

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

MICHELLE FLORES DOMINGUES

**MODULAÇÃO DO INFLUXO DE CÁLCIO PELO PEPTÍDEO YY (3-36) EM
CÉLULAS DO HIPOCAMPO DE RATOS**

PORTO ALEGRE

2015

MICHELLE FLORES DOMINGUES

**MODULAÇÃO DO INFLUXO DE CÁLCIO PELO PEPTÍDEO YY (3-36) EM
CÉLULAS DO HIPOCAMPO DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

PORTO ALEGRE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D671m Domingues, Michelle Flores

Modulação do influxo de cálcio pelo peptídeo YY (3-36) em células do hipocampo de ratos. / Michelle Flores Domingues. – Porto Alegre, 2015.

97f. il.; tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Neurociências) – Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

1. Neurociências. 2. Influxo de Cálcio. 3. Peptídeo YY. 4. Receptor Y2. 5. Hipocampo. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Belo, Cháriston André Dal. III. Título.

CDD 612.8

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

MICHELLE FLORES DOMINGUES

**MODULAÇÃO DO INFLUXO DE CÁLCIO PELO PEPTÍDEO YY (3-36) EM
CÉLULAS DO HIPOCAMPO DE RATOS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga - UFRGS

Prof^ª. Dra. Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini - PUCRS

Dr. Samuel Greggio – PUCRS

Dra. Gianina Teribele Venturin – PUCRS (Suplente)

PORTO ALEGRE

2015

Dedico esta dissertação aos meus pais pelo amor incondicional,
pela educação recebida e pela dedicação imensurável.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS pela oportunidade de realizar o meu mestrado e aos professores do programa pela contribuição com o meu crescimento profissional e científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas e pelo incentivo à pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS (IPB/PUCRS) pela infraestrutura oferecida para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Ao Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular do Instituto do Cérebro onde foi possível desenvolver e concluir com sucesso este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa dedico especial agradecimento pela oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa em Neurociências desde a minha iniciação científica e pela orientação deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo pelas valiosas contribuições para o estabelecimento das técnicas essenciais para a realização desse projeto e por todo o auxílio até a concretização do mesmo.

Ao meu colega e amigo Dênis Reis de Assis pela essencial contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, pelo auxílio ao longo dos experimentos, muitas vezes aos finais de semana ou se estendendo até a noite, pelo empenho para a conclusão desse trabalho e pelas valiosas considerações no processo de elaboração do artigo.

À minha amiga e colega de mestrado Daniele Vieira pela amizade construída ao longo desses dois anos, por compartilhar tantos momentos decisivos nesta etapa da minha vida, pelas longas conversas, por dividir períodos de angústias e dúvidas relacionadas ao nosso processo de aprendizagem e crescimento e pelo auxílio sempre que possível aos experimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Neurociências e Sinalização Celular: Dra. Simone Denise Salamoni, Ricardo Breda e Daniela Abreu pelo acolhimento desde a minha iniciação científica, por todo o carinho, amizade e apoio para que este trabalho de mestrado pudesse ser desenvolvido e concretizado com sucesso.

À Vanessa Fey, técnica do Laboratório de Parasitologia do IPB/PUCRS, pela amizade de longos anos, desde a graduação, iniciação científica e agora no mesmo Instituto de Pesquisa, obrigado por me apoiar sempre que necessário.

À Natália Jaeger pela amizade desde a graduação, por compartilharmos tantos momentos especiais em nossas vidas ao longo destes anos, pelo apoio e ajuda de sempre, e em especial nestes dois anos de nossos mestrados desenvolvidos no IPB/PUCRS.

À Prof. Dra. Denise Machado Cantarelli por disponibilizar a Sala de Cultura do Laboratório de Biologia Molecular e Celular para que parte essencial deste trabalho pudesse ser desenvolvida.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Neurociências e Sinalização Celular e dos demais laboratórios do IPB/PUCRS com quem dividi meus dias durante estes dois anos de mestrado e que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

Aos meus pais, Flávio e Rejani, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem nas minhas escolhas, por me apoiarem a alcançar os meus objetivos e por não medirem esforços para que eu pudesse sempre concretizá-los.

À minha irmã Kelly pelo amor, amizade, incentivo e apoio em todos os momentos, por sempre torcer e acreditar em mim e por se alegrar a cada nova conquista alcançada. E ao meu cunhado Alessandro por toda amizade e apoio de sempre.

À minha querida Vó Alzenira pelo amor e incentivo para que eu nunca desista dos meus sonhos, por sempre torcer e rezar por mim e por sempre me acolher com tanto carinho.

A todos os meus queridos amigos, pelo carinho e pela compreensão do meu distanciamento principalmente neste último ano, e em especial a Grazi Hansen que também contribui agora na reta final para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O peptídeo YY (PYY) pertence à família do neuropeptídeo Y que é composta também pelo neuropeptídeo Y (NPY) e pelo polipeptídeo pancreático (PP). São peptídeos biologicamente ativos, compostos por 36 aminoácidos e atuam via receptores acoplados a proteína G. Existem quatro subtipos de receptores para a família do NPY que são funcionais em humanos, denominados como: Y1, Y2, Y4 e Y5. O PYY é secretado no intestino pelas células L e circula no organismo em duas formas ativas que atravessam a barreira hematoencefálica, que são o PYY (1-36) e sua forma clivada PYY (3-36). O PYY (3-36) é um agonista seletivo do receptor Y2 e tem sido evidenciado por seu papel como um modulador do apetite, promovendo a sensação de saciedade em mamíferos. O hipocampo é uma região rica em receptores Y2 e já se demonstrou que a ativação destes receptores no hipocampo pode inibir a transmissão sináptica excitatória e a liberação de glutamato estimulada por potássio em fatias hipocâmpais. Em camundongos *knockout* para o receptor Y2 observou-se déficits na memória espacial e na memória não espacial nestes animais evidenciando também seu envolvimento na regulação da função cognitiva associada com o aprendizado e memória. O desenvolvimento desta dissertação teve por objetivo buscar uma melhor compreensão da interação do PYY (3-36) e seu receptor Y2 em células do sistema nervoso central. Para isso investigou-se a atividade deste peptídeo no influxo de cálcio (Ca^{2+}) em células cultivadas do hipocampo de ratos Wistar neonatos. Avaliou-se a influência do Ca^{2+} presente no meio extracelular, bem como o envolvimento dos canais de Ca^{2+} e Na^+ voltagem dependentes presentes na membrana plasmática, e a influência de mecanismos intracelulares presentes no retículo endoplasmático (RE), como a bomba do retículo sarco/endoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), os receptores de inositol trifosfato (IP3Rs) e os receptores de rianodina (RyRs) nas respostas induzidas pelo PYY (3-36) sobre a modulação da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), através da utilização de bloqueadores específicos para estes canais. Foi observado que o aumento da concentração de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) citosólico evocado pelo PYY (3-36) em células do hipocampo é independente do Ca^{2+} do meio extracelular. E através da utilização de bloqueadores dos canais de Na^+ voltagem dependentes conseguiu-se demonstrar que a ação do PYY (3-36) é independente do influxo de Na^+ , sugerindo que a sua atividade sobre as células hipocâmpais não induz ou independe da despolarização celular. Nos experimentos utilizando bloqueadores dos RyRs ou da bomba SERCA observou-se uma elevação do influxo de Ca^{2+} , o que provavelmente ocorreu devido a ativação dos canais de cálcio operados por

estoque (SOCC, do inglês *store-operated calcium channels*), porém na presença concomitante de bloqueadores de canais de Na⁺ voltagem dependentes, este efeito foi bloqueado, sugerindo uma provável inibição dos canais SOCC nessas condições. Finalmente, na presença de inibidores dos IP3Rs, ocorreu uma diminuição da [Ca²⁺] citosólico evocada pelo PYY (3-36) nas células. Os resultados evidenciam que a ação do PYY (3-36) sobre a mobilização do Ca²⁺ é através de receptores intracelulares do RE, sugerindo que a elevação da [Ca²⁺]_i observada, é modulada principalmente pela ativação da cascata de sinalização do Ca²⁺ intracelular pelos receptores de IP3.

Palavras-chave: PYY (3-36). Receptor Y2. Influxo de Cálcio. Hipocampo.

ABSTRACT

Peptide YY (PYY) belongs to the neuropeptide Y (NPY) family, which also includes the neuropeptide Y (NPY) and pancreatic polypeptide (PP). These substances are biologically active, constituted of 36 aminoacids, and act via G protein coupled receptors. There are four functional subtypes of NPY family receptors in humans, namely Y1, Y2, Y4, and Y5. PYY is secreted by the intestinal L cells, being present in the blood stream in two active forms capable of crossing the blood brain barrier, PYY (1-36) and its cleavage product, PYY (3-36). PYY is a selective agonist for the Y2 receptor (Y2R) and has been identified as a modulator of appetite, promoting satiety sensation in mammals. Y2R are abundant in the brain hippocampus, where these receptors inhibit excitatory synaptic transmission and glutamatergic release when activated by potassium in hippocampal slices. Besides, knockout mice for Y2R present deficits in spatial and non-spatial memory tasks, showing a role of Y2R in learning and memory. The aim of this Master's dissertation was searching for a better understanding of the interaction of PYY (3-36) and its Y2 receptor in CNS cells. For this purpose the activity of this peptide was investigated on Ca^{2+} influx in hippocampal cell cultures of Wistar neonate rats. We evaluated the influence of the presence of Ca^{2+} in the extracellular fluid, as well as the involvement of plasma membrane voltage-dependent Ca^{2+} and Na^+ channels, and the influence of intracellular mechanisms related to the endoplasmic reticulum (ER), such as the SERCA pump, the inositol triphosphate (IP3) receptors and the ryanodine receptors (RyRs) in the responses induced by PYY (3-36) on the modulation of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$, by using blockers specific for these channels. It was observed that the increase of the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ evoked by PYY (3-36) in hippocampal cells is independent of Ca^{2+} from the extracellular environment. Using a voltage-dependent Na^+ channels blocker it was possible demonstrate that PYY (3-36) action is independent on Na^+ , suggesting that its activity on hippocampal cells does not induce or does not depend on cellular depolarization. In the experiments using RyRs or SERCA pump blockers it was observed an elevation of Ca^{2+} influx, that probably occurred due to the activation of SOCC, but with the concomitant presence of the a voltage-dependent Na^+ channels blocker, this effect was abolished, suggesting a probable inhibition of SOCC channels in these conditions. In the experiments in the presence of an IP3Rs inhibitor, there was a decrease in cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ evoked by PYY (3-36). The results from our experiments indicate that the action of PYY (3-36) on Ca^{2+} mobilization is mediated by intracellular receptors of the ER, suggesting that the observed

elevation of $[Ca^{2+}]_i$ is modulated especially by the activation of the intracellular Ca^{2+} signalling cascade through IP3 receptors.

Key-words: PYY (3-36). Y2 Receptor. Calcium Influx. Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modulação da homeostase do apetite e do peso via PYY (1-36) e PYY (3-36) no hipotálamo.....	23
FIGURA 2. Ilustração dos principais sistemas de transporte que controlam a concentração de cálcio intracelular neuronal.....	30
FIGURA 3. Sistema para imagem do cálcio.....	36
FIGURA 4. Cultura primária de células do hipocampo.	40
FIGURA 5. Efeito do PYY (3-36) sobre o influxo de Ca^{2+} nas células hipocâmpais.....	41
FIGURA 6. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular.	43
FIGURA 7. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando os canais de Na^+ voltagem dependentes estão bloqueados.....	44
FIGURA 8. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando a bomba SERCA está bloqueada.....	45
FIGURA 9. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando os RyRs estão bloqueados.....	46
FIGURA 10. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando os IP3Rs estão bloqueados.....	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência de aminoácidos dos peptídeos humanos da família do neuropeptídeo Y.....	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AraC – Citosina- β -D-arabinofuranoside

BSA – Albumina de soro bovino. Do inglês: *bovine serum albumin*

CA – Corno de Amon

Ca²⁺ - Cálcio

[**Ca²⁺**] – Concentração de Cálcio

[**Ca²⁺**]_i - Concentração de Cálcio intracelular

CaCl – Cloreto de Cálcio

CICR – Liberação de cálcio induzida por cálcio. Do inglês: *calcium-induced calcium release*

DAG – Diacilglicerol

DAPI - 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DMSO - Dimetil sulfóxido

DPBS – Tampão fosfato-salina de Dulbecco. Do inglês: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

DPP – IV – Dipeptidil peptidase IV

FBS – Soro fetal bovino. Do inglês: *fetal bovine serum*

FITC - Do inglês: *Fluorescein isothiocyanate*

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial. Do inglês: *Glial fibrillary acidic protein*

GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon. Do inglês: *glucagon-like peptide 1*

GPCR – Proteína G acoplada ao receptor. Do inglês: *G protein-coupled receptors*

HBS – HEPES tampão salina. Do inglês: *HEPES-buffered saline*

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência. Do inglês: *High Performance Liquid Chromatograph*

IP3 – Inositol trifosfato

IP3Rs – Receptores de inositol trifosfato

K⁺ - Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

LTP – Potenciação de longa duração. Do inglês: *Long-term Potentiation*

LTD - Despressão de longa duração. Do inglês: *Long-term Depression*

mAChR-M1 - Receptores muscarínicos de acetilcolina do tipo M1

mAChR-M2 - Receptores muscarínicos de acetilcolina do tipo M2

MgCl – Cloreto de Magnésio

mGluRs – Receptores metabotrópicos de glutamato

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro. Do inglês: *messenger Ribonuclein Acid*

Na⁺ - Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NMDA- N-Metil D-Asparto

NPY – Neuropeptídeo Y

PCMA – Bomba de cálcio da membrana plasmática. Do inglês: *plasma membrane calcium pump*

PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. Do inglês: *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*

PKC – Proteína quinase C. Do inglês: *Protein kinase C*

PLC – Fosfolipase C. Do inglês: *Phospholipase C*

PP – Polipeptídeo Y

PYY – Peptídeo YY

RE – Retículo endoplasmático

RyRs – Receptores de rianodina

SERCA – Bomba do retículo sarco/endoplasmático Ca²⁺- ATPase. Do inglês: *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺- ATPase*

SNC – Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SOCC – Canal de cálcio operado por estoque. Do inglês: *Store-operated calcium channel*

TTX – Tetrodotoxina

VGCC – Canais de cálcio voltagem dependentes. Do inglês: *voltage-gated calcium channel*

2-APB – 2 - aminoethoxydiphenylborate

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. FAMÍLIA DO NEUROPEPTÍDIO Y	18
1.1.1. Receptores Y.....	19
1.1.2. Neuropeptídeo Y (NPY)	20
1.1.3. Polipeptídeo Pancreático (PP).....	21
1.1.4. Peptídeo YY (PYY)	21
1.1.4.1. Funções do PYY	22
1.2. SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO	25
1.2.1. Canais dos receptores de rianodina (RyRs).....	28
1.2.2. Canais dos receptores de inositol trifosfato (IP3Rs)	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2. ANIMAIS	33
4.3. CULTURA DE CÉLULAS	33
4.4. IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA	34
4.5. IMAGEM DO CÁLCIO (Ca ²⁺)	35
4.6. PEPTÍDEO YY (3-36)	36
4.7. ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DO PYY (3-36).....	37
4.7.1. Remoção do Ca ²⁺ do meio extracelular.....	37
4.7.2. Inibição dos canais de Na ⁺	37
4.7.3. Inibição da bomba SERCA.....	38
4.7.4. Inibição dos receptores de rianodina.....	38
4.7.5. Inibição dos receptores de inositol trifosfato	38
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	40
5.1. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO HIPOCAMPO	40

5.2. EFEITO DO PYY (3-36) NA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} INTRACELULAR DAS CÉLULAS HIPOCAMPAIS	40
5.3. EFEITO DO PYY (3-36) NA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} CITOSÓLICO NAS CÉLULAS HIPOCAMPAIS NA AUSÊNCIA DE Ca^{2+} NO MEIO EXTRACELULAR.....	42
5.4. EFEITO DO PYY (3-36) QUANDO OS CANAIS DE Na^{+} VOLTAGEM DEPENDENTES ESTÃO BLOQUEADOS.....	43
5.5. EFEITO DO PYY (3-36) EM PRESENÇA DE BLOQUEADORES DA BOMBA SERCA	44
5.6. EFEITO DO PYY (3-36) NA PRESENÇA DE BLOQUEADORES DE RECEPTORES DE RIANODINA....	46
5.7. EFEITO DO PYY (3-36) QUANDO OS RECEPTORES DE INOSITOL TRIFOSFATO ESTÃO BLOQUEADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. ARTIGO ORIGINAL	53
8. CONCLUSÕES	74
9. REFERÊNCIAS	75
10. ANEXOS	82
10.1. ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA – PUCRS.....	82
10.2. ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA INTERNACIONAL INDEXADA NEUROPHARMACOLOGY.....	83
10.3. ANEXO C - SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. FAMÍLIA DO NEUROPEPTÍDIO Y

A família do neuropeptídeo Y é composta pelo neuropeptídeo Y (NPY), pelo peptídeo YY (PYY) e pelo polipeptídeo pancreático (PP). São peptídeos biologicamente ativos, secretados por células do sistema gastrointestinal e do sistema nervoso. São compostos por 36 aminoácidos (Tabela 1), em uma cadeia linear de polipeptídios, e atuam via receptores acoplados a proteína G (TATEMOTO; CARLQUIST; MUTT, 1982; TATEMOTO; MUTT, 1980). Enquanto o NPY atua primariamente como um neurotransmissor, o PYY e o PP atuam como hormônios. Ambos NPY e PYY são encontrados em todos os principais representantes dos vertebrados, enquanto o PP somente em tetrápodes. Evolutivamente o NPY é um dos peptídeos mais altamente conservados. Embora o PP tenha sido primeiramente descoberto e o NPY tenha sido o último identificado, a análise evolutiva demonstrou que o PP é, na verdade, o mais novo membro desta família peptídica (LARHAMMAR, 1996a). Então baseado nestas considerações evolucionárias é recomendado que a família destes polipeptídios seja denominada como família do neuropeptídeo Y (MICHEL et al., 1998).

Tabela 1. Sequência de aminoácidos dos peptídeos humanos da família do neuropeptídeo Y

NPY - YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY

PYY - YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

PP - APLEPVYPGDNATPEQMAQYAADLRRYINMLTRPRY

Fonte: Tabela adaptada de Parker e Balasubramaniam (PARKER, S.; BALASUBRAMANIAM, 2008).

1.1.1. Receptores Y

Existem cinco subtipos de receptores para a família do neuropeptídeo Y identificados, em mamíferos, que são denominados como: Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6, os quais medeiam os amplos efeitos fisiológicos destes peptídeos (MICHEL et al., 1998). Os receptores Y1 e Y2 são os que estão melhores caracterizados, e ambos NPY e PYY se ligam a eles. A similaridade de sequência entre Y1 e Y2 é baixa (apenas 31%), entretanto a evolução destes receptores parece ser lenta, pois tanto o receptor Y1 quanto o receptor Y2 apresentam uma similaridade entre ratos e camundongos de 98% e entre ratos e humanos de 94% (LARHAMMAR, 1996b).

Os receptores Y são acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G protein-coupled receptor*), da família rodopsina dos GPCR, e em geral, demonstram um acoplamento preferencial a receptores G_i e G_o (que são proteínas G sensíveis a toxina pertussis) (LIMBIRD, 1988). Os GPCR são a classe de receptores mais abundantes em humanos. Mecanismos de sinalização celular via GPCR estão envolvidos em importantes processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão. O principal papel das proteínas G é ativar a produção de segundos mensageiros, o que leva a ativação de uma cascata de sinalização intracelular (GOLAN; TASHJIAN; ARMSTRONG, 2011). Destes cinco subtipos preliminarmente identificados (Y1, Y2, Y4, Y5, Y6) quatro são funcionais em humanos (Y1, Y2, Y4, Y5) (MICHEL et al., 1998) e apresentam padrões de expressão específicos em diferentes tecidos (MULLINS; ZHANG; HAWES, 2002).

Um estudo determinou e comparou a expressão de RNA mensageiro (mRNA, do inglês *messenger ribonucleic acid*) dos receptores Y1, Y2, Y4, Y5 em diferentes regiões do cérebro de rato. Foi demonstrado que os receptores Y estão amplamente distribuídos por todo o cérebro de rato, sendo particularmente evidenciados no sistema límbico, incluindo o hipotálamo, hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex cingulado e áreas tegmental (PARKER, R.; HERZOG, 1999). Estas áreas estão fortemente envolvidas com o comportamento, emoção, aprendizado, memória e regulação homeostática, o que sugere um importante envolvimento destes receptores e seus ligantes em uma ampla variedade de funções fisiológicas no organismo de mamíferos.

Os receptores Y estão expressos e co-expressados, em diferentes níveis em cada região do sistema nervoso central (SNC). Neste mesmo estudo, observou-se que a expressão do

mRNA do receptor Y5 sempre coincide com a presença do receptor Y1 (o inverso não acontece). E cada região exibe expressão preferencial de um ou de uma combinação seletiva de mRNA dos receptores Y, por exemplo, no hipocampo, o receptor Y1 apresenta maior expressão no giro dentado, enquanto o receptor Y2 apresenta-se expresso em todas as regiões do hipocampo, exibindo concentrações mais elevadas nas regiões de CA1 e CA3, e o receptor Y5 apresenta expressão de mRNA nas regiões de CA e no giro dentado (PARKER, R.; HERZOG, 1999).

