

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

Participação da leptina na modulação de eventos
aversivos

CARLA JUNIA SANTOS

Belo Horizonte

2014

CARLA JUNIA SANTOS

Participação da leptina na modulação de eventos aversivos

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Cristina Aguiar

Belo Horizonte

2014

*Dedico esse trabalho à Carolina, à minha mãe,
à minha avó-mãe Zorita e ao meu avô-pai José (in memoriam).*

“Aquele que toma a realidade e dela faz um sonho é um poeta, um artista”.

Artista e poeta será também aquele que do sonho faz a realidade.”

Malba Tahan

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra Daniele Cristina de Aguiar, orientadora e mãe científica, pela oportunidade, confiança, disponibilidade, dedicação, paciência e pela excelente orientação, ainda que um por breve período, mas suficiente para um enorme crescimento pessoal e profissional.

A toda a equipe do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, repleta de profissionais extremamente qualificados, que não apenas contribuíram para o enriquecimento do meu conhecimento, mas sem dúvida para meu crescimento pessoal, especialmente ao Prof. Dr. Fabrício Moreira, que muito mais do que um professor e grande pesquisador, um grande poeta, obrigada pelas sábias palavras.

Aos companheiros do Laboratório de Neuropsicofarmacologia pelo apoio, pelas trocas e por tantos momentos de descontração, especialmente à Thércia, Pedro e Ana Luisa, companheiros de projetos, pelo apoio incessante, por tamanha paciência e disponibilidade, sobretudo nos momentos finais desse trabalho.

Ao CNPq (2010- 2012) pelo apoio financeiro para realização desse trabalho.

A Deus por todos os dias de força, superação e esperança.

À minha família Santos, especialmente minha mãe, minha “vó-mãe” Zorita e meu “vô-pai” José (*in memorian*), por terem me possibilitado a vida e por sempre acreditarem em mim.

À minha família Alves da Silva, especialmente à Cida, Paulo e Fernanda que acolheram a mim e a minha filha em seu cerne, para que eu pudesse realizar esse trabalho.

Ao Fábio pelo companheirismo, paciência e credibilidade a mim confiada durante a realização desse trabalho e à Carol, simplesmente por ser minha fiel companheira em todos os momentos e por tornar meus dias melhores e mais esperançosos.

Às “ladies” do ICB, por nossos chás, almoços e outros tantos bons momentos, especialmente às queridas amigas Isabel e Mari pelo companheirismo, apoio, confiança e pela amizade. Adoro vocês amigas!

À minha amiga-irmã Flávia Almeida, a qual carregarei sempre comigo, por seu exemplo de simplicidade, força, garra e dedicação, muito obrigada pelo grande apoio, dedicação, disponibilidade, companheirismo, confiança, paciência e pela amizade. Você é mais do que especial, uma grande amiga.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
Revisão da literatura	13
1.1. A Leptina.....	14
1.2. Leptina e sinalização intracelular	16
1.3. Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	17
1.4. Leptina e ansiedade.....	19
1.5. Ansiedade	20
1.6. Comportamento defensivo	23
1.7. Neurotransmissores envolvidos na modulação de respostas defensivas	24
1.8. Óxido nítrico	24
1.9. Neurotransmissão nitrérgica e leptina.....	26
Objetivos	28
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
Materiais e métodos	30
3.1. Animais	31
3.2. Drogas	31
3.3. Cirurgia estereotáxica	32
3.4. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)	32
3.5. Testes comportamentais.....	33
3.5.1 Labirinto em cruz elevado.....	33
3.5.2 Teste de lambrer punido de Vogel	34
3.5.3 Teste de Retirada de Cauda: Tail-flick.....	35
3.6. Histologia	36
3.7. Delineamento experimental	38
3.8. Análise Estatística	40

Descrição dos Resultados.....	41
4.1. Efeito da leptina no LCE	42
4.2. Efeito da leptina no teste de lambert punido de Vogel	44
4.3. Efeito do pré-tratamento de N-propil-l-arginina, um inibidor seletivo da nNOS, sobre os efeitos da injeção de leptina no LCE	46
4.4. Efeito do pré-tratamento de l-arginina, precursor de NO, sobre os efeitos da injeção de leptina no LCE	50
Discussão.....	54
Referências bibliográficas	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Labirinto em cruz elevado.

Figura 2: Teste de lamber punido de Vogel.

Figura 3: Teste tail-flick.

Figura 4: Efeito da leptina (0,1µg/µL, 1,00µg/µL, 3,00µg/µL e 10,0µg/µL) injetada *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE.

Figura 5: Efeito da leptina 10,0µg/µL administrada *i.c.v.* em ratos avaliados no teste de lamber punido de Vogel.

Figura 6: Efeitos da morfina 5mg/kg (IP), leptina 10,0µg/µL (*icv*) e veículo (*icv*) em ratos, no teste de retirada da cauda.

Figura 7: Efeito de NPLA (0,1pmol/µL, 1,0pmol/µL e 10,0pmol/µL) injetado *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE.

Figura 8: Efeito do pré-tratamento de NPLA 10,0pmol/µL no efeito promovido pela leptina injetada *i.c.v.* (10,0µg/µL) em ratos expostos ao LCE.

Figura 9: Efeito de l-arginina (10nmol/µL, 100nmol/µL e 300nmol/µL) injetada *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE.

Figura 10: Efeito do pré-tratamento de l-arginina 10,0nmol/µL no efeito promovido pela leptina injetada *i.c.v.* (10,0µg/µL) em ratos expostos ao LCE.

Figura 11: Efeito inibitório da leptina sobre a formação de NO endógeno e seu papel tipo-ansiolítico.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA: Análise de variância
AP: Anteroposterior
CRH: Hormônio liberador de corticotrofina
E.P.M.: Erro padrão da média
EDRF: Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GCs: Guanilato ciclase solúvel
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina
HPA: Hipotálamo-hipófise-adrenal
I.C.V.: Intracerebroventricular
I.P.: Intraperitoneal
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
JAK: Quinases da família *Janus*
L: Lateral
L-ARG: L-arginina
LCE: Labirinto em Cruz Elevado
nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
NPLA: N-propil-L-arginina
NPY: Neuropeptídeo Y
NS: Não significativo
OB: Obese
OB-R_L: Receptor de forma longa para leptina
OB-R_S: Receptor de forma curta para leptina
SCPdl: substância cinzenta periaquedutal dorsolateral
SNC: Sistema nervoso central
STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição
VTA: Área tegmental ventral

RESUMO

A leptina é um hormônio secretado principalmente pelo tecido adiposo branco, caracterizado como uma proteína circulante, inicialmente descrita como importante regulador do metabolismo energético e do peso corporal. Após ser produzido, esse hormônio atinge seus locais de ação no sistema nervoso central através de um sistema de transporte saturável na barreira hematoencefálica. Os receptores para leptina estão localizados principalmente no hipotálamo, porém eles também são expressos em outras regiões encefálicas, dentre elas, regiões relacionadas a transtornos como ansiedade e depressão, como córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, sugerindo que a leptina possa exercer um papel modulador sobre os transtornos de humor. Vários neurotransmissores podem modular as respostas emocionais relacionadas com o comportamento defensivo, dentre eles o óxido nítrico (NO). Dados da literatura demonstram que a leptina parece modular a síntese de NO. Baseado nessas evidências, este trabalho investigou a participação da leptina em dois modelos animais de ansiedade: o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Teste de Lamber Punido de Vogel. Além disso, verificou-se a hipótese de que os efeitos da leptina seriam decorrentes da inibição de NO. Os resultados mostram que a injeção *i.c.v.* de leptina (10,0µg/µL) promoveu efeito tipo ansiolítico nos dois modelos utilizados, aumentando a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE e o número de lambidas punidas no Teste de Lamber Punido de Vogel. O efeito tipo ansiolítico verificado no LCE foi revertido quando os animais foram pré-tratados com l-arginina, um precursor de NO, sugerindo que esse efeito é mediado por uma facilitação da sinalização nitrérgica. Dessa forma conclui-se que a leptina também participa nas respostas defensivas relacionadas à ansiedade, possivelmente inibindo a neurotransmissão nitrérgica.

Palavras-chave: Leptina, óxido nítrico, ansiedade, labirinto em cruz elevado, teste de lamber punido de Vogel.

ABSTRACT

Leptin is an adipokine secreted mainly by adipocytes and plays a pivotal role in metabolism homeostasis and body weight. It reaches the central nervous system via a saturable transport system through the blood-brain barrier. The leptin receptors are expressed mainly in hypothalamus, however they are also present in brain regions related to anxiety and depression related behaviors, such as, prefrontal cortex, amygdala and hippocampus suggesting that leptin could also be involved in stress related responses. Several neurotransmitters may be involved in the control of mood disorders, including nitric oxide (NO). Moreover, leptin may be related with NO production. However, the role of this peptide on behavioral consequences related to stressful events is poorly understood. Thus, the aim of this study was verify the role of leptin in two animal models of anxiety, the elevated plus maze and Vogel Conflict test. We also verified if the leptin effect on anxiety-response were due NO inhibition. Our results showed that the injection of 10 µg/1µL significantly increased the percentage of entries in the open arms as compared to vehicle group, suggesting an anxiolytic-like effect. No effects were observed in the number of entries into the enclosed arms, suggesting that its effects were not related to impairment in locomotion. Moreover, leptin also induced anxiolytic-like effects in the VCT, observed by a significantly increase in the number of punished licks. These effects were not related with water consumption or nociceptive threshold, discarding potential confounding factors for the Vogel conflict test. The leptin effects in the EPM test were prevented by L-arginine, suggesting that its effects were related to NO inhibition. In conclusion, our results showed that *i.c.v.* injections of leptin induced anxiolytic-like effects in two different animal models of anxiety, suggesting that this peptide could also modulate anxiety-related responses, possibly through inhibition of NO synthesis.

Keywords: Leptin, nitric oxide, anxiety, elevated plus maze, Vogel conflict test.

Revisão da literatura

1.1. A Leptina

A leptina, codificada pelo gene “*obese (ob)*”, foi inicialmente caracterizada como um hormônio circulante secretado principalmente pelo tecido adiposo (ZHANG et al. 1994). Constitui-se por uma proteína de 16-kDa, com 167 resíduos de aminoácidos, e atinge o encéfalo por sistema de transporte saturável na barreira hemato-encefálica (BADO et al. 1996). Atualmente sabe-se que a leptina também é produzida por outros tecidos, como placenta (MASUZAKI et al. 1997), músculos (WANG et al. 1998) e sistema nervoso central [SNC, (DEL BIANCO-BORGES et al.; MORASH et al. 1999; UR et al. 2002)].

Seus efeitos são principalmente na regulação do metabolismo, do comportamento alimentar, do balanço energético e da reprodução (HIMMS-HAGEN, 1999; AHIMA et al. 2000). Adicionalmente, a leptina pode modular a liberação de hormônios relacionados com a resposta ao estresse, como por exemplo, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no hipotálamo e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise (SPINEDI; GAILLARD, 1998).

O conhecimento que se tem sobre a leptina foi possível graças ao desenvolvimento de dois importantes modelos animais, um, inicialmente de obesidade, com animais nocautes para a proteína *ob* e outro, inicialmente de diabetes, com animais nocautes para a proteína *db*. Porém, esses animais com diferente genótipo apresentam um fenótipo semelhante, a mutação do gene *obese (ob)*, localizado no cromossomo 6, resulta em animais estéreis, com obesidade profunda, diabetes tipo II (INGALLS, et al. 1950) e hipercorticosteronemia (GARTHWAITE, et al. 1980). Já o genótipo *db/db*, resultante da mutação do gene *db*

situado no cromossomo 4, promove um fenótipo semelhante aos mutantes do gene *ob* (HUMMEL, et al. 1966). A partir desses trabalhos denominou-se leptina (do grego *leptós* = magro) a proteína codificada pelo gene *ob* (HALAAS, et al. 1995)].

A mutação observada em animais *ob/ob*, resulta em severas anormalidades neuroendócrinas e metabólicas, dentre as quais, obesidade mórbida e hiperfagia (CAMPFIELD et al. 1995, HALAAS et al.1995), hiperinsulinemia, dislipidemias, hiperglicemia e resistência à insulina, além de diminuição do metabolismo e da temperatura corporal (PELLEYMOUNTER et al. 1995). A administração central e sistêmica de leptina é capaz de reduzir a ingesta alimentar e o peso corporal desses animais (CAMPFIELD et al. 1995; HALAAS et al. 1995). Esses efeitos não foram observados em animais *db/db*, sugerindo que esses animais são incapazes de responder adequadamente à proteína *ob* circulante (CAMPFIELD et al. 1995).

Surpreendentemente, a síntese de leptina não está comprometida em animais obesos, ao contrário sua expressão está aumentada na obesidade, sugerindo um possível mecanismo de resistência (FREDERICH et al. 1995; MAFFEI et al. 1995; CONSIDINE et al. 1995; LONNQVIST et al. 1995; HALAAS et al. 1995).

