on galanin. *European Journal of Pharmacology*, v. 626, n. 1, p. 9–17, 2010.

O'Keefe J.; Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, v. 34, p. 171–175, 1971.

PARÉ, W. P.; GLAVIN, G. B. Restraint Stress in Biomedical Research : A review. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, v. 10, p. 339–370, 1986.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. (2nd ed.). San Diego: Academic Press, 2009.

PLOTNIKOFF, N. P. et al. DOPA Potentiation by a Hypothalamic Factor, MSH Release-Inhibiting Hormone (MIF). *Life Sciences*, v. 10, p. 1279–1283, 1971.

PLOTNIKOFF, N. P. et al. Deserpidine Antagonism by a Tripeptide, L-prolyl-L-leucylglycinamide. *Neuroendocrinology*, v. 11, p. 67–71, 1973.

PREDIGER, R. D. S. et al. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) – the spontaneously hypertensive rat (SHR). *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 8, n. 04, p. 583, 2005.

RAMAMOORTHY, P.; WANG, Q.; WHIM, M. Cell type-dependent trafficking of neuropeptide Y- containing dense core granules in CNS neurons. *Neuroscience*, v. 31, n. 41, p. 14783–14788, 2011.

RAMAMOORTHY, P.; WHIM, M. Trafficking and fusion of neuropeptide Y-containing dense core granules in astrocytes.

Journal of Neuroscience, v. 28, n. 51, p. 13815–13827, 2008.

RANABIR, S.; REETU, K. Stress and hormones. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, v. 15, n. 1, p. 18, 2011.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. Behavioural Brain Research, v. 140, p. 1–47, 2003.

ROBERTS, W. W.; DEMBER, W. N.; BRODWICK, M. Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions. Journal of Comparative and Physiological Psychology, v. 55, n. 5, p. 695–700, 1962.

ROSENBAUM, R. S. et al. Remote spatial memory in aging : all is not lost. Frontiers in Aging Neuroscience, v. 4, p. 1–10, 2012.

SANDERSON, D. J.; BANNERMAN, D. M. The Role of Habituation in Hippocampus-Dependent Spatial Working Memory Tasks : Evidence From GluA1 AMPA Receptor Subunit Knockout Mice. Hippocampus, v. 994, p. 981–994, 2012.

SARA, S. J. Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. Learning & Memory, v. 7, n. 2, p. 73–84, 2000.

SCHOENFELD, T. J. et al. Stress and loss of adult neurogenesis differentially reduce hippocampal volume. Biological Psychiatry, v. 82, n. 12, p. 914–923, 2018.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, v. 138, p. 32, 1936.

STARBÄCK, P. et al. Neuropeptide Y receptor gene y6: multiple deaths or resurrections? Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 277, p. 264–269, 2000.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. Neuropeptide y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature, v. 296, p. 659–660, 1982.

THORSELL, A. et al. Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 23, p. 12852–7, 2000.

VALES, L. D. F. M. DOS; FUKUDA, M. T. H.; ALMEIDA, S. S. Effects of acute stress on learning and memory processes of malnourished rats. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 27, n. 4, p. 784–793, 2014.

VEZZANI, A.; SPERK, G.; COLMERS, W. F. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends in Neurosciences*, v. 22, n. 1, p. 25–30, 1999.

WAHLESTEDTL, C.; EKMAN, R.; WIDERLOV, E. Neuropeptide Y (NPY) and the central nervous system: distribution effects and possible relationship to neurological and psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 13, p. 31–54, 1989.