1.1.2. Neuropeptídeo Y (NPY)

O NPY é o neuropeptídeo mais abundante nos mamíferos e está amplamente distribuído no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), sendo primariamente sintetizado e liberado por neurônios (MICHEL et al., 1998). Muitas funções têm sido sugeridas para o NPY, incluindo a regulação da alimentação, ansiedade, depressão, epilepsia, doenças neurodegenerativas e função cardiovascular (DECRESSAC; BARKER, 2012; GRAY, 2008; GRUNDEMAR; HÅKANSON, 1994). O NPY pode atuar também como fator de proliferação neuronal (CORVINO et al., 2014; HANSEL; EIPPER; RONNETT, 2001) e está envolvido com a regulação da função cognitiva associada com o aprendizado e memória (REDROBE, JOHN P et al., 1999), cuja função demonstrou-se estar ligada ao receptor Y2, onde um estudo com camundongos *knockout* para o receptor Y2 encontrou déficits na memória espacial e na memória não espacial nestes animais (REDROBE, JOHN PAUL et al., 2004). O receptor Y2 é o único que apresenta localização pré-sináptica e é mediador da supressão auto inibitória da liberação de NPY (COLMERS et al., 1991; STANIĆ et al., 2011).

O hipocampo é uma região do cérebro particularmente enriquecida com NPY e seus receptores, incluindo especificamente os subtipos Y1, Y2 e Y5 (PARKER, R.; HERZOG, 1999). Observou-se que em camundongos *knockout* para o NPY ocorre uma maior expressão de mRNA do receptor Y2 na região de CA1, o que demonstra um efeito compensatório devido à falta de inibição pelo NPY (TRIVEDI et al., 2001).

Atuando via receptores Y2 o NPY pode inibir a transmissão sináptica excitatória (COLMERS et al., 1991) e a liberação de glutamato estimulada por potássio em fatias hipocámpais (GREBER; SCHWARZER; SPERK, 1994). Quando administrado pela via

intracerebroventricular o NPY apresenta efeito anticonvulsivante (VEZZANI; SPERK; COLMERS, 1999).

Os receptores Y1 e Y2 já foram identificados em terminais nervosos glutamatérgicos no hipocampo e apresentam um importante papel na modulação da liberação de glutamato. Quando ativados seletivamente nesta região ambos inibem a liberação de glutamato induzida por Ca^{2+} (SILVA et al., 2001). Entretanto, o receptor Y2 parece ter um papel predominante no controle da excitação sináptica quando ativado por agonistas endógenos do NPY (SILVA et al., 2003).

1.1.3. Polipeptídio Pancreático (PP)

O PP é primariamente sintetizado e liberado por células endócrinas das ilhotas pancreáticas, denominadas como células F. É secretado após a ingestão de alimento, apresentando elevação dos níveis séricos no período pós-prandial. Exerce efeitos regulatórios sobre processos gastrointestinais, tais como a secreção pancreática, contração da vesícula biliar e esvaziamento gástrico (EKBLAD; SUNDLER, 2002). A ação do PP é mediada pelo receptor Y4, que está expresso tanto no sistema gastrointestinal quanto no SNC. Poucos estudos deste polipeptídio têm sido realizados no SNC, entretanto um estudo recente avaliou um modelo de camundongo *knockout* para o receptor Y4 e observou redução do comportamento relacionado à ansiedade e aumento das respostas depressivas nestes animais, indicando que o PP através de seu receptor específico também possui ação no sobre o SNC (TASAN et al., 2009).

1.1.4. Peptídeo YY (PYY)

Em 1980, Talemoto and Mutt, isolaram pela primeira vez em intestino de porco o PYY e subsequentemente o sequenciaram (TATEMOTO, 1982; TATEMOTO; MUTT, 1980). E em 1988, o isolaram em intestino humano (TATEMOTO et al., 1988). O PYY foi assim nomeado devido ao resíduo de aminoácido tirosina formar o C-terminal e o N-terminal do peptídeo, e pelo fato da tirosina ser abreviada como Y, designou-se peptídeo YY.

É predominantemente sintetizado e liberado por células intestinais endócrinas, chamadas células L. Estas células estão difusamente distribuídas na mucosa ao longo do intestino, principalmente na porção distal do intestino delgado e no cólon (GRANDT et al., 1994). Quando estas células são expostas para aumentar a quantidade de absorção de nutrientes, elas liberam o PYY na circulação e no lúmen do trato gastrointestinal (GRANDT et al., 1994).

O PYY circula no organismo em duas formas ativas: PYY (1-36) e PYY (3-36) e ambas as formas atravessam a barreira hematoencefálica (NONAKA et al., 2003). A forma PYY (3-36) resulta da clivagem do PYY (1-36) pela enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-IV), o que leva a perda do N-terminal tirosina-prolina do PYY (1-36) (MENTLEIN; GALLWITZ; SCHMIDT, 1993). Importaneamente, a DPP-IV é a mesma enzima responsável por inativar o hormônio peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1, do inglês *glucagon-like peptide 1*), o qual também é secretado pelas células L do intestino, indicando que a DPP-IV pode apresentar um papel essencial na regulação destes peptídeos. Em um estudo com humanos, a infusão de GLP-1 diminui os níveis basais de PYY, sugerindo que a elevação dos níveis de GLP-1 diretamente inibe a secreção de PYY pelas células L (LUGARI et al., 2004).

Através da dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquide Chromatograph*) seguida por quantificação por radioimunoensaio demonstrou-se que ambas as formas do peptídeo estão presentes no plasma humano, apresentando níveis pré-prandiais com média de 7.0 pM para o PYY (1-36) (63.1%) e de 4.1 pM para o PYY (3-36) (36.9%). Em níveis pós-prandiais observou-se uma média de 22.0 pM para o PYY (1-36) (45.8%) e de 26.0 pM para o PYY (3-36) (54.2%). Demonstrando a elevação do peptídeo após a ingestão de alimentos (GRANDT et al., 1994).

1.1.4.1. Funções do PYY

O PYY pode exercer função endócrina tanto parácrina quanto sistêmica. A ação parácrina do PYY, quando liberado pelas células L no lúmen intestinal, consiste na diminuição da motilidade do trato gastrointestinal, diminuição da secreção de ácido gástrico, redução da secreção de bile, diminuição da secreção pancreática e aumento da absorção dos nutrientes pelos enterócitos (BIRD et al., 1996).

Estudos têm demonstrado uma ampla ação do PYY no SNC, evidenciando seu envolvimento em importantes funções fisiológicas e patológicas. Sabe-se que existe uma comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro, denominada como eixo intestino-cérebro, que está ativa tanto no estado de saúde quanto de doença, apresentando envolvimento não somente em patologias do sistema gastrointestinal, mas também em doenças neurológicas, especialmente nas doenças psiquiátricas (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012).

A forma clivada, PYY (3-36), tem sido evidenciada por seu papel como um modulador do apetite, promovendo a sensação de saciedade em mamíferos (BALLANTYNE, 2006; BATTERHAM, 2007; KODA et al., 2005). Este efeito do peptídeo tem sido atribuído a sua ação sobre os neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (BALLANTYNE, 2006). As duas formas do PYY apresentam efeitos opostos através da ligação a diferentes receptores. O PYY (1-36) age sobre o receptor Y1 e quando atua sobre estes receptores no hipotálamo apresenta função de estimular o apetite, levando conseqüentemente ao ganho de peso, enquanto o PYY (3-36) se liga ao receptor Y2, e no hipotálamo exerce a função de inibição do apetite, promovendo a perda de peso (esquemáticamente representado na Figura 1) (BALLANTYNE, 2006).

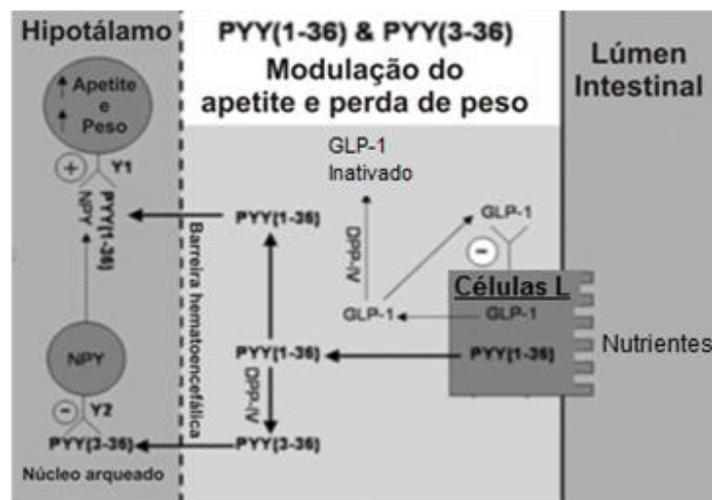


Figura 1. Modulação da homeostase do apetite e do peso via PYY (1-36) e PYY (3-36) no hipotálamo. Nutrientes no lúmen intestinal estimulam a liberação do PYY (1-36) pelas células L. A co-liberação do GLP-1 regula negativamente o PYY (1-36). A DPP-IV cliva o PYY (1-36) em PYY (3-36). As duas formas bioativas atravessam a barreira hematoencefálica. PYY (1-36) se liga ao receptor Y1 e estimula o apetite e o ganho de peso. PYY (3-36) se liga ao receptor Y2 inibindo o apetite e o ganho de peso e inibe a liberação do NPY. Adaptada de Ballantyne (BALLANTYNE, 2006).

Estudos recentes demonstraram diminuição dos níveis séricos basais e pós-prandiais de PYY em indivíduos obesos quando comparados com indivíduos magros (BATTERHAM et al., 2003). Além disso, em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica para o tratamento da obesidade mórbida, os níveis séricos pós-prandiais do PYY aumentaram cerca de 10 vezes (CHAN et al., 2006). Estes achados sugerem o envolvimento do PYY na patogênese da obesidade. Porém, apesar de um amplo número de trabalhos terem sido conduzidos na tentativa de se entender os mecanismos centrais do PYY, não existe confirmação se a deficiência do PYY no organismo poderia induzir a obesidade ou se a obesidade induziria a diminuição dos níveis de PYY.

A administração periférica do PYY (3-36) é capaz de promover a ativação neuronal em diferentes áreas do SNC de ratos, isto foi evidenciado através da quantificação da expressão de c-Fos (STADLBAUER et al., 2012). Através de ressonância magnética funcional em humanos, demonstrou-se que a administração periférica de PYY (3-36) induz ativação da via dopaminérgica mesocorticolímbica, promovendo ativação de várias regiões no cérebro, em especial uma área relacionada com o sistema de recompensa, localizada na região do córtex pré-frontal esquerdo. A ativação desta área foi diretamente proporcional à diminuição do apetite nos indivíduos testados (BATTERHAM, 2007). Da mesma forma, a administração de PYY (3-36) em ratos, ativou diversas regiões do cérebro e provocou um efeito anoréxico nos animais (KODA et al., 2005; STADLBAUER et al., 2012).

Entretanto, além de sua importância no comportamento alimentar e balanço energético, o aumento de evidências indicam que o PYY (3-36) pode estar envolvido em distúrbios neuropsiquiátricos e comportamento suicida, como demonstrado em análises post-mortem, cuja causa tinha sido suicídio, onde encontrou-se uma diminuição da expressão de mRNA de NPY no córtex pré-frontal de indivíduos com doença bipolar (CABERLOTTO; HURD, 1999) e uma elevação significativa na expressão de mRNA do receptor Y2 na camada cortical IV (CABERLOTTO; HURD, 2001). A taxa de suicídio em pacientes submetidos a cirurgia bariátrica para tratamento de obesidade torna-se cerca de 58% maior quando comparado a indivíduos obesos não submetidos a cirurgia (ADAMS et al., 2007) e como relatado acima os níveis de PYY (3-36) também se elevam nestes pacientes (CHAN et al., 2006), entretanto ainda não há evidências de correlação entre esses dois achados, devido a carência de estudos investigando as causas do suicídio neste grupo de pacientes.

Além disso, alterações agudas em uma série de funções cognitivas e comportamentais, algumas das quais são compatíveis com alterações observadas em modelos de esquizofrenia,

foram observadas em ratos após receberem administração periférica de PYY (3-36) (STADLBAUER; LANGHANS; MEYER, 2013; STADLBAUER et al., 2014). Estas alterações foram bloqueadas pela administração de haloperidol, um antagonista do receptor D2. Desta maneira, atribuiu-se as alterações causadas pelo PYY (3-36) à transmissão dopaminérgica, mas de forma indireta, uma vez que este peptídeo reduz a atividade neural de células gabaérgicas, consequentemente diminui a inibição de células dopaminérgicas, facilitando assim a liberação de dopamina no corpo estriado (STADLBAUER et al., 2013; STADLBAUER et al., 2014).

É importante salientar que os comportamentos acima referidos têm sido correlacionados com alterações do hipocampo, o qual, por sua vez, não só afeta, mas também modula a transmissão dopaminérgica (BAST; FELDON, 2003; ZHANG; BAST; FELDON, 2002). Além disso, o hipocampo é rico em receptores Y2 (PARKER, R.; HERZOG, 1999). Assim, é concebível que as alterações comportamentais provocados por PYY (3-36) podem ocorrer através de alterações fisiopatológicas causadas por PYY (3-36) sobre células do hipocampo. A identificação e compreensão desses efeitos se torna necessário, a fim de identificar novos mecanismos pelos quais o PYY (3-36) pode estar desempenhando sua função tanto em distúrbios neuropsiquiátricos como em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

Em resumo, todos estes estudos demonstraram que o PYY secretado ou administrado periféricamente, especialmente em sua forma clivada PYY (3-36), agonista seletivo do receptor Y2, é capaz de induzir a ativação neuronal em várias áreas cerebrais, tanto em modelo animal quanto em humanos, e a elevação dos níveis séricos deste peptídeo pode estar relacionada com alterações cognitivas e comportamentais. Estas ações do peptídeo se solidificam também devido à ampla distribuição do receptor Y2 em todo o SNC.

1.2. SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um segundo mensageiro intracelular que regula várias funções celulares como excitabilidade de membrana, exocitose, atividade sináptica e expressão gênica (SATTLER; TYMIANSKI, 2000). Dessa forma, os neurônios são células excitáveis que transferem sinais eletroquímicos de maneira altamente controlada, sendo o Ca^{2+} o fator de acoplamento entre a excitação e a propagação desses sinais. Além disso, o Ca^{2+} medeia muitas

respostas fisiológicas neuronais em resposta a estímulos químicos e elétricos, sendo a concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) determinante para a atividade neuronal. Embora o Ca^{2+} seja fundamental para manutenção da vida, um aumento exacerbado ou prolongado de sua concentração pode levar a célula a morte, como demonstrado em processos de excitotoxicidade central pelo glutamato (SATTLER; TYMIANSKI, 2000) ou periférica induzido por neurotoxinas fosfolipásicas A2 de venenos animais (RIGONI et al., 2005).

A concentração de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) no citosol de neurônios é mantida em níveis muito baixos, em torno de 100 nM, e alterações na homeostase desse íon foram relatadas por induzirem a morte neuronal por apoptose e necrose, as duas principais vias de morte celular envolvidas no processo de neurodegeneração. Foi demonstrado, utilizando culturas de células do SNC, que um aumento exacerbado na $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, com níveis entre 0,5 e 1 μM , promove a rápida indução de morte neuronal por necrose. Por outro lado, uma prolongada diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, com níveis abaixo de 60 nM, é capaz de induzir a morte neuronal por desencadear o processo de sinalização da via apoptótica na célula (FRANKLIN; JOHNSON, 1994; FRANKLIN; JOHNSON JR, 1992).

Além disso, alterações na homeostase do Ca^{2+} podem também influenciar diretamente na indução do potencial de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e da depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*). O LTP é um aumento na transmissão sináptica induzida por uma elevação breve na magnitude do Ca^{2+} pós-sináptico (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993). Quanto a LTD, a mesma se traduz por uma diminuição da força sináptica induzida por uma elevação moderada e prolongada do Ca^{2+} intracelular (LINDEN, 1994). Nesse sentido, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e seus receptores n-metil d-aspartato (NMDA), o maior indutor do influxo de Ca^{2+} para a formação da LTP. Uma diminuição na ativação dos receptores NMDA limita a indução de LTP, favorecendo a LTD (FOSTER, 2007). O aumento da susceptibilidade para LTD pode levar a perda sináptica e a uma redução do volume cerebral (FOSTER, 2006). Alterações na homeostase do Ca^{2+} também são observadas no envelhecimento normal e em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e de Parkinson (MATTSON, 2007).

Portanto, é fundamental a manutenção da homeostase do Ca^{2+} intracelular, sendo imprescindível para a viabilidade e funcionamento neuronal. Desse modo, alterações na maquinaria que controla os níveis de Ca^{2+} podem causar sérios danos à célula. A elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico pode ocorrer por duas vias: liberação do Ca^{2+} de estoques intracelulares ou através do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular. Os mecanismos que controlam as alterações

na $[Ca^{2+}]_i$ consistem de interações complexas entre três categorias de eventos: influxo de Ca^{2+} , armazenamento intracelular de Ca^{2+} e o efluxo de Ca^{2+} (SATTLER; TYMIANSKI, 2000).

O influxo de Ca^{2+} é mediado por meio de canais distribuídos na membrana plasmática neuronal. São descritos dois tipos de canais de Ca^{2+} : os voltagem dependentes (VGCC, do inglês *voltage-gated calcium channel*), que estão expressos em todos os tipos de neurônios, e os ligante-dependentes (por exemplo, os receptores ionotrópicos NMDA) (RECASENS; VIGNES, 1995). Esses dois tipos de canais são os maiores promotores do transporte do Ca^{2+} para o meio intracelular, promovendo o rápido e sustentado influxo desse íon em células neuronais. Estes canais podem ser ativados por estímulos extracelulares, neurotransmissores, neuromoduladores e por despolarização direta ou indireta (GUTIERREZ-MERINO et al., 2014). Existem diferentes tipos de VGCC designados como: canais do tipo L ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v1.4$), N ($Ca_v2.1$), P/Q ($Ca_v2.2$), R ($Ca_v2.3$) e T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$, $Ca_v3.3$). Canais do tipo Ca_v1 são primariamente regulados por fosforilação de proteínas e os Ca_v2 e Ca_v3 são regulados por proteínas G (CATTERALL, 2000). Os VGCC do tipo L são os mais relevantes para a homeostase do Ca^{2+} neuronal e estão expressos em todos os diferentes tipos de neurônios. Dos seus quatro subtipos identificados, dois são expressos no cérebro, $Ca_v1.2$ e $Ca_v1.3$, sendo que o $Ca_v1.2$ representa cerca de 80% e $Ca_v1.3$ representa entre 10 e 25% da expressão dos VGCC do tipo L no cérebro. Os tipos N, P/Q, R e T são amplamente expressos nas membranas plasmáticas pré-sinápticas e sua ativação induz a liberação de neurotransmissores nas sinapses (GUTIERREZ-MERINO et al., 2014).

O influxo de Ca^{2+} também pode ocorrer através de canais operados por estoque (SOCC, do inglês *store-operated calcium channels*), que estão amplamente distribuídos na membrana plasmática de todas as células eucarióticas. Estes canais são ativados quando ocorre a depleção dos níveis de Ca^{2+} do RE, e acredita-se que a principal função dos SOCC é a manutenção dos níveis de Ca^{2+} do RE (PAREKH; PUTNEY JR, 2005).

O Ca^{2+} é removido do citoplasma para o meio extracelular através da bomba de Ca^{2+} da membrana plasmática (PCMA, do inglês *plasma membrane calcium pump*) ou através de bombas que transportam ativamente este íon para o meio extracelular (bombas trocadoras Na^+ / Ca^{2+}). O Ca^{2+} também pode ser removido do citosol através da bomba SERCA que transporta ativamente o Ca^{2+} para reservas intracelulares, podendo ainda ser removido através de proteínas ligadoras do Ca^{2+} , como a parvalbumina e a calbidina (CLAPHAM, 1995). O armazenamento intracelular de Ca^{2+} ocorre em estoques intracelulares, tais como o RE e a

mitocôndria. As mitocôndrias representam uma reserva adicional de Ca^{2+} intracelular, podendo armazenar uma quantidade relativamente grande de Ca^{2+} e embora os transportadores mitocôndrias apresentem menor afinidade pelo Ca^{2+} que a bomba SERCA, eles também desempenham um importante papel na regulação dos níveis de Ca^{2+} citosólico (CLAPHAM, 1995). A liberação de Ca^{2+} das mitocôndrias neuronais é capaz de promover um aumento considerável de Ca^{2+} no citosol, porém esta elevação tem sido observada somente durante o processo de morte neuronal. Nesses casos ocorre uma maior permeabilidade do poro de transição mitocondrial, tornando a liberação de Ca^{2+} mitocondrial um provável mecanismo molecular que desencadeia eventos irreversíveis no processo de morte neuronal (SMAILI et al., 2000).

Existem duas classes principais de canais para a liberação de Ca^{2+} das reservas do RE em neurônios: os canais dos receptores de rianodina (RyRs) e os canais dos receptores de inositol trifosfato (IP3Rs). Os RyRs são estimulados pelo Ca^{2+} citosólico, enquanto os IP3Rs são sensíveis ao inositol trifosfato (IP3). Estes dois canais são ativados em diferentes respostas neuronais e na plasticidade sináptica (GUTIERREZ-MERINO et al., 2014).

1.2.1. Canais dos receptores de rianodina (RyRs)

Os RyRs são expressos em neurônios e células musculares e são estimulados pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico. Em neurônios, a ativação da liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR, do inglês *calcium-induced calcium release*) evocada por receptores de rianodina pode ocorrer em resposta a entrada de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes. A liberação dos neurotransmissores pode também ser modulada por meio de substâncias que afetam as reservas internas de Ca^{2+} ou por fatores que influenciam negativamente a maquinaria de liberação desde o influxo de Ca^{2+} até os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e independentemente do Ca^{2+} intracelular, influenciando diretamente as proteínas de liberação que estão envolvidas na exocitose (SCIANCALEPORE et al., 1998). Uma dessas substâncias é o vermelho de rutênio (fórmula estrutural $(\text{NH}_3)_5\text{Ru}(\text{O})\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{ORU}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_6$), que é um potente bloqueador dos RyRs. O vermelho de rutênio é um corante inorgânico sintético cristalino policatiônico utilizado inicialmente como corante em microscopia eletrônica de células e tecidos, pois reage fortemente com os fosfolípidos e ácidos graxos ligando-se a ácidos mucopolissacarídeos (MALÉCOT; BITO; ARGIBAY, 1998).

1.2.2. Canais dos receptores de inositol trifosfato (IP3Rs)

Os IP3Rs são expressos em muitos tipos celulares e são sensíveis ao inositol trifosfato (IP3). O IP3 em neurônios é gerado após a ativação da proteína $G_{q/11}$ acoplada ao GTP ligado a receptores do tipo de sete domínios transmembrana (GPCR), tais como os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) do grupo I e os receptores muscarínicos do tipo M1 de acetilcolina (mAChR-M1) ou a proteína $G_{i/o}$ acoplada ao GPCR, como os receptores mAChR-M2 e os receptores adrenérgicos α_2 . Após a ativação, estes receptores estimulam a troca da proteína G-guanina e se dissociam em duas subunidades, G_α e $G_{\beta\gamma}$. As subunidades $G_{q/11\alpha}$ e $G_{i/o\beta\gamma}$, por sua vez, estimulam a fosfolipase C (PLC) na membrana plasmática, que cliva o fosfolípido da membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em IP3 e diacilglicerol (DAG). O IP3 mobilizado difunde-se através do citosol para se ligar aos IP3Rs, enquanto que o DAG se liga a proteína quinase C (PKC) ativando-a (BANERJEE; HASAN, 2005). Existem duas classes de antagonistas de IP3Rs comercialmente disponíveis: a toxina da esponja marinha xestospongina C e o derivado do composto químico boro 2-aminoethoxydiphenyl-borate (2-APB) (HAGENSTON et al., 2009).

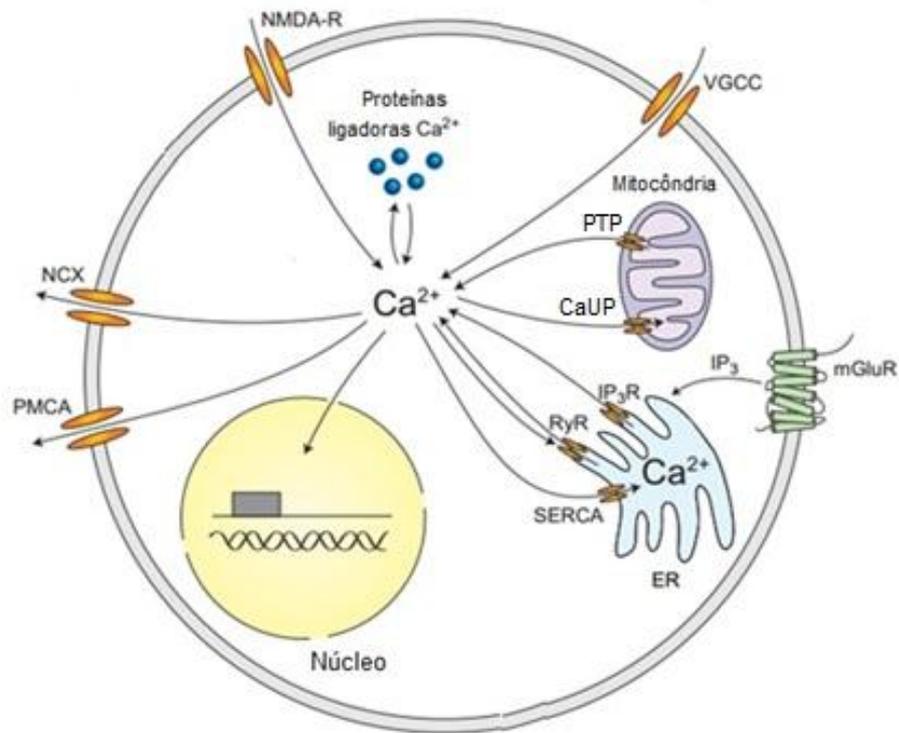


Figura 2. Ilustração dos principais sistemas de transporte que controlam a concentração de cálcio intracelular neuronal. As setas indicam a entrada de cálcio para o citoplasma e a extrusão do cálcio do citoplasma. Abreviaturas: NMDA-R, receptor de NMDA; VGCC, canais de cálcio voltagem dependentes; PMCA, bomba de cálcio da membrana plasmática, NCX, bomba trocadora de sódio/cálcio; mGluR, receptor metabotrópico de Glutamato; ER, retículo endoplasmático; SERCA, bomba de cálcio do retículo endoplasmático IP₃, inositol trifosfato; IP₃R, receptor de inositol trifosfato; RyR, receptor de rianodina; PTP, poro de transição mitocondrial; CaUP, untransportador mitocondrial de cálcio. Adaptada de Grienberger and Konnerth (GRIENBERGER; KONNERTH, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A cirurgia bariátrica revolucionou o tratamento da obesidade, sendo um método seguro e viável, e atualmente é o tratamento mais eficaz para a obesidade mórbida. Estudos de seguimento demonstram que, em geral, a cirurgia bariátrica diminui a morbidade e a mortalidade em pacientes, levando a uma significativa perda de peso e a remissão de suas comorbidades (ADAMS et al., 2007). Porém, muitos mecanismos fisiológicos envolvidos nestas alterações permanecem ainda desconhecidos. Estudos têm encontrado alterações comportamentais nestes pacientes como maior dificuldade de controlar impulsos, aumento do uso de álcool, além de taxas de suicídio mais elevadas nestes pacientes do que em indivíduos obesos não operados e indivíduos magros (ADAMS et al., 2007; PETERHÄNSEL et al., 2013). Sabe-se que existe uma comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro determinada como eixo intestino-cérebro (HOLZER et al., 2012) e baseado nisto, acredita-se que as alterações fisiológicas promovidas pela cirurgia bariátrica podem estar fortemente associadas com alterações hormonais neste eixo.

O PYY é secretado por células do sistema gastrointestinal e na última década tornou-se alvo de diversos estudos devido seu importante papel no controle do apetite e do peso corporal. Estudos demonstram que em pacientes submetidos à cirurgia bariátrica os níveis séricos deste peptídeo estão cerca de 10 vezes mais elevados (CHAN et al., 2006). Sabendo-se que o PYY atravessa a barreira hematoencefálica e possui ação no SNC, através de sua ligação aos mesmos receptores do neuropeptídeo Y torna-se importante esclarecer os mecanismos de ação do PYY sobre células do SNC.

Sendo assim, este trabalho buscou uma melhor compreensão da interação do PYY (3-36) e seus receptores em células do SNC, utilizando a cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos neonatos onde avaliou-se o envolvimento dos canais de Ca^{2+} e Na^+ voltagem dependentes bem como a influência da bomba SERCA e dos receptores de IP3 e de rianodina presentes no RE nas respostas induzidas pelo PYY (3-36) sobre a modulação do influxo de Ca^{2+} .

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade do PYY (3-36) no influxo de cálcio em células cultivadas do hipocampo de ratos neonatos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os diferentes tipos celulares presentes na cultura primária de hipocampo, através de imunocitoquímica, utilizando anticorpos para a marcação de neurônios e células da glia de ratos.

- Padronizar a dose do PYY (3-36) para utilizar nos experimentos de análise do influxo de cálcio nas culturas de células hipocampais.

- Discriminar os mecanismos celulares do cálcio frente à ação do PYY (3-36) por meio da utilização de diferentes moduladores das oscilações do cálcio intracelular, como:

- Remoção do Ca^{2+} do meio extracelular;
- Inibição dos canais de Ca^{2+} e Na^{+} voltagem dependentes;
- Inibição da bomba SERCA;
- Inibição dos receptores de rianodina;
- Inibição dos receptores de inositol trifosfato.

4. METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Neurociências do Instituto do Cérebro da PUCRS, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS e Comissão de Ética no Uso de Animais sob protocolo número 13/00340, conforme anexo A.

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar neonatos para a cultura primária de células do hipocampo. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS, e mantidos sob iluminação e temperatura controlada (alternando ciclo claro e escuro de 12 horas e em temperatura de 22°C), recebendo água e ração à vontade. Foram utilizadas cinco ninhadas de ratas Wistar diferentes (sendo utilizados quatro ratos neonatos de cada ninhada, somando um total de 20 ratos neonatos) para o desenvolvimento deste estudo. A eutanásia dos animais ocorreu ao 2º dia pós-nascimento para a obtenção dos hipocampos. Foi realizado com o mínimo de dor, medo e angústia por deslocamento cervical seguido de decapitação devido à rapidez do procedimento e por ser a forma mais indicada para eutanásia de animais desta idade.

4.3. CULTURA DE CÉLULAS

A cultura primária de células do hipocampo foi realizada seguindo o protocolo previamente descrito por Buschell et. al (BUSHELL et al., 2006) com pequenas alterações. No 2º dia pós-nascimento, os ratos foram eutanasiados. Os cérebros foram então cuidadosamente removidos em ambiente descontaminado (capela de fluxo laminar) e em seguida foram dissecados os hipocampos dos dois hemisférios com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas. Os hipocampos foram triturados delicadamente com uma lâmina de bisturi e colocados em um tubo plástico cônico de 15 mL. Para a digestão do tecido os hipocampos foram incubados com 5 mL de tripsina 0,25% durante 20 minutos em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂. No meio deste período de incubação os tubos foram

homogeneizados por inversão. Após foram centrifugados a $120 \times g$, durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio neurobasal suplementado com B27 (2 mL/dL) e glutamina 0,5 mM (1,25 mL/dL). A viabilidade e densidade celular foram avaliadas pelo método de exclusão com azul de tripan em câmara de Neubauer. As células foram semeadas em lamínulas de 13 mm, em uma concentração de 10^6 células/mL. As lamínulas foram tratadas com 1 mg/ml de poli-L-lisina, incubadas durante uma hora e lavadas com ddH₂O duas vezes. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. No 5º dia de cultura foi adicionado 10 µM de citosina-β-D-arabinofuranoside (AraC) para inibir a proliferação de células da glia.

4.4. IMUNOCITOQUÍMICA POR FLUORESCÊNCIA

No 11º dia de cultura, o meio foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após, foram lavadas com tampão fosfato-salina de Dulbecco (DPBS, do inglês *Dulbecco's phosphate buffered saline*) 3 vezes por 5 minutos cada e adicionou-se a solução de bloqueio composta de 1% albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*), 5% soro fetal bovino (FBS, do inglês *fetal bovine serum*), 0.2% de TritonX em DPBS) durante uma hora em temperatura ambiente. Após, foi adicionado o anticorpo primário proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês *Glial fibrillary acidic protein*) diluído na solução de bloqueio, na diluição 1:100, e incubado *over night* a 4°C. A solução foi removida e as células foram lavadas com DPBS, 3 vezes por 5 minutos cada, então adicionou-se o anticorpo secundário, Alexa Fluor 633, diluído na solução de bloqueio, na diluição 1:400 e incubou-se por 1 hora no escuro em temperatura ambiente. Foi removida a solução e lavado com DPBS, 3 vezes por 5 minutos cada. Após, foi adicionado o anticorpo Fluoropan Neuronal Marker conjugado com *fluorescein isothiocyanate* (FITC), diluído na solução de bloqueio, na diluição 1:100 e incubado por 2 horas no escuro. Foi removida a solução e as células foram lavadas com DPBS, 3 vezes por 5 minutos cada. Por fim, foi feita a montagem da lamínula sobre a lâmina adicionando 20 µL de solução de montagem contendo 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,01%, para a marcação nuclear e incubado por 20 minutos no escuro em temperatura ambiente. As células foram analisadas utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter com lente objetiva de 40X.

4.5. IMAGEM DO CÁLCIO (CA²⁺)

Os experimentos de imagem do Ca²⁺ foram realizados seguindo o protocolo previamente descrito por Meucci et al. (MEUCCI et al., 1998) com pequenas modificações. As células hipocâmpais encontravam-se viáveis para este experimento a partir do 11º dia até o 13º dia de cultura. Antes do experimento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com solução de HEPES tampão salina (HBS, do inglês *HEPES-buffered saline*) composta por (em mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES e 10 D-Glicose, pH 7.4 (ajustado pH com solução NaOH 10M) e osmolaridade 308-312 mOsm (ajustado osmolaridade com sucrose). Após, foi adicionado a cultura celular 5 µM de Fluo-4 AM (marcador do cálcio) diluído em 1,5 mL de HBS e incubado durante 45 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após, foi removido a solução e as células foram lavadas 3 vezes com HBS e mantidas com 2 ml de HBS no escuro em temperatura ambiente. Durante os experimentos as células eram perfundidas continuamente com solução de HBS em fluxo de 1-2 mL/minuto à temperatura ambiente. Todas as drogas testadas foram adicionadas nas células via perfusão. Todos os experimentos com imagem do cálcio foram realizados em um sistema de imagem digital de epifluorescência (WinFluor, J. Dempster, Universidade de Strathclyde, Escócia), as imagens foram adquiridas pela câmera digital Hamamatsu ORCA-ER adaptada ao microscópio invertido Nikon Eclipse TE 2000 usando objetiva de 10X. Foi utilizado o filtro *Blue Excitation Filter Block B-2E/C* com comprimento de onda de excitação de 493 nm e emissão de 513 nm. Os dados foram calculados de acordo com as alterações na taxa de fluorescência e expressa como $\Delta F/F_0$, onde F_0 é a taxa de fluorescência basal, obtida durante a fase de registro do controle e o ΔF é o pico máximo de fluorescência obtido pela saturação de cálcio. As células foram avaliadas individualmente. A figura 3A mostra o sistema adaptado para a captura das imagens e a figura 3B mostra a análise do influxo de cálcio nas células.

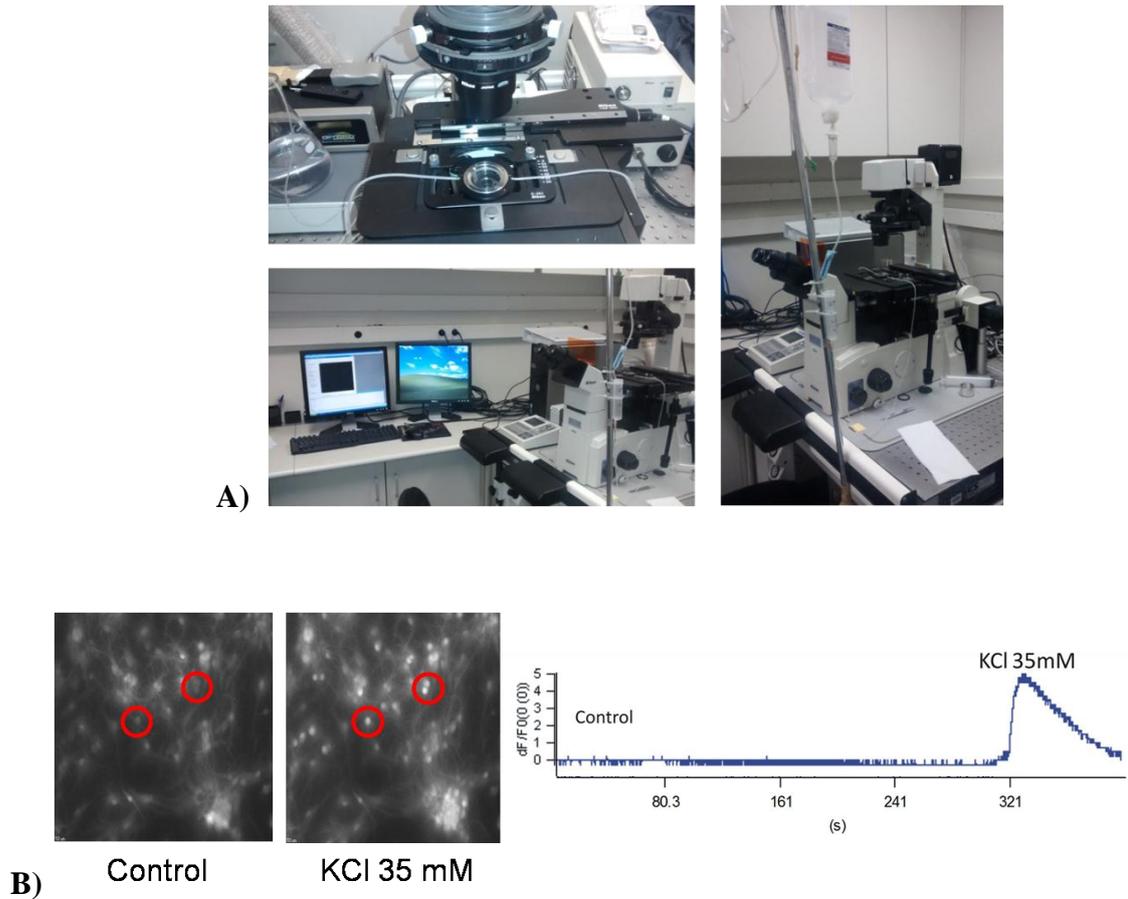


Figura 3. Sistema para imagem do cálcio. **A)** Microscópio Nikon Eclipse TE 2000 adaptado com o sistema de imagem digital de epifluorescência (WinFluor, J. Dempster, Universidade de Strathclyde, Escócia). **B)** Experimento com a cultura de células do hipocampo de ratos marcadas com o Fluo-4, objetiva de 10X, e o gráfico demonstrando a taxa de fluorescência expressa como $\Delta F/F_0$ em resposta a administração do KCl na concentração de 35 mM.

4.6. PEPTÍDEO YY (3-36)

O PYY (3-36) foi adicionado nas células por meio do sistema de perfusão contínuo e diluído em solução HBS, em diferentes concentrações, sendo elas: 1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM e 1 μ M. A dose escolhida como padrão para os demais experimentos foi de 10 nM, por ser uma concentração relativamente baixa e que demonstrou atividade excitatória sobre o Ca^{2+} .

4.7. ENSAIOS PARA A DETERMINAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DO PYY (3-36)

Todas as drogas testadas foram diluídas em solução HBS e adicionadas via perfusão em fluxo contínuo, seguindo o protocolo de registro de: 2 minutos de controle (com perfusão da solução HBS), 2 minutos com a droga, 2 minutos com a droga e o PYY (3-36), 2 minutos de lavagem com a solução HBS e ao final de cada protocolo foi adicionado KCl 35 mM por 2 minutos. Uma vez que é esperado aumento do influxo de Ca^{2+} para o citoplasma das células intactas em resposta a alta concentração de K^+ extracelular, assumiu-se que as elevações na fluorescência de Ca^{2+} mediante a infusão de KCl a certeza de que as células eram viáveis e que o Fluo-4 estava funcionando corretamente como um marcador sensível ao Ca^{2+} para detectar as variações na concentração de Ca^{2+} durante os experimentos.

Estão listados a seguir os ensaios realizados:

4.7.1. Remoção do Ca^{2+} do meio extracelular

Sabendo-se que a elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular pode resultar do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular ou da liberação de Ca^{2+} armazenado em compartimentos intracelulares, primeiramente avaliamos se a modulação do Ca^{2+} pela ação do PYY (3-36) era dependente de Ca^{2+} extracelular. Então, neste ensaio não adicionamos o Ca^{2+} na solução extracelular, além disso, quelamos o Ca^{2+} do meio externo com 1 mM de EGTA e bloqueamos os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, com 10 μM de nifedipina, para averiguar se a ação do PYY (3-36) era dependente de Ca^{2+} do meio extracelular. A solução estoque de nifedipina foi diluída em DMSO (dimethyl sulfoxide) a 0,1%, esta concentração de DMSO não altera os níveis de Ca^{2+} ou a viabilidade celular.

4.7.2. Inibição dos canais de Na^+

A tetrodotoxina (TTX) é um antagonista seletivo dos canais de Na^+ presentes nas membranas de células excitáveis, seletivamente impedindo o influxo de Na^+ , bloqueando

assim efetivamente os potenciais de ação de neurônios. Este experimento foi importante para avaliar se a ação do PYY (3-36) poderia ser modulada pelos canais de Na^+ . A solução estoque de TTX foi diluída na solução em H_2O e a concentração usada nos experimentos foi de $1 \mu\text{M}$.

4.7.3. Inibição da bomba SERCA

A thapsigargina é um antagonista específico da bomba do retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA), ela bloqueia efetivamente a atividade da SERCA, promovendo assim a depleção dos estoques de Ca^{2+} do RE, devido impedir a captação de Ca^{2+} para repor os estoques do RE. Este experimento avaliou se a ação do PYY (3-36) é modulada pela atividade da bomba SERCA. A solução estoque de thapsigargina foi diluída em DMSO na concentração de 0,1% e a concentração usada nos experimentos foi de $2 \mu\text{M}$.

4.7.4. Inibição dos receptores de rianodina

O vermelho de rutênio é um bloqueador específico dos receptores de rianodina (RyRs) do RE. Este experimento avaliou se a ação do PYY (3-36) é modulada pela atividade dos RyRs. A solução estoque de vermelho de rutênio foi diluída em H_2O e a concentração usada nos experimentos foi de $30 \mu\text{M}$.

4.7.5. Inibição dos receptores de inositol trifosfato

O 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) é um bloqueador específico dos receptores de inositol trifosfato (IP3Rs) do RE. Este experimento avaliou se a ação do PYY (3-36) é dependente da atividade dos IP3Rs. A solução estoque de thapsigargina foi diluída em DMSO na concentração de 0,1% e a concentração usada nos experimentos foi de $100 \mu\text{M}$.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em células provenientes de cinco culturas individuais obtidas de diferentes animais, onde se avaliou o pico de fluorescência expresso como $\Delta F/F_0$. Todos os resultados foram expressos como a média \pm EPM, onde n indica o número de células avaliadas. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ou por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, conforme apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

5.1. CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DO HIPOCAMPO

As culturas de células obtidas do hipocampo de ratos Wistar neonatos apresentavam-se aderidas à lamínula desde o primeiro dia em cultura, com início dos processos neuronais já na primeira semana. As culturas utilizadas neste trabalho caracterizavam-se basicamente por dois tipos celulares: neurônios e células astrocítárias (Figura 4). Os astrócitos mesmo com a utilização do inibidor AraC, encontravam-se em maior número do que os neurônios. Para os experimentos de influxo de cálcio as células encontravam-se viáveis e em ótimas condições durante o 11^o, 12^o e 13^o dia *in vitro*.

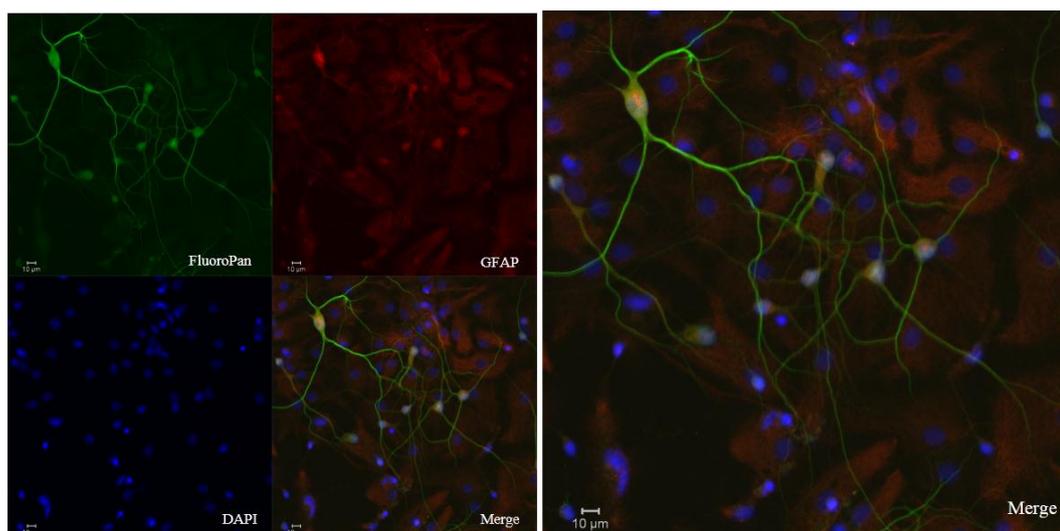
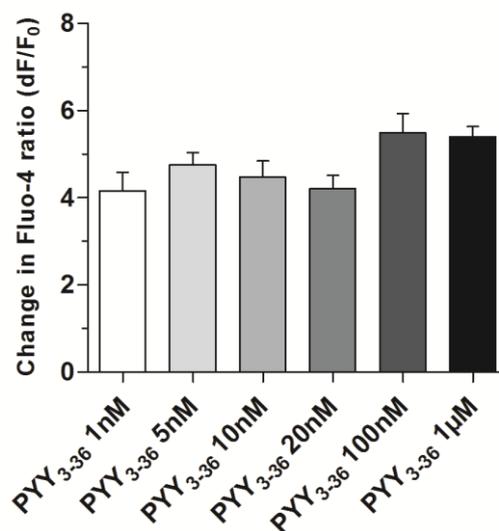


Figura 4. Cultura primária de células do hipocampo. As células foram identificadas por imunofluorescência através da utilização dos anticorpos específicos: Fluoropan (verde) marcador neuronal (1:100), GFAP (vermelho) marcador de astrócitos (1:100) e DAPI (azul) marcador nuclear. As células foram analisadas utilizando microscópio confocal Zeiss LSM-5 exciter com lente objetiva de 40X.

5.2. EFEITO DO PYY (3-36) NA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} INTRACELULAR DAS CÉLULAS HIPOCAMPAS

As células foram tratadas com diferentes concentrações do PYY (3-36) (1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM e 1 µM). O PYY (3-36) foi diluído em solução HBS e administrado por meio do sistema de perfusão contínua. Observou-se aumento da concentração de Ca^{2+}

intracelular em todas as doses testadas. Nas concentrações mais baixas (1 nM, 5 nM, 10 nM e 20 nM) houve aumento do influxo de cálcio semelhante entre as doses, sem diferença significativa entre elas (4.2 ± 0.43 , $n = 26$; 4.8 ± 0.29 , $n = 20$; 4.5 ± 0.37 , $n = 18$; 4.2 ± 0.31 , $n = 21$; respectivamente). Nas concentrações mais elevadas (100 nM e 1 μ M) também ocorreu aumento do influxo de cálcio sem diferença significativa entre elas (5.5 ± 0.44 , $n = 21$; 5.4 ± 1.1 , $n = 20$) ou com as doses menores, entretanto estas duas concentrações apresentaram tendência para um maior aumento da concentração do Ca^{2+} intracelular (Figura 5).



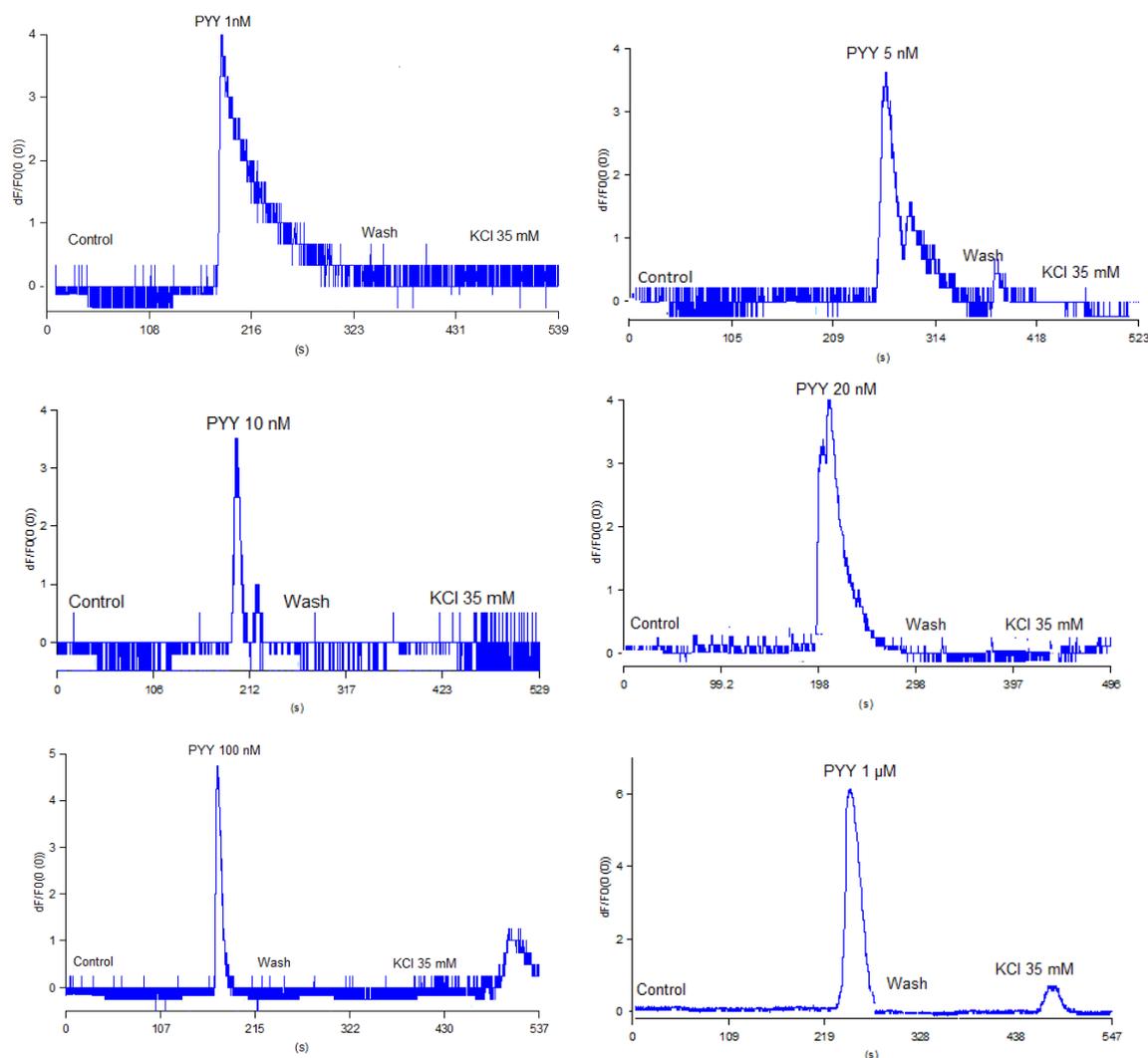


Figura 5. Efeito do PYY (3-36) sobre o influxo de Ca^{2+} nas células hipocâmpais. As células da cultura de hipocampo foram expostas a diferentes concentrações do PYY (3-36) (1 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 100 nM e 1 μM) em perfusão com fluxo contínuo. Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e comparados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

5.3. EFEITO DO PYY (3-36) NA CONCENTRAÇÃO DE Ca^{2+} CITOSÓLICO NAS CÉLULAS HIPOCÂMPAIS NA AUSÊNCIA DE Ca^{2+} NO MEIO EXTRACELULAR

As células hipocâmpais foram perfundidas com solução HBS sem adição de Ca^{2+} , com 1 mM de EGTA para quelar o Ca^{2+} do meio extracelular e com 10 μM de nifedipina para bloquear os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L, seguidas por exposição ao PYY (3-36) na concentração de 10 nM. Estas células apresentaram aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico (5.3 ± 0.32 , $n = 24$) e esta elevação não foi significativamente diferente em comparação com as células do grupo controle que foram perfundidas com a solução HBS com Ca^{2+} e expostas a mesma concentração do peptídeo (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) (Figura 6).

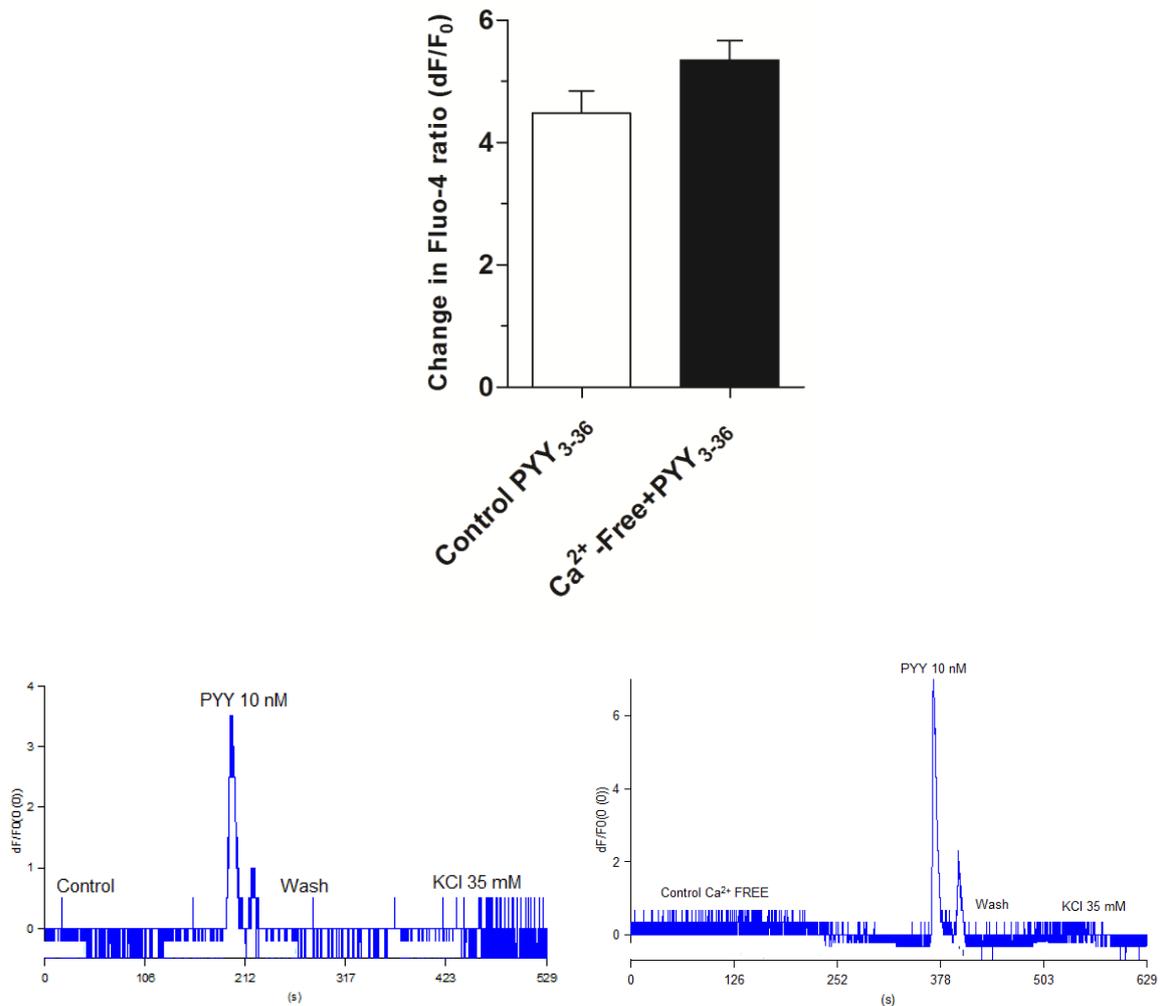


Figura 6. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular. As células da cultura de hipocampo foram expostas a 10 nM do PYY (3-36) em perfusão com fluxo contínuo de solução tampão sem Ca^{2+} , com 1 mM de EGTA e com 10 μM de nifedipina. Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e comparados pelo teste *t* de Student.

5.4. EFEITO DO PYY (3-36) QUANDO OS CANAIS DE Na^+ VOLTAGEM DEPENDENTES ESTÃO BLOQUEADOS

As células hipocâmpais foram tratadas com 1 μM de TTX para bloquear os canais de Na^+ , seguidas da adição de 10 nM do PYY (3-36) administrados por meio do sistema de perfusão contínua. Estas células apresentaram uma $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico significativamente aumentada (6.2 ± 0.39 , $n = 37$) (** $P < 0.01$) quando foram comparadas com as células do grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) que foram perfundidas com a solução HBS e expostas a mesma concentração do peptídeo (Figura 7).

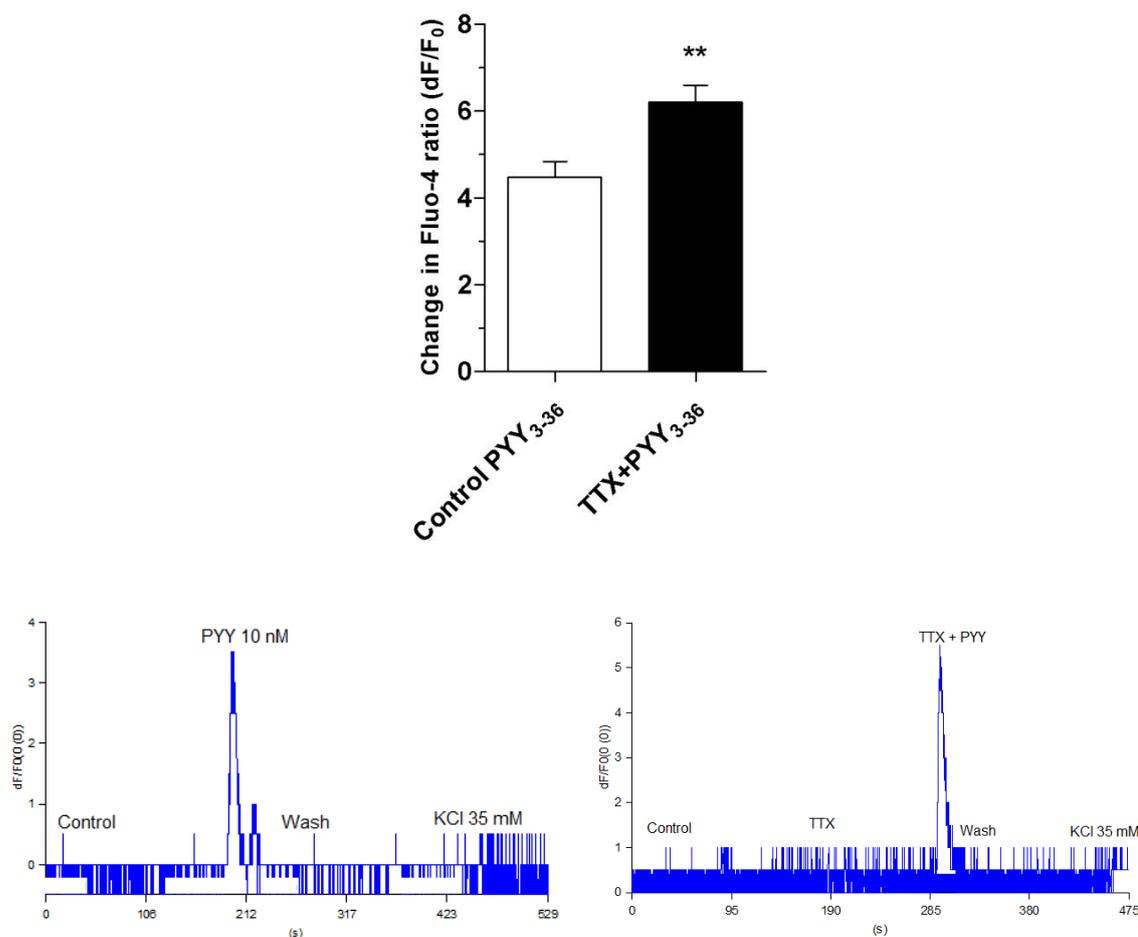


Figura 7. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando os canais de Na^+ voltagem dependentes estão bloqueados. As células da cultura de hipocampo foram expostas a $1 \mu\text{M}$ de TTX, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) em perfusão com fluxo contínuo. Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e comparados pelo teste *t* de Student. **** $P < 0,01$.**

5.5. EFEITO DO PYY (3-36) EM PRESENÇA DE BLOQUEADORES DA BOMBA SERCA

As células hipocâmpais foram tratadas com $2 \mu\text{M}$ de tapsigargina, um bloqueador da bomba SERCA, seguido pela adição de 10 nM de PYY (3-36) ou foram tratadas com $2 \mu\text{M}$ de tapsigargina juntamente com $1 \mu\text{M}$ de TTX, seguido pela adição de 10 nM do PYY (3-36), todos administrados em perfusão contínua. As células tratadas com tapsigargina apresentaram influxo de Ca^{2+} significativamente maior (6.1 ± 0.31 , $n = 50$) quando comparadas tanto ao grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) (** $P < 0,01$) bem como quanto ao grupo de células tratadas com tapsigargina e TTX (3.2 ± 0.13 , $n = 29$) (** $P < 0,001$). Também houve diferença significativa entre o grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) e o grupo tratado com

tapsigargina e TTX (3.2 ± 0.13 , $n = 29$) (* $P < 0,05$), onde o grupo tratado com as duas drogas apresentou influxo de Ca^{2+} menor do que o controle (Figura 8).

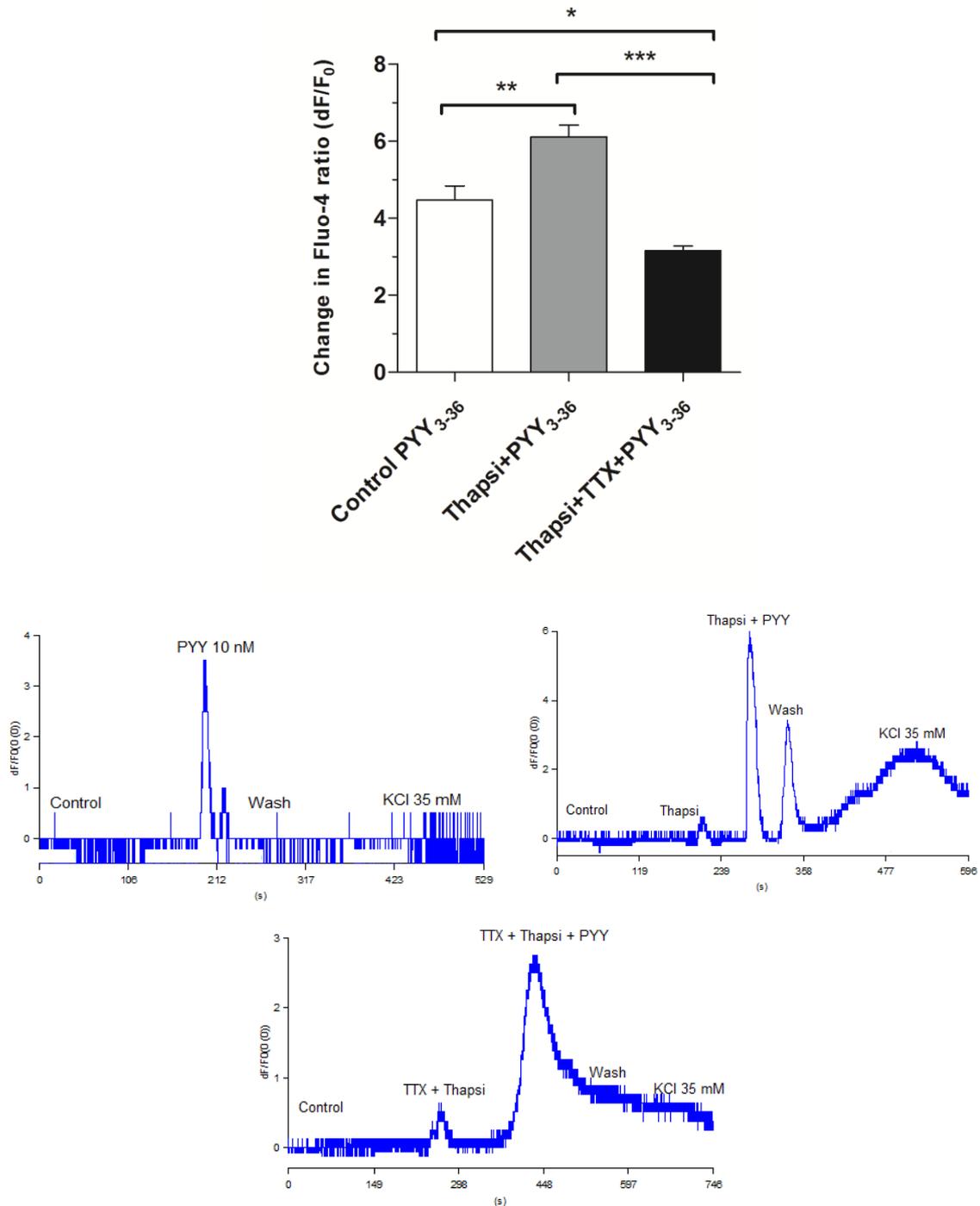
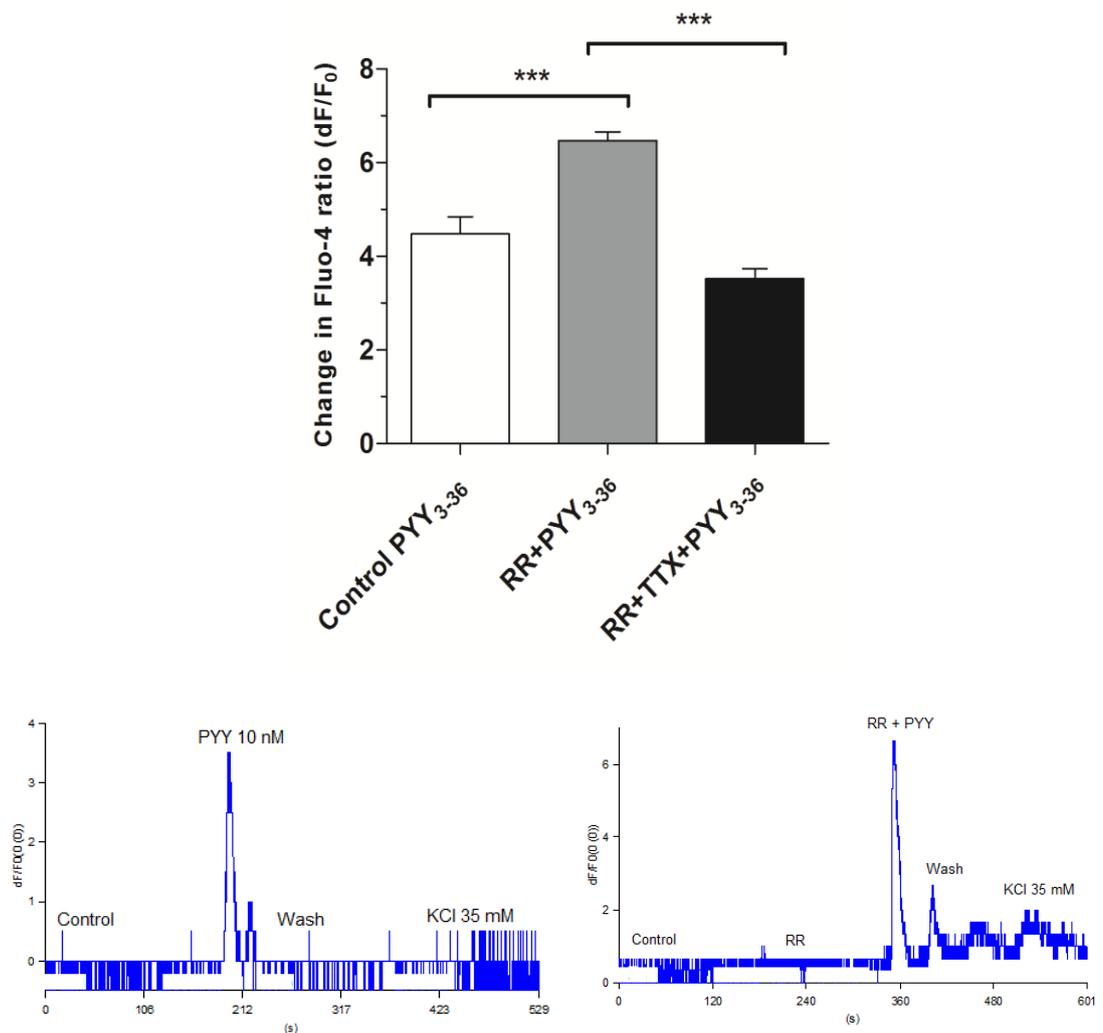


Figura 8. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando a bomba SERCA está bloqueada. As células da cultura de hipocampo foram expostas a 2 μ M de tapsigargina, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) ou as células eram expostas a 2 μ M de tapsigargina juntamente com 1 μ M de TTX, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) em perfusão com fluxo contínuo. Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e comparados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

5.6. EFEITO DO PYY (3-36) NA PRESENÇA DE BLOQUEADORES DE RECEPTORES DE RIANODINA

As células hipocampais foram tratadas com 30 μM de vermelho de rutênio que é um bloqueador dos RyRs, seguido pela adição de 10 nM de PYY (3-36), ou as células foram tratadas com 30 μM de vermelho de rutênio juntamente com 1 μM de TTX, seguidos pela adição de 10 nM de PYY (3-36), todos administrados em perfusão contínua. As células tratadas com vermelho de rutênio apresentaram um influxo de Ca^{2+} significativamente maior (6.5 ± 0.19 , $n = 63$) quando comparadas tanto ao grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) (** $P < 0,001$) quanto ao grupo de células tratadas com vermelho de rutênio e TTX (3.5 ± 0.21 , $n = 23$) (** $P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com as duas drogas simultaneamente (Figura 9).



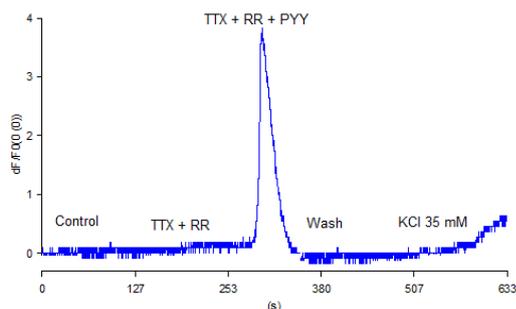


Figura 9. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca^{2+} citosólico nas células hipocâmpais quando os RyRs bloqueados. As células da cultura de hipocampo foram expostas a $30 \mu\text{M}$ de vermelho de rutênio, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) ou as células eram expostas a $30 \mu\text{M}$ de vermelho de rutênio juntamente com $1 \mu\text{M}$ de TTX, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) em perfusão com fluxo contínuo. Os resultados foram expressos como a média \pm EPM e comparados por ANOVA de uma via seguido por teste de Tukey. *** $P < 0,001$.

5.7. EFEITO DO PYY (3-36) QUANDO OS RECEPTORES DE INOSITOL TRIFOSFATO ESTÃO BLOQUEADOS

As células hipocâmpais foram tratadas com $100 \mu\text{M}$ de 2-APB, que é um bloqueador dos IP3Rs, seguido pela adição de 10 nM de PYY (3-36) ou foram tratadas com $100 \mu\text{M}$ de 2-APB juntamente com $1 \mu\text{M}$ de TTX seguidos pela adição de 10 nM PYY (3-36), todos administrados em perfusão contínua. As células tratadas somente com o 2-APB apresentaram um influxo de Ca^{2+} significativamente menor (3.1 ± 0.25 , $n = 35$) quando comparadas ao grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) (* $P < 0,05$). O mesmo ocorreu comparando as células tratadas com o 2-APB com aquelas em que também se adicionou o TTX (6.7 ± 0.46 , $n = 24$) (*** $P < 0,001$). Houve diferença significativa entre o grupo controle (4.5 ± 0.37 , $n = 18$) e o grupo tratado com 2-APB e TTX (6.3 ± 0.46 , $n = 24$) (*** $P < 0,001$), onde o grupo tratado com as duas drogas apresentou influxo de Ca^{2+} maior do que o grupo controle (Figura 10).

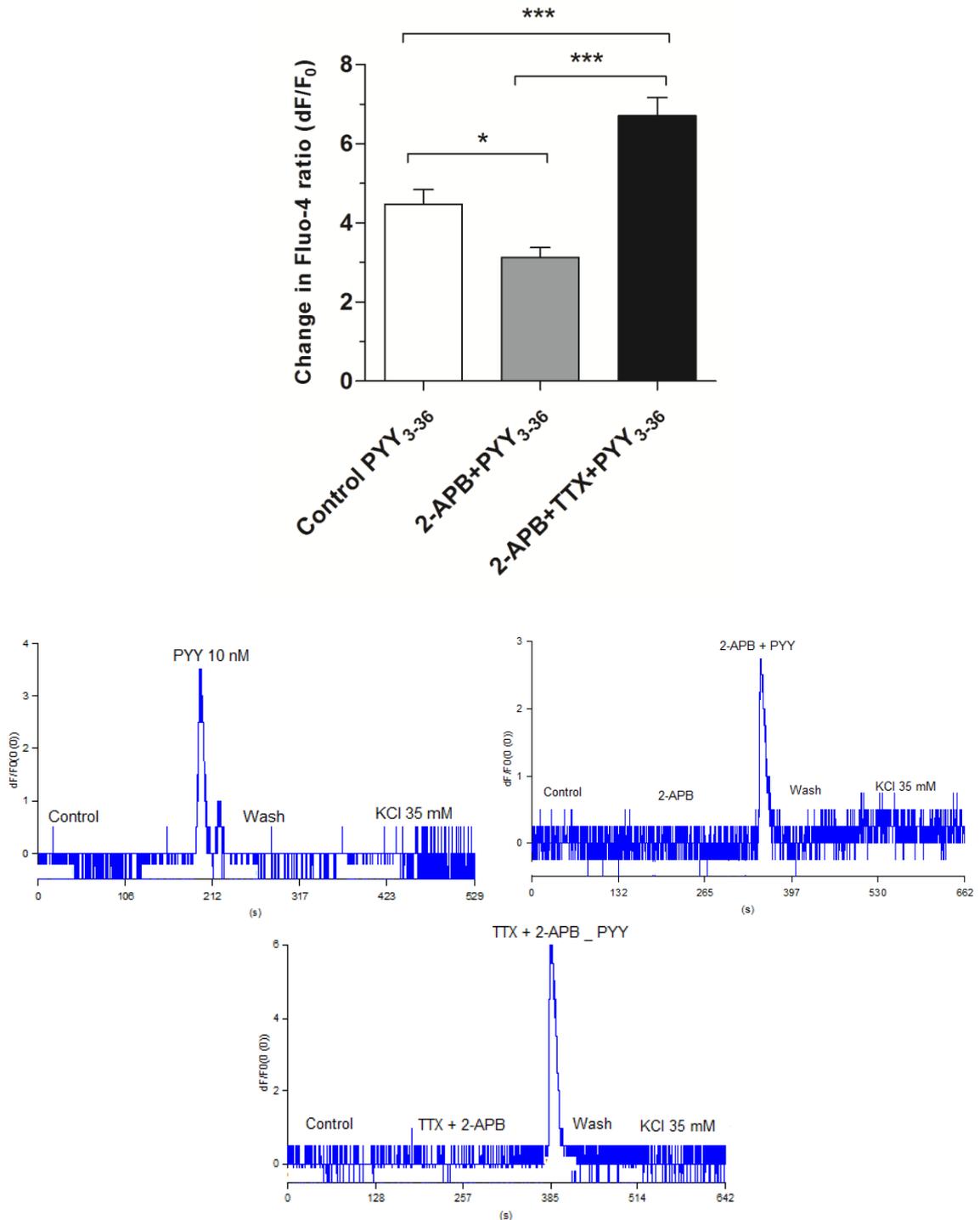


Figura 10. Efeito do PYY (3-36) sobre a concentração de Ca²⁺ citosólico nas células hipocâmpais quando os IP3Rs estão bloqueados. As células da cultura de hipocampo foram expostas a 100 μM de 2-APB, seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) ou as células eram expostas a 100 μM de 2-APB juntamente com 1 μM de TTX seguido por exposição a 10 nM do PYY (3-36) em perfusão com fluxo contínuo. Os resultados foram expressos como a média ± EPM e comparados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey. *P < 0,05; ***P < 0,001.

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi investigada a interação funcional entre o PYY (3-36) e os seus receptores utilizando a cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos Wistar neonatos. Além disso, avaliou-se o envolvimento dos canais de Ca^{2+} e de Na^+ dependentes de voltagem bem como a influência da bomba Ca^{2+} -ATPase (SERCA) presente no RE, e dos receptores de IP3 e de rianodina sobre as respostas induzidas pelo PYY (3-36) sobre o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico.

Inicialmente realizou-se o ensaio de concentração-resposta do peptídeo em cultura de células mistas de hipocampo, onde se observou uma atividade variável do PYY (3-36), mas estatisticamente não significativa, demonstrando que sua ação não foi dose-dependente. Esse aumento variável na resposta do peptídeo provavelmente se deve à variedade de tipos celulares presentes em nossas condições experimentais, as quais demonstraram conter um grande número de células gliais (astrócitos) e neurônios em menor número, em concordância com Bushell e cols. (2006) (BUSHELL et al., 2006). A dose-padrão escolhida para os demais ensaios foi uma concentração relativamente baixa (10 nM) em comparação a outros estudos *in vitro* realizados com o PYY (3-36) (SILVA et al., 2001). Em nossas condições experimentais, os baixos níveis de secreção do peptídeo no organismo, nortearam a escolha de doses baixas para o estudo dos mecanismos do cálcio. Por exemplo, em indivíduos magros os níveis pós-prandiais médios do PYY (3-36) são de 37.0 ± 11.6 pg/mL. Em indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica, onde se sabe que os níveis pós-prandiais deste peptídeo se elevam cerca de quase 10 vezes, a média da concentração é de 303.0 ± 37.0 pg/mL (CHAN et al., 2006).

Os ensaios farmacológicos para a investigação da relação de diferentes canais iônicos e receptores intracelulares na atividade do peptídeo revelaram alterações significativas sob sítios celulares específicos às respostas moduladoras do Ca^{2+} evocadas pelo PYY (3-36). Dessa forma, em ensaios com PYY (3-36) em que as células foram banhadas com solução extracelular sem Ca^{2+} , em presença do EGTA e da nifedipina houve um aumento da fluorescência do Ca^{2+} citosólico, que é nesse caso, independente da ativação das vias do Ca^{2+} extracelular. Com relação a esse último ensaio, a exacerbação da liberação do Ca^{2+} possivelmente foi decorrente da mobilização dos estoques desse íon de reservas intracelulares (GUTIERREZ-MERINO et al., 2014). Nesse sentido, esse dado também sugere uma

atividade exclusiva do peptídeo sobre receptores intracelulares, que seria independente de uma atividade sobre os canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L da membrana plasmática. Estudos em células cultivadas do hipocampo têm demonstrado a atividade de terminais pré-sinápticos independentemente de alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (MALGAROLI; TSIEN, 1992). Além disso, já foi demonstrado que na ausência de Ca^{2+} no meio extracelular ocorre à depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelulares (SAVIĆ; SCIANCALEPORE, 1998), o que explicaria a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ que foi evidenciada em nossas condições experimentais na ausência de Ca^{2+} extracelular.

Em nossas condições experimentais, quando a TTX, uma toxina que inibe seletivamente os canais de Na^+ voltagem dependente, foi incubada previamente ao peptídeo, houve um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico nas células hipocâmpais. Esse dado demonstra que a ação do PYY (3-36) foi independente do influxo de Na^+ , sugerindo que a sua atividade sobre as células hipocâmpais não induz ou independe da despolarização celular. Além disso, o fato da despolarização neuronal estar impedida pela ação da TTX reforça a possibilidade do peptídeo induzir uma hiperpolarização celular, reforçando o papel inibitório do PYY (3-36) no SNC (STADLBAUER et al., 2014). De fato, esse efeito corrobora uma atividade pré-sináptica inibitória do peptídeo sobre neurônios gabaérgicos (ACUNA-GOYCOLEA; VAN DEN POL, 2005) e glutamatérgicos do hipocampo de ratos, pela ativação de receptores Y2 (GREBER et al., 1994).

Os ensaios em presença da tapsigargina, um inibidor da bomba SERCA, resultaram em elevação da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico pela ação do PYY (3-36) sobre as células do hipocampo. Devido a tapsigargina causar a depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelulares (THASTRUP et al., 1990) sugere-se que o aumento do Ca^{2+} na presença dessa droga, ocorra pela ativação dos SOCC, que são canais ativados na vigência da depleção dos estoques de Ca^{2+} do RE (PAREKH; PUTNEY JR, 2005). Este último dado, evidência um efeito do peptídeo sobre a mobilização do Ca^{2+} por meio de uma ação sobre os receptores intracelulares do RE.

Por outro lado, quando a TTX e a tapsigargina foram incubadas previamente a adição do peptídeo nas células hipocâmpais, houve inibição do efeito da tapsigargina, que resultou em significativa diminuição na fluorescência do Ca^{2+} . Embora a tapsigargina ative os SOCC, estes canais parecem não serem ativados em presença de um inibidor de canais de Na^+ voltagem dependente. Ensaios futuros deverão concentrar-se na investigação da participação dos canais de Na^+ dependentes voltagem, nessa possível ação dos SOCC em células excitáveis do hipocampo. Nesse contexto, o fato de ter sido demonstrado que os SOCC são permeáveis

aos íons Na^+ além do Ca^{2+} (ARNON; HAMLIN; BLAUSTEIN, 2000), poderia justificar uma ação da TTX sobre esses canais, o que resultaria em uma consequente diminuição nos níveis de Ca^{2+} citosólico em presença da tapsigargina e TTX.

Quando utilizamos o vermelho de rutênio, um bloqueador dos RyRs, observou-se uma resposta semelhante à da tapsigargina isolada, onde ocorreu um aumento exacerbado da fluorescência do Ca^{2+} . Esse efeito também sugere a ativação dos SOCC. Além disso, inicialmente esse dado poderia sugerir uma ativação dos VGCC do tipo L, devido ao acoplamento funcional entre esses canais e os RyRs (CHAVIS et al., 1996). No entanto, esta via de ação não parece estar envolvida devido a inibição da ativação dos VGCC do tipo L em presença de bloqueadores dos RyRs (CHAVIS et al., 1996). E, igualmente aos ensaios com tapsigargina, quando utilizou-se a TTX juntamente com vermelho de rutênio, o efeito promovido pelo vermelho de rutênio foi inativado, ocorrendo uma significativa diminuição na $[\text{Ca}^{2+}]$ do citosol das células do hipocampo, ressaltando que os canais SOCC parecem não serem ativados em presença de um inibidor de canais de Na^+ voltagem dependente.

Por fim, o tratamento das células hipocámpais com 2-APB, um antagonista dos IP3R, inibiu o aumento da fluorescência do Ca^{2+} induzido pelo PYY (3-36). A contraposição desse efeito pela TTX, sugere que pelo menos em parte, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico evocado pelo PYY (3-36) em cultura de células hipocámpais, esteja associado à cascata de sinalização do IP3. Como dito anteriormente na parte introdutória desse trabalho, em neurônios, o IP3 é gerado após a ativação da proteína $G_{q/11}$ ou $G_{i/o}$ acoplada aos receptores do tipo de sete domínios transmembrana ligado a GPCR. Após a ativação, estes receptores estimulam a troca da proteína G guanina e a sua dissociação em duas subunidades G_α e G_β . As subunidades $G_{q/11\alpha}$ e $G_{i/o\beta\gamma}$, por sua vez, estimulam a PLC na membrana plasmática, que cliva o fosfolípido da membrana, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, em IP3 e DAG. O IP3 mobilizado difunde-se através do citosol para se ligar aos IP3Rs provocando a propagação de ondas internas de Ca^{2+} liberado do RE (BANERJEE; HASAN, 2005).

Nossos resultados sugerem que o efeito do PYY (3-36) sobre as células do hipocampo, além de complexo, envolva a cascata de sinalização do IP3. Devido ao fato do DAG permanecer retido na membrana plasmática para que haja a ativação da PLC (BANERJEE; HASAN, 2005), sugere-se que o IP3 esteja mais relacionado ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico observado em nossas condições experimentais, já que o mesmo tem a capacidade de se difundir pelo citosol celular.

Assim, as alterações fisiológicas e patológicas induzidas pelo PYY sobre o SNC, onde a sua concentração encontra-se especialmente alterada em doenças psiquiátricas (DECRESSAC; BARKER, 2012; HOLZER et al., 2012) e neurodegenerativas (DECRESSAC; BARKER, 2012), teriam uma forte relação com a modulação da $[Ca^{2+}]_i$. Por exemplo, alterações na homeostase do Ca^{2+} são observadas no envelhecimento normal e também em doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e doença de Parkinson. Nesse contexto, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e os receptores NMDA a maior fonte de entrada do Ca^{2+} para a indução do potencial de longa duração (LTP). Uma diminuição na ativação dos receptores NMDA limita a indução de LTP (FOSTER, 2007). O PYY (3-36), devido a sua ação inibitória sobre neurônios glutamatérgicos, inibe a liberação de glutamato (GREBER et al., 1994) e conseqüentemente diminui a ativação dos receptores NMDA. Esse efêmero efeito poderia estar interferindo com a LTP, favorecendo a indução da LTD (FOSTER, 2007). Não obstante, o aumento da susceptibilidade para a LTD poderia promover alterações morfológicas cerebrais como à perda sináptica e a redução do volume cerebral (FOSTER, 2006).

Portanto, um aumento exacerbado dos níveis de PYY (3-36) no organismo pode estar corroborando para danos ao SNC, contribuindo principalmente sobre as funções cognitivas. Esses efeitos deletérios resultariam em danos nas respostas mnemônicas, e poderiam estar também favorecendo o surgimento de outras doenças neurodegenerativas. Porém, mais estudos serão necessários no sentido de investigar a ação deste peptídeo no SNC, principalmente envolvendo trabalhos com modelos *in vivo* que avaliem as funções cognitivas e comportamentais.

Em conclusão, foi demonstrado neste trabalho que o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ citosólico evocado pelo PYY (3-36) em células do hipocampo é independente do Ca^{2+} do meio extracelular. Além disso, fica claro que a mobilização de Ca^{2+} observada foi modulada principalmente pela ativação da cascata de sinalização do Ca^{2+} intracelular pelos receptores de IP3. Foi também demonstrada uma diminuição do influxo de Ca^{2+} na presença de bloqueadores de canais de Na^+ dependentes de voltagem com tapsigargina ou vermelho de rutênio, sugerindo a inibição dos canais SOCC nessas condições.

7. ARTIGO ORIGINAL

Regular article to Neuropharmacology ♦

PEPTIDE YY (3-36) MODULATES CALCIUM INFLUX IN PRIMARY CULTURES OF RAT HIPPOCAMPAL CELLS

Michelle Flores Domingues¹, Dênis Reis de Assis¹, Cháriston André Dal Belo², Jaderson Costa da Costa^{1*}

¹Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS.

²Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia, Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

*Corresponding autor: Jaderson Costa da Costa, PhD

Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS.

Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 63, 2º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: +5551 33203312

E-mail adress: jcc@pucrs.br

♦ As normas de publicação encontram-se no ANEXO B e o comprovante de submissão do manuscrito para publicação no ANEXO C.

Abstract

Peptide YY (3-36) [PYY (3-36)] is a peptide belonging to the NPY peptides family, synthesized in the intestine, and well-known for acting in hypothalamic neurons, where it binds to Y2 receptors and induces satiety. Besides its importance on eating behaviour and energy balance, recent evidence implicate PYY (3-36) in dopamine-dependent behaviors related to neuropsychiatric disorders and suicide. Besides, PYY (3-36) accumulation in patients after bariatric surgery to treat obesity correlates with an increase of suicide rates. Since brain regions linked to these behaviours are strongly modulated by the hippocampus, here we evaluated the effects of PYY (3-36) on calcium oscillations in primary cultures of hippocampal cells from rats. We show that several doses of PYY (3-36) increase calcium oscillations on hippocampal cells. Besides, experiments based on pharmacological interventions suggest that the increase of cytoplasmic calcium induced by PYY (3-36) is mediated at expenses of calcium mobilized from the endoplasmic reticulum by channels regulated by IP3 receptors. Case our results can be extrapolated for *in vivo* conditions, we suggest a possible involvement of hippocampal cells in the behavioural changes caused by PYY (3-36).

1. Introduction

The peptide YY (PYY) is a 36 amino acid molecule belonging to the same family as the neuropeptide Y (NPY) and the pancreatic polypeptide (PP), exerting their effects through four different G-protein coupled receptors in humans: Y1, Y2, Y4, and Y5. PYY is predominantly produced by the intestinal secretory L cells as PYY (1-36), being further cleaved by the enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) into the PYY (3-36) (GRANDT et al., 1994; MENTLEIN et al., 1993; MICHEL et al., 1998; TATEMOTO et al., 1982; TATEMOTO; MUTT, 1980). Both peptides are present in the bloodstream as biologically active molecules and are permeable to the blood-brain barrier acting not only in the gastric system, but also in sites as distant from the intestine as the brain (NONAKA et al., 2003). Locally, PYY reduces gastrointestinal secretions and motility while increases the absorption of nutrients (BIRD et al., 1996). In the brain, though, PYY (1-36) and PYY (3-36) present opposite affects, since these peptides bind to distinct receptors (Y1 and Y2, respectively). In the thalamus, for

example, PYY (1-36) increases appetite, provoking gain of weight, while PYY (3-36) decreases the appetite, causing loss of weight (BALLANTYNE, 2006). A study applying magnetic resonance imaging have shown that infusion of PYY (3-36) into humans activates neurons in several brain regions, especially in the left caudolateral orbital frontal cortex (OFC), a region related to reward. OFC activation was directly correlated with decrease of appetite in the tested individuals. PYY (3-36) also activates brain regions such as the limbic system, ventral striatum, and the frontal, parietal, temporal and cerebellar cortices (BATTERHAM, 2007), confirming that Y receptors are present in several brain regions (PARKER, R.; HERZOG, 1999). Similarly, PYY (3-36) administration in rats activated several brain areas and provoked an anorexic effect in the animals (KODA et al., 2005; STADLBAUER et al., 2012).

Besides its importance in eating behaviour and energy balance, increased evidence has pointed that PYY (3-36) may be implicated in neuropsychiatric disorders and suicide behaviour. Accordingly, *post-mortem* analyses have shown an decrease of NPY mRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with bipolar disorder (CABERLOTTO; HURD, 1999) and an increase in the Y2 receptors mRNA expression in the cortical layer IV of subjects whose cause of death was suicide (CABERLOTTO; HURD, 2001). Interestingly, levels of PYY (3-36) are found up to ten times increased in patients who have undergone bariatric bypass surgery to treat obesity (CHAN et al., 2006), whilst, their rate of suicide becomes around 58% higher as compared to obese subjects who have declined the surgery (ADAMS et al., 2007). In addition, mice receiving exogenous administration of PYY (3-36) present significant alterations in several parameters of behaviour relevant to neuropsychiatric disorders and attributed to alterations in dopaminergic transmission, but in an indirect fashion since PYY (3-36) reduces the neural activity of GABAergic cells thereby facilitates the release of dopamine in the striatum (STADLBAUER et al., 2013; STADLBAUER et al., 2014).

It is important to highlight that the behaviours mentioned above have long been correlated to hippocampal alterations, which, in turn, not only affect, but also modulate dopaminergic transmission (BAST; FELDON, 2003; ZHANG et al., 2002). Besides, hippocampus is rich in Y2 receptors, the binding sites for PYY (3-36) molecules (PARKER, R.; HERZOG, 1999). Thus, it is conceivable that the behavioural alterations caused by PYY (3-36) could occur via physiological alterations caused by PYY (3-36) on hippocampal cells. Identification and understanding of these effects would be of interest in order to identify novel mechanisms by

which PYY (3-36) could play a role in both neuropsychiatric disturbances and in obese patients after bariatric surgery.

The purpose of the present study was to investigate the interactions of PYY (3-36) on molecular targets of CNS cells using primary cultures of hippocampal cells from rats. We evaluated the involvement of voltage-gated calcium (Ca^{2+}) and sodium (Na^+) channels as well as the influence of the sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA pump), inositol 1,4,5-triphosphate receptors (IP3R) and ryanodine receptors (RyRs) present in the endoplasmic reticulum (ER) in responses induced by PYY (3-36) on the Ca^{2+} influx modulation using of Ca^{2+} -imaging techniques.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), Fetal Bovine Serum (FBS), HEPES Buffered Saline (HBS), Neurobasal-A medium, B27 supplement, L-glutamine, poly-l-lysine and secondary antibody Alexa Fluor 633 were purchased from Invitrogen-Gibco (La Jolla, USA). PYY (3-36) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Fluo-4 AM was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Trypsin, Bovine Serum Albumin (BSA), Triton X-100, monoclonal anti-mouse Glial Fibrillary Astrocytic Protein (GFAP) and all drugs used in pharmacological interventions were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fluoropan Neuronal Marker Fluorescein Isothicyanate (FITC)-cojugated from Millipore (Billerica, Massachusetts, EUA), and mounting solution containing 0.01% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) from Vector laboratories (Burlingame, CA).

2.2. Animals

Two-day-old Wistar rats of both sexes were used for the primary cell cultures. Pregnant female rats were purchased from the Centre of Biological Experimental Models from the Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul (PUCRS). The animals were kept under an alternate 12 hours cycle of light/dark, at a constant 22°C temperature, with *ad*

libitum access to water and food. The newborn rats were kept with the dams until the moment of the sacrifice.

The experiments were conducted at the Neurosciences Laboratory of the Brain Institute, at PUCRS. The study was performed according to and approved by the Ethics and Research Committee and Ethics Commission in Animal Use, under the protocol number 13/00340.

2.3. *Primary cultures of hippocampal cells*

Primary cultures of hippocampal cells were performed following the method of Bushell and colleagues (BUSHELL et al., 2006) with small modifications. The neonate rats were sacrificed by cervical displacement followed by decapitation. The heads were placed in sterile Petri dishes inside a laminar flow hood. The brains were removed, and the hippocampi dissected. Hippocampal tissue was carefully chopped and placed in a conical plastic tube to be digested with 0.25% trypsin in HBSS for 20 minutes at 37°C. After incubation, the cells were mechanically dissociated and centrifuged at 120 x g for 5 minutes. The supernatant was removed and the cells resuspended in 1 mL of Neurobasal-A medium supplemented with 0.2% B27, and 0.5 mM L-glutamine, to be counted with a Neubauer chamber. Next, 1×10^6 cells/mL were seeded onto 13 mm round coverslips coated with poly-L-lysine. These coverslips containing cells were kept in 35 mm plastic Petri dishes with supplemented Neurobasal-A medium in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37° C. Half of the medium was changed every three days. Glial proliferation was stopped by the addition of 10 μM cytosine-β-D-arabino-furanoside (AraC) into the cells at 5 DIV. All experiments were performed in a minimum of three different cultures from different animals.

2.4. *Immunocytochemistry*

At the day of the experiment, medium was removed and cells fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes. Cells were subsequently washed 3 times with DPBS for 5 minutes and were treated with a blocking solution (1% BSA, 5% FBS, 0.2% Triton-X in DPBS) for 1 hour at RT. After this, the primary anti-GFAP antibody was added (1:100 in blocking solution) and incubated overnight at 4° C. After this, the solution was washed 3 times with DPBS and the secondary antibody (Alexa Fluor 633, 1:400 in blocking solution)

was added and incubated for 1 hour at RT in the dark. The cells were washed and the Fluoropan Neuronal Marker (1:100 in blocking solution) was added and incubated for 2 hours at RT in the dark. Finally, cells were washed and the coverslips were mounted onto slides, using the mounting solution containing DAPI. The slides were analysed through a fluorescence Zeiss LSM-5 exciter microscope, under a 40X magnification objective.

2.5. Calcium (Ca^{2+}) imaging

Ca^{2+} imaging experiments were performed following the method described by Meucci and colleagues (MEUCCI et al., 1998) with modifications. Cells of 11 to 13 DIV had the culture medium removed and were washed twice with HBS solution, constituted of (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, and 10 D-glucose (pH 7.4, mOsm/Kg 308-312). Next, the cells were incubated in the dark and at RT with 5 μM Fluo-4 AM (a Ca^{2+} sensitive dye) for 45 minutes. After this, the cells were washed twice and kept in HBS solution until being placed into a closed chamber, allowing a constant perfusion (1-2 mL per minute), having HBS as the external solution. All the tested drugs were added to the cells via perfusion. Data were calculated according to alterations in the fluorescence rates, expressed as $\Delta F/F_0$. Ca^{2+} imaging was recorded through an epifluorescence digital imaging system (WinFluor, J. Dempster, University of Strathclyde, Scotland), adapted to a Nikon Eclipse TE 2000 microscope, using a 10X objective.

2.6. Treatment with peptide YY (3-36) and pharmacological interventions

PYY (3-36) and all tested drugs were administrated to the cells via perfusion (during 2 minutes, at 1-2 mL/minute) diluted in HBS solution. Initially, PYY (3-36) was tested at concentrations ranging from 1 nM to 1 μM , and thereafter we chose the concentration of 10 nM to test several types of pharmacological interventions. Then, for each coverslip containing cells it was performed a 2 minutes perfusion followed by a 2 minutes wash between drugs infusion. After the last drug infusion, cells were washed and 35 mM KCl was added. Since it is expected a Ca^{2+} influx into the cytoplasm of intact cells in response to high extracellular $[K^+]$, we assumed that elevations in Ca^{2+} fluorescence upon KCl infusion assured that the cells were viable and that Fluo-4 was working properly as a Ca^{2+} -sensitive dye to detect variations in $[Ca^{2+}]$ during the experiments. The pharmacological interventions were

extracellular solution without Ca^{2+} with the Ca^{2+} chelator and the L-type Ca^{2+} channel blocker; voltage-dependent Na^+ channel blocker; inhibition of SERCA; ryanidine receptor blocker and inositol trisphosphate receptors blocker.

2.7. *Statistical analyses*

Experiments were performed on cells taken from five separate cultures obtained from different rats which evaluated the peak of the fluorescence change rate, expressed as $\Delta F/F_0$. The rates of fluorescence alteration, $\Delta F/F_0$, were obtained through an epifluorescence digital image system (WinFluor, J. Dempster, University of Strathclyde, Scotland) adapted to the microscope used during the experiments. All the results were expressed as mean \pm SEM, where n = the number of cells investigated. Statistical significance was determined using Student “t” test or One Way Analysis of Variance (ANOVA), followed by post hoc test of Tukey, with $p < 0.05$ taken as significant. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, United States).

3. **Results**

3.1. *Primary cultures of hippocampal cells*

We could observe the growing of neuronal processes since the first week of culture, and verified that the culture constituted of a mixture of astrocytes (GFAP positive cells) and neurons (Fluoropan positive cells) at 11 DIV, as shown in Figure 1, despite the addition of the inhibitor of glial cell proliferation AraC at 5 DIV. It was verified that the cultures achieved confluence and optimal Ca^{2+} response upon the infusion of an external solution with high K^+ at 11 to 13 DIV (data not shown). Thus all experiments were performed within this period.

3.2. *Effect of PYY (3-36) on the intracellular Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)*

PYY (3-36) infusion significantly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in all tested concentrations, ranging from 1 nM to 1 μM . For the lower doses (between 1 to 20 nM), it was observed an increase in $\Delta F/F_0$ similar between doses, with no significant difference between them (4.2 ± 0.43 , $n = 26$; $4.8 \pm$

0.29, $n = 20$; 4.5 ± 0.37 , $n = 18$; 4.2 ± 0.31 , $n = 21$; respectively), whereas the higher concentrations of PYY (3-36) tested (100 nM and 1 μ M) caused an greater increase but no significant difference between them or with lower doses (5.5 ± 0.44 , $n = 21$; 5.4 ± 1.1 , $n = 20$; respectively) (Figure 2). It was clear that the increased caused by PYY (3-36) on $[Ca^{2+}]_i$ did not occur in a dose-dependent manner. Then we chose 10 nM as the working concentration from here on, since this was a small concentration that could fully elicit a significant effect of the peptide on the cells.

3.3. *Effect of PYY (3-36) in the absence of extracellular Ca^{2+}*

In order to test whether the effect of PYY (3-36) on the increase of $[Ca^{2+}]_i$ was due to the entrance of Ca^{2+} from the extracellular fluid, we prepared an extracellular solution (HBS) without Ca^{2+} , and with the Ca^{2+} chelator EGTA (1mM) and the L-type Ca^{2+} channels blocker nifedipine (10 nM). We first perfused the cells with this Ca^{2+} -free solution and then with PYY (3-36) diluted in this same solution. As it can be observed in Figure 3, removing Ca^{2+} from the extracellular solution did not impair the increase in the $[Ca^{2+}]_i$ caused by PYY (3-36) (Free Ca^{2+} solution: 5.3 ± 0.32 , $n = 24$ and control: 4.5 ± 0.37 , $n = 18$) indicating that the increase of cytoplasmatic Ca^{2+} induced by the peptide did not occur at the expense of Ca^{2+} from outside the cells. This suggests that in hippocampal cells, PYY (3-36) probably acts by mobilizing Ca^{2+} from intracellular compartments into the cytoplasm.

3.4. *Effect of PYY (3-36) when the voltage-dependent Na^+ channel is blocked*

Next, we tested if the effect of PYY (3-36) on the hippocampal cells depend on voltage-dependent Na^+ channels, by blocking it with infusion of tetrodotoxin (TTX - 1 μ M) followed by infusion of PYY (3-36). Figure 4 shows that blocking these channels magnifies the $[Ca^{2+}]_i$ caused by PYY (3-36), so that $\Delta F/F_0$ significantly increased (4.5 ± 0.37 , $n = 18$ from 6.2 ± 0.39 , $n = 37$) (**P <0,01). This result indicated that PYY (3-36) do not exert its effect by extracellular Ca^{2+} passage into the cytoplasm through voltage-dependent Na^+ channels, nor is dependent on action potentials, being in agreement with the results showing that abolition of extracellular Ca^{2+} does not affect the effect of PYY (3-36) on hippocampal cells.

3.5. *Effect of PYY (3-36) when the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) is inhibited*

As the results above indicated that extracellular Ca²⁺ did not contribute for the raise of cytoplasmatic Ca²⁺ caused by PYY (3-36), we start pursue the hypothesis that PYY (3-36) could elicit Ca²⁺ mobilization from another source, the endoplasmic reticulum (ER). The sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) is the pump responsible for the active transport of Ca²⁺ from the cytoplasm into the endoplasmic reticulum (ER), contrary to RyR and IP3R, thus decreasing cytoplasmatic Ca²⁺ when activated. We wondered that if the effect of PYY (3-36) was really relying on mobilization of Ca²⁺ from ER, inhibition of SERCA could enhance even more the increase in [Ca²⁺]_i provoked by the peptide. In order to test SERCA influence on the PYY (3-36)-induced increase of [Ca²⁺]_i, we infused the SERCA inhibitor thapsigargin (2 μM) to the cells prior to PYY (3-36). We also tested this effect in the presence of TTX. As shown in Figure 5, when SERCA is blocked there is an increment in the effect of PYY (3-36) ($\Delta F/F_0$ increased from 4.5 ± 0.37 , $n = 18$ to 6.1 ± 0.31 , $n = 50$) (**P < 0,01), as expected, since stopping Ca²⁺ intake by ER may contribute to cytoplasmatic Ca²⁺ accumulation. However, for our surprise, the presence of TTX did not only hamper this additive effect, but also significantly decreased it ($\Delta F/F_0 = 3.2 \pm 0.13$, $n = 29$) (***P < 0,001).

3.6. *Effect of PYY (3-36) when the ryanodine receptor channel (RyR) is blocked*

The ryanodine receptor channel (RyRs), could play a role in the PYY (3-36) effect, by blocking RyRs with ruthenium red (RR 30 μM) and voltage-dependent Na⁺ channels with TTX (1 μM) prior to PYY (3-36) infusion. Co-incubation with RR potentiated the effect of the peptide, whereas the presence of TTX decreased this effect (Figure 6, $\Delta F/F_0$ for PYY (3-36) alone = 4.5 ± 0.37 , $n = 18$; $\Delta F/F_0$ for PYY (3-36) + RR = 6.5 ± 0.19 , $n = 63$; and $\Delta F/F_0$ for PYY (3-36) + RR + TTX = 3.5 ± 0.21 , $n = 23$) (***P < 0,001).

3.7. *Effect of PYY (3-36) when the inositol trisphosphate receptor (IP3R) is blocked*

The channel regulated by RyR is not the only way Ca²⁺ can be transported from the ER to the cytoplasm. Another channel with this same function is the inositol trisphosphate receptor

channel (IP3R). In order to test the influence of IP3R on the effects mediated by PYY (3-36), we blocked IP3R with the drug aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 100 μ M), and the voltage-dependent Na⁺ channels with TTX before PYY (3-36) infusion. As displayed in the Figure 7, co-infusion of 2-APB with PYY (3-36) significantly decreased the effect of PYY (3-36) infusion alone ($\Delta F/F_0 = 3.1 \pm 0.25$, $n = 35$ and 4.5 ± 0.37 , $n = 18$, respectively) (* $P < 0,05$), pointing out that the opening of IP3R could be one of the ways PYY (3-36) increases calcium transients in hippocampal cells. However, as IP3R is not the only target for 2-APB, we cannot rule out the participation of other mechanisms. In contrast, in the presence of 2-APB and TTX, the effect of PYY (3-36) was potentiated (6.7 ± 0.46 , $n = 24$), indicating that in the absence of action potentials possibly PYY (3-36) shifts its mechanism of action by recruiting Ca²⁺ from another source in hippocampal cells.

4. Discussion

To our knowledge, herein we show for the first time the effect of PYY (3-36) on intracellular calcium oscillations in a mixed culture of neurons and astrocytes from neonate rat hippocampus. We have also investigated the mechanisms mediating PYY (3-36) [Ca²⁺]_i modulation through specific inhibitors of cellular Ca²⁺ transport systems.

Initially, we verified that low physiological doses of PYY (3-36) (from 1 to 20 nM) increased about 4-fold the basal levels of [Ca²⁺]_i in these cells. Despite the effect was not dose-dependent, it is important to emphasize that the cells responded to higher doses (100 nM and 1 μ M) of the peptide producing a further increment in [Ca²⁺]_i. Next, we demonstrated that in the absence of extracellular Ca²⁺ and blockage of L-type Ca²⁺ channels with nifedipine elevations of [Ca²⁺]_i mediated by PYY (3-36) kept intact, so that the peptide does not act by mobilizing extracellular calcium into the cells. Then we infused the selective blocker of voltage-dependent Na⁺ channels TTX prior to PYY (3-36) application and observed an increase in the [Ca²⁺]_i in the hippocampal cells. This demonstrates that the PYY (3-36) action was independent on Na⁺ influx, suggesting that the activity of PYY (3-36) does not induce or not depend on cellular depolarization. Moreover, this impairment of neuronal depolarization by TTX reinforces the possibility of a hyperpolarization induced by the peptide, confirming the inhibitory role of PYY (3-36) on the CNS (STADLBAUER et al., 2014). In fact, this effect corroborates for a pre-synaptic inhibitory activity of PYY (3-36) on rat hippocampal GABAergic (ACUNA-GOYCOLEA; VAN DEN POL, 2005) and glutamatergic neurons, via

activation of Y2 receptors (GREBER et al., 1994). Next, we studied the effect of PYY (3-36) on the two receptors of channels transporting Ca^{2+} from the ER stores to the cytoplasm, ryanodine (RyR) and IP3 receptors (IP3R), by blocking them with ruthenium red and 2-APB, respectively. Our results showed that 2-APB, but not ruthenium red decreased elevations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediated by PYY (3-36), suggesting that PYY (3-36) may increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in hippocampal cells by activating Ca^{2+} transport from ER into the cytoplasm mediated by IP3R. Then we tested the influence of PYY (3-36) on SERCA, the main transport system replenishing Ca^{2+} ER stores, by inhibiting its activity with thapsigargin. This treatment enhanced even more the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ by PYY (3-36), being compatible with the sum of the Ca^{2+} mobilized by the effect of PYY (3-36) on IP3R activation, plus the Ca^{2+} accumulated in the cytosol due to SERCA inhibition by thapsigargin. In this experimental conditions, we could not rule out the contribution of extracellular Ca^{2+} transported by SOCC (store-operated calcium channels), in response to thapsigargin-induced Ca^{2+} depletion (PAREKH; PUTNEY JR, 2005). Interestingly, in this experiment co-infusion of TTX and thapsigargin prior to PYY (3-36) in the hippocampal cells decreased the rise $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elicited by the peptide, a result compatible the contribution of SOCC in the effect of thapsigargin potentiating PYY (3-36) effect, since SOCC are probably sensitive to voltage-dependent Na^+ channels, once they are permeable to both Ca^{2+} and Na^+ (ARNON et al., 2000). However, we discarded that PYY (3-36) could act by activating SOCC channels because these channels are involved in the transport of extracellular Ca^{2+} (KOSS et al., 2013), the first mechanism excluded by our experiments showing that the effect of PYY (3-36) on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ does not depend on extracellular Ca^{2+} . Since our scope was not studying the influence of PYY (3-36) on mitochondrial stores of calcium, so we cannot discard an effect of this peptide on mitochondria.

PYY (3-36) has long been known by its role as a modulator of appetite, causing satiety sensation in mammals (BALLANTYNE, 2006; BATTERHAM, 2007; KODA et al., 2005; STADLBAUER et al., 2012). It has been attributed to the action of the peptide on neurons at the arcuate nucleus of the hypothalamus. Besides, blood levels of this peptide rise up to tenfold in obese patients after bariatric bypass surgery, being considered as an important contributor in the successful weight loss after this procedure (BALLANTYNE, 2006). This anorexigenic effect has made PYY (3-36) an attractive candidate compound to be used to treat obesity in the future (ACUNA-GOYCOLEA; VAN DEN POL, 2005).

On the other hand, there is growing evidence that NPY family of peptides may also be involved in behavioural abnormalities. Accordingly, it has been found a decrease in the expression of NPY mRNA in patients with bipolar disorder (CABERLOTTO; HURD, 1999) and an increased expression of Y2 receptor mRNA in individuals that committed suicide, which is in most of cases linked to previous psychiatric problems (CABERLOTTO; HURD, 2001). In parallel, a more than 50% increase in the rates of suicide has been reported in the obese patients after bariatric surgery (ADAMS et al., 2007) a condition causing rise in PYY (3-36) levels (CHAN et al., 2006), indicating a possible correlation between behavioural changes and PYY (3-36) rise. On the other hand, acute systemic administration of PYY (3-36) in rats produces deficits in social interaction, sensorimotor gating, and working memory, all closely related to schizophrenia and anxiety disorder and associated with dopaminergic transmission, since they are preventable by the D2 receptor antagonist haloperidol (STADLBAUER et al., 2013). In a first place, it was believed that PYY (3-36) would directly activate dopamine release from neurons in the striatum, as shown in a study using rat striatal slices (ADEWALE; MACARTHUR; WESTFALL, 2007). Nevertheless, a more recent work has shown that systemic administration of PYY (3-36) in rats disturbs behaviours dependent on dopaminergic signalling by activating rather GABAergic than dopaminergic neurons in the ventral and dorsal striatum. This clearly implicates an indirect rather than direct effect of PYY (3-36) on brain dopaminergic cells. Another possibility would be an indirect influence of PYY (3-36) on dopaminergic neurons after a direct depolarization or hyperpolarization of cells from areas projecting to dopaminergic areas. This is the case of hippocampus, a brain area well-known for projecting outputs to dopaminergic regions implicated in neuropsychiatric behaviours like the nucleus accumbens, amygdala, and prefrontal cortex, a fact that could explain why alterations in hippocampal functioning ultimately result in behaviours related to schizophrenia and bipolar disorder (BAST; FELDON, 2003; ZHANG et al., 2002). Here we found a considerable effect of PYY (3-36) increasing calcium oscillations in hippocampal cells. We provided evidence that this effect occur at expenses of calcium transported from the endoplasmic reticulum to the cytoplasm through channels controlled by IP3 receptors, probably resulting in neurotransmitter release (EMPTAGE; REID; FINE, 2001). Extrapolating these results for *in vivo* conditions would provide evidence that PYY (3-36) could have a significant physiological effect, since NPY family of neuropeptides is involved in important physiological functions for the CNS, including during neuropsychiatric (HOLZER et al., 2012) and neurodegenerative illnesses (DECRESSAC; BARKER, 2012). Considering our present results, alterations in Ca^{2+} homeostasis under the

influence of these peptides are likely to contribute for the pathologic findings in these diseases. In this sense, it is possible that the inhibitory action of PYY (3-36) on glutamatergic (GREBER et al., 1994) and GABAergic (STADLBAUER et al., 2014) neurons in the hippocampus may disrupt LTP and favour a LTD induction, ultimately affecting hippocampal output to dopaminergic areas responsible for neuropsychiatric relevant behaviours (BAST; FELDON, 2003).

Gaining deeper knowledge about the mechanisms underlying the effects of PYY (3-36) on the hippocampus is of critical importance due to its relevance in neuropsychiatric disorders and obesity. Complementary *in vivo* studies are needed to confirm our theory, as well as to determine accurately the identity of the cells activated or deactivated by PYY (3-36) in the hippocampus.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Domingues M. F. and Assis D. R. are the scholarships from CAPES and FAPERGS, respectively, DaCosta J. C. is a researcher at CNPq.

References

- Acuna-Goycolea, C., van den Pol, A. N., 2005. Peptide YY3-36 inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis. *The Journal of neuroscience* 25, 10510-10519.
- Adams, T. D., Gress, R. E., Smith, S. C., Halverson, R. C., Simper, S. C., Rosamond, W. D., LaMonte, M. J., Stroup, A. M., Hunt, S. C., 2007. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *New England Journal of Medicine* 357, 753-761.
- Adewale, A. S., Macarthur, H., Westfall, T. C., 2007. Neuropeptide Y-induced enhancement of the evoked release of newly synthesized dopamine in rat striatum: Mediation by Y₂ receptors. *Neuropharmacology* 52, 1396-1402.
- Arnon, A., Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., 2000. Na⁺ entry via store-operated channels modulates Ca²⁺ signaling in arterial myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 278, C163-C173.
- Ballantyne, G. H., 2006. Peptide YY (1-36) and peptide YY (3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obesity surgery* 16, 651-658.
- Bast, T., Feldon, J., 2003. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Progress in neurobiology* 70, 319-345.
- Batterham, R. L., 2007. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature* 450, 106-109.
- Bird, A., Croom, W., Fan, Y., Black, B., McBride, B., Taylor, I., 1996. Peptide regulation of intestinal glucose absorption. *Journal of animal science* 74, 2523-2540.
- Bushell, T. J., Plevin, R., Cobb, S., Irving, A. J., 2006. Characterization of proteinase-activated receptor 2 signalling and expression in rat hippocampal neurons and astrocytes. *Neuropharmacology* 50, 714-725.
- Caberlotto, L., Hurd, Y. L., 1999. Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder. *Neuroreport* 10, 1747-1750.
- Caberlotto, L., Hurd, Y. L., 2001. Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor mRNA expression in the prefrontal cortex of psychiatric subjects. *Neuropsychopharmacology* 25, 91-97.
- Chan, J. L., Mun, E. C., Stoyneva, V., Mantzoros, C. S., Goldfine, A. B., 2006. Peptide YY levels are elevated after gastric bypass surgery. *Obesity* 14, 194-198.
- Decressac, M., Barker, R., 2012. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Experimental neurology*.
- Emptage, N. J., Reid, C. A., Fine, A., 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29, 197-208.
- Grandt, D., Schimiczek, M., Beglinger, C., Layer, P., Goebell, H., Eysselein, V., Reeve Jr, J., 1994. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36. *Regul Pept* 51, 151-159.
- Greber, S., Schwarzer, C., Sperk, G., 1994. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. *British journal of pharmacology* 113, 737-740.
- Holzer, P., Reichmann, F., Farzi, A., 2012. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides* 46, 261-274.
- Koda, S., Date, Y., Murakami, N., Shimbara, T., Hanada, T., Toshinai, K., Nijima, A., Furuya, M., Inomata, N., Osuye, K., 2005. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 146, 2369-2375.

- Koss, D. J., Riedel, G., Bence, K., Platt, B., 2013. Store-operated Ca^{2+} entry in hippocampal neurons: Regulation by protein tyrosine phosphatase PTP1B. *Cell calcium* 53, 125-138.
- Mentlein, R., GALLWITZ, B., SCHMIDT, W. E., 1993. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7–36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European Journal of Biochemistry* 214, 829-835.
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., Bushell, T. J., Gray, P. W., Miller, R. J., 1998. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 14500-14505.
- Michel, M. C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H. N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion, R., Schwartz, T., Westfall, T., 1998. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacological reviews* 50, 143-150.
- Nonaka, N., Shioda, S., Niehoff, M. L., Banks, W. A., 2003. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306, 948-953.
- Parekh, A. B., Putney Jr, J. W., 2005. Store-operated calcium channels. *Physiological reviews* 85, 757-810.
- Parker, R., Herzog, H., 1999. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *European Journal of Neuroscience* 11, 1431-1448.
- Stadlbauer, U., Arnold, M., Weber, E., Langhans, W., 2012. Possible mechanisms of circulating PYY-induced satiation in male rats. *Endocrinology* 154, 193-204.
- Stadlbauer, U., Langhans, W., Meyer, U., 2013. Administration of the Y2 Receptor Agonist PYY3-36 in Mice Induces Multiple Behavioral Changes Relevant to Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38, 2446-2455.
- Stadlbauer, U., Weber, E., Langhans, W., Meyer, U., 2014. The Y2 receptor agonist PYY3–36 increases the behavioural response to novelty and acute dopaminergic drug challenge in mice. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 17, 407-419.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V., 1982. Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.
- Tatemoto, K., Mutt, V., 1980. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides.
- Zhang, W.-N., Bast, T., Feldon, J., 2002. Prepulse inhibition in rats with temporary inhibition/inactivation of ventral or dorsal hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73, 929-940.

Figure Legends

Fig. 1. Primary culture of rat hippocampal cells. Hippocampal cells were identified by immunocytochemistry through the neural marker Fluoropan (1:100, green colour), the astrocyte marker GFAP (1:100, red colour), and the nuclear marker DAPI (blue). Cells were analysed using a 40X magnification objective of a Zeiss LSM-5 exciter microscope.

Fig. 2. Effect of different doses of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations. Rat hippocampal cells were infused with different doses of PYY (3-36), ranging from 1 nM to 1 μ M. The results were expressed as mean \pm SEM and compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

Fig. 3. Effect of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations when extracellular calcium is removed. Hippocampal cells were infused with a solution of PYY (3-36) without calcium and with 1 mM EGTA and 10 μ M nifedipine. The results were expressed as mean of \pm SEM and compared by the Student *t* test.

Fig. 4. Effect of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations when voltage dependent Na⁺ channel are blocked. Hippocampal cells were infused with 1 μ M TTX following the infusion of 10 nM PYY (3-36). The results were expressed as mean \pm SEM and compared by the Student *t* test. **P < 0.01.

Fig. 5. Effect of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations when calcium pump SERCA is blocked. Hippocampal cells were infused with 2 μ M thapsigargin following the infusion of 10 nM PYY (3-36), or with 2 μ M thapsigargin and 1 μ M TTX following the infusion of 10 nM PYY (3-36). The results were expressed as mean \pm SEM and compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Fig. 6. Effect of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations when calcium channels regulated by ryanodine receptors are blocked. Hippocampal cells were infused with 30 μ M ruthenium red following the infusion of 10 nM PYY (3-36), or with 30 μ M ruthenium red and 1 μ M TTX following the infusion of 10 nM PYY (3-36). The results were

expressed as mean \pm SEM and compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. ***P < 0.001.

Fig. 7. Effect of PYY (3-36) on intracellular calcium concentrations when calcium channels regulated by inositol triphosphate are blocked. Hippocampal cells were infused with 100 μ M 2-APB following the infusion of 10 nM PYY (3-36), or with 100 μ M 2-APB and 1 μ M TTX following the infusion of 10 nM PYY (3-36). The results were expressed as mean \pm SEM and compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test. *P < 0.05; ***p < 0,001.

Figures

Fig. 1.

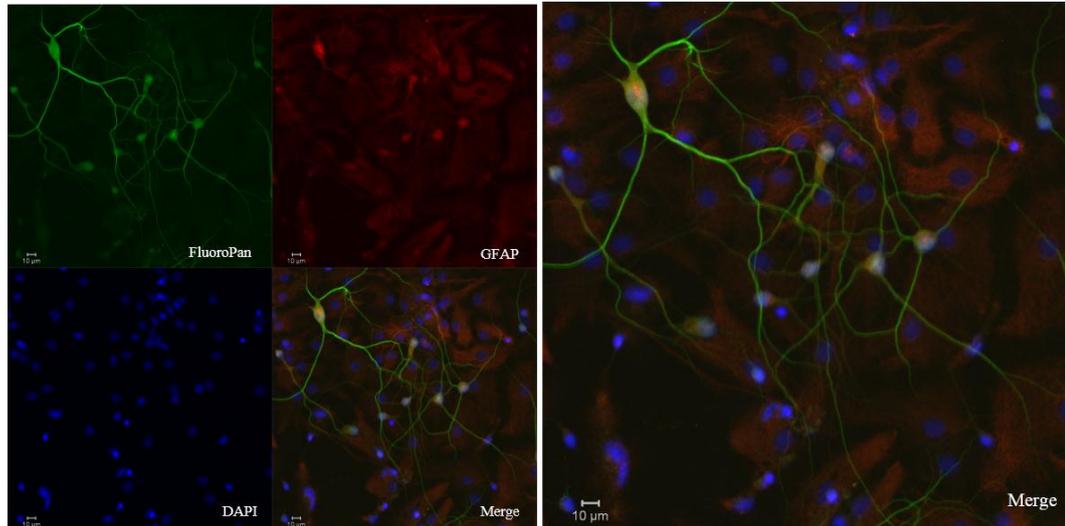


Fig. 2.

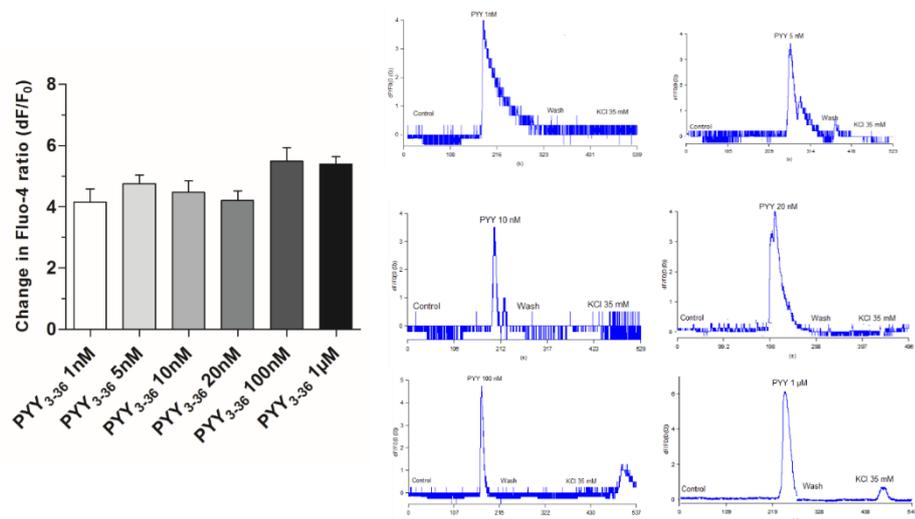


Fig. 3.

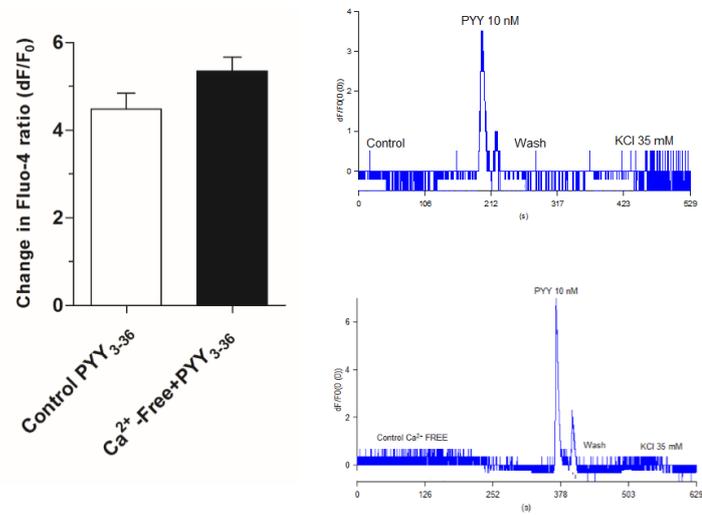


Fig. 4.

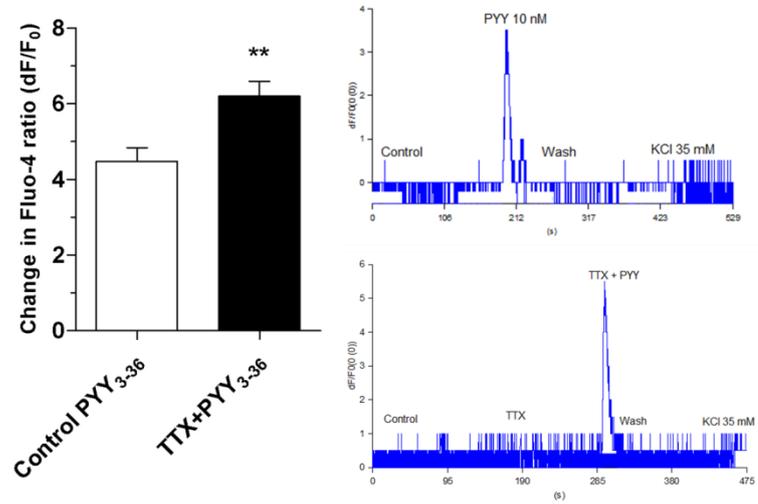


Fig. 5.

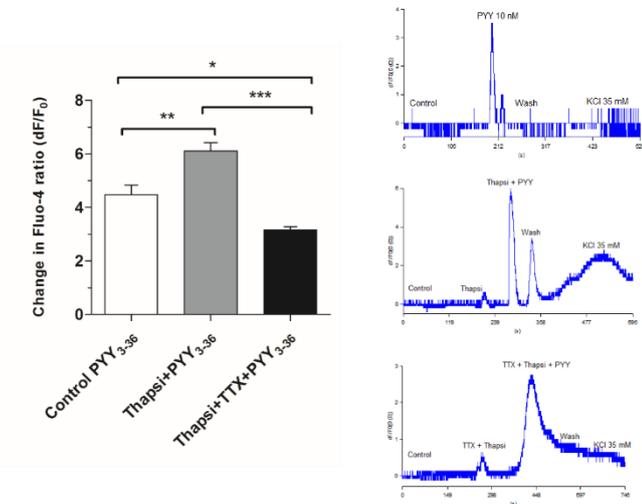


Fig. 6.

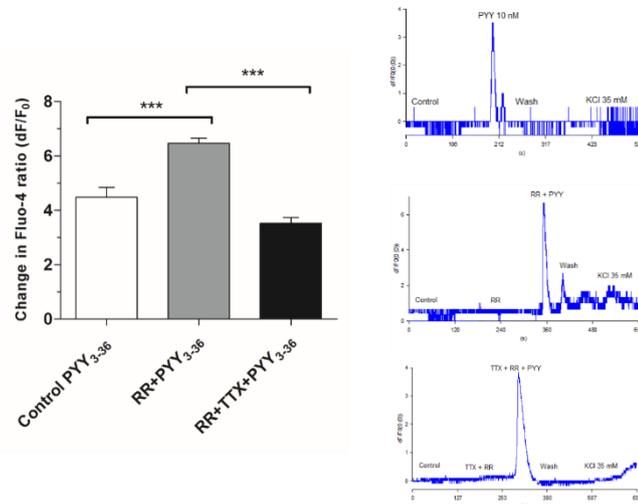
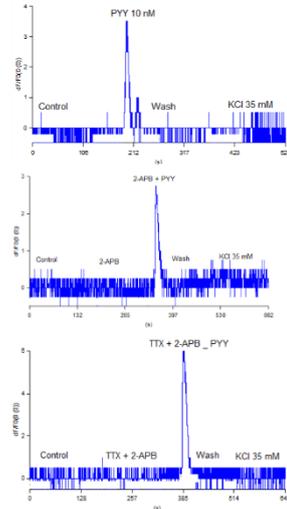
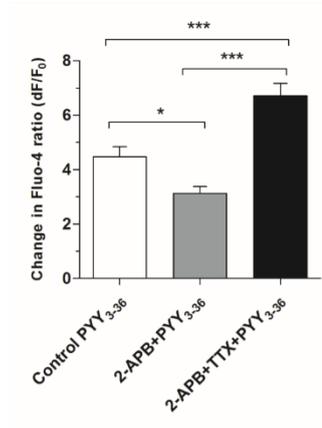


Fig. 7.



8. CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação de mestrado indicam que:

- O PYY (3-36) aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular em células hipocámpais em concentrações que variam entre 1 nM e 1 μM , apresentando uma atividade de resposta variável não dose-dependente.
- O PYY (3-36) exerce atividade independente da ativação das vias do Ca^{2+} extracelular. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular evocado pelo peptídeo é possivelmente decorrente da mobilização do Ca^{2+} das reservas intracelulares.
- A atividade do PYY (3-36) sobre as células hipocámpais é independente do influxo de Na^+ , o que sugere que a sua atividade não induz ou independe da despolarização celular.
- O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular evocado pelo peptídeo não é dependente dos canais de receptores de rianodina e da bomba SERCA.
- O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular evocado pelo peptídeo é modulado principalmente pela ativação da cascata de sinalização do Ca^{2+} intracelular pelos receptores de IP3.

9. REFERÊNCIAS

ACUNA-GOYCOLEA, C.; VAN DEN POL, A. N. Peptide YY3-36 inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 45, p. 10510-10519, 2005.

ADAMS, T. D. et al. Long-term mortality after gastric bypass surgery. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 8, p. 753-761, 2007.

ADEWALE, A. S.; MACARTHUR, H.; WESTFALL, T. C. Neuropeptide Y-induced enhancement of the evoked release of newly synthesized dopamine in rat striatum: Mediation by Y₂ receptors. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 6, p. 1396-1402, 2007.

ARNON, A.; HAMLYN, J. M.; BLAUSTEIN, M. P. Na⁺ entry via store-operated channels modulates Ca²⁺ signaling in arterial myocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 278, n. 1, p. C163-C173, 2000.

BALLANTYNE, G. H. Peptide YY (1-36) and peptide YY (3-36): Part I. Distribution, release and actions. **Obesity surgery**, v. 16, n. 5, p. 651-658, 2006.

BANERJEE, S.; HASAN, G. The InsP3 receptor: its role in neuronal physiology and neurodegeneration. **Bioessays**, v. 27, n. 10, p. 1035-1047, 2005.

BAST, T.; FELDON, J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. **Progress in neurobiology**, v. 70, n. 4, p. 319-345, 2003.

BATTERHAM, R. L. PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. **Nature**, v. 450, n. 7166, p. 106-109, 2007.

BATTERHAM, R. L. et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 10, p. 941-948, 2003.

BIRD, A. et al. Peptide regulation of intestinal glucose absorption. **Journal of animal science**, v. 74, n. 10, p. 2523-2540, 1996.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31-39, 1993.

BUSHELL, T. J. et al. Characterization of proteinase-activated receptor 2 signalling and expression in rat hippocampal neurons and astrocytes. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 6, p. 714-725, 2006.

CABERLOTTO, L.; HURD, Y. L. Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the prefrontal cortex of subjects with bipolar disorder. **Neuroreport**, v. 10, n. 8, p. 1747-1750, 1999.

_____. Neuropeptide Y Y1 and Y2 receptor mRNA expression in the prefrontal cortex of psychiatric subjects. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 91-97, 2001.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 521-555, 2000.

CHAN, J. L. et al. Peptide YY levels are elevated after gastric bypass surgery. **Obesity**, v. 14, n. 2, p. 194-198, 2006.

CHAVIS, P. et al. Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons. **Nature**, v. 382, n. 6593, p. 719-722, 1996.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 259-268, 1995.

COLMERS, W. F. et al. Presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampal slice in vitro is mediated by a Y2 receptor. **British journal of pharmacology**, v. 102, n. 1, p. 41-44, 1991.

CORVINO, V. et al. The Neurogenic Effects of Exogenous Neuropeptide Y: Early Molecular Events and Long-Lasting Effects in the Hippocampus of Trimethyltin-Treated Rats. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88294, 2014.

DECRESSAC, M.; BARKER, R. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. **Experimental neurology**, 2012.

EKBLAD, E.; SUNDLER, F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. **Peptides**, v. 23, n. 2, p. 251-261, 2002.

EMPTAGE, N. J.; REID, C. A.; FINE, A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. **Neuron**, v. 29, n. 1, p. 197-208, 2001.

FOSTER, T. C. Biological markers of age-related memory deficits. **CNS drugs**, v. 20, n. 2, p. 153-166, 2006.

_____. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. **Aging cell**, v. 6, n. 3, p. 319-325, 2007.

FRANKLIN, J. L.; JOHNSON, E. M. Block of Neuronal Apoptosis by a Sustained Increase of Steady-State Free Ca²⁺ Concentration. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 345, n. 1313, p. 251-256, 1994.

FRANKLIN, J. L.; JOHNSON JR, E. M. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. **Trends in neurosciences**, v. 15, n. 12, p. 501-508, 1992.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J. **Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy**. Lippincott Williams & Wilkins, 2011. ISBN 1608312704.

GRANDT, D. et al. Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1–36 and PYY 3–36. **Regul Pept**, v. 51, n. 2, p. 151-159, 1994.

GRAY, W. P. Neuropeptide Y signalling on hippocampal stem cells in health and disease. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 288, n. 1, p. 52-62, 2008.

GREBER, S.; SCHWARZER, C.; SPERK, G. Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. **British journal of pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 737-740, 1994.

GRIENBERGER, C.; KONNERTH, A. Imaging calcium in neurons. **Neuron**, v. 73, n. 5, p. 862-885, 2012.

GRUNDEMAR, L.; HÅKANSON, R. Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. **Trends in pharmacological sciences**, v. 15, n. 5, p. 153-159, 1994.

GUTIERREZ-MERINO, C. et al. Cytosolic Calcium Homeostasis in Neurons—Control Systems, Modulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species, and Space and Time Fluctuations. 2014.

HAGENSTON, A. M. et al. 2-Aminoethoxydiphenyl-borate (2-APB) increases excitability in pyramidal neurons. **Cell calcium**, v. 45, n. 3, p. 310-317, 2009.

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

HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut–brain axis. **Neuropeptides**, v. 46, n. 6, p. 261-274, 2012.

KODA, S. et al. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3–36-induced feeding reduction in rats. **Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 2369-2375, 2005.

KOSS, D. J. et al. Store-operated Ca^{2+} entry in hippocampal neurons: Regulation by protein tyrosine phosphatase PTP1B. **Cell calcium**, v. 53, n. 2, p. 125-138, 2013.

LARHAMMAR, D. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. **Regul Pept**, v. 62, n. 1, p. 1-11, 1996a.

_____. Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. **Regul Pept**, v. 65, n. 3, p. 165-174, 1996b.

LIMBIRD, L. E. Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. **The FASEB journal**, v. 2, n. 11, p. 2686-2695, 1988.

LINDEN, D. J. Long-term synaptic depression in the mammalian brain. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 457-472, 1994.

LUGARI, R. et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion and plasma dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activity in morbidly obese patients undergoing biliopancreatic diversion. **Hormone and metabolic research**, v. 36, n. 02, p. 111-115, 2004.

MALÉCOT, C. O.; BITO, V.; ARGIBAY, J. A. Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells. **British journal of pharmacology**, v. 124, n. 3, p. 465-472, 1998.

MALGAROLI, A.; TSIEN, R. W. Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. **Nature**, v. 357, n. 6374, p. 134-139, 1992.

MATTSON, M. P. Calcium and neurodegeneration. **Aging cell**, v. 6, n. 3, p. 337-350, 2007.

MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7–36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 829-835, 1993.

MEUCCI, O. et al. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 24, p. 14500-14505, 1998.

MICHEL, M. C. et al. XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 1, p. 143-150, 1998.

MULLINS, D. E.; ZHANG, X.; HAWES, B. E. Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y₁, Y₂, Y₄ and Y₅ receptor subtypes. **Regul Pept**, v. 105, n. 1, p. 65-73, 2002.

NONAKA, N. et al. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 3, p. 948-953, 2003.

PAREKH, A. B.; PUTNEY JR, J. W. Store-operated calcium channels. **Physiological reviews**, v. 85, n. 2, p. 757-810, 2005.

PARKER, R.; HERZOG, H. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 4, p. 1431-1448, 1999.

PARKER, S.; BALASUBRAMANIAM, A. Neuropeptide Y Y₂ receptor in health and disease. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 3, p. 420-431, 2008.

PETERHÄNSEL, C. et al. Risk of completed suicide after bariatric surgery: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 14, n. 5, p. 369-382, 2013.

RECASENS, M.; VIGNES, M. Excitatory amino acid metabotropic receptor subtypes and calcium regulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 757, n. 1, p. 418-429, 1995.

REDROBE, J. P. et al. Characterization of neuropeptide Y, Y₂ receptor knockout mice in two animal models of learning and memory processing. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 159-166, 2004.

REDROBE, J. P. et al. Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizures and cognition. **Brain research**, v. 848, n. 1, p. 153-166, 1999.

RIGONI, M. et al. Equivalent effects of snake PLA₂ neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1678-1680, 2005.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **Journal of molecular medicine**, v. 78, n. 1, p. 3-13, 2000.

SAVIĆ, N.; SCIANCALEPORE, M. Intracellular calcium stores modulate miniature GABA-mediated synaptic currents in neonatal rat hippocampal neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 3379-3386, 1998.

SCIANCALEPORE, M. et al. Facilitation of miniature GABAergic currents by ruthenium red in neonatal rat hippocampal neurons. **Journal of neurophysiology**, v. 80, n. 5, p. 2316-2322, 1998.

SILVA, A. P. et al. Modulation of intracellular calcium changes and glutamate release by neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus: differential effects in CA1, CA3 and dentate gyrus. **Journal of neurochemistry**, v. 79, n. 2, p. 286-296, 2001.

_____. Functional interaction between neuropeptide Y receptors and modulation of calcium channels in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 2, p. 282-292, 2003.

SMAILI, S. S. et al. Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 32, n. 1, p. 35-46, 2000.

STADLBAUER, U. et al. Possible mechanisms of circulating PYY-induced satiation in male rats. **Endocrinology**, v. 154, n. 1, p. 193-204, 2012.

STADLBAUER, U.; LANGHANS, W.; MEYER, U. Administration of the Y2 Receptor Agonist PYY3-36 in Mice Induces Multiple Behavioral Changes Relevant to Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 12, p. 2446-2455, 2013.

STADLBAUER, U. et al. The Y2 receptor agonist PYY3–36 increases the behavioural response to novelty and acute dopaminergic drug challenge in mice. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 03, p. 407-419, 2014.

STANIĆ, D. et al. Characterization of NPY Y2 receptor protein expression in the mouse brain. II. Coexistence with NPY, the Y1 receptor, and other neurotransmitter-related molecules. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, n. 7, p. 1219-1257, 2011.

TASAN, R. et al. Increased novelty-induced motor activity and reduced depression-like behavior in neuropeptide Y (NPY)–Y4 receptor knockout mice. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1717-1730, 2009.

TATEMOTO, K. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 8, p. 2514-2518, 1982.

TATEMOTO, K.; CARLQUIST, M.; MUTT, V. Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. 1982.

TATEMOTO, K.; MUTT, V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. 1980.

TATEMOTO, K. et al. Isolation and primary structure of human peptide YY. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 2, p. 713-717, 1988.

THASTRUP, O. et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ (+)-ATPase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 7, p. 2466-2470, 1990.

TRIVEDI, P. G. et al. Differential regulation of neuropeptide Y receptors in the brains of NPY knock-out mice. **Peptides**, v. 22, n. 3, p. 395-403, 2001.

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.

ZHANG, W.-N.; BAST, T.; FELDON, J. Prepulse inhibition in rats with temporary inhibition/inactivation of ventral or dorsal hippocampus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 4, p. 929-940, 2002.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CEUA – PUCRS


 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 66/13 - CEUA Porto Alegre, 13 de setembro de 2013.

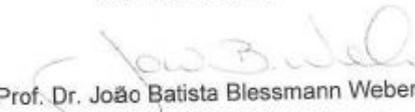
Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00340, intitulado **“Avaliar in vitro os efeitos de diferentes concentrações do peptídeo YY (1-36) e peptídeo YY (3-36) sobre neurônios do hipocampo de camundongo C57/BL6”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


 Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
 Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
 Prof. Jaderson Costa da Costa
 INSCER
 Nesta Universidade


Campus Central
 Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
 CEP: 90610-000
 Fone/Fax: (51) 3320-3345
 E-mail: ceua@pucrs.br

10.2. ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA INTERNACIONAL INDEXADA NEUROPHARMACOLOGY

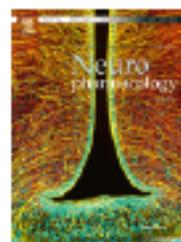


NEUROPHARMACOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0028-3908

DESCRIPTION

Neuropharmacology publishes high quality, original research and review articles within the discipline of **neuroscience**, especially articles with a neuropharmacological component. However, papers within any area of neuroscience will be considered. The journal does not usually accept clinical research, although preclinical **neuropharmacological studies** in humans may be considered. The journal only considers **submissions** in which the chemical structures and compositions of experimental agents are readily available in the literature or disclosed by the authors in the submitted manuscript. Only in exceptional circumstances will natural products be considered, and then only if the preparation is well defined by scientific means. *Neuropharmacology* publishes articles of any length (original research and reviews).

Neuropharmacology also publishes succinct topical reviews on subjects within its remit. These reviews (of between 3000 and 5000 words) are commissioned by the Editorial Team or arise after correspondence with potential authors. Unsolicited reviews will be considered, but authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief ahead of time of their intention to submit a review and to indicate clearly how the review differs from, and adds to, recent published reviews on related topics. On the basis of the case made by authors, potential overlap with planned *Neuropharmacology* content, and discussions with the Editorial Team, the Editor-in-Chief will provide authors with a decision regarding their proposed review as quickly as possible.

The scope of the journal is broad. It covers many disciplines and spans molecules (e.g., molecular biology, biochemistry) through systems (e.g., neurophysiology) to behaviour (e.g. cognition, psychopharmacology). The journal covers all aspects of neuroscience with an emphasis on neurotransmitters and their receptors, ion channels, signalling, psychopharmacology and animal models of disease, such as investigations on the neurobiology of cognition, depression, schizophrenia, anxiety, epilepsy, ischaemia, neuroprotection, neurodegeneration, drugs of abuse and pain.

The journal publishes occasional Special Issues (and will consider publishing Supplements). Each year Elsevier/*Neuropharmacology* organise a satellite symposium to the Meeting of the Society for Neuroscience. The journal publishes a Special Issue to accompany each meeting. Please see <http://www.neuropharmacology-conference.elsevier.com/> for details of this year's meeting and accompanying Special Issue.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Neuropharmacology and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the [Guide for authors](#)

AUDIENCE

Neuroscientists and neuropharmacologists, particularly in the field of cellular and molecular neuroscience.

IMPACT FACTOR

2013: 4.819 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Chemical Abstracts
Current Contents/BIOBASE Database
Current Contents/Life Sciences
Current Contents/SciSearch Database
Current Contents/Science Citation Index
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Psychology Abstracts
Research Alert
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor -in Chief

Bruno Frenguelli, School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, England, UK

Senior Editor:

Stuart Allan, Manchester, England, UK
Gemma Casadesus, PhD, Cleveland, Ohio, USA
John Cryan, Cork, Ireland
Thomas Gould, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Joseph Kittler, London, UK
Michaela Kress, Wilten, Austria
Christopher Parsons, Frankfurt am Main, Germany
Danny Winder, Nashville, Tennessee, USA

Editorial Board:

Carine All, Caen Cedex, France
Vaishali Bakshi, Madison, Wisconsin, USA
Nicholas Barnes, Birmingham, UK
Frank Barone, New York, New York, USA
Alasdair Barr, Vancouver, British Columbia, Canada
David Bleakman, Indianapolis, Indiana, USA
Angelique Bordey, New Haven, Connecticut, USA
Martine Cador, Bordeaux, France
Gina Carelli, Chapel Hill, North Carolina, USA
Hwel-Hsien Chen, Hualien, Taiwan, ROC
María Isabel Colado, Madrid, Spain
Anis Contractor, Chicago, Illinois, USA
Peter Crack, Parkville, Victoria, Australia
Ellsabetta Daré, Stockholm, Sweden
Ceri Davies, Harlow, UK
Chris Dulla, Medford, Massachusetts, USA

John Garthwalte, London, UK
Fabrizio Gasparini, Basel, Switzerland
Yukiko Goda, London, UK
Timothy Greenamyre, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
David Heal, Nottingham, UK
Ray Hill, Harlow, UK
Peter Hutson, Wayne, Pennsylvania, USA
Kazutaka Ikeda, Tokyo, Japan
Masanobu Kano, Tokyo, Japan
Paul Kenny, PhD, Jupiter, Florida, USA
Baljit Khakh, Los Angeles, California, USA
Gavin Kilpatrick, Histon, UK
Chul-Hoon Kim, Seoul, South Korea
Jennifer Laird, Montréal, Quebec, Canada
David Lovinger, PhD, Bethesda, Maryland, USA
Wolfgang Löscher, Hannover, Germany
Lan Ma, Shanghai, China
Robert Malenka, Palo Alto, California, USA
Carina Mallard, Sweden
Olivier Manzoni
Hélène Marle, Valbonne, France
Athina Markou, PhD, La Jolla, California, USA
Charles Marsden, Nottingham, UK
Stephen Moss, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Michael Ossipov, Tucson, Arizona, USA
Menelas Pangolas, Princeton, New Jersey, USA
Loren Parsons, La Jolla, California, USA
Gavril Pasternak, New York, New York, USA
Diana Pettit, Bronx, New York, USA
Andrew Plested, Bethesda, Maryland, USA
Victoria Risbrough, San Diego, California, USA
Michael Robinson, Philadelphia, Pennsylvania, USA
Patricia Robledo, Barcelona, Spain
David Rossi, Portland, Oregon, USA
Jerome Sanes, Providence, Rhode Island, USA
Yael Stern-Bach, Jerusalem, Israel
Geoffrey T. Swanson, Chicago, Illinois, USA
Anne-Marie van Dam, Amsterdam, Netherlands
Maarten van den Buuse, Melbourne, Victoria, Australia
Jarda Wroblewski, Washington DC, District of Columbia, USA
Jared Young, La Jolla, California, USA
Xiang Yu, Shanghai, China
Xiongwei Zhu, Cleveland, Ohio, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Exceptions: It is the policy of Elsevier that authors need not obtain permission in the following cases only: (1) to use their original figures or tables in their future works; (2) to make copies of their papers for use in their classroom teaching; and (3) to include their papers as part of their dissertations

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee in this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

The Neuroscience Peer Review Consortium

Neuropharmacology is a member of the Neuroscience Peer Review Consortium (NPRC). The NPRC has been formed to reduce the time expended and, in particular, the duplication of effort by, and associated burden on reviewers involved in the peer review of original neuroscience research papers.

It is an alliance of neuroscience journals that have agreed to accept manuscript reviews from other Consortium journals. By reducing the number of times that a manuscript is reviewed, the Consortium will reduce the load on reviewers and Editors, and speed the publication of research results.

If a manuscript has been rejected by another journal in the Consortium, authors can submit the manuscript to *Neuropharmacology* and indicate that the referees' reports from the first journal will be made available to the Editors of *Neuropharmacology*.

It is the authors' decision as to whether or not to indicate that a set of referee's reports should be forwarded from the first journal to *Neuropharmacology*. If an author does not wish for this to happen, the manuscript can be submitted to *Neuropharmacology* without reference to the previous submission. No information will be exchanged between journals except at the request of authors. However, if the original referees' reports suggested that the paper is of high quality, but not suitable for the first journal, then it will often be to an author's advantage to indicate that referees' reports should be made available.

Authors should revise the original submission in accordance with the first journal's set of referee reports, and submit the paper to *Neuropharmacology* with a covering letter describing the changes that have been made, and informing the Editors that the authors will ask for the referee's reports to be forwarded from the Consortium journal. The authors then must contact the first journal, and ask that reviews be forwarded, indicating they have submitted to *Neuropharmacology*, providing the new manuscript ID number.

The Editors of *Neuropharmacology* will use forwarded referee's reports at their discretion. The Editors may use the reports directly to make a decision, or they may request further reviews if they feel such are necessary.

Visit <http://nprc.elsevier.com> for a list of Consortium journals, as well as further information on the scheme.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure**Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental**Experimental procedures**

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimise animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilise alternatives to in vivo techniques, if available.

Authors are advised to consult A fair press for animals [New Scientist (1992) 1816: 1830] before preparing their manuscript. The Editors reserve the right to reject papers if there is doubt whether suitable procedures have been used.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-iltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

For all accepted manuscripts, page proofs will be sent to the corresponding author (or the first-named author) for checking. **Corrections to the proofs must be restricted to printer's errors.** Any substantial alterations other than these may be charged to the author. Authors are particularly requested to return their corrected proofs as quickly as possible in order to facilitate rapid publication. Please note that **authors are urged to check their proofs carefully before return, since late corrections cannot be guaranteed for inclusion in the printed journal.** Reprints and copies of the issue (at a specially reduced rate) can be ordered on the form which will accompany the proofs. These should be returned to: Elsevier Ltd, Bampfylde Street, Exeter, EX1 2AH, U.K.

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

10.3. ANEXO C - SUBMISSÃO DO MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

Elsevier Editorial System(tm) for Neuropharmacology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: PEPTIDE YY (3-36) MODULATES CALCIUM INFLUX IN PRIMARY CULTURES OF RAT HIPPOCAMPAL CELLS

Article Type: Research Paper

Keywords: PYY (3-36); Y2 receptor; Influx of Calcium; Hippocampus.

Corresponding Author: Ms. Michelle Flores Domingues, Master degree student

Corresponding Author's Institution: Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul

First Author: Michelle Flores Domingues, Master degree student

Order of Authors: Michelle Flores Domingues, Master degree student; Dênis R Assis, PhD; Chariston A Dal Belo, PhD; Jaderson C da Costa, PhD

Abstract: Abstract

Peptide YY (3-36) [PYY (3-36)] is a peptide belonging to the NPY peptides family, synthesized in the intestine, and well-known for acting in hypothalamic neurons, where it binds to Y2 receptors and induces satiety. Besides its importance on eating behaviour and energy balance, recent evidence implicate PYY (3-36) in dopamine-dependent behaviors related to neuropsychiatric disorders and suicide. Besides, PYY (3-36) accumulation in patients after bariatric surgery to treat obesity correlates with an increase of suicide rates. Since brain regions linked to these behaviours are strongly modulated by the hippocampus, here we evaluated the effects of PYY (3-36) on calcium oscillations in primary cultures of hippocampal cells from rats. We show that several doses of PYY (3-36) increase calcium oscillations on hippocampal cells. Besides, experiments based on pharmacological interventions suggest that the increase of cytoplasmic calcium induced by PYY (3-36) is mediated at expenses of calcium mobilized from the endoplasmic reticulum by channels regulated by IP3 receptors. Case our results can be extrapolated for in vivo conditions, we suggest a possible involvement of hippocampal cells in the behavioural changes caused by PYY (3-36).

Neuropharmacology

Title: PEPTIDE YY (3-36) MODULATES CALCIUM INFLUX IN PRIMARY CULTURES OF RAT HIPPOCAMPAL CELLS

Authors: Michelle Flores Domingues, Master degree student; Dênis R Assis, PhD; Chariston A Dal Belo, PhD; Jaderson C da Costa, PhD

Article Type: Research Paper

Dear Michelle,

Your submission entitled "PEPTIDE YY (3-36) MODULATES CALCIUM INFLUX IN PRIMARY CULTURES OF RAT HIPPOCAMPAL CELLS" has been received by Neuropharmacology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/neuropharm/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Neuropharmacology

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com