Mesmo antes da descoberta da leptina suspeitava-se que havia mecanismos hipotalâmicos de regulação da alimentação e do peso corporal (HETHERINGTON et al. 1940; ANAND et al. 1951). Com a descoberta do hormônio codificado pelo gene *ob*, foi possível identificar as áreas cerebrais e os mecanismos moleculares envolvidos no controle do comportamento alimentar e do balanço energético (GAUTRON; ELMQUIST, 2011).

1.2. Leptina e sinalização intracelular

Através da técnica de “*binding*” foi possível clonar um receptor de alta afinidade para a leptina, que é uma proteína homóloga aos receptores de citocina de classe I (TARTAGLIA et al. 1995), amplamente distribuído em distintas regiões cerebrais como hipotálamo (SCHWARTZ et al. 1996), córtex, hipocampo, tálamo (MERCER et al. 1996), trato olfatório, substancia nigra, núcleo dorsal da rafe, cerebelo, córtex piriforme (ELMQUIST et al. 1998), área tegmental ventral (FIGLEWICZ et al. 2003), além de outros tecidos como pulmão, fígado, músculo (TARTAGLIA et al. 1995).

Foram identificadas duas isoformas para esse receptor que diferem quanto ao número de resíduos de aminoácidos no domínio citoplasmático, um receptor de forma curta (OB-R_S), com apenas 34 resíduos de aminoácidos no domínio intracelular, expresso em diversos tecidos e outro de forma longa (OB-R_L), com 303 resíduos de aminoácidos no domínio citoplasmático (CHEN et al. 1996), o qual é expresso predominantemente no hipotálamo, sendo, portanto, fundamental para o controle do peso corporal (MERCER et al. 1996; TARTAGLIA 1997).

A clonagem do gene que codifica esse receptor permitiu verificar que a falha na sinalização para a manutenção do peso corporal observada em animais db/db, irresponsivos ao tratamento com leptina, estava relacionada a uma mutação no gene db, que resulta em um *stop codon* prematuro e consequente expressão de um receptor semelhante ao de forma curta [OB-R_S, (CHEN et al. 1996; CHUA et al. 1996)].

Para exercer a maioria dos seus efeitos, a leptina secretada por diferentes tecidos alcança o SNC por meio de um sistema de transporte saturável através da barreira hematoencefálica (BANKS et al. 1996).

No encéfalo a leptina exerce seus efeitos através da ativação de receptores acoplados a tirosina quinases, especificamente as quinases da família *Janus* (JAK) (TARTAGLIA et al. 1995). A ligação da leptina ao receptor desencadeia a dimerização do receptor acoplado às JAKs, seguida de uma série de fosforilações, incluindo autofosforilação associada às JAKs. O complexo receptor-JAKs fosforilados ativam as proteínas citosólicas do tipo STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) promovendo sua dimerização, translocação para o núcleo e consequente ativação da transcrição gênica (IHLE, 1996). Especificamente no hipotálamo, Vaisse e cols. (1996) demonstraram que a transdução de sinais pela leptina ocorre via ativação de STAT3, após única injeção sistêmica do hormônio em animais ob/ob, o que não ocorre em animais db/db, que apresentam mutação no receptor.

1.3. Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) apresenta uma estreita relação com o desenvolvimento de ansiedade (ARBORELIUS et al. 1999) e a leptina, por sua vez, também apresenta uma relação bem documentada com esse eixo (HEIMAN et al. 1997; SPINED; GAILLARD, 1998). Nesse sentido, observa-se que os níveis séricos de leptina são pulsáteis, com pico de concentração plasmática entre 20 e 04 horas, e inversamente relacionados aos níveis de cortisol (LICINIO et

al. 1997). Adicionalmente, o eixo HPA está ativado, com elevação dos níveis de hormônio adrenocorticotrófico na hipófise, em animais ob/ob (GARTHWAITE et al. 1980), sendo que o tratamento crônico com leptina recombinante corrige a hipercorticonemia desses animais, mas não em animais db/db (STEPHENS et al. 1995).

Dados da literatura mostram que há redução dos níveis de leptina concomitantemente à elevação dos níveis de cortisol, observada após o estresse agudo promovido por incisão cirúrgica (KAIN et al. 1999). O pré-tratamento com leptina reduz, de maneira dose dependente, os níveis séricos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona em animais submetidos ao estresse de restrição, um modelo animal que promove ativação do eixo HPA, sugerindo que a leptina possui um papel inibitório sobre esse eixo (HEIMAN et al. 1997).

Interessantemente, animais adrenalectomizados, os quais apresentam falha no mecanismo de retroalimentação negativa do eixo HPA, tem seus níveis de ACTH extremamente elevados e queda dos níveis de leptina (SPINEDO; GAILLARD, 1998), o que corrobora a idéia de que esse hormônio participa do mecanismo de retroalimentação regulado pelos glicocorticoides (HEIMAN et al. 1997). Esse mecanismo é considerado essencial para adaptação do organismo ao estresse e o mau funcionamento desse sistema está intimamente relacionado ao desenvolvimento de condições patológicas comportamentais, dentre as quais, ansiedade e depressão (CHROUSOS, 2009). É possível que indivíduos que possuem hipoleptinemia e apresentem depressão ou distúrbios de ansiedade apresentem um prejuízo neste mecanismo de retroalimentação do eixo HPA (LIAO et al. 2006).

Apesar de tantas evidências sobre a importância da leptina para o funcionamento adequado do eixo HPA, seu papel em eventos estressores ainda é pouco estudado.

1.4. Leptina e ansiedade

Os receptores para leptina são expressos no SNC em diversas regiões incluindo regiões extra-hipotalâmicas relacionadas com a elaboração de respostas comportamentais relacionadas com ansiedade e depressão, como por exemplo, córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e mesencéfalo (HARVEY, 2007), sugerindo que esse hormônio exerce um controle sobre as respostas emocionais. Porém, os dados referentes à sua participação sobre os comportamentos relacionados à ansiedade ainda são escassos, ressaltando-se a importância de estudos que verifiquem a participação desse hormônio na modulação de respostas emocionais.

Estudos epidemiológicos mostram que a obesidade apresenta-se frequentemente como co-morbidade com alguns transtornos psiquiátricos, principalmente depressão e ansiedade (CARPENTER et al. 2000; BECKER et al. 2001; ONYIKE et al. 2003; SIMON et al. 2006; SCOTT et al. 2008). Dados da literatura revelam redução significativa dos níveis plasmáticos e no líquido cefalorraquidiano de leptina em paciente deprimidos (JOW et al. 2006; WESTLING et al. 2004), reforçando a possibilidade de que a leptina exerça uma modulação sobre respostas emocionais.

Nesse contexto, animais submetidos a diferentes estressores apresentaram alteração comportamental, caracterizada pela redução da ingestão de solução de

sacarose, acompanhada de redução dos níveis plasmáticos de leptina, sendo esses efeitos revertidos pelo tratamento com leptina (LU et al. 2006). Analogamente, animais ob/ob (ZHANG et al. 1994), apresentaram comportamento do tipo depressivo no teste do nado forçado (COLLIN et al. 2000) e comportamento tipo ansiogênico, em modelos bem estabelecidos de ansiedade, como na caixa claro-escuro (FINGER, et al. 2010) e no labirinto em cruz elevado [LCE, (ASAKAWA et al. 2003)], sendo que o efeito tipo ansiogênico observado no LCE foi revertido pela administração de leptina (ASAKAWA et al. 2003). Adicionalmente, animais db/db, mutantes para o receptor de forma longa para o peptídeo codificado pelo gene ob (CHEN et al. 1996; CHUA et al. 1996), também apresentaram comportamento tipo depressivo no teste do nado forçado, porém demonstraram comportamento tipo ansiolítico no LCE (SHARMA et al. 2010).

1.5. Ansiedade

Os transtornos mentais representam importante problema de saúde pública mundial. Segundo um estudo epidemiológico, 121 milhões de pessoas sofrem de depressão em todo o mundo (BROMET, et al. 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a depressão constitui a segunda maior causa de incapacidade do mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, que ocupam o primeiro lugar. Os transtornos da ansiedade também relevância estatísticas, sendo que o transtorno de ansiedade generalizado (TAG) consiste no transtorno mental com maior prevalência no mundo após a depressão (World Health Organization (WHO), 2014).

A ansiedade é uma emoção semelhante ao medo, contudo, esse é consequência de ameaça definida enquanto a ansiedade manifesta-se quando a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (GRAEFF, 2001). A ansiedade, como resposta fisiológica, pode ser considerada um fenômeno adaptativo com duração e intensidade apropriadas, fundamental ao homem no enfrentamento das situações que lhe são impostas pela vida. É considerada uma das respostas inatas mais importantes dos indivíduos, já que a antecipação mental de um possível ataque por predadores possibilitou o surgimento de estratégias eficazes de fuga ou enfrentamento, o que garantiu a integridade física e a continuidade da espécie (NUTT, 1990; DRACTU & LADER, 1993).

Níveis normais de ansiedade são benéficos aos indivíduos, já que promovem uma melhoria no desempenho de atividades motoras e cognitivas (GRAEFF, 1999). Porém, quando esses níveis ultrapassam certo limiar, o qual varia de pessoa para pessoa, e causam prejuízos funcionais, estabelece-se uma condição patológica, denominada “Transtorno de ansiedade”. A distinção entre a ansiedade normal e a patológica baseia-se na intensidade e duração das manifestações, grau de limitação provocado e na proporcionalidade entre o evento desencadeante e a reação do indivíduo. Portanto, quando a ansiedade é intensa, persistente, desproporcional às possíveis causas aparentes e interfere de maneira considerável no funcionamento do indivíduo, dever ser considerada doença e alvo de intervenção médica (NUTT, 1990; HETEM, 2004).

Os transtornos da ansiedade manifestam-se como um conjunto de alterações psíquicas e somáticas, desencadeadas, dentre outros fatores, pela ativação do sistema nervoso simpático e do eixo HPA, que muitas vezes não são exclusivas

desses distúrbios, dessa forma, para facilitar o diagnóstico são adotados manuais internacionais, como o Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM – *Diagnostic Statistical Manual of Mental Diseases*) desenvolvido pela Associação Americana de Psiquiatria, em sua quinta revisão (DSM-V, 2013), conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos transtornos de ansiedade, segundo DSM-V, 2013.

Transtorno de ansiedade da separação

Mutismo seletivo

Fobia específica

Transtorno de ansiedade social (fobia social)

Transtorno de pânico

Ataque de pânico

Agorafobia

Transtorno de ansiedade generalizado

Transtorno de ansiedade induzido por substâncias/medicamentos

Transtorno de ansiedade associado a uma condição médica

Transtorno de ansiedade de outra especificação

Transtorno de ansiedade inespecífico

1.6. Comportamento defensivo

Os modelos animais de ansiedade fundamentam-se nas perspectivas evolutivas instituídas por Charles Darwin em seu livro “The Expression of Emotions in Man and Animals” (1872), no qual ele descreve as cinco emoções básicas que se preservaram nas diferentes espécies animais, são elas, alegria, medo, raiva, nojo, surpresa. No que diz respeito a ansiedade, a perspectiva evolutiva sugere que tal emoção está associada às estratégias de defesa emitidas em resposta a perigos que os animais encontram em seu nicho ecológico.

O comportamento defensivo consiste em uma série de respostas defensivas que os animais apresentam frente a estímulos ameaçadores ou situações de perigo como, por exemplo, a exposição a predadores ou ainda o confronto entre animais da mesma espécie. Além desses, fatores ambientais como a iluminação, altura, exposição a lugares ou objetos novos também representam condições aversivas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Uma vez expostos a situações de perigo, os animais expressam respostas defensivas, tais como fuga, congelamento, avaliação de risco, esquiva, ameaça ou ataque defensivo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; GRAEFF et al, 1998; ZANOVELI, 2005). Em seu livro “The Expression of Emotions in Man and Animals” Darwin observou uma semelhança entre o comportamento dos humanos e dos demais animais na expressão das emoções de natureza aversiva.

A partir desta perspectiva, diversos trabalhos foram realizados com o intuito de determinar as bases neurobiológicas responsáveis pelo desencadeamento de respostas comportamentais, bem como as bases envolvidas nos transtornos de

ansiedade (CANTERAS et al, 2001; CAROBREZ et al, 2001; BRANDÃO et al, 2003; BERGINK et al, 2004; JAVITT, 2004; GUIMARÃES et al, 2005).

1.7. Neurotransmissores envolvidos na modulação de respostas defensivas

Diferentes neurotransmissores estão envolvidos na modulação da atividade dos circuitos neuroanatômicos responsáveis pelas respostas defensivas, dentre eles o hormônio liberador de corticotrofinas, neuropeptídeo Y, substância P, transmissores monoaminérgicos (noradrenalina, serotonina e dopamina), ácido gama-aminobutírico (GABA), óxido nítrico, glutamato, vanilóides e canabinóides (BERGINK et al. 2004; DEAKIN; GRAEFF, 1991; GUIMARÃES et al. 2005; MOREIRA et al. 2009; MOREIRA et al. 2011).