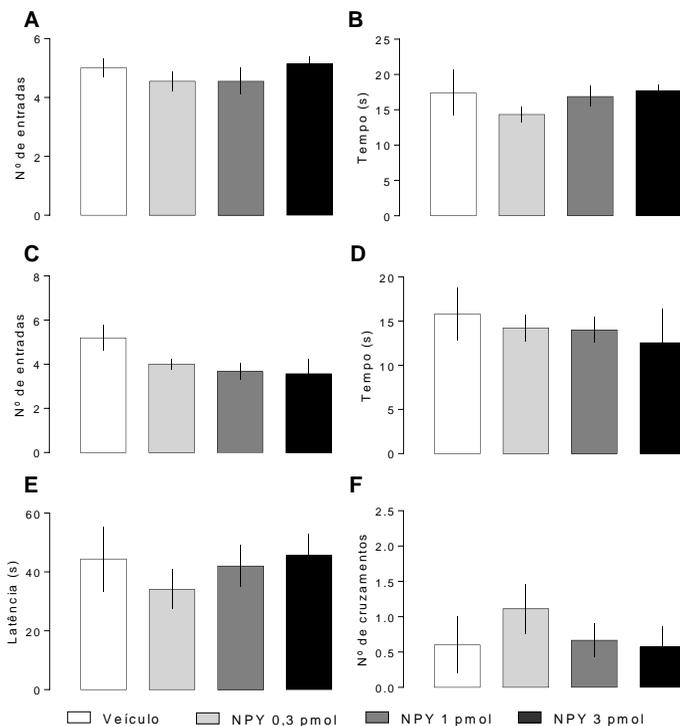
WAN, C. P.; LAU, B. H. S. Neuropeptide Y receptor subtypes. *Life Sciences*, v. 56, n. 13, p. 1055–1064, 1995.

WIED, D. D. E. et al. Release of ACTH by Substances of Central Nervous System Origin. *Endocrinology*, v. 85, n. November, p. 561–569, 1968.

YARIBEYGI, H. et al. The impact of stress on body function: a review. *EXCLI Journal*, v. 16, p. 1057–1072, 2017.

APÊNDICE A – Efeito do NPY sete dias após o labirinto aquático

Figura 1. Efeito da microinfusão do neuropeptídeo Y no HD sete dias após a sessão de treino sobre a consolidação da memória na sessão de teste do labirinto aquático.



Doses de 0,3, 1 e 3 pmol foram testadas sobre a consolidação da memória. **A)** Número de entradas no quadrante oposto ao quadrante da plataforma. **B)** Tempo no quadrante oposto ao da plataforma. **C)** Número de entradas no quadrante da plataforma. **D)** Tempo no quadrante da plataforma. **E)** Latência para encontrar o local da plataforma. **F)** Número de cruzamentos no local da plataforma. Resultados expressos como média \pm EPM ($n=5-9$ /grupo). ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ quando comparado com o respectivo grupo veículo.

APÊNDICE B – Quadro de efeitos dos receptores do NPY

Quadro 1 – Efeitos dos receptores Y1 e Y2 do NPY no HD sobre os parâmetros avaliados no teste do labirinto aquático.

Parâmetro	Y1	Y2
Entradas no quadrante oposto	X	
Tempo no quadrante oposto		X
Entradas no quadrante da plataforma		
Tempo no quadrante da plataforma	X	
Latência para o local da plataforma	X	X
Cruzamentos no local da plataforma	X	X

Fonte: Autor.

ANEXO A – Aprovação do projeto



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 12 de junho de 2018
CEUA N 9771250417

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Thereza Christina Monteiro De Lima
Área: Farmacologia
Thereza Christina Monteiro De Lima (orientador)

Título da proposta: "Avaliação dos efeitos promovidos pelo neuropeptídeo Y e pelos receptores Kapa-opioides no hipocampo dorsal de ratos nas diferentes etapas de formação e manutenção de memórias aversivas".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, análise e **APROVOU** a Notificação (versão de 15/mayo/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito a inclusão de ERICKS SOUSA SOARES, aluno regularmente matriculado nesta instituição, nº de matrícula 201700882, a nível de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, no projeto 9771250417 intitulado AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROMOVIDOS PELO NEUROPEPTÍDEO Y E PELOS RECEPTORES KAPA-OPIOIDES NO HIPOCAMPO DORSAL DE RATOS NAS DIFERENTES ETAPAS DE FORMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS. Quando o projeto foi aprovado o aluno ainda não havia concluído o curso de manejo animal porém atualmente já cursou e foi aprovado, como mostra o histórico em anexo".