1.8. Óxido nítrico

Até o final da década de 70, o óxido nítrico (NO) era considerado membro de uma família de poluentes atmosféricos, participando da chamada chuva ácida e da formação de carcinógenos em potencial.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki, utilizando-se de preparações de aortas de coelho pré-contraídas com noradrenalina, demonstraram que a acetilcolina era capaz de promover o relaxamento da musculatura lisa vascular dependente da integridade da camada endotelial. A interação da acetilcolina com receptores muscarínicos presentes em células endoteliais levaria à liberação de um fator responsável pela vasodilatação, inicialmente denominado Fator de Relaxamento

Derivado do Endotélio (EDRF). Mais tarde, em 1987, Ignarro e colaboradores identificaram quimicamente o EDRF como sendo o óxido nítrico (NO), estabelecendo sua importância como molécula sinalizadora no sistema vascular.

O NO é produzido endogenamente a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina pela enzima NO sintase (NOS) (MONCADA et al. 1991; MONCADA et al. 1989), a qual possui três isoformas, uma induzível pelo estímulo inflamatório (iNOS) e duas constitutivas: a NOS endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), ambas com atividade dependente do aumento da concentração de cálcio citoplasmático (MONCADA et al. 1991).

Além do relaxamento vascular, o NO modula uma série de processos fisiológicos, dentre eles: regulação genética, apoptose, função plaquetária, neurotransmissão, memória, ativação do sistema imune, reprodução, dentre outros (LANCASTER, 1996; NAPOLI; IGNARRO, 2003).

No SNC, o NO está presente em neurônios do cerebelo, substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPdl), colículos superior e inferior, giro denteado do hipocampo, núcleo do leito da estria terminal, camadas superficiais do córtex cerebral, bulbo olfatório, etc. (BREDT et al. 1990), onde atua na regulação da excitabilidade e da taxa de disparos neuronais, modulação da plasticidade sináptica, neurotoxicidade e neuroproteção (PRAST; PHILIPPU, 2001). Além disso, diversos trabalhos demonstram a participação do NO na fisiopatologia de diversos distúrbios neuropsiquiátricos (CUNNINGHAM; FERKANY; ENNA, 1994), incluindo distúrbios de ansiedade (DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2001).

A nNOS, expressa constitutivamente no SNC, está amplamente distribuída em diferentes regiões encefálicas relacionadas com comportamentos de medo e

ansiedade, como hipotálamo, amígdala e SCPdl (VINCENT; KIMURA 1992). Trabalhos da literatura demonstram que o NO exerce um importante controle nos estados emocionais relacionados à ansiedade, possivelmente facilitando-os (GUIMARAES et al. 2005).

1.9. Neurotransmissão nitrérgica e leptina

Diferentes populações de neurônios nitrérgicos estão distribuídas em regiões encefálicas que também expressam neurônios leptinérgicos, dentre elas núcleo arqueado hipotalâmico, hipotálamo lateral, hipotálamo ventromedial, núcleo dorsomedial hipotalâmico, núcleo pré-mamilar ventral e núcleo do trato solitário (VINCENT et al. 1992; ELMQUIST et al. 1998; SCOTT et al. 2009; IWASE et al. 1998).

Alguns trabalhos demonstram que a leptina exerce seus efeitos centrais através da interação com o NO (CALAPAI et al. 1999; BARATTA et al. 2002; KOSIOR-KORZECKA; BOBOWIEC 2006). Nesse sentido, tanto a administração sistêmica quanto intra-cerebroventricular de leptina foi capaz de inibir a atividade da nNOS em camundongos (CALAPAI et al. 1998). Trabalhos do mesmo grupo demonstraram que a via do NO está diretamente relacionada com os efeitos promovidos pela leptina no controle da ingestão de alimentos e peso corporal (CALAPAI et al. 1999). Adicionalmente, demonstrou-se que a leptina promove anorexia em aves através da inibição da nNOS, sendo este efeito revertido pelo precursor de NO, L-arginina (YANG; DENBOW, 2007).

Mehebi-Mojaat e cols. (2009) demonstraram que a leptina em preparações isoladas de adipócitos, induz o aumento da síntese de NO. Niang e cols. (2011) demonstraram no mesmo tecido que a leptina induz lipólise e oxidação de ácidos graxos não esterificados via aumento da síntese de NO, visto que esse efeito foi revertido pelo pré-tratamento com um inibidor de NOS e foi reproduzido pelo pré-tratamento com um doador de NO. Porém, recentemente, Donato e cols. (2010) demonstraram que a leptina é capaz de induzir a fosforilação da nNOS em neurônios hipotalâmicos.

Dessa forma, considerando-se as ações da leptina sobre o eixo HPA e sobre a neurotransmissão nitrérgica, seria possível sugerir que os efeitos do tipo ansiolíticos promovidos pela leptina sejam devido à inibição dessas vias.

Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é verificar se a leptina é capaz de exercer efeitos do tipo ansiolítico em modelos animais de ansiedade.

2.2. Objetivos específicos

- a) Testar a hipótese de que a leptina exercerá efeitos ansiolíticos em animais submetidos ao LCE e ao teste de lambar punido de Vogel;
- b) Testar a hipótese de que os efeitos comportamentais promovidos pela leptina decorrem da inibição do óxido nítrico (NO).

Materiais e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, pesando entre 300-330 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal (protocolo 57/2011).

Os ratos foram mantidos em grupos de 5 animais por gaiola, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de 12 h (início às 7:00 h) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Leptina recombinante (Sigma-Aldrich®): 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, diluída em Tris-HCl 20mM, pH 8,0 e cloreto de sódio 0,9% (DEL BIANCO-BORGES et al. 2010).
- L-arginina, l-arg (precursor de NO, Sigma-Aldrich®): 10nmol/ μL , 100nmol/ μL , 300nmol/ μL , diluída em cloreto de sódio 0,9% (DEL BEL et al. 2005).
- N-propil-l-arginina, NPLA (inibidor seletivo de nNOS, Tocris®): 0,1pmol/ μL , 1,0pmol/ μL , 10,0pmol/ μL , diluído em cloreto de sódio 0,9% (AGUIAR et al. 2009).
- Morfina (analgésico opioide, Sigma-Aldrich®): 5mg/kg/mL, diluído em cloreto de sódio 0,9% (MOREIRA et al. 2006).

3.3. Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com Ketamina (60,0mg/Kg) e Xilazina (8,0mg/Kg), via i.p. e fixados a um aparelho estereotáxico. Foi realizada uma incisão sagital para exposição da calvária e remoção do periósteo, a calota craniana foi perfurada com um orifício (coordenadas: AP-bregma 0,6mm, L-2,0mm, P-3,8mm, ângulo-90°, PAXINOS; WATSON, 1997) para introdução da cânula guia (10mm) dirigida ao ventrículo lateral direito, a qual foi fixada ao crânio com cimento acrílico, conforme descrito em trabalhos prévios (GUIMARÃES et al. 1991; AGUIAR et al. 2006). Foi introduzido na cânula um mandril de aço inoxidável para evitar obstrução. Os animais receberam injeção de pentabiótico e do analgésico, antitérmico e antiinflamatório Banamine® (Flunixin Meglumine, 1mL/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (7 dias) e então foram submetidos à injeção no ventrículo lateral direito.

3.4. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)

Para o procedimento da injeção segurou-se o animal gentilmente para retirada do mandril e introdução, pela cânula guia, de uma agulha odontológica gengival (10,5mm), até atingir o ventrículo lateral direito, 0,5mm abaixo da extremidade da cânula. A agulha foi conectada a uma seringa Hamilton® de 10µL por meio de um segmento de Polietileno (P10). As injeções foram realizadas com ajuda de uma bomba de infusão Insight® a uma velocidade de 1µl/min em um volume de 1,0µL.

3.5. Testes comportamentais

3.5.1 Labirinto em cruz elevado

O aparelho é constituído de quatro braços de iguais dimensões, sendo dois deles abertos e dois fechados situados a 50 cm de altura do solo (Figura 1).

Após receberem o tratamento específico, cada animal foi colocado na plataforma central do equipamento com a face virada para um dos braços fechados para explorá-lo livremente durante 5 minutos. Os experimentos foram filmados com auxílio de uma câmara de vídeo (Microsoft®) localizada 1,5 metros acima do labirinto durante 5 minutos. Simultaneamente, foram analisados com auxílio do software ANY-MAZE (versão 4.5), o qual registra a posição do animal no LCE e calcula a percentagem de entradas nos braços abertos, a percentagem de tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas nos braços fechados do LCE. No intervalo entre os testes de cada animal o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (70 %). Após o teste os animais sofreram perfusão intracardíaca para remoção do encéfalo e posterior análise histológica do sítio de injeção.



Figura 1: Labirinto em cruz elevado

3.5.2 Teste de lamber punido de Vogel

A caixa de Vogel (Insight®) é constituída de acrílico (42x50x25 cm) e possui um assoalho de grade metálica. A garrafa de água é conectada ao interior da caixa através de um suporte metálico (Figura 2). O contato do animal com o assoalho e com a garrafa de água fecha um circuito elétrico controlado por sensor, o qual produz 7 pulsos/s quando o animal entra em contato com ambos os componentes. Cada pulso é considerado como uma lambida e a cada 20 lambidas o animal recebe um choque de 0,5 mA/2s. O sensor registra o número total de lambidas e de choques durante o período do teste.

Inicialmente os animais foram privados de água por 24 horas, após esse período eles foram colocados na caixa e beberam água durante 3 minutos (pré-teste). Vinte e quatro horas após o pré-teste, os animais receberam o tratamento farmacológico e 10 minutos após foram colocados na caixa para realização do teste.

O teste inicia-se a partir do momento que o animal começa a lambe o bebedouro, nessa situação a cada 20 lambidas um choque era administrado. O teste teve a duração de 3 minutos, o número total de choques e o número total de lambidas foi registrado pelo aparelho.



Figura 2: Teste de lambeo punido de Vogel

3.5.3 Teste de Retirada de Cauda: Tail-flick

O teste de tail-flick, utilizado para avaliar efeito nociceptivo de drogas, consiste em uma plataforma de acrílico com uma resistência metálica, mantidos à temperatura ambiente (Figura 3). No momento do teste aciona-se o aquecimento da resistência, a qual tem um aumento de temperatura de 9°C/s, através de passagem de corrente elétrica.

Após o tratamento a cauda dos animais, é gentilmente colocada em contato com a resistência do equipamento, o aquecimento é acionado até que o reflexo de

retirada da cauda seja obtido. Realiza-se a medida basal da latência de retirada da cauda e 10, 20, 30 e 40 minutos após a injeção das drogas.

O teste tail-flick é utilizado para avaliar se o efeito de drogas que apresentam efeito ansiolítico no teste de Vogel não é devido a um efeito nociceptivo da mesma (MOREIRA et al. 2006).



Figura 3: Teste tail-flick

3.6. Histologia

Ao término dos testes realizou-se a verificação do local da injeção. Os animais foram anestesiados com Uretana (25%, 5mL/Kg de peso) e sofreram perfusão intracardíaca com salina 0,9 % e formol 10 %. Os encéfalos foram extraídos, estocados em formol 10 % por três dias, e cortados, ao nível do sítio de injeção, em secções de 50 μ m de espessura em um criostato (Microm HM 505 N). Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e foram analisados para a

verificação do local de injeção com o auxílio de um microscópio, segundo os diagramas do Atlas PAXINOS; WATSON, 1997.

3.7. Delineamento experimental

3.7.1 Experimento 1: Efeito da leptina no LCE (n = 9-13 por grupo)

Nesse experimento os animais foram divididos em quatro (4) grupos: Tris-HCl 20mM: salina 0,9% (3:10) (1,0 μ L); Leptina 0,1 μ g/ μ L; Leptina 1,0 μ g/ μ L; Leptina 3,0 μ g/ μ L; Leptina 10,0 μ g/ μ L. Os animais foram expostos ao LCE 10 min após a administração das drogas e tiveram seu comportamento avaliado por 5 min.

3.7.2 Experimento 2: Efeito da leptina no teste de lamber punido de Vogel (n = 5-13 por grupo)

Nesse experimento os animais foram divididos nos seguintes grupos: Tris-HCl 20mM: salina 0,9% (3:10) e Leptina 10,0 μ g/ μ L. Os animais foram colocados na caixa 10 min após a administração das drogas e o teste durou 10 min.

3.7.3 Experimento 3: Efeito da leptina sobre o consumo de água e no teste Tail-flick (n = 5 por grupo)

Esse experimento teve como objetivo verificar se os efeitos da leptina não eram decorrentes de alteração do consumo de água nos animais ou alterações na resposta nociceptiva. Grupos experimentais: Tris-HCl 20mM : salina 0,9% (3:10) (1,0 μ L); Leptina 10,0 μ g/ μ L e Morfina 5mg/kg (utilizada apenas no teste do tail-flick).

3.7.4 Experimento 4: Efeito do pré-tratamento de NPLA sobre as respostas comportamentais promovidas pela Leptina no LCE.

Inicialmente realizou-se uma curva-dose resposta com o NPLA para determinar a dose que seria utilizada no experimento com a leptina. Para isso, realizamos os seguintes grupos experimentais: Salina 0,9% ; NPLA 0,1pmol/ μ L; NPLA 1,0pmol/ μ L e NPLA 10,0pmol/ μ L (n=7-8/grupo).

A partir desse experimento, optamos por utilizar a dose de 10pmol. Grupos experimentais: Salina (1,0 μ L) + Salina (1,0 μ L); Salina (1,0 μ L) + Leptina 10,0 μ g/ μ L; NPLA 10,0pmol/ μ L + Salina 0,9% (1,0 μ L); NPLA 10,0pmol/ μ L + Leptina 10,0 μ g/ μ L (n=9-13/grupo).

3.7.6 Experimento 6: Efeito do pré-tratamento da L-arginina, precursor de NO, sobre os efeitos mediados pela leptina no LCE

Da mesma forma que no experimento anterior, realizamos uma curva dose-resposta com a L-arginina para determinar a dose que seria utilizada no experimento com a Leptina. Grupos experimentais: Salina 0,9% (1,0 μ L); L-arginina 10,0nmol/ μ L; L-arginina 100,0nmol/ μ L; L-arginina 300,0nmol/ μ L (n=6-7/grupo).

A partir desse experimento optamos pela dose de 10,0nmol para a L-arginina. Grupos experimentais: Salina 0,9% (1,0 μ L) + Salina 0,9% (1,0 μ L); Salina 0,9% (1,0 μ L) + Leptina 10,0 μ g/ μ L; L-arginina 10,0nmol/ μ L + Salina 0,9% (1,0 μ L); L-arginina 10,0nmol/ μ L + Leptina 10,0 μ g/ μ L (n=11-15/grupo).

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) ou ANOVA de duas vias conforme apropriado, de acordo com a homogeneidade presente nos grupos experimentais. O nível de significância estabelecido foi $p < 0.05$, em caso de significância análises de post-hoc foram realizadas com o teste de Bonferroni.

Descrição dos Resultados

4.1. Efeito da leptina no LCE

A injeção *i.c.v.* da maior dose de leptina (10,0µg/µL) promoveu efeito tipo ansiolítico no LCE 10 minutos após a injeção. Esse efeito caracterizou-se pelo aumento significativo da porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE ($F_{(4,56)} = 1.69$, $p = 0.16$ - Duncan $p < 0.05$) em relação ao grupo controle (Figura 4).

O tratamento não promoveu diferença estatística em relação ao controle na porcentagem de tempo nos braços abertos ($F_{(4,56)} = 0,89$; ns). Não houve diferenças entre os grupos no número de entradas nos braços fechados ($F_{(4,56)} = 0,87$; ns - Figura 4), o que sugere que o efeito tipo ansiolítico não se correlaciona com alteração da atividade locomotora.

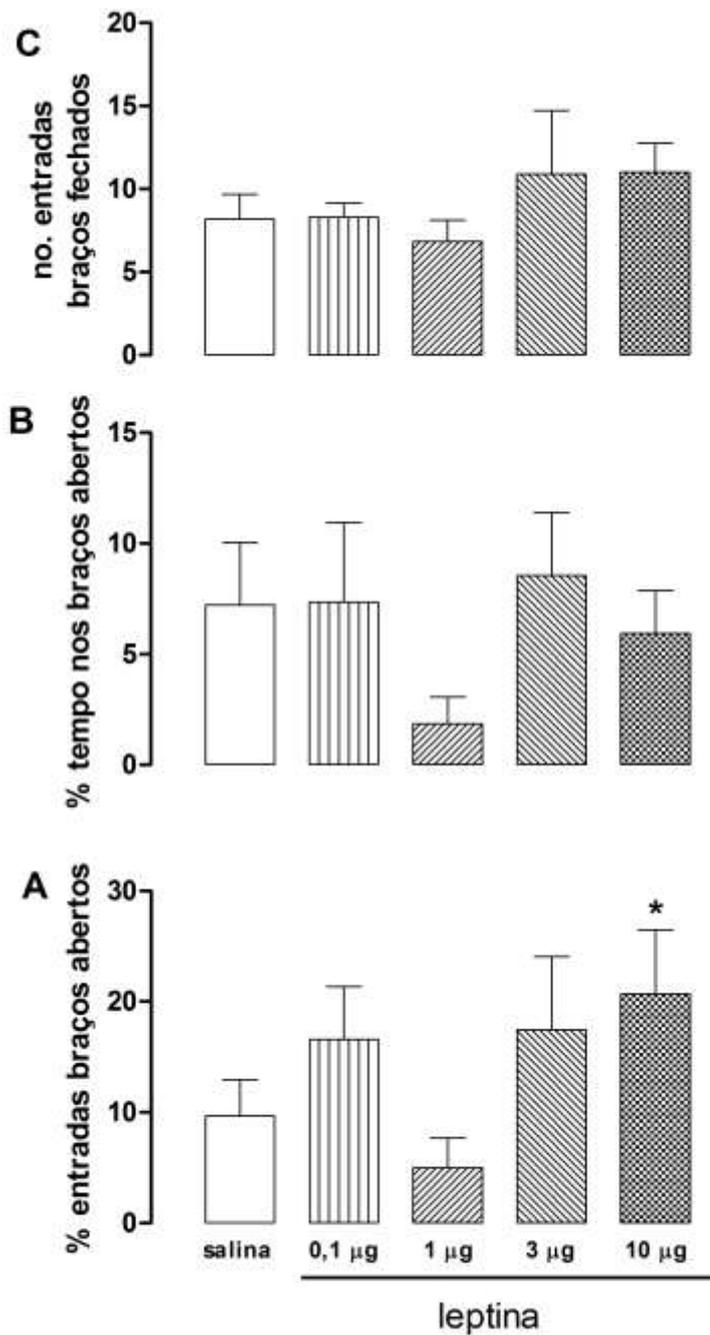


Figura 4: Efeito da leptina (0,1µg/µL, 1,00µg/µL, 3,00µg/µL e 10,0µg/µL) injetada *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE. As colunas representam a média ± E.P.M do número de entradas nos braços fechados (C), da porcentagem de tempo (B) e porcentagem de entradas (A) nos braços abertos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; ANOVA seguida de teste de Duncan, $n=9-13$ /grupo).

4.2. Efeito da leptina no teste de lambar punido de Vogel

A injeção *i.c.v.* da maior dose de leptina (10,0µg/µL) promoveu efeito tipo ansiolítico no teste de lambar punido de Vogel, caracterizado pelo aumento significativo do número de lambidas punidas ($t_{21}=2.51$, $p=0.02$ teste *t* Student) em relação ao grupo salina (Figura 5).

O teste de lambar punido de Vogel caracteriza-se por privar o animal de água durante quarenta e oito horas, dessa forma a leptina poderia aumentar o número de lambidas punidas não por um efeito simplesmente tipo-ansiolítico, mas talvez por ativação do centro hipotalâmico de sede. Para descartar tal possibilidade, realizou-se o teste de ingestão de água, sem a administração de choques, com a dose efetiva de leptina na caixa do teste de lambar punido de Vogel. A injeção *i.c.v.* da maior dose de leptina (10,0µg/µL) não promoveu diferença estatística no número de lambidas não punidas na caixa do teste de lambar punido de Vogel (veículo: 893.6 ± 71.36 , leptina 10,0µg/µL: 669.0 ± 77.32 , $t_8 = 2,14$; ns; $n=5$ /grupo), em comparação ao grupo controle.

Adicionalmente, esse teste envolve punição do animal, o que sugere que a leptina aumenta o número de lambidas punidas por exercer efeito antinociceptivo. Para eliminar essa hipótese realizou-se o teste de retirada da cauda. Nesse experimento, observou-se que a morfina (*i.p.* 5mg/Kg) aumentou significativamente em relação ao grupo controle a latência para retirada da cauda ($F_{2,14} = 12,29$, $p = 0,03$, ANOVA de medidas repetidas, seguida teste de Duncan), sugerindo um efeito anti-nociceptivo (Figura 6). A injeção *i.c.v.* de leptina (10,0µg/µL) não promoveu diferença estatística na latência de retirada da cauda, em comparação ao grupo controle (Figura 6).

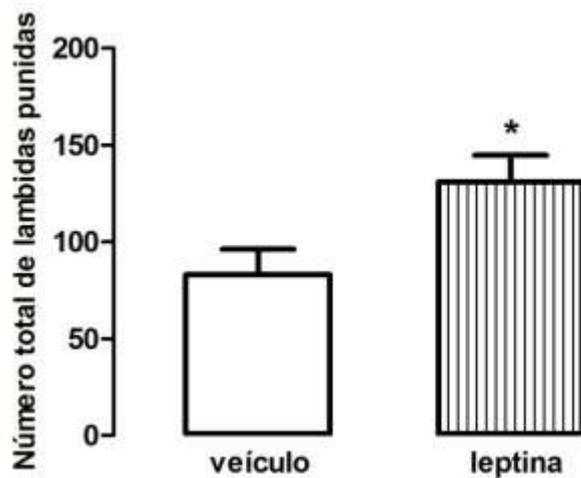


Figura 5: Efeito da leptina 10,0µg/µL administrada *i.c.v.* em ratos avaliados no teste de lamber punido de Vogel. As colunas representam a média do número total de lambidas punidas ± E.P.M. (* $p < 0,05$ comparado ao grupo salina, teste *t* Student, $n = 5-13$ /grupo).

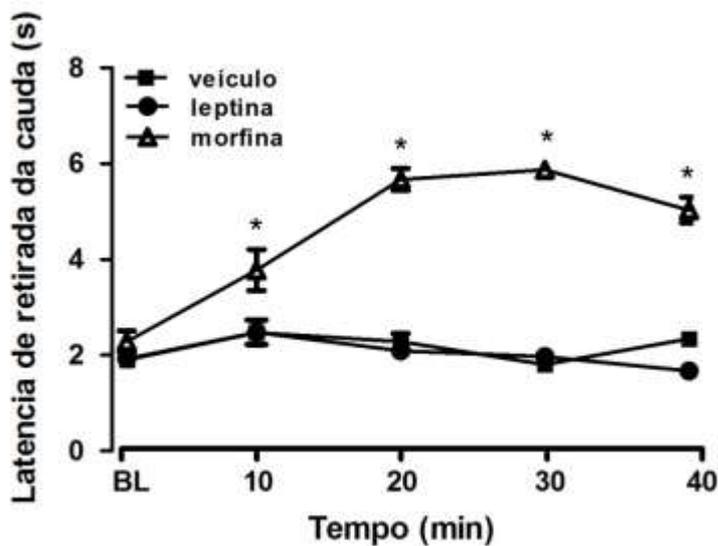


Figura 6: Efeitos da morfina 5mg/kg *i.p.*, leptina 10,0µg/µL (*icv*) e veículo (*icv*) em ratos, no teste de retirada da cauda. Cada ponto representa a média do tempo de latência de retirada da cauda ± E.P.M. (* $p < 0,05$, em relação ao grupo salina; ANOVA de medidas repetidas seguido do teste de Duncan, $n = 5$ /grupo).

4.3. Efeito do pré-tratamento de N-propil-l-arginina, um inibidor seletivo da nNOS, sobre os efeitos da injeção de leptina no LCE

Inicialmente, realizamos uma curva dose-resposta para o NPLA para determinar a dose que seria utilizada no experimento subsequente. A injeção *i.c.v* de NPLA (0,1pmol/μL, 1,0pmol/μL e 10,0pmol/μL) não promoveu diferença estatística na porcentagem de tempo ($F_{(3,29)} = 1,14$; ns) e entradas nos braços abertos ($F_{(3,29)} = 0,08$; ns- Figura 7), na porcentagem e no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,29)} = 0,51$; ns), em comparação ao grupo controle. Dessa forma, a dose de n-propil-l-arginina escolhida para o próximo experimento foi 10pmol/μL.

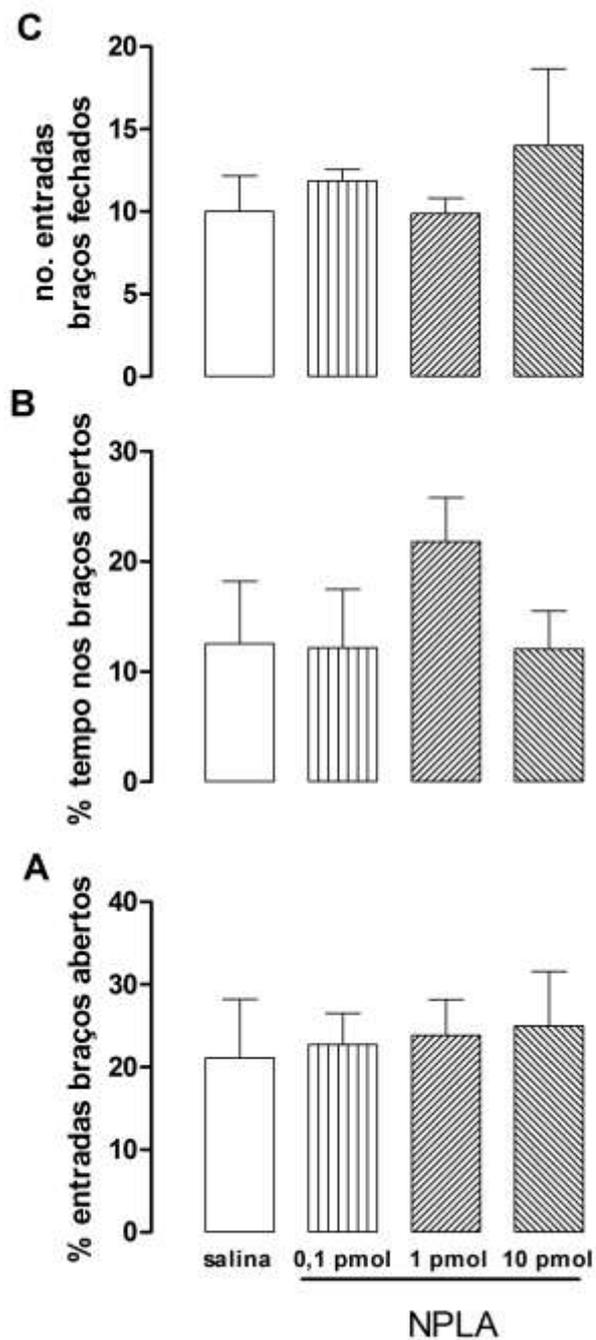


Figura 7: Efeito de NPLA (0,1pmol/ μ L, 1,0pmol/ μ L e 10,0pmol/ μ L) injetado *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE. As colunas representam a média \pm E.P.M do número de entradas nos braços fechados (C), da porcentagem de tempo (B) e porcentagem de entradas (A) nos braços abertos (* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; ANOVA seguida de teste de Dunett, $n = 7-8$ /grupo).

Nesse experimento subsequente, verificamos o efeito do pré-tratamento com NPLA sobre a injeção *i.c.v* de leptina 10,0µg/µL. Conforme observado anteriormente, a administração de leptina promoveu efeito do tipo ansiolítico no LCE, caracterizado por um aumento significativo na porcentagem de entradas no LCE ($F_{(1,40)} = 6,47$; $p=0,01$; ANOVA de duas vias – Bonferroni $p<0.05$, em comparação ao grupo veículo+veículo, Figura 8). Não houve diferença estatística na porcentagem de tempo nos braços abertos [$F_{(1,40)} = 2,50$; $p= 0,12$] e no número de entradas nos braços fechados em comparação ao grupo veículo-veículo [$F_{(1,40)} = 0.0006$; $p=0,97$]. O NPLA não promoveu diferenças significativas nos parâmetros avaliados (porcentagem de tempo: $F_{(1,40)} = 0,73$ e $p= 0,39$; porcentagem de entradas $F_{(1,40)} = 1,61$ e $p= 0,2$; número entradas fechado: $F_{(1,40)}= 0,14$ e $p= 0,70$, Figura 8). Não houve interação entre os tratamentos de NPLA e leptina em nenhum dos parâmetros avaliados (porcentagem de tempo: $F_{(1,40)} = 0,85$ e $p= 0,36$; porcentagem de entradas $F_{(1,40)} = 1,17$ e $p= 0,28$; número entradas fechado: $F_{(1,40)}= 0,18$ e $p= 0,70$, Figura 8) .

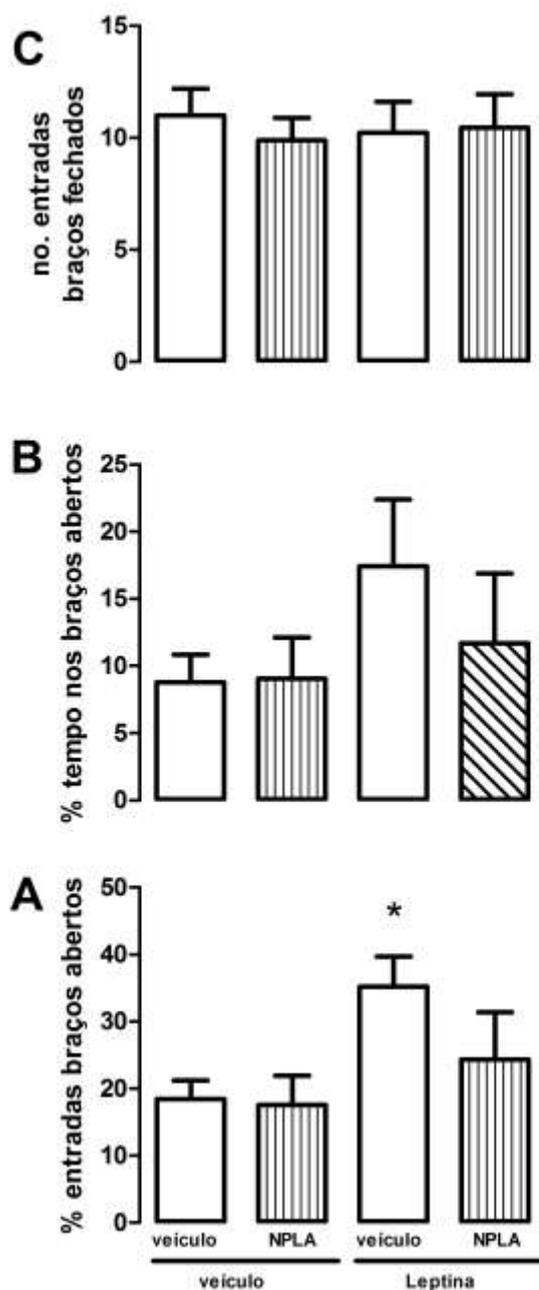


Figura 8: Efeito do pré-tratamento com NPLA 10,0pmol/ μ L, inibidor seletivo de nNOS, no efeito promovido pela leptina injetada *i.c.v.* (10,0 μ g/ μ L) em ratos expostos ao LCE. As colunas representam a média \pm E.P.M do número de entradas nos braços fechados (C), da porcentagem de tempo (B) e porcentagem de entradas (A) nos braços abertos. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni, $n = 9-13$ /grupo).

4.4. Efeito do pré-tratamento de l-arginina, precursor de NO, sobre os efeitos da injeção de leptina no LCE

Inicialmente, realizou-se também uma curva dose-resposta com l-arginina, um precursor de NO, para verificar qual dose seria utilizada no experimento subsequente.

A injeção *i.c.v.* da maior dose de l-arginina (300nmol/ μ L) promoveu efeito tipo ansiogênico no LCE 10 minutos após a injeção em comparação ao grupo l-arginina (10nmol/ μ L). Esse efeito caracteriza-se pela redução significativa da porcentagem de tempo nos braços abertos do LCE ($F_{(3,24)} = 3.47$, $p=0.03$; One-Way ANOVA Bonferroni $p<0.05$, em relação ao grupo l-arginina 10nmol/ μ L, Figura 9). O tratamento não promoveu diferença estatística na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(3,24)} = 3,19$ e $p=0.04$; Figura 9) e no número de entradas nos braços fechados ($F_{(3,24)} = 1,44$; ns, Figura 9), em comparação ao grupo controle, o que sugere que o efeito tipo ansiogênico não se correlaciona com prejuízo da atividade locomotora.

Dessa forma, a dose de l-arginina escolhida para o próximo experimento foi 10nmol/ μ L.

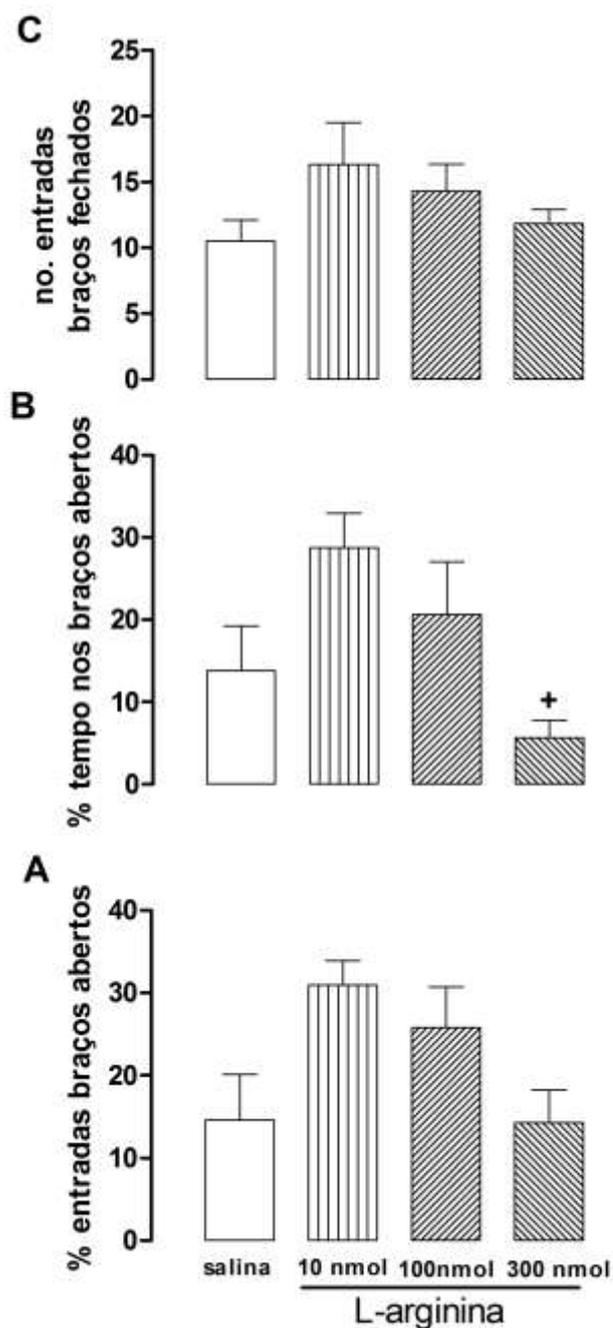


Figura 9: Efeito de L-arginina (10nmol/ μ L, 100nmol/ μ L e 300nmol/ μ L) injetada *i.c.v.* em ratos expostos ao LCE. As colunas representam a média \pm E.P.M do número de entradas nos braços fechados (C), da porcentagem de tempo (B) e porcentagem de entradas (A) nos braços abertos (+ $p < 0,05$ em relação ao grupo L-arginina 10nmol/ μ L; One-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni, $n=6-7$ /grupo).

Como previamente observado, a injeção de leptina *i.c.v* promoveu efeito do tipo ansiolítico nos animais expostos ao LCE caracterizado por um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F_{(1,48)}=8,29$ e $p=0,005$; Two-Way ANOVA) em relação ao grupo veículo-veículo ($p<0.05$, Bonferroni, Figura 10). O pré-tratamento com l-arginina na dose de $10,0\text{nmol}/\mu\text{L}$ foi capaz de atenuar esse efeito (l-arginina $F_{(1,48)} =16,40$ e $p= 0,001$; Two-Way ANOVA), porém independente do tratamento (Figura 10). Não houve diferenças para os tratamentos na porcentagem de tempo nos braços abertos (leptina $F_{(1,48)}=2,67$ e $p=0,1$; l-arginina $F_{(1,48)}=2,19$ e $p=0,14$) e nos braços fechados (leptina $F_{(1,48)}=2,16$ e $p=0,14$; l-arginina $F_{(1,48)}=0,004$ e $p=0,98$; Two Way ANOVA, Figura 10).

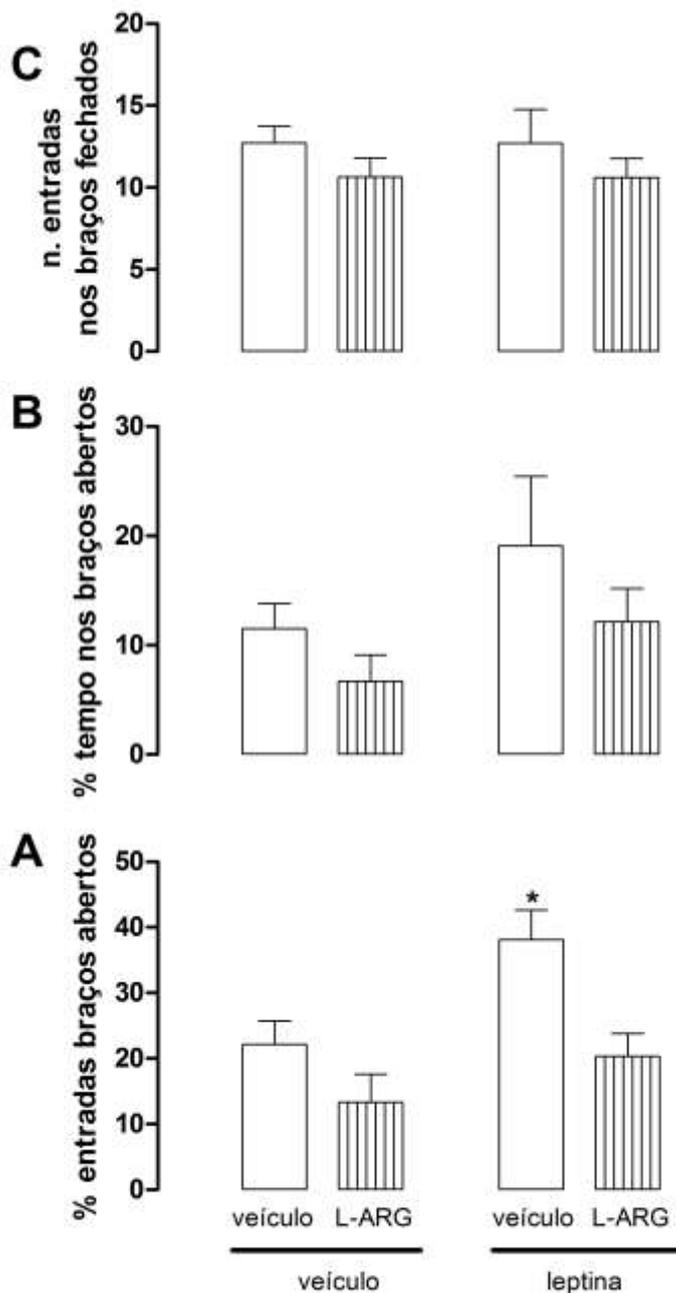


Figura 10: Efeito do pré-tratamento de L-arginina 10,0nmol/ μ L no efeito promovido pela leptina injetada *i.c.v.* (10,0 μ g/ μ L) em ratos expostos ao LCE. As colunas representam a média \pm E.P.M do número de entradas nos braços fechados (C), da porcentagem de tempo (B) e porcentagem de entradas (A) nos braços abertos. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni, $n = 11-15$ /grupo).

Discussão

Nesse trabalho, observamos o efeito de administrações *i.c.v* de leptina de maneira dose-dependente (0,1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em animais expostos ao LCE. Nossos resultados mostraram que a leptina promoveu efeito ansiolítico na maior dose utilizada, 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo esse efeito caracterizado por um aumento significativo na porcentagem de entradas dos braços abertos no LCE. Esse efeito não foi decorrente de aumento da atividade exploratória, pois essa dose não alterou o número de entradas nos braços fechados.

Em outro modelo animal de ansiedade, o teste de lambar punido de Vogel, a administração *i.c.v* de leptina 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ aumentou significativamente o número de lambidas punidas em relação ao grupo controle. Nesse teste o animal é privado de água por praticamente 48h (MILLAN; BROCCO, 2003) e os efeitos observados nesse modelo poderiam relacionar-se com um efeito da leptina sobre o centro hipotalâmico de sede. Os dados referentes à ingestão de água descartam tal possibilidade, pois a leptina na dose de 10,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não aumentou o consumo de água dos animais em relação ao grupo controle. Verificamos também que esse efeito não estava relacionado com um efeito antinociceptivo, pois também não observamos alterações no limiar nociceptivo em animais submetidos ao teste de retirada da cauda.

Nossos dados sugerem que a leptina foi capaz de modular os comportamentos relacionados com a ansiedade em dois modelos animais de ansiedade distintos. Esses efeitos corroboram dados obtidos após a administração sistêmica de leptina em camundongos (LIU et al. 2010).

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e foi caracterizada inicialmente como hormônio responsável pela regulação do controle energético

atuando principalmente em centros hipotalâmicos, diminuindo a ingestão alimentar, aumentando o consumo energético e o metabolismo de glicose/lipídeos (MYERS et al. 2008). Atualmente as funções conhecidas desse hormônio vão muito além das funções relacionadas ao controle do metabolismo, diversos trabalhos mostram que a leptina pode influenciar no controle da reprodução, cognição e transtornos de humor (LU et al., 2006; HARVEY, 2007; DEL BIANCO-BORGES et al. 2010; LIU et al. 2010). Isso possivelmente está relacionado ao fato de que os receptores para leptina estão presentes no hipotálamo como também em regiões extra-hipotalâmicas, incluindo córtex, hipocampo, amígdala e mesencéfalo (ELMQUIST et al. 1998).

Especificamente relacionando a participação da leptina nos transtornos de humor, dados clínicos mostram que pacientes deprimidos possuem concentrações mais baixas de leptina no soro e no líquido cefalorraquidiano (KRAUS et al. 2001; ATMACA et al. 2002; WESTLING et al. 2004; JOW et al. 2006). Adicionalmente, pacientes obesos possuem uma incidência 20% maior a desenvolver depressão em relação a pacientes não obesos (SIMON et al. 2006). Embora esse último dado pareça controverso, é bem documentado que pessoas obesas apresentam resistência à leptina causada por deficiência na via de sinalização da leptina em vários níveis, incluindo deficiência do transporte da leptina através da barreira hemato-encefálica, redução da função do receptor e prejuízo na transdução na sinalização da leptina (MUNZBERG; MYERS, 2005).

Nesse sentido, animais que possuem deficiência na sinalização da leptina como os nocautes gene *ob*, ou ainda nocautes para o receptor da leptina (*db/db*) apresentam comportamentos do tipo depressivo e ansiogênico (ASAKAWA et al.

2003; YAMADA et al. 2011). Adicionalmente, ratos expostos a um estresse crônico imprevisível apresentam comportamento do tipo depressivo como também redução dos níveis basais de leptina no plasma (LU et al., 2006). Esses efeitos possivelmente relacionam-se ao prejuízo na sinalização de leptina, pois foram revertidos após a administração sistêmica de leptina (ASAKAWA et al. 2003; LU et al. 2006; YAMADA et al. 2011). Em conjunto, esses dados sugerem que déficits na sinalização de leptina podem precipitar transtornos relacionados ao estresse.

Nossos resultados estão de acordo com essa possibilidade, pois nós observamos que a administração *i.c.v.* de leptina promoveu efeito do tipo ansiolítico em dois modelos animais de ansiedade distintos, o LCE e o teste de conflito de Vogel. Recentemente, Haque et al. (2012) demonstraram que a administração de leptina foi capaz de reverter as alterações comportamentais induzidas por estresse, observados em modelos como o campo aberto, LCE e caixa claro-escuro de maneira dose-dependente (HAQUE et al. 2012).

Após a sua descoberta, a identificação de receptores para leptina em diferentes regiões encefálicas, impulsionou uma série de pesquisas com objetivo de se elucidar seu papel central, e como resultado diversos pesquisadores demonstraram que além do seu papel na regulação da alimentação, do metabolismo e do eixo neuroendócrino, ela atua como neuromodulador em diferentes tipos de neurotransmissores.

Inicialmente, os efeitos promovidos pela leptina no controle da ingestão alimentar foram correlacionados principalmente com sua ação na redução da concentração do neuropeptídeo Y (NPY), sugerindo que o SNC é o principal sítio de sua ação (SCHWARTZ et al. 1996). Nesse contexto, a leptina pode ativar neurônios

anorexígenos, os pro-opiomelanocortina (POMC) e inibir neurônios orexígenos, que expressam neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo agouti relacionado (AgRP). A deficiência de POMC em camundongos (CHALLIS, et al. 2004) e humanos (KRUDE, et al. 1998) promove hiperfagia e obesidade. O peptídeo agouti-relacionado, um antagonista endógeno dos receptores MC4R, é co-expresso com NPY no núcleo arqueado hipotalâmico (CONE, 2005; OSWAL; YEO, 2007). Ambos são potentes orexígenos, a ativação direta desses neurônios promove hiperfagia e obesidade, enquanto sua deleção resulta em redução drástica da ingestão alimentar (BEWICK, et al. 2005; GROPP, et al. 2005; LUQUET, et al. 2005).

Contudo, como animais nocaute para NPY são responsivos à leptina (ERICKSON; CLEGG; PALMITER, 1996), estudos posteriores demonstraram que a leptina também exerce seus efeitos através da modulação de outros neurotransmissores, como serotonina (CALAPAI et al., 1999), dopamina, glutamato e gaba (FULTON et al., 2006; HOMMEL et al., 2006; LIU et al., 2011; GUO et al., 2012).

Guo e cols. (2012) demonstraram que deleção seletiva da isoforma longa do receptor para leptina em neurônios glutamatérgicos, no hipocampo e córtex, resultou em comportamento tipo depressivo, o qual é revertido pelo pré-tratamento com Ro25-6981, antagonista seletivo do receptor GluN2B para glutamato. No mesmo trabalho eles demonstraram que esses animais, não apresentavam comportamento tipo ansiogênico.

Em outro estudo, o mesmo grupo demonstrou que deleção do mesmo receptor para leptina, porém em neurônios dopaminérgicos, promove comportamento tipo-ansiogênico em diferentes modelos de ansiedade, como LCE e caixa claro-escuro, o

qual foi revertido após administração de um antagonista dopaminérgico seletivo para receptores D1 na amígdala central (LIU et al. 2011). Adicionalmente, trabalhos anteriores demonstraram que a leptina ativa neurônios dopaminérgicos e gabaérgicos em regiões extra-hipotalâmicas, como área tegmental ventral (VTA) (FULTON et al. 2006; HOMMEL et al. 2006), sendo que injeção intra-VTA de leptina reduz a ingestão alimentar em ratos e injeção sistêmica desse hormônio reduz a taxa de disparos de neurônios dopaminérgicos (HOMMEL et al. 2006).

Juntos, esses resultados sugerem que os comportamentos relacionados à depressão e ansiedade, e até mesmo o papel metabólico modulado pela leptina são mediados por circuitos neuronais diferentes.

Mais recentemente, diversos trabalhos sugerem que a leptina pode exercer seus efeitos centrais também através da interação com NO (CALAPAI et al. 1998; CALAPAI et al. 1999; WHITE et al. 2006; LESHAN et al. 2012). O NO, é um gás considerado como um neurotransmissor atípico no SNC devido a suas características físico-químicas (GARTHWAITE, 1991). Uma vez formado o NO é capaz de interagir com diferentes alvos, sendo o principal a ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) dependente de NO que, por sua vez, catalisa a síntese do segundo mensageiro 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina [GMPc (GUIX et al., 2005)]. No SNC, a nNOS é expressa constitutivamente e está amplamente distribuída em diferentes regiões encefálicas relacionadas com comportamentos de medo e ansiedade, como hipotálamo, amígdala e a substância cinzenta periaquedutal dorsolateral [SCPdl (VINCENT; KIMURA, 1992)].

Trabalhos da literatura demonstram que o NO exerce um importante controle nos estados emocionais relacionados à ansiedade, possivelmente facilitando-os

[para revisão ver (GUIMARAES et al. 2005)]. Animais submetidos ao estresse de restrição agudo apresentaram aumentos significativos no RNA mensageiro para nNOS em regiões encefálicas como o núcleo paraventricular do hipotálamo, amígdala medial e SCPdl (DE OLIVEIRA et al. 2000), sugerindo que o estresse de restrição promove mudanças na expressão do gene da nNOS em áreas relacionadas às reações de estresse. Adicionalmente, ratos submetidos a situações de estímulos aversivos mais etológicos, como por exemplo, o LCE ou a exposição ao predador apresentaram aumento significativo de neurônios nitrérgicos ativados nestas estruturas (BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006b; BEIJAMINI; GUIMARAES, 2006a; AGUIAR; GUIMARAES, 2009).

Considerando-se a possível interação entre a leptina e o NO, a outra hipótese testada nesse trabalho foi de que os efeitos ansiolíticos da leptina seriam decorrentes da inibição da NOS. Nossos dados mostram que o efeito do tipo ansiolítico da leptina no LCE foram atenuados pelo pré-tratamento com L-arginina, um precursor de NO. Porém, o pré-tratamento com o inibidor da nNOS não foi capaz de potencializar esse efeito.

Corroborando nossos dados, tanto a administração sistêmica quanto *i.c.v.* de leptina foi capaz de inibir a atividade da nNOS em camundongos (CALAPAI et al. 1998). Trabalhos do mesmo grupo demonstraram que a via do NO está diretamente relacionada com os efeitos promovidos pela leptina no controle da ingestão de alimentos e peso corporal (CALAPAI et al. 1999). Adicionalmente, demonstrou-se que a leptina promove anorexia em aves através da inibição da nNOS, sendo este efeito revertido pelo precursor de NO, L-arginina (YANG; DENBOW, 2007).

Reforçando a interação desse sistema, existe a co-localização de neurônios que expressam os receptores para leptina e neurônios nitrérgicos no hipotálamo (DONATO et al. 2010). Interessantemente, neurônios que contém a nNOS correspondem a 20% dos neurônios que possuem o receptor da leptina nessa mesma região (LESHAN et al. 2012).

Uma possível explicação para a discrepância obtida com o inibidor seletivo da nNOS, relaciona-se com os efeitos em U invertido observados após a administração de inibidores da NOS em diversos modelos de ansiedade [para revisão ver, (GUIMARAES et al. 2005)], ou seja, a utilização da dose efetiva de leptina juntamente com o inibidor da nNOS possivelmente resultou em uma inibição exacerbada da via do NO e o efeito ansiolítico deixou de ser observado. Efeito semelhante com inibidores da NOS já foi observado em animais expostos ao predador como também ao LCE (GUIMARAES et al. 2005; AGUIAR; GUIMARAES, 2009).

Outra hipótese relacionada à ausência de efeito após a administração de inibidor da nNOS, diz respeito a dose de leptina utilizada, conforme observado por Kosior-Korzecka e Bobowiec (2006) altas concentrações de leptina promoveram redução da síntese de NO pela hipófise de ovelhas (in vitro), enquanto baixas concentrações do hormônio resultaram em aumento da síntese de NO, o que sugere que a dose efetiva de leptina utilizada em nosso trabalho possa ter reduzido a síntese de NO, promovido uma inibição exacerbada da via do NO e, dessa forma, o efeito ansiolítico deixou de ser observado.

Como o pré-tratamento com NPLA, inibidor seletivo de nNOS, não foi capaz de potencializar o efeito tipo ansiolítico promovido pela leptina no LCE, poderíamos

sugerir esse efeito seja devido a um papel inibitório da leptina sobre outra isoforma de NOS, a iNOS, localizada em células da glia (LYONS; ORLOFF; CUNNINGHAM; 1992), visto que Montezuma e cols. (2012) demonstraram, de maneira inédita, que tratamento sistêmico com inibidor de iNOS foi capaz de reverter as alterações comportamentais observadas em animais em um modelo animal de ansiedade, o teste do nado forçado. Dessa forma, para testar essa hipótese, estudos posteriores utilizando inibidores seletivos de iNOS devem ser realizados nos modelos animais de ansiedade utilizados nesse trabalho.

Em conclusão, nosso trabalho mostrou que a leptina é capaz de modular os comportamentos relacionados com ansiedade, possivelmente através da inibição da via do NO, conforme esquematizado a seguir.

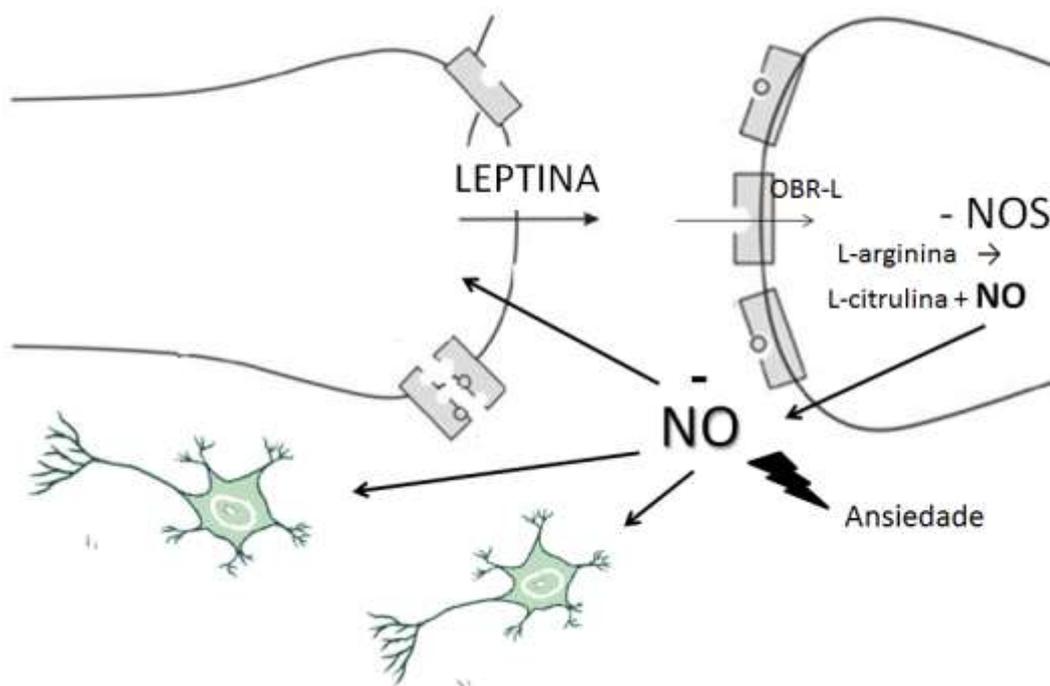


Figura 11: Efeito inibitório da leptina sobre a formação de NO endógeno e seu papel tipo-ansiolítico.

Referências bibliográficas

Aguiar, D. C; Moreira, F. A; Guimarães, F. S (2006). Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 83: 296–301.

Aguiar, D.C; Guimaraes, F.S. (2009). Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **J Neurosci Res** 87: 2418-29.

Aguiar, D.C; Terzian, A.L; Guimaraes, F.S; Moreira, F.A. (2009). Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. **Psychopharmacology** (Berl) 205: 217-25.

Ahima, R,S; Saper, C.B; Flier, J.S; Elmquist, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol** 21: 263-307.

American Psychiatric Association. **The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V, 2013**. Disponível em: <<http://www.psych.org/>> Acesso em: 27 mar. 2014.

Anand; Brobeck. (1951) Localization of a "Feeding Center" in the Hypothalamus of the Rat. **Exp. Biol. Med.** 77: 323-325.

Arborelius, L; Owens, M.J; Plotsky, P.M; Nemeroff, C.B.(1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *Journal of Endocrinology*. 160: 1-12.

Asakawa, A; Inui, A; Inui, T; Katsuura, G; Fujino, M.A; Kasuga, M. (2003). Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. **J Diabetes Complications** 17: 105-7.

Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B and Bayik Y (2002). Serum leptin and cholesterol levels in patients with bipolar disorder. **Neuropsychobiology** 46: 176-9.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau J, Bortoluzzi M, Moizo L, Lehy T, Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. (1996) Leptin Enters the Brain by a Saturable System Independent of Insulin. **Peptides**. 17(2): 305-311.

Baratta, M; Saleri, R; Mainardi, G.L; Valle, D; Giustina, A; Tamanini, C. (2002). Leptin Regulates GH Gene Expression and Secretion and Nitric Oxide Production in Pig Pituitary Cells. **Endocrinology** 143(2):551–557.

Becker ES, Margraf J, V Türke, Soeder U, Neumer S. Obesity and mental illness in a representative sample of young women. *International Journal of Obesity*.; 25: S5–S9.

Beijamini V and Guimaraes F S (2006a). (2001) Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res Bull** 69: 347-55.

Beijamini V and Guimaraes F S (2006b). c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res** 170: 52-61.

Bergink, V; Van Megen, H. J. G. M; Westenberg, G. M (2004). Bertagna X. Proopiomelanocortin-derived peptides. **Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.** 23: 467-85.

Bergink, V; Van Megen, H. J. G. M; Westenberg, G. M (2004). Glutamate and anxiety. **Eur Neuropsychopharm** 14:175-183.

Bewick GA, Gardiner JV, Dhillo WS, Kent AS, White NE, Webster Z, Ghatei MA, Bloom SR. (2005). Postembryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. **FASEB**.

Blanchard, D. C; Blanchard, R. J (1988). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol** 39: 43-68.

Bouret SG. (2010) Neurodevelopmental actions of leptin. **Brain Research.** 1350: 2-9.

Brandao, M. L; Vianna, D. M; Masson, S; Santos, J (2003). Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr** 25:36-41.

Bredt, D.S; Hwang, P.M; Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neuronal role for nitric oxide. **Nature.** 347: 768-770.

Bromet E, Andrade LH, Hwang I, Sampson NA, Alonso J, Girolamo G, Graaf R, Demyttenaere K, Hu C, Iwata N, Karam AN, Kaur J, Kostyuchenko S, Lepine J, Levinson D, Matschinger H, Mora MEM, Browne MO, Villa JP, Viana MC, Williams DR, Kessler RC. (2011) Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Medicine.**

Burley SK, Friedman JM. (1995) Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the obese Gene. **Science.** 269: 543-546.

Calapai G, Corica F, Allegra A, Corsonello A, Sautebin L, De Gregorio T, et al. (1998). Effects of intracerebroventricular leptin administration on food intake, body weight gain and diencephalic nitric oxide synthase activity in the mouse. **Br J Pharmacol** 125: 798-802.

Calapai G, Corica F, Corsonello A, Sautebin L, Di Rosa M, Campo G M, et al. (1999). Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. **J Clin Invest** 104: 975-82.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. (1995) Recombinant Mouse ob Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks. **Science**. 269: 546-549.

Canteras, N. S; Ribeiro-Barbosa, E. R; Comoli, E (2001). Tracing from the dorsal preammillary nucleus prosencephalic systems involved in the organization of innate fear responses. **Neurosci Biobehav Rev**. 25:661-668.

Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza, Rodgers RJ. (2002) Anxiolytic-like effect of WAY-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of priortest experience. **Brain Research**. 928: 50-59.

Carobrez, A. P; Teixeira, K. V; Graeff, F. G. (2001). Modulation of defnsive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci Biobehav Rev** 25:697-709.

Carpenter KM, Hasin DS, Allison DB, Faith M. (2000) Relationships Between Obesity and DSM-IV Major Depressive Disorder, Suicide Ideation, and Suicide Attempts: Results From a General Population Study. **American Journal of Public Health**. 90(2): 251-257.

Cervero A, Horcajadas JA, Domínguez F, Pellicer A, Simón C. (2005) Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. **Reproductive BioMedicine Online**. 10(2): 217-223.

Challis BG, Coll AP, Yeo GSH, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher RR, Dixon J, Zahn D, Rochford JJ, White A, Oliver RL, Millington G, Aparicio SA, Colledge WH, Russ AP, Carlton MB, O'Rahilly S. (2004) Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY3–36. **PNAS**. 101(13): 4695–4700.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, More KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. (1996) Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice. **Cell**. 84: 491–495.

Chrousos GP. (2009) Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**. 5: 374-381.

Chua Jr SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu S, Tartaglia L, Leibel RL. (1996) Phenotypes of Mouse diabetes and Rat fatty Due to Mutations in the OB (Leptin) Receptor. **Science**. 271: 994-996.

Collin M, Hakansson-Ovesjö ML, Misane I, Ögren SO, Meister B. (2000) Decreased 5-HT transporter mRNA in neurons of the dorsal raphe nucleus and behavioral depression in the obese leptin-deficient ob/ob mouse. **Molecular Brain Research**. 81: 51-61.

Cone RD. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**. 8(5): 571-578.

Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF. (1995) Evidence Against Either a Premature Stop Codon or the Absence of Obese Gene mRNA in Human Obesity. **J. Clin. Invest**. 95: 2986-2988.

Cruz APM, Frei F, Graeff FG. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. 49: 171-176.

Cunningham, M.D; Ferkany, J.W; Enna, S.J. (1994) Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sciences**. 54: 135-148.

Darnell Jr JE, Kerr M, Stark GR. (1994) Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. **Science**. 264:1415-1421.

Darwin, C. **The expression of emotion in man and animals**. New York: Philosophical Library; 1985. 1872.

De Oliveira R M, Aparecida Del Bel E, Mamede-Rosa M L, Padovan C M, Deakin J F, Guimaraes F S (2000). Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett** 289: 123-6.

De Oliveira, R.M.W; Del Bel E.A; Guimarães, F.S. (2000) Behavioral and c-fos expression. changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res. Bull**. 51: 457-464.

Deakin, J. F; Graeff, F. G (1991). 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol** 5:305-15.

Del Bel E A, Guimaraes F S, Bermudez-Echeverry M, Gomes M Z, Schiaveto-De-Souza A, Padovan-Neto F E, et al. (2005). Role of nitric oxide on motor behavior. **Cell Mol Neurobiol**. 25: 371-92.

Del Bianco-Borges B, Cabral F J and Franci C R (2010). Co-expression of leptin and oestrogen receptors in the preoptic-hypothalamic area. **J Neuroendocrinol** 22: 996-1003.

Donato J, Jr., Frazao R, Fukuda M, Vianna C R and Elias C F (2010). Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. **Endocrinology** 151: 5415-27.

Dractu L, Lader M. **Ansiedade: conceito, classificação e biologia.** Uma interpretação contemporânea da literatura. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria.* 1993; 42: 19-32.

Elmqvist J K, Bjorbaek C, Ahima R S, Flier J S and Saper C B (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol** 395: 535-47.

Elmqvist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol** 395:535–547 40.

Elmqvist, JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. (1998) Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain. **The Journal of comparative neurology.** 395:535–547.

Erickson, J.C., Clegg, K.E., and Palmiter, R.D. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. **Nature.** 381:415–421.

Farr SA, Banks WA, Morley JE. (2006) Effects of leptin on memory processing. **Peptides.** 27: 1420-1425.

Fernandes C, File Se. (1996) The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour.** 54(1): 31-40.

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoena M, Baskina DG. (2003) Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area / substantia nigra (VTA/SN) of the rat. **Brain Research.** 964:107–115.

Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. (2010). Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviours. **Psychopharmacology.** 210: 559-568.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature Medicine.** 1(12): 1311-1314.

Fulton, S; Pissios, P; Manchon, R. P; Stiles, L.; Frank, L.; Pothos, E. N; M-F, E; Flier, E. (2006) Leptin Regulation of the Mesoaccumbens Dopamine Pathway. **Neuron** 51: 811–822.

Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376.

Garthwaite J (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci** 14: 60-7.

Garthwaite T L, Martinson D R, Tseng LF, Hagen TC, Menahan LA. (1980) A Longitudinal Hormonal Profile of the Genetically Obese Mouse. **Endocrinology** 107(3): 671-676.

Gautron L; Elmquist JK. (2011) Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. **The Journal of Clinical Investigation**. 121(6): 2087-2093.

Graeff FG. **Ansiedade**. In: Graeff FG, Brandão ML. Neurobiologia das doenças mentais. 5. ed. Lemos, São Paulo: 135-178, 2001.

Graeff FG. **Medicamentos ansiolíticos**. In: Graeff FG, Guimarães FS. Fundamentos de psicofarmacologia. Editora Atheneu, São Paulo: 123-169, 1999.

Graeff, F. G; Zangrossi, H. JR (2002). Animal Models of Anxiety Disorders. In: D'haenen, H.; Den Boer, J.A.; Westenberg, H.; Willner, P (eds). **Textbook of biological psychiatry Wiley and Sons**: London, p. 879-893.

Graeff, F. G; Ferreira-Neto, C; Zangrossi, H, JR (1998) The Elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Behavioral Reviews**. 23:237-246.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. (2011) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nature Neuroscience**. 8(10): 1289-1291.

Guimarães, F.S; Carobrez, A.P; De Aguiar, J.C; Graeff, F.G. Anxiolytic effect in the elevated plus maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. **Psychopharmacology** 103: 91-94, 1991.

Guimaraes F S, Beijamini V, Moreira F A, Aguiar D C and De Lucca A C (2005). Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neurosci Biobehav Rev** 29: 1313-22.

Guimarães FS, Del Bel EA, Padovan CM, Netto SM, de Almeida RT. (1993) Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. **Behav Brain Res**. 58: 133-139.

Guimarães, F. S; Beijamini, V; Moreira, F. A; Aguiar, D. C; De Lucca, A. C. B (2005) Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Behavioral Reviews** 29:1313-1322.

Guix F X, Uribealgo I, Coma M and Munoz F J (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol** 76: 126-52.

Guo, M Lu, Y; Garza, J. C; Li, Y; Chua, S. C; Zhang, W; Lu. B; Lu, X-Y (2012). Forebrain glutamatergic neurons mediate leptin action on depression-like behaviors and synaptic depression. **Translational Psychiatry** 2: e83.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL,

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM, Deitel M. (1995) Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. **Nature Medicine**. 1(9): 953-956.

Harvey J (2007). Leptin: a diverse regulator of neuronal function. **J Neurochem** 100: 307-313.

Harvey J, Ashford MLJ. (2003) Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. **Neuropharmacology**. 44: 845–854.

Harvey J. (2007) Leptin: a diverse regulator of neuronal function. **Journal of Neurochemistry**. 100: 307-313.

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. (1997) Leptin Inhibition of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Stress. **Endocrinology**. 138(9): 3859-3863.

Hetem LAB. **Bases Neurais**. In: Hetem LAB, Graeff FG. Transtornos de ansiedade. São Paulo: Editora Atheneu, 107-132, 2004.

Hetherington AW, Ranson SW. (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **Anat Rec**. 78(2):149–172.

Himms-Hagen J (1999). Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. **Crit Rev Clin Lab Sci** 36: 575-655.

Hommel, J. D; Trinko, R; Sears, R. M; Georgescu, D; Liu, Z; Gao, X; Thurmon, J. J; Marinelli, M; Dileone, R. J. (2006). Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. **Neuron** 51: 801–810.

Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. (1966) Diabetes, a New Mutation in the Mouse. **Science**. 153(): 1127-1128.

Ihle, J.N. (1996) Signal transducers and activators of transcription. **Cell**. 84: 331-334.

Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. **J Hered**. 41(12): 317-318.

Iwase K, Iyama K, Akagi K, Yano S, Fukunaga K, Miyamoto E, Mori M, Takiguchi M (1998) Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. **Brain Res Mol Brain Res** 53:1–12.

Javitt, D. C (2004). Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. **Mol Psychiatry** 9:984-997.

Jow G M, Yang T T and Chen C L (2006). Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. **J Affect Disord** 90: 21-7.

Kain ZN, Zimolo Z, Heninger G. (1999) Leptin and the Perioperative Neuroendocrinological Stress Response. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 84(7): 2438-2442.

Kosior-Korzecka, U.; Bobowiec, R. (2006). Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from pituitary cells in vitro. **Journal of physiology and pharmacology**. 4:637-647.

Kraus T, Haack M, Schuld A, Hinze-Selch D and Pollmacher T (2001). Low leptin levels but normal body mass indices in patients with depression or schizophrenia. **Neuroendocrinology** 73: 243-247.

Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. **Nature Genetics** 19: 155-157.

Lancaster, J. (1996) Nitric Oxide: Principles and actions. **Academic Press Inc.**

Leshan R L, Greenwald-Yarnell M, Patterson C M, Gonzalez I E and Myers M G, Jr. (2012). Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance. **Nat Med** 18: 820-3.

Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. (2002) Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. **Neuroscience**. 113(3): 607-615.

Liao SC, Lee MB, Lee YJ, Huang TS. (2006) The counterbalance between leptin and cortisol may be associated with comorbid depression and anxiety. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**. 60: 120.

Licinio J, Mantzoros C, Negrão AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, Chrousos GP, Karp B, Allen C, Flier JS, Gold PW. (1997) Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. **Nature Medicine**. 3(5): 575-579.

Liu J, Garza J C, Bronner J, Kim C S, Zhang W and Lu X Y (2010). Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. **Psychopharmacology (Berl)** 207: 535-45.

Liu J, Perez SM, Zhang W, Lodge DJ, Lu X-Y. (2011) Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increased dopaminergic activity in amygdale. **Molecular Psychiatry**. 1-15.

Liu L, Karkaniyas GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N, Wang J, Rossetti L. (1998) Intracerebroventricular Leptin Regulates Hepatic but Not Peripheral Glucose Fluxes. **The Journal of biological chemistry**. 273(47): 31160-31167.

Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. (1995) Overexpression of the obese (*ob*) gene in adipose tissue of human obese subjects. **Nature Medicine**. 1(9): 950-953.

Lu X Y, Kim C S, Frazer A and Zhang W (2006). Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci** 103: 1593-8.

Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W. (2006) Leptin: A potential novel antidepressant. **PNAS**. 103(5): 1593-1598.

Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. (2005) Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. **Science**. 310: 683-685.

Lyons, CR, Orloff, GJ, Cunningham, JM. (1992) Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. **J. Biol. Chem**. 267: 6370-6374.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**. 1(11): 1155-1161.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nat Med** 3: 1029-33.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature Medicine**. 3(9): 1029-1033.

Maymó JL, Pérez AP, Gambino Y, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. (2011) Review: Leptin gene expression in the placenta e Regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. **Trophoblast Research**. 25: S146-S153.

Mccan Sm, Kimura M, Walczwuska A, Karanth S, Rettori V, Yu Wh. (1998) Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, CYTOKINES AND leptin. **Domest Anim Endocrinol**. 15: 333-344.

Mehebi-Mojaat, N; Ribiere, C; Niang, F; Forest, C; Jaubert, A. (2009) Leptin and Insulin Induce Mutual Resistance for Nitric Oxide Synthase III Activation in Adipocytes. **Journal of Cellular Biochemistry** 108:982–988.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. (1996) Localization (*Ob-Rb*) of leptin receptor mRNA and the long form splice variant in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Letters**. 387:113-116.

Millan M J; Brocco M (2003). The Vogel conflict test: procedural aspects, gamma-aminobutyric acid, glutamate and monoamines. **Eur J Pharmacol** 463: 67-96.

Moncada, S., Vane, J.R. (1978) Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. **Pharmacol. Rev.**, 30: 293–331.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. (1989) Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol** 38: 1709-1715.

Moncada, S., Palmer, R.M.; Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 43: 109-142.

Montezuma, K.; Biojoneb, C.; Lisboa, S.F.; Cunha, F.Q.; Guimarães, F.S.; Joca, S.R.L. (2012) Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: Pharmacological and genetic evidence. **Neuropharmacology** 62: 485-491.

Morash B, Audrey L, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. (1999) Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. **Endocrinology.** 140(12): 5995-5998.

Morash B, Li A, Murphy P R, Wilkinson M and Ur E (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. **Endocrinology** 140: 5995-5998.

Moreira F A, Aguiar D C; Guimaraes F S (2006). Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 30: 1466-71.

Moreira, F. A; Aguiar, D. C; Campos, A. C; Lisboa, S. F; Terzian, A. L; Resstel, L. B; Guimarães, F. S (2009). Antiaversive effects of cannabinoids: is the periaqueductal gray involved? **Neural Plast** 625469.

Moreira, F.A; Aguiar, D. C; Terzian, A. L; Guimarães, F. S; Wotjak, C. T (2011). Cannabinoid type 1 receptors and transient receptor potential vanilloid type 1 channels in fear and anxiety-two sides of one coin? **Neuroscience.**

Munzberg H and Myers M G, Jr. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nat Neurosci** 8: 566-70.

Myers M G, Cowley M A and Munzberg H (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annu Rev Physiol** 70: 537-56.

Napoli, C.; Ignarro, L. J. (2003) Nitric Oxide- Releasing Drugs. **Annu.Rev. Pharmacol. Toxicol.** 43(97).

Niang, F; Benelli, C; Ribiere, C; Collinet, M; Mehebik-Mojaat, N; Penot, G; Forest, C; Jaubert, A. (2011) Leptin Induces Nitric Oxide-Mediated Inhibition of Lipolysis and Glyceroneogenesis in Rat White Adipose Tissue. **J. Nutr.** 141: 4-9.

Nutt DJ. **The pharmacology of human anxiety.** Pharmacology and Therapeutics. 1990; 47: 233-266.

Onyike CU, Crum RM, Lee HB, Lyketsos CG, Eaton WW. (2003) Is Obesity Associated with Major Depression? Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **American Journal of Epidemiology.** 158(12): 1139-1147.

Oomura Y, Hori N, Shiraishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner MJ, Sasaki K. (2006) Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. **Peptides.** 27: 2738-2749.

Oswal A & Yeo GSH. (2007) The leptin melanocortin pathway and the control of body weight: lessons from human and murine genetics. **Obesity reviews.** 8: 293–306.

Paxinos G, Watson C. (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press.**

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. (1995) Effects of the obese Gene Product on Body Weight Regulation in ob/ob Mice. **Science.** 269: 540-543.

Prast, H; Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in neurobiology** 64: 51-68.

Schindler C, Darnell Jr JE. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. **Annu. Rev. Biochem.** 64:621-651.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. (1996) Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus. **J. Clin. Invest.** 98(5):1101-1106.

Scott KM, McGee MA, Wells JE, Browne MAO. (2008) Obesity and mental disorders in the adult general population. **Journal of Psychosomatic Research.** 64: 97-105.

Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK (2009) Leptin targets in the mouse brain. **J Comp Neurol** 514: 518–532.

Sevgi S, Ozek M, Eroglu L. (2006) L-NAME prevents anxiety-like and depression-like behavior in rats exposed to restraint stress. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** 28(2): 95-99.

Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB. (2010) Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. **Physiology & Behavior**. 101: 381-388.

Simon G E, Von Korff M, Saunders K, Miglioretti D L, Crane P K, Van Belle G, et al. (2006). Association between obesity and psychiatric disorders in the US adult population. **Arch Gen Psychiatry** 63: 824-830.

Simon GE, Korff MV, Saunders K, Miglioretti DL, Crane PK, van Belle G, Kessler RC. (2006) Association Between Obesity and Psychiatric Disorders in the US Adult Population. **Arch Gen Psychiatry**. 63: 824-830.

Spinedi E; Gaillard RC. (1998) A Regulatory Loop the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis and Circulating Leptin: A Physiological Role of ACTH. **Endocrinology**. 139(9): 4016-4020.

Spinedi E; Gaillard R C (1998). A regulatory loop between the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. **Endocrinology** 139: 4016-20.

Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutsner M. (1986) Does the excitatory amino acid receptor 3-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**. 90: 166-169.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, JOHN HALE, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, Mackellar W, Rosteck Jr PR, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang XY, Heiman M. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. **Nature**. 377: 530-532.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. (1995) Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. **Cell**. 83: 1263-1271.

Tartaglia LA. (1997) The Leptin Receptor. **The Journal of biological chemistry**. 272(10): 6093–6096.

Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H. (2007). Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. **Congenital Anomalies**. 47: 77-83.

Ur E, Wilkinson D A, Morash B A and Wilkinson M (2002). Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. **Neuroendocrinology** 75: 264-72.

Ur E, Wilkinson DA, Morash BA, Wilkinson M. (2002) Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. **Neuroendocrinology**. 75(4): 264-272.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Stoffel M, Friedman JM. (1996) Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nature Genetics**. 14: 95–97.

Vincent S R; Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience** 46: 755-84.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N and Rossetti L (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature** 393: 684-688.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**. 393: 684-688.

Westling S, Ahren B, Traskman-Bendz L and Westrin A (2004). Low CSF leptin in female suicide attempters with major depression. **J Affect Disord** 81: 41-8.

Westling S, Ahrén B, Träskman-Bendz L, Westrin A. (2004) Low CSF leptin in female suicide attempters with major depression. **Journal of Affective Disorders**. 81: 41-48.

White V, Gonzalez E, Capobianco E, Pustovrh C, Martinez N, Higa R, et al. (2006). Leptin modulates nitric oxide production and lipid metabolism in human placenta. **Reprod Fertil Dev** 18: 425-32.

World Health Organization WHO. **Mental disorders**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/mental_disorders/en/> Acesso em: 26 nov. 2013.

Yamada N, Katsuura G, Ochi Y, Ebihara K, Kusakabe T, Hosoda K, et al. (2011). Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. **Endocrinology** 152: 2634-2643.

Yang S J and Denbow D M (2007). Interaction of leptin and nitric oxide on food intake in broilers and Leghorns. **Physiol Behav** 92: 651-7.

Zanoveli, J. M (2005). **Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT1A e 5-HT2A localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal no efeito de drogas usadas na terapêutica do transtorno do pânico: evidências obtidas em ratos submetidos ao labirinto em T elevado**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**. 372(6505): 425-432.