Comentário da CEUA: "RESULTADO DA REUNIÃO DA CEUA - APROVADO Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela Aprovação. - vide pareceres Atenciosamente, Divisão Administrativa - CEUA parecer 1: APROVADO - Srs. Membros da Comissão de Ética no Uso de Animais [] CEUA. Trata a presente solicitação de adendo ao Projeto CEUA 9771250417, encaminhado pela Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima. O mesmo trata de inclusão do mestrando Ericks Sousa Soares, aluno do PPG Farmacologia, ao projeto originalmente proposto e aprovado. O referido aluno apresenta certificado de curso de Manejo em animais de experimentação, em nível PPG, e, desta forma, sou de parecer FAVORÁVEL a presente solicitação. parecer 2: APROVADO - Sou de parecer favorável à solicitação de inclusão do aluno ERICKS SOUSA SOARES no referido projeto de pesquisa."

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ANEXO B – Aprovação de emenda ao projeto



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 08 de outubro de 2018
CEUA N 9771250417

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Thereza Christina Monteiro De Lima
Área: Farmacologia
Thereza Christina Monteiro De Lima (orientador)

Título da proposta: "Avaliação dos efeitos promovidos pelo neuropeptídeo Y e pelos receptores Kapa-opioides no hipocampo dorsal de ratos nas diferentes etapas de formação e manutenção de memórias aversivas".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 10/setembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Memória é a capacidade de armazenar informações e posteriormente conseguir recuperá-las e utilizá-las. Neste processo, sistemas neuromoduladores, como neuropeptídeos, também são tão importantes quanto mecanismos clássicos de neurotransmissão, uma vez que estão envolvidos em processos sinápticos. Dados provenientes do nosso laboratório mostram que a administração do neuropeptídeo Y (NPY) é capaz de prejudicar a consolidação e a reconsolidação da memória no teste de condicionamento aversivo contextual. Atualmente sabe-se que o NPY prejudica a consolidação de uma memória aversiva contextual forte, o que é de grande importância clínica uma vez que se faz necessário o desenvolvimento de fármacos que sejam direcionados para memórias extremamente aversivas (patológicas), mas não para aquelas memórias de menor grau de aversividade (memórias adaptativas). No entanto, ainda não está claro se o efeito mediado por NPY também pode ser reproduzido em um protocolo de aprendizado que envolva um menor grau de aversividade, como o labirinto aquático, e se ele exige um determinado nível de estresse. Para avaliar se um estresse maior resulta em uma maior expressão dos receptores do NPY, antes de serem submetidos ao labirinto aquático, os animais serão transferidos para uma sala de experimentação e gentilmente colocados em tubos plásticos com tamanho similar ao corpo do animal e com pequenos furos que permitem sua respiração. Apenas a cauda ficará fora do tubo. Os animais permanecerão na sala por 30 ou 60 minutos, a depender da sessão do experimento. Ao término do protocolo, eles retornarão para o biotério."

Comentário da CEUA: "RESULTADO DA REUNIÃO DA CEUA - APROVADO Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela Aprovação. - vide pareceres Atenciosamente, Divisão Administrativa - CEUA Parecer 1: APROVADO - Ilustres membros da CEUA, Trata o presente de solicitação de Emenda, especificamente de adição de procedimento experimental: estresse de contenção. Tal solicitação é necessária para avaliar a influência do estresse sob os efeitos do Neuropeptídeo Y na consolidação de memórias adaptativas. A solicitação de adendo está devidamente justificada no Formulário e embasada na literatura científica. O protocolo de estresse de contenção está devidamente descrito. Parecer 2: APROVADO - Sou de parecer favorável à emenda".

Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina