

**MARCELO DUZZIONI**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO DA SUBSTÂNCIA P COM O DO  
DIAZEPAM E DO PENTILENOTETRAZOL NO COMPORTAMENTO  
DE RATOS AVALIADOS NO LABIRINTO EM T**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em Farmacologia  
da Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial à obtenção do título  
de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina  
Monteiro de Lima Nogueira

FLORIANÓPOLIS – SC

2005

DUZZIONI, Marcelo. **Comparação do efeito da substância P com o do diazepam e do pentilenotetrazol no comportamento de ratos avaliados no labirinto em T.** Florianópolis, 2005, 81p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira

Defesa: 23/02/2005

O presente estudo teve por objetivo investigar a relação entre a [substância P (SP)] e o [diazepam (DZP)] nos comportamentos de [ansiedade] e [memória] em ratos avaliados no [labirinto em T (LT)]. O procedimento experimental no teste consistiu em medir a latência para deixar o braço fechado (Linha de Base, Esquiva 1 e Esquiva 2) e aberto (Fuga 1) do aparelho; e no re-teste (72 h após) foram registradas a Esquiva 3 e Fuga 2. Nossos resultados mostraram que o DZP i.p. apresentou um efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração (STM) da esquiva inibitória (E.I.), o PTZ i.p. um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aprendizagem da E.I. e a SP i.p. não apresentou efeito algum neste paradigma experimental. Observamos ainda que o tratamento i.p. com PTZ e SP foi capaz de bloquear e reverter o(s) efeito(s) promovido(s) pelo DZP. Nossos resultados mostraram também que a administração i.c.v. de SP foi capaz de reverter, via receptores NK<sub>1</sub>, o efeito ansiolítico e/ou amnésico da STM promovido pelo DZP i.p. na E.I. Por fim, nenhum dos diferentes tratamentos foi capaz de afetar a latência de fuga no teste e re-teste, bem como a memória de longa duração da E.I. Em resumo, nossos resultados ratificam a interação existente entre os sistemas GABAérgico e taquicinérgico na modulação da ansiedade e memória no LT, demonstrada em outros modelos experimentais, e mostram que o LT não é um modelo sensível às ações da SP *per se*.

**“Há mais mistérios entre o céu e a terra que imagina a vã Filosofia”**

**Willian Shakespeare (1564-1616)**

**Mas,**

**“Eu sou brasileiro e não desisto nunca”**

**autor desconhecido**

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira pela orientação dada, não só sobre assuntos do mundo acadêmico, mas principalmente pelos ensinamentos da vida; pela compreensão, amizade e convivência.
- A todos os professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, pela qualidade do programa e por terem contribuído para a minha formação acadêmica.
- Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia, particularmente à Sandra, Rita, Diana e Maria Goretti
- Ao Pedro, funcionário do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela amizade e qualidade dos serviços prestados.
- Aos colegas da turma de mestrado 2003, em especial ao Fabrício e Rafael, pelo companheirismo nos momentos de alegria e tristeza.
- Aos ex- e atuais colegas de laboratório, Ricardo Vieira (*in memoriam*), Luiz Rangel, Raquel, Selma, Tulani, Clarissa, Luciana, Karine, Elaine Gavioli, Marco Lorenzo, Denise, Ana Calixto, Rebeca, Filipe (Marreta), Rosane, Aline Foppa, Elayne de Moraes, Fernanda e Gilliard, pelos conhecimentos trocados, pela convivência e acima de tudo, por terem feito do laboratório uma extensão da minha casa.
- Aos professores membros da banca examinadora do mestrado: Antônio de Pádua Carobrez, Cláudio da Cunha e Reinaldo Naoto Takahashi, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais, que contribuíram para a elaboração da versão final desta dissertação.
- Aos professores Dr. João Batista Calixto e Dra. Maria Martha Campos, pela doação do FK 888.
- À minha família, em especial aos meus pais: Nilton e Sirlei, pelo amor, carinho e por não medirem esforços para a concretização de meus sonhos; aos meus irmãos: Rodrigo, Daniela, Eduardo, Fernando e Renata, pelo carinho, apoio

e amizade; e as minhas sobrinhas: Ana Carolina e Maria Eduarda, pela beleza, simplicidade e pureza.

- À minha namorada, Janaína, pelo amor, carinho e dedicação e, em especial, pela compreensão.
- Ao CNPq, pelo apoio financeiro.
- À todas as pessoas não mencionadas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
<i>ABSTRACT</i> .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE ABREVIACOES .....	vi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
Neuropeptídeos .....	1
Taquicininas .....	4
Substância P .....	6
Localização da substância P no sistema nervoso central .....	6
Distribuição dos receptores taquicinérgicos no sistema nervoso central ....	6
Substância P e ansiedade .....	8
Substância P e memória .....	11
Benzodiazepínicos .....	16
Benzodiazepínicos, ansiedade e memória .....	17
Labirinto em T elevado – modelo experimental de ansiedade e memória ..	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
Animais .....	23
Drogas e soluções .....	23
Procedimentos gerais .....	25
Aparelho .....	25
Protocolos experimentais .....	26
Procedimento para administração central de drogas .....	28
Cirurgias estereotáxicas .....	28
Cânulas, estiletos, parafusos e agulhas injetoras.....	29
Administração central de drogas .....	30
Histologia .....	30
Análise estatística .....	30

<b>RESULTADOS</b> .....	32
Caracterização dos efeitos comportamentais da injeção intraperitoneal de diazepam, pentilenotetrazol e substância P na ansiedade e nos processos mnemônicos em ratos avaliados no labirinto em T. ....	32
Efeito comportamental da administração intraperitoneal de pentilenotetrazol e substância P no efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T. ....	39
Efeito comportamental da administração central de substância P no efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T. ....	43
Avaliação da participação do receptor NK <sub>1</sub> na influência da substância P sobre o efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T. ....	46
<b>DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo investigar a relação entre a substância P (SP) e o diazepam (DZP) nos comportamentos de ansiedade e memória em ratos avaliados no labirinto em T (LT). Na primeira etapa, os animais foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com diazepam (DZP, 0,5, 1 e 2 mg/Kg; ansiolítico padrão), pentilenotetrazol (PTZ, 5, 15 e 30 mg/Kg; ansiogênico padrão), SP (5, 50 e 250 µg/Kg, droga teste) ou solução Salina (NaCl 0,9%, solução controle), antes de serem testados no LT. O procedimento experimental no teste consistiu em medir a latência para deixar o braço fechado (Linha de Base, Esquiva 1 e Esquiva 2) e aberto (Fuga 1) do aparelho; e no re-teste (72 h após) foram registrados a Esquiva 3 e a Fuga 2. Nossos resultados mostraram que a droga padrão DZP apresentou um efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração (STM) e a droga padrão PTZ um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aprendizagem da esquiva inibitória. Por outro lado, a SP não apresentou *per se* efeito algum neste paradigma experimental. Na segunda etapa, os animais foram pré-tratados i.p. com DZP (1 mg/Kg) e tratados, pela mesma via, com Salina, SP (5 mg/Kg) ou PTZ (30 mg/Kg). Os resultados mostraram que o DZP continuou apresentando um efeito ansiolítico e/ou amnésico da STM da esquiva inibitória e que este efeito foi bloqueado e revertido tanto pelo PTZ como pela SP. Na terceira etapa, os animais foram pré-tratados i.p. com DZP (1 mg/Kg) e tratados via intracerebroventricular (i.c.v.) com SP (10 pmoL) ou PBS (controle). O DZP continuou apresentando seu(s) efeito(s) e este(s) efeito(s) sendo revertido(s) pela administração central de SP. Na quarta e última etapa, foi avaliado o envolvimento dos receptores NK<sub>1</sub> na reversão do efeito ansiolítico e/ou amnésico produzido pelo DZP com a administração central de SP. Os animais foram pré-tratados com DZP (1 mg/Kg) i.p. e com FK 888 (100 pmoL) i.c.v. e na seqüência tratados i.c.v. com SP (10 pmoL) ou PBS. O FK 888, antagonista do receptor NK<sub>1</sub>, não interferiu *per se* no(s) efeito(s) do DZP, mas foi capaz de abolir a reversão do(s) efeito(s) do DZP induzido pela injeção i.c.v. de SP. A latência de fuga no teste e re-teste, bem como a memória de longa duração da esquiva inibitória não foi afetada pelos diferentes tratamentos em nenhuma das etapas experimentais avaliadas no LT.



Em resumo, nossos resultados mostraram que o LT não é um modelo sensível aos efeitos tipo ansiogênico e facilitador dos processos mnemônicos da SP, além de ratificarem a interação existente entre os sistemas GABAérgico e taquicinérgico, já mostrada em outros modelos experimentais, na modulação da ansiedade e memória no LT.

## ABSTRACT

The present study aimed to investigate the relationship among substance P (SP) and diazepam (DZP) in anxiety and memory related behaviors as evaluated in the elevated T maze (ETM) in rats. In the first approach, the animals were intraperitoneally (i.p.) treated with diazepam (DZP, 0,5, 1 and 2 mg/Kg; the standard drug for an anxiolytic action), pentylentetrazol (PTZ, 5, 15 and 30 mg/Kg; the standard drug for an anxiogenic action), SP (5, 50 and 250 mg/Kg, drug under investigation) or physiological saline solution (NaCl 0,9%, control solution), before they being tested in ETM. The experimental procedure in this test consisted in measuring the latency to leave the enclosed arm (Baseline, Avoidance 1 and Avoidance 2) and the open arm (Escape 1) of the apparatus, and in the re-test (72 h later), Avoidance 3 and Escape 2 were registered. Our results showed that the standard drug DZP presented an anxiolytic effect and/or an amnesic effect in the short-term memory (STM) and the standard drug PTZ showed an anxiogenic effect and/or a facilitatory effect in the learning of inhibitory avoidance. On the other hand, SP did not present any effect *per se* in this experimental paradigm. In the second approach, the animals were i.p. pretreated with DZP (1 mg/Kg) and treated, by the same route, with physiological saline solution, SP (5 mg/Kg) or PTZ (30 mg/Kg). The results showed that DZP continued to present an anxiolytic effect and/or a amnesic effect in the STM of inhibitory avoidance and this effect was blocked and reverted by pretreatment with PTZ and SP, respectively. In the third approach, the animals were pretreated i.p. with DZP (1 mg/Kg) and intracerebroventricularly (i.c.v.) treated with SP (10 pmoL) or phosphate-buffered saline (PBS). DZP continued presenting its effects which were reverted by the central administration of SP. In the last experimental approach, we have evaluated the participation of NK1 receptors in the blockade and reversion of the DZP effects by the central administration of SP. The animals were pretreated with DZP (1 mg/Kg) i.p. and FK 888 (100 pmoL) i.c.v. followed by i.c.v. treatment with SP (10 pmoL) or PBS. FK 888, an antagonist of the NK1 receptor, did not interfere in the DZP effects of DZP, but it was able to abolish the reversion of these effects induced by the central injection of SP. The latency to escape in the test and retest,

as well as the long-term memory of the inhibitory avoidance was not affected by different treatments in none of the experimental studies at ETM. In conclusion, our results shows that ETM is not a sensitive experimental paradigm to evaluate SP's effect on anxiety and memory processes and they also strengthens previous experimental data showing an interaction between the systems GABAergic and tachykinergic systems, such as previously demonstrated in other experimental models, to the modulation of anxiety and memory in ETM.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Efeito do diazepam na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ....	34
<b>Figura 2</b> - Efeito do pentilenotetrazol na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ....	36
<b>Figura 3</b> - Efeito da substância P na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ....	38
<b>Figura 4</b> - Influência da administração sistêmica de substância P e pentilenotetrazol no efeito ansiolítico e/ou amnésico do diazepam medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ...	42
<b>Figura 5</b> - Influência da administração i.c.v. de substância P no efeito amnésico e/ou ansiolítico da injeção i.p. de diazepam medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ....	45
<b>Figura 6</b> - Efeito do antagonista NK <sub>1</sub> , FK 888, na influência do tratamento central (i.c.v.) com substância P sobre o efeito amnésico e/ou ansiolítico do diazepam medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. ....	48

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Alguns neuropeptídeos de mamíferos e suas famílias. ....	3
<b>Tabela 2</b> - Classificação dos distúrbios de ansiedade segundo o manual DSM-IV. ....	9

**LISTA DE ABREVIações**

AAs	Aminoácidos
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
BZD(s)	Benzodiazepínico(s)
CCK	Colecistocinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CRH	Hormônio liberador da corticotropina
DPAG	Substância cinzenta periaquedutal dorsal
DZP	Diazepam
EK	Endocinina
GHRH	Hormônio liberador do hormônio de crescimento
GLP-1	Peptídeo-1 tipo glucagon
HK-1	Hemocinina-1
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDCVs	Vesículas de alta densidade
LHRH	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
LT	Labirinto em T
LTD	Potenciação de curta duração
LTP	Potenciação de longa duração
NBM	Núcleo Basal Magnocelular
NK	Neurocinina
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NP(s)	Neuropeptídeo(s)
nts	Neurotensina
PBS	Solução de tampão fosfatada
PPTA	Pré-pró-taquicinina A
PPTB	Pré-pró-taquicinina B

PPTC	Pré-pró-taquicinina C
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TK(s)	Taquicinina(s)
TRH	Hormônio liberador da tireotropina

## INTRODUÇÃO

### Neuropeptídeos

A definição óbvia de um neuropeptídeo (NP) seria “um peptídeo encontrado no nervo”. Entretanto, esta definição incluiria um número muito grande de peptídeos e proteínas de pequeno tamanho com inúmeras funções. Holmgren e Jensen (2001), na tentativa de dar um significado mais restrito a palavra, definem os NPs como sendo peptídeos que podem ser liberados por um neurônio como moléculas sinalizadoras, que apresentarão efeitos como neurotransmissores ou moduladores em outras células excitáveis e algumas vezes na própria célula que o libera.

Existem várias diferenças entre os NPs e os transmissores clássicos no sistema nervoso em relação à síntese, armazenamento e sinalização (Hökfelt *et al.*, 2003). Os NPs são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso, formando uma grande molécula precursora inativa (pré-pró-peptídeo). Uma parte desta molécula é clivada na seqüência N-terminal, peptídeo de sinal, dando origem a um pró-peptídeo. No aparelho de Golgi o pró-peptídeo é armazenado em vesículas de alta densidade (LDCVs, do inglês *Large Dense Core Vesicles*) junto a enzimas de processamento e transportado axonalmente para o terminal nervoso. Estas enzimas de processamento, também chamadas de convertases, removem fragmentos de peptídeos demarcados por pares de aminoácidos (AAs) básicos (Lys-Lys ou Lys-Arg). Os NPs liberados pela ação das convertases podem ser ativos ou sofrer processamento adicional pós-tradução, tal como, amidação C-terminal, glicosilação, acetilação, fosforilação e sulfatação, antes de serem secretados por exocitose, mediante um estímulo apropriado (Hökfelt *et al.*, 2000; Rang *et al.*, 2001; Zupanc, 1996).

O padrão de expressão dos NPs nos neurônios, em circunstâncias normais, pode se dar de três modos distintos: no primeiro, os NPs estão presentes em altos níveis, indicando que eles estão funcionalmente disponíveis a qualquer momento; no segundo, são expressos em níveis muito baixos, podendo ser *up-regulated*

após um estímulo apropriado, como um dano nervoso; no terceiro, apresentam expressão transitória durante o desenvolvimento, sendo muitas vezes *up-regulated* durante o período pré-natal (Hökfelt *et al.*, 2000).

Os NPs estão presentes em todas as partes do sistema nervoso e quase sempre coexistem com outros mensageiros no interior do mesmo neurônio. Geralmente, os NPs estão armazenados em compartimentos sub-celulares (LDCVs) diferentemente dos outros mensageiros (Merighi, 2002). Por esta razão, essas substâncias podem ser liberadas seletivamente sob determinados estímulos e, conseqüentemente, produzir respostas com diferentes amplitudes, durações e sinais (Nusbaum *et al.*, 2001).

Os NPs, à exceção do receptor ionotrópico para o tetrapeptídeo FMRFamida, encontrado nos neurônios do caracol *Helix aspersa* e do molusco *Aplysia*, e de um dos subtipos de receptores para a neurotensina (nts3), promovem suas ações biológicas através da ligação a receptores acoplados à proteína G, encontrados nos mais variados tecidos corporais (Cottrell, 1997; Lingueglia *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1999).

Outros dois fatos envolvendo os receptores dos NPs merecem atenção: a internalização do complexo ligante-receptor, por ser um mecanismo importante para a inativação do ligante, a regulação do receptor e talvez também para a sinalização trans-membrana (Beudet *et al.*, 1998); e a presença de receptores pré-sinápticos que afetam sua própria liberação ou a de outros co-transmissores (Lever *et al.*, 2003; Malcangio e Bowery, 1999; Maubach *et al.*, 2001).

Diferente de outros transmissores que possuem um mecanismo de recaptação, os NPs têm geralmente suas atividades peptídicas terminadas por enzimas proteolíticas, também chamadas de peptidases, proteases ou proteinases. Estas enzimas podem ser divididas em *exopeptidases* e *endopeptidases*, sendo que as primeiras hidrolisam as ligações próximas às extremidades N e C-terminal da cadeia polipeptídica, enquanto que as últimas atuam sobre as demais ligações (García-López *et al.*, 2002).

Mediante alguns critérios como distribuição anatômica, função biológica, homologia na seqüência de AAs e a procedência de um precursor comum, os NPs



têm sido agrupados em famílias, conforme pode ser visto na tabela 1 (Merighi, 2002).

**Tabela 1.** Alguns neuropeptídeos de mamíferos e suas famílias.

---

Hormônios hipotalâmicos:

Ocitocina; Vasopressina; Somatostatina; Hormônio liberador da corticotropina (CRH); Hormônio liberador do hormônio de crescimento (GHRH); Hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH); Hormônio liberador da tireotropina (TRH)

---

Taquicininas:

Substância P; Neurocinina A; Neurocinina B

---

Peptídeos opióides:

$\beta$ -endorfina; Dinorfina; Met-encefalina; Leu-encefalina

---

Neuropeptídeo Y e peptídeos relacionados:

Neuropeptídeo tirosina; Polipeptídeo pancreático; Polipeptídeo tirosina-tirosina

---

Família VIP-glucagon:

Polipeptídeo intestinal vasoativo; Peptídeo-1 tipo glucagon (GLP-1)

---

Peptídeos não-classificados:

Peptídeo natriurético cerebral; CART/peptídeo; Corticostatina; Endorfina-1 e 2; Peptídeo tipo glucagon 1; Galanina; Hipocretina/orexina; Neurotensina; Nocistatina; Nociceptina/orfanina FQ; Urocortina; Hormônio adrenocorticotrópico (ACTH); Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); Colecistocinina (CCK)

---

Adaptado de Merighi (2002).

## Taquicininas

Em 1931, Ulf von Euler e John Gaddum descreveram que um extrato bruto, obtido a partir do cérebro e intestino de eqüinos, continha um fator resistente à atropina que causava contração de tecidos intestinais isolados e reduzia a pressão sangüínea em coelhos. Em 1934, John Gaddum e Schild introduziram o termo substância P (SP), referindo-se a um concentrado do princípio ativo na forma de um pó seco estável, previamente denominado como “preparação P”. Em 1971, Michael Chang, Susan Leeman e Hugh Niall determinaram pela primeira vez a seqüência de AAs da SP como sendo a de um undecapeptídeo (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>; Para revisão histórica ver Leeman e Ferguson, 2000).

A SP foi o primeiro e o único peptídeo, até 1983, a ser caracterizado como uma taquicinina (TK) nos mamíferos. Em 1983, dois grupos distintos de pesquisadores relataram simultaneamente a existência de novas TKs (Kimura *et al.*, 1983; Maggio *et al.*, 1983; Nawa *et al.*, 1983) que, mais tarde, tornaram-se conhecidas como neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB). Passados dois anos, dois novos peptídeos foram incluídos a essa família, o neuropeptídeo K (Tatemoto *et al.*, 1985) e o neuropeptídeo  $\gamma$  (Kage *et al.*, 1988).

O nome TK resulta da similaridade farmacológica desses peptídeos com a bradicinina, um mediador inflamatório endógeno, que elícita uma contração lenta (*brady*) da musculatura lisa extra-vascular. As TKs, ao contrário, promovem uma contração imediata (rápida, *tachy*) do mesmo tecido (Khawaja e Rogers, 1996). Os membros dessa família compartilham uma seqüência comum de AAs na extremidade C-terminal, Phe-**X**-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, onde o **X** pode ser um AA aromático ou alifático, fenilalanina (Phe) ou tirosina (Try) e valina (Val) ou isoleucina (Ile), respectivamente (para revisão ver Severini *et al.*, 2002).

Nos mamíferos, as TKs são derivadas de dois genes distintos, os genes pré-pró-taquicinina A (PPTA) e pré-pró-taquicinina B (PPTB), que codificam a síntese da SP, NKA, neuropeptídeo K, neuropeptídeo- $\gamma$  e NKB, respectivamente. O gene PPTA pode expressar quatro diferentes formas de RNAm (RNAm da  $\alpha$ ,  $\beta$ ,

$\gamma$  e  $\delta$ -PPTA), sendo que todas elas transcrevem a seqüência de AAs para a síntese de SP (Harmar *et al.*, 1990; Hökfelt *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 1987; Nawa *et al.*, 1983).

Recentemente, a família das TKs foi ampliada com a descoberta de um terceiro gene, o pré-pró-taquicinina C (PPTC), que codifica a síntese dos peptídeos hemocinina 1 (HK-1) e endocininas A, B, C e D (EKA-D), em roedores e humanos (Kurtz *et al.*, 2002; Page *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000).

As ações biológicas promovidas pelas TKs são mediadas pela interação com três subtipos de receptores acoplados a proteína G: neurocinina (NK)<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>; que exibem preferência de ligação para SP, NKA e NKB, respectivamente. Embora, as TKs endógenas não sejam altamente seletivas para um dado receptor, um dos critérios válidos para a classificação dos receptores taquicinérgicos é a ordem de potência dos agonistas (Mussap *et al.*, 1993; Nakanishi, 1991). Com as recentes demonstrações de que a potência de ligação da HK-1 é similar a da SP aos receptores taquicinérgicos (Kurtz *et al.*, 2002; Duffy *et al.*, 2003), a nomenclatura existente para esses peptídeos e seus receptores vem sendo questionada e ainda não alcançou um consenso geral (Patacchini *et al.*, 2004).

A estrutura molecular de cada um dos receptores taquicinérgicos difere ligeiramente entre as espécies, particularmente entre ratos e cobaias (Nakanishi, 1991). Gerard e colaboradores (1991) demonstraram que a seqüência protéica do receptor NK<sub>1</sub> em ratos e humanos apresenta uma homologia de 92% entre as duas espécies. Além disso, há evidências que corroboram para a existência de diferentes subtipos ou conformações dos receptores NK<sub>1</sub> em roedores e humanos (Beaujouan *et al.*, 2000; Caberlotto *et al.*, 2003; Fong *et al.*, 1992).

Em ratos, os genes que codificam os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> estão localizados nos cromossomos 4, 20 e 2, respectivamente (Mori *et al.*, 1992), enquanto nos seres humanos os genes que codificam os receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub> estão localizados nos cromossomos 2, 10 e 4, respectivamente (Gerard *et al.*, 1990; Gerard *et al.*, 1991; Kris *et al.*, 1991; Pennefather *et al.*, 2004).

## Substância P

### Localização da substância P no sistema nervoso central

A investigação da distribuição anatômica de SP só foi possível a partir dos anos 70, com o desenvolvimento de anticorpos anti-SP (Ribeiro-da-Silva e Hökfelt, 2000). No sistema nervoso central (SNC) de ratos, fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos à SP foram encontrados em altas densidades no hipotálamo (núcleo pré-optico medial e núcleo hipotalâmico anterior), tálamo (parte dorsal do núcleo medial da habênula), globo pálido, estriado, núcleo entopeduncular, núcleo amigdalóide cortical, substância cinzenta periaquedutal, substância negra, *locus coeruleus* e núcleo do trato solitário (Cuello e Kanazawa, 1978; Shults *et al.*, 1984; Ribeiro-da-Silva e Hökfelt, 2000). Em humanos, as áreas mais imunorreativas à SP no SNC estão na amígdala, no núcleo caudado, no putâmen, no globo pálido, no hipotálamo, na substância negra e no *locus ceruleus* (Severini *et al.*, 2002). Além disso, Harlan *et al.* (1989), usando a técnica de hibridização *in situ*, revelaram que o septo lateral, a região central e medial da amígdala e a substância cinzenta periaquedutal contêm neurônios que expressam o gene PPTA, cuja transcrição origina o RNAm responsável pela síntese da SP e NKA.

### Distribuição dos receptores taquicinérgicos no sistema nervoso central

A distribuição dos receptores NK<sub>1</sub> no SNC de mamíferos tem sido investigada por técnicas de hibridização *in situ*, imunohistoquímica e radioautografia, que revelaram resultados similares e forneceram evidências para uma ampla, mas distinta distribuição desses receptores em várias áreas cerebrais (Saria, 1999). No SNC de ratos os receptores NK<sub>1</sub> estão distribuídos, de forma moderada à intensa, no estriado, núcleo entopeduncular, núcleo *accumbens*, núcleo amigdalóide medial, giro denteado, habênula, núcleo lateral do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), núcleo da rafe, *locus coeruleus*,

núcleo do trato solitário e tronco cerebral (Maeno *et al.*, 1993; Mussap *et al.*, 1993; Nakaya *et al.*, 1994). Esses resultados somados aos obtidos por Yip e Chahl (1999), que revelaram o padrão de ativação de *c-fos*, após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de um agonista seletivo do receptor NK<sub>1</sub> ([Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]), em várias estruturas do sistema límbico do cérebro de cobaias, sugerem papéis importantes para os receptores NK<sub>1</sub> no controle das emoções, aprendizagem e memória, atenção e regulação autonômica. Entretanto, ao se comparar o padrão regional de distribuição do receptor NK<sub>1</sub> com o das fibras e corpos celulares positivos para SP no SNC, percebe-se que em algumas dessas áreas não há uma relação consistente entre esses parâmetros. Um exemplo disso está na substância negra, onde há uma intensa densidade de fibras nervosas reativas para SP e quase não há para o receptor NK<sub>1</sub> (Nakaya *et al.*, 1994; Shults *et al.*, 1984).

A presença dos receptores NK<sub>2</sub> no SNC tem sido investigada utilizando diferentes radioligantes, mas devido a pobre seletividade dos ligantes utilizados, esses resultados não são convincentes (Maggi, 1995). Porém, a demonstração da presença de receptores NK<sub>2</sub> no SNC, especialmente em alguns núcleos talâmicos, hipocampo e camadas corticais, tem sido feita com outras técnicas e ferramentas, incluindo o uso de radioligantes mais seletivos (Hagan *et al.*, 1993; Saffroy *et al.*, 2001).

Vários estudos, através das técnicas de radioautografia (Dam *et al.*, 1990; Mussap e Burcher, 1990; Renzetti *et al.*, 1991; Stoessl e Hill, 1990), hibridização *in situ* (Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996) e imunohistoquímica (Carpentier e Baude, 1996) têm mostrado uma ampla distribuição dos receptores NK<sub>3</sub> no SNC de ratos. Particularmente, uma distribuição de forma moderada à intensa é encontrada no bulbo olfatório, córtex cingulado, hipocampo, amígdala, núcleo do leito da estria terminal, áreas hipotalâmicas dorsal e lateral, área tegmental ventral, *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago (para revisão ver Massi *et al.*, 2000).

## **Substância P e ansiedade**

Existem tantas definições de ansiedade quanto às causas de sua manifestação. De modo geral, a ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, difuso ou vago, freqüentemente acompanhado por uma ou mais sensações físicas – por exemplo, aumento da pressão arterial, da freqüência cardíaca, da respiração, urgência de micção ou defecação induzida pela expectativa de perigo, dor ou necessidade de um esforço especial. A inquietação e o desejo de movimentar-se são também comuns (Brandão, 2001).

A ansiedade difere conceitualmente do medo. O medo refere-se às respostas comportamentais e neurovegetativas decorrentes de uma ameaça física ou à própria sobrevivência do organismo, se manifestando em situações onde o perigo é iminente pela presença imediata do objeto ou da situação temida. A ansiedade é um estado de apreensão diante de circunstâncias onde o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente, estando ligada a uma expectativa futura desproporcional, ou quando os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos (Gentil, 1994; Gentil Filho, 1994; Graeff *et al.*, 1999).

Embora a ansiedade seja considerada um fenômeno emocional comum na população humana, ela pode expressar um estado de ansiedade patológica que causa sofrimento aos pacientes (Clement e Chapouthier, 1998). Entretanto, o limite entre ansiedade normal e patológica é difícil de estabelecer. Um certo grau de ansiedade é necessário para um bom desempenho em tarefas cognitivas, enquanto que uma ansiedade exagerada pode ser inadequada, a ponto de perturbar acentuadamente o desempenho (Brandão, 2001; Graeff *et al.*, 1999).

A ansiedade pode ser dividida em duas categorias: o “traço de ansiedade” e o “estado de ansiedade”. O “traço de ansiedade” é uma característica durável e persistente da personalidade do indivíduo e que reflete a forma como ele interage com seu ambiente físico e social. Por outro lado, o “estado de ansiedade” é o que é visto em um dado indivíduo por um determinado período. Portanto, muda com o

tempo, com os níveis de estresse e a forma que o estresse é percebido (Sandford *et al.*, 2000; para revisão ver Endler e Kocovski, 2001).

A 4ª edição do Manual Estatístico e Diagnóstico de Distúrbios Mentais (DSM-IV, do inglês *Diagnostic Statistical Manual*), da Associação Psiquiátrica Norte-americana, lista seis tipos de ansiedade patológica (Tabela 2), tomando como referência à fenomenologia (intensidade, duração, qualidade e a história dos sintomas da ansiedade) e as diferenças biológicas (genética, respostas fisiológicas e farmacológicas; *American Psychiatric Association*, 1994).

**Tabela 2.** Classificação dos distúrbios de ansiedade segundo o manual DSM-IV.

<b>DISTÚRBIOS DE ANSIEDADE</b>
Distúrbio de ansiedade generalizada
Distúrbio do pânico (com ou sem agorafobia)
Distúrbio de estresse pós-traumático
Fobias sociais
Fobias específicas
Distúrbio obsessivo compulsivo

Adaptado de Gross e Hen (2004).

A ansiedade patológica pode provocar confusão e distorções da percepção temporal, espacial, em relação a pessoas e ao significado dos acontecimentos. Essas distorções podem interferir no aprendizado pela diminuição da concentração, redução da memória e prejuízo da capacidade de associação (Brandão, 2001).

Os efeitos da SP sobre os comportamentos relacionados com medo e ansiedade em roedores são diferentes na dependência da região cerebral e da dose administrada. Dessa forma, a administração sistêmica de SP, em baixas doses, ou no núcleo basal magnocelular (NBM) resulta em um efeito ansiolítico (Hasenöhrl *et al.*, 1998); enquanto a injeção sistêmica de SP, em altas doses, na DPAG, no núcleo septal lateral ou i.c.v. promove um efeito ansiogênico (Aguiar e

Brandão, 1996; De Araujo *et al.*, 1999; Gavioli *et al.*, 2002; Gavioli *et al.*, 1999; Hasenöhrl *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 1996).

Esses dados obtidos com a SP podem ser extrapolados para os seus fragmentos (amino (N)- e carboxi (C)-terminal) e para outras espécies de animais. Estudos têm demonstrado que a injeção do fragmento C-terminal no ventrículo lateral e na DPAG apresenta um efeito ansiogênico (De Araujo *et al.*, 2001; De Araujo *et al.*, 1999; Duarte *et al.*, 2004), enquanto a administração sistêmica do fragmento N-terminal, em primatas não-humanos (*Callithrix penicillata*; Barros *et al.*, 2002) ou na DPAG (De Araujo *et al.*, 2001), e dos fragmentos C- e N-terminal, no NBM de roedores (Nikolaus *et al.*, 2000), apresenta efeito ansiolítico.

Mais evidências de que o sistema SP-NK<sub>1</sub> está envolvido na regulação das respostas de medo e ansiedade vêm dos estudos com antagonistas e animais *knockout* do receptor NK<sub>1</sub> (NK<sub>1</sub> -/-) ou do gene que codifica SP (PPTA -/-; Santarelli e Saxe, 2003). Diferentes antagonistas dos receptores NK<sub>1</sub> inibem as vocalizações em cobaias separadas de suas mães (Boyce *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2000) e em gerbilos e outros roedores apresentam um aumento no contato social no teste de interação social (Cheeta *et al.*, 2001; File, 1997; Gentsch *et al.*, 2002; Vassout *et al.*, 2000) e efeitos tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE, Teixeira *et al.*, 1996; Varty *et al.*, 2002). Os resultados obtidos com a utilização de animais *knockout* demonstraram que as supressões do gene PPTA e do receptor NK<sub>1</sub> resultaram em comportamentos antidepressivo em camundongos avaliados nos testes da natação forçada (“forced-swimming test”) e da suspensão pela cauda (“tail-suspension test”), e ansiolítico nos testes de interação social, vocalizações induzidas por separação maternal e LCE (Bilkei-Gorzo *et al.*, 2002; Rupniak *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2001). Juntos, a interrupção farmacológica e genética da neurotransmissão SP/NK<sub>1</sub> fornecem evidências substanciais de que esta via está envolvida na mediação de comportamentos em modelos animais de ansiedade e depressão.

Além dos receptores NK<sub>1</sub>, a modulação da atividade dos outros receptores taquicinérgicos tem sido explorada por seu possível papel funcional nos distúrbios de ansiedade. Os receptores NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>, principalmente, estão distribuídos em



áreas tradicionalmente envolvidas no controle do medo e/ou ansiedade, tais como hipotálamo, amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (Ding *et al.*, 1996; Maggi, 1995; Mussap *et al.*, 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993). A partir dessa hipótese, alguns trabalhos demonstraram que a administração i.c.v. dos agonistas natural (NKA) e seletivo ( $[\beta\text{-Ala}^8]$ neurocinina A-(4-10)) do receptor  $\text{NK}_2$  apresentaram um efeito ansiogênico, enquanto que a administração do agonista sintético seletivo do receptor  $\text{NK}_3$  (senktide), pela mesma via, indicou um efeito ansiolítico em roedores avaliados no LCE (Ribeiro *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 1996). De acordo com esses resultados estão os obtidos com os antagonistas do receptor  $\text{NK}_2$  (GR 159897, GR 100679 e SR 48968), que apresentaram um efeito ansiolítico, em roedores e primatas, nos testes de interação social, LCE e caixa claro-escuro (De Lima *et al.*, 1995; Griebel *et al.*, 2001; Stratton *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1995) e aqueles com o antagonista peptídico do receptor  $\text{NK}_3$ ,  $[\text{Trp}^7, \beta\text{Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ , que mostrou um perfil de ação ansiogênica, em camundongos avaliados no LCE (Ribeiro *et al.*, 1999).

### **Substância P e memória**

A memória é a capacidade que têm o homem e os animais de armazenarem informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Ela pode ser classificada quanto ao tempo de retenção e quanto à sua natureza. Quanto ao tempo de retenção, a memória pode ser dividida em (1) *memória imediata* ou *memória ultra-rápida*, cuja retenção não dura mais que alguns segundos; (2) *memória de curta duração* (STM, do inglês *short-term memory*), que dura segundos, minutos ou horas e serve para proporcionar a continuidade do nosso sentido de “presente”. Um tipo especial de memória de curta duração é a chamada memória operacional (WM, do inglês *working memory*), que se refere à habilidade de reter informações por um tempo suficiente para uma ação seqüencial; e (3) *memória de longa duração* (LTM, do inglês *long-term memory*), que retém a informação por dias, semanas ou até mesmo a vida inteira (Lent, 2004; Purves *et al.*, 1997).

Uma questão que tem gerado muita controvérsia é se as memórias de curta e de longa duração estão seqüencialmente ligadas ou agem independentemente e em paralelo (McGaugh, 2000). Estudos realizados utilizando uma tarefa de esquivia inibitória (*step-down*) têm mostrado que a memória de longa duração inicia imediatamente após a aquisição e coexiste, mas não é dependente, dos processos da memória de curta duração, que opera através de seus próprios sistemas bioquímicos (Bevilaqua *et al.*, 2003; Bianchini *et al.*, 1999; Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo *et al.*, 1999; Izquierdo *et al.*, 1998; Quevedo *et al.*, 2004). Em termos comportamentais, também existem diferenças entre as características das memórias de curta e de longa duração. Ao contrário da primeira, a memória de longa duração sofre extinção e é susceptível aos efeitos amnésicos da exposição a um novo ambiente (Izquierdo *et al.*, 1999). A formação da memória de longa duração ocorre através de mudanças nas sinapses, sendo que duas formas de plasticidade sináptica, a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e a potenciação de curta duração (LTD, do inglês *long-term depression*), são os processos candidatos a mediar as bases bioquímicas da aprendizagem e memória (Malenka e Bear, 2004).

Quanto à sua natureza, a memória pode ser classificada em *explícita* ou *implícita*. A memória *explícita* ou declarativa é a espécie de memória que é mencionada quando o termo “memória” é usado na linguagem do dia a dia; e se refere à capacidade de recordação consciente de fatos e eventos. A informação armazenada é flexível e pode orientar o desempenho em uma ampla variedade de teste e/ou condições experimentais. Esse tipo de memória depende da integridade do lobo temporal medial e de estruturas diencefálicas, tais como o hipocampo, *subiculum* e córtex entorrinal. A memória *implícita* ou *não declarativa*, ao contrário da memória explícita, é caracterizada pela evocação não consciente de tarefas, como as habilidades motoras e depende da integridade do córtex motor e pré-motor, do estriado e também do cerebelo (Kolb e Whishaw, 2002; Lent, 2004; Squire, 2004).

A memória implícita pode ser dividida em quatro tipos: 1) *memória de representação perceptual* ou *memória adquirida e evocada por meio de “dicas”*

(*priming*), que corresponde à representação difusa de uma imagem, preliminar à compreensão do que ela significa; 2) *memória de procedimentos*, que corresponde às habilidades e hábitos; 3) *memória associativa*, que associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico) ou um estímulo a uma certa resposta (condicionamento operante); e 4) *memória não associativa*, que atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição da apresentação de um estímulo (Lent, 2004).

A memória é muitas vezes considerada como um processo que tem vários estágios, incluindo aquisição, consolidação e evocação (Abel e Lattal, 2001). A aquisição consiste na entrada de uma informação qualquer nos sistemas neurais ligados à memória. Como as informações são geralmente múltiplas e complexas, os sistemas de memória fazem uma seleção, permitindo somente a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição, mais marcantes para a emoção, mais focalizados pela nossa atenção, mais fortes sensorialmente ou, simplesmente, priorizados por critérios desconhecidos. Após a aquisição dos aspectos selecionados de uma informação, estes são retidos temporariamente e em seguida, alguns desses aspectos ou mesmo todos eles, podem desaparecer da memória (esquecimento) ou permanecer por um tempo prolongado, às vezes permanentemente. Neste último caso diz-se que houve consolidação (Lent, 2004). Há alguns casos em que o esquecimento é patológico. A perda da memória e/ou da capacidade de adquirir novas informações é chamada de amnésia e pode ser dividida em amnésia retrógrada e amnésia anterógrada (Kapczinski *et al.*, 2000). Na amnésia anterógrada ocorre perda seletiva da memória para eventos ocorridos após a recuperação da consciência, enquanto que na amnésia retrógrada ocorre perda seletiva para eventos ocorridos antes do distúrbio que gerou a perda da consciência (Brandão, 2001).

Não há dúvida que a memória para eventos com componente emocional tende a ser mais bem lembrada que a para eventos neutros (McGaugh, 2004). Isso é claramente adaptativo, pois estímulos emocionais, sejam prazerosos ou aversivos, são geralmente mais importantes para a sobrevivência das espécies (Quevedo *et al.*, 2003). Há várias evidências de que a amígdala, particularmente o

núcleo basolateral, está envolvida na modulação da consolidação da memória, através de projeções para muitas outras regiões cerebrais, incluindo o hipocampo, o prosencéfalo basal, o núcleo *accumbens*, o estriado e várias regiões corticais (MacGaugh, 2002a). Relatos obtidos a partir de diferentes tipos de experimentos indicam que os hormônios do estresse adrenal, adrenalina e glicocorticóides, liberados durante ou após experiências com caráter emocional, exercem um papel crítico na consolidação de memórias duradouras através da ativação da amígdala basolateral (McGaugh, 2002b; para revisão ver McGaugh, 2004).

O último dos processos mnemônicos é a evocação ou lembrança, através da qual temos acesso à informação armazenada para utilizá-la mentalmente na cognição e na emoção, por exemplo, ou para exteriorizá-la através do comportamento (Lent, 2004).

Vários estudos têm mostrado que a SP está envolvida em processos mnemônicos, bem como em processos reforçadores. Nesses estudos, diferentes tarefas de aprendizagem (esquiva inibitória e tarefas apetitivas, modelos de aprendizagem e habituação em labirintos), vias de administração (sistêmica e em certas áreas cerebrais) e variação no tempo de injeção em relação à tarefa (pré-, pós-treino e pré-teste) têm sido utilizadas (Huston e Hasenöhrl, 1995). A administração sistêmica de SP em roedores facilita a aprendizagem de tarefas de discriminação (Schlesinger *et al.*, 1986), de esquiva ativa e passiva (Schlesinger *et al.*, 1983a) e reverte a amnésia retrógrada e anterógrada induzida por choque eletroconvulsivo e diazepam, respectivamente (Costa e Tomaz, 1998; Schlesinger *et al.*, 1983b). Além disso, outros trabalhos têm demonstrado que a administração pós-treino de SP tem efeitos facilitadores da memória em tarefas de esquiva passiva, após injeção sistêmica (Tomaz e Huston, 1986; Hasenöhrl *et al.*, 2000) ou central no núcleo septal medial (Stäubli e Huston, 1980), no núcleo basal magnocelular (Gerhardt *et al.*, 1992) e na amígdala basolateral (Lénárd e Kertes, 2002).

Entretanto, estudos mais antigos mostraram que a administração central pós-treino de SP na substância negra (Huston e Stäubli, 1978) e na amígdala (Huston e Stäubli, 1979) prejudica o desempenho dos animais em tarefas de

aprendizagem, sendo que este último dado contraria os resultados mais recentes de Lénárd e Kertes (2002).

Huston e colaboradores (1977) propõem a teoria do processamento da memória para agentes reforçadores. Especificamente, os agentes reforçadores podem fortalecer eventos centrais geralmente referidos como “traços de memória”, impedindo a sua extinção e, conseqüentemente, fortalecendo a aprendizagem (consolidação; para revisão ver Huston e Oitzl, 1989). Vários estudos têm estabelecido uma relação entre os agentes reforçadores, como as drogas de abuso, estimulantes e comida, com os níveis de dopamina no sistema mesolímbico (Koob, 1992; Koob e Bloom, 1988; Wise e Rompre, 1989). Além disso, o bloqueio ou destruição da atividade dopaminérgica no núcleo *accumbens* impede o efeito reforçador desses estímulos (Leone e Di Chiara, 1987). A administração periférica e central de SP também apresenta efeitos reforçadores (Holzhäuer-Oitzl *et al.*, 1988; Holzhäuer-Oitzl *et al.*, 1987; Huston e Oitzl, 1989). Soma-se a isso o fato de que a administração sistêmica de SP aumenta a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (Boix *et al.*, 1992). Assim, é possível que a SP melhore o desempenho em tarefas de aprendizagem por sua ação reforçadora nos processos mnemônicos (para revisão ver Huston e Oitzl, 1989).

Os efeitos nos processos mnemônicos e reforçadores obtidos com a SP íntegra podem também ser extrapolados para seus fragmentos C- e N-terminal. A administração sistêmica (Hasenöhrl *et al.*, 1990a; Hasenöhrl *et al.*, 1990b) e central no núcleo basal magnocelular (Gerhardt *et al.*, 1992; Hasenöhrl *et al.*, 1990b) das seqüências N- e C-terminal promovem um aumento na aprendizagem da esQUIVA inibitória e na preferência condicionada de lugar, respectivamente, de forma similar à molécula de SP inteira (para revisão ver Huston *et al.*, 1993). Uma outra relação estrutura-atividade bastante similar tem sido obtida para o efeito mnemônico da SP após a injeção no núcleo *accumbens*, onde o fragmento N-terminal (SP<sub>1-7</sub>), mas não o C-terminal (SP<sub>7-11</sub>), demonstrou facilitar a aprendizagem em uma tarefa de esQUIVA passiva (Gaffori *et al.*, 1984).

## Benzodiazepínicos

Desde sua introdução na prática clínica há 40 anos, o uso dos benzodiazepínicos (BZDs) tem tornado-se amplo por causa de sua eficácia, segurança e tolerabilidade. Até 1977 o seu mecanismo de ação era desconhecido, quando foi descoberto que os BZDs interagem com receptores específicos no SNC. Em 1987 este receptor, o benzodiazepínico-GABA<sub>A</sub>, pertencente à superfamília de canais iônicos ativados por ligantes foi clonado. Atualmente, sofisticadas técnicas de biologia molecular e de neuroimagem estão fornecendo informações precisas de como e onde os BZDs atuam (Nutt e Malizia, 2001).

Os BZDs agem por aumentar a efetividade do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, do inglês *gamma-aminobutyric acid*), o neurotransmissor inibitório predominante no SNC. A ligação do GABA ao complexo receptor benzodiazepínico-GABA<sub>A</sub> induz mudanças conformacionais que aumentam a permeabilidade do poro central aos íons cloreto. O influxo resultante de cloreto hiperpolariza o neurônio, reduzindo sua excitabilidade e produzindo um efeito inibitório geral na atividade neuronal (Nutt e Malizia, 2001; Owens e Kriegstein, 2002).

Os receptores GABA<sub>A</sub> também contêm outros sítios de ligação para diferentes espécies de moduladores, tais como os barbitúricos, neuroesteróides, picrotoxina e anestésicos, o que o torna alvo de medicações psiquiátricas para o tratamento, dentre outros, da ansiedade, insônia e epilepsia (Korpi *et al.*, 2002; Sandford *et al.*, 2000).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são compostos por cinco subunidades protéicas, cuja composição e arranjo podem variar. Nos mamíferos são conhecidas dezenove subunidades ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\phi$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3), que podem formar os mais variados subtipos de receptores, amplamente distribuídos no SNC, com algumas subunidades sendo mais restrita a determinadas localizações, como por exemplo, a subunidade  $\alpha$ -5 nas células piramidais hipocámpais (Burt, 2003). Usando técnicas de biologia molecular (camundongos *knockout* e *knockin*) têm-se demonstrado que a subunidade  $\alpha$ 1 exerce um papel importante no efeito sedativo;

a subunidade  $\alpha 2$  no efeito ansiolítico; e a subunidade  $\alpha 5$  nas ações dos BZDs nos processos mnemônicos (Burt, 2003; Whiting, 2003).

### **Benzodiazepínicos, ansiedade e memória**

As evidências de que os distúrbios de ansiedade podem ser causados por anormalidades no receptor BZD vêm de estudos utilizando agonistas e antagonistas deste receptor (Nutt e Malizia, 2001). Em animais experimentais, efeito ansiolítico tem sido relatado no LCE, após a administração aguda de BZDs e ansiogênico, após a administração de antagonistas e agonistas inversos do receptor  $GABA_A$  (Rodgers e Cole, 1994). Além disso, os BZDs reduzem as medidas ansiogênicas avaliadas no campo aberto, como tempo gasto na periferia, “grooming” e defecação, e na caixa claro-escuro, onde aumentam a latência para entrar no compartimento escuro (Clement e Chapouthier, 1998).

Clinicamente, os BZDs têm sido usados extensivamente para o tratamento do distúrbio de ansiedade generalizada (DAG), pois possuem um rápido início de ação, com máximo efeito alcançado dentro de duas semanas. A droga favorita, por anos nesta classe de medicamentos, tem sido o diazepam (DZP, agonista do receptor  $GABA_A$ ). Entretanto, para o tratamento do distúrbio de pânico (DP) o BDZ mais eficaz é o alprazolam, BDZ de alta potência (Argyropoulos *et al.*, 2000).

Além da ação ansiolítica, os BZDs possuem outras propriedades farmacológicas importantes, que encontram aplicações clínicas. Assim, são hipnóticos em doses mais elevadas que as ansiolíticas, produzem relaxamento parcial da musculatura estriada ou voluntária e melhoram certas manifestações da epilepsia. Em contrapartida, causam ataxia e instabilidade da marcha (Graeff *et al.*, 1999).

Várias evidências têm apontado o envolvimento do complexo receptor  $GABA_A$  nos processos mnemônicos. Compostos que aumentam a ação do GABA, tais como os BZDs, prejudicam o processamento da memória. Por outro lado, compostos que reduzem a ação do GABA, tais como  $\beta$ -carbolina ( $\beta$ -CCM),

pentilenotetrazol ou picrotoxina, têm uma ação oposta, isto é, melhoram o processamento da memória (Chapouthier e Venault, 2004).

Estudos experimentais, usando tarefas de esQUIVA inibitória, mostraram que a administração pós-treino do agonista GABA<sub>A</sub>, muscimol, na região CA1 do hipocampo causa amnésia para a STM e de LTM; no córtex entorrinal e parietal reduz a latência de retenção da STM; e no córtex pré-frontal anterolateral bloqueia a LTM (Izquierdo *et al.*, 1999; Izquierdo *et al.*, 1998; Zarrindast *et al.*, 2002). Na amígdala, a injeção pós-treino de muscimol e baclofen, antagonista do receptor GABA<sub>B</sub>, também reduz a latência de retenção, enquanto a administração intrahipocampal e intraamígdala do antagonista GABA<sub>A</sub>, bicuculina, promove um efeito contrário e diminui o efeito do muscimol (Izquierdo e Medina, 1991; Zarrindast *et al.*, 2002). Estudos experimentais e clínicos mostraram ainda um efeito amnésico para os BZDs. Em animais experimentais, vários BZDs demonstraram causar amnésia, em diferentes variantes de uma tarefa de esQUIVA passiva (Costa e Tomaz, 1998; Izquierdo *et al.*, 1999; Zarrindast *et al.*, 2002). Em seres humanos, os efeitos foram primeiramente observados quando os BZDs foram utilizados na anestesia pré-cirúrgica (Chapouthier e Venault, 2004; Rudolph e Antkowlak, 2004).

### **Labirinto em T elevado - modelo experimental de ansiedade e memória**

O modelo experimental de determinada condição normal ou patológica representa uma tentativa de: 1) estabelecer um sistema de teste, possibilitando a simulação de certos aspectos da condição clínica e normal; 2) permitir analisar o mecanismo de ação de agentes conhecidos; 3) detectar o potencial terapêutico de novas drogas (Porsolt *et al.*, 1993). No entanto, para que um modelo seja considerado útil para avaliar uma determinada condição normal ou patológica, ele precisa ser previamente validado. Três critérios de validade costumam ser utilizados (Clement e Chapouthier, 1998; Graeff e Guimarães, 2001): 1) validade de predição ou predictabilidade, é definida como a capacidade do teste de prever efeitos de drogas na clínica. Assim, um modelo com alto valor neste critério deve



ser sensível a agentes farmacológicos que atenuam ou agravam determinada condição patológica, na direção esperada, bem como insensível a drogas que afetam outros distúrbios. Mais ainda, deve apresentar correlação positiva, altamente significativa, entre a magnitude do efeito clínico e a alteração da medida do comportamento animal no teste, tomada como índice da psicopatologia; 2) validade de expressão ou analógica se refere à semelhança entre o comportamento do animal no teste com as manifestações clínicas do transtorno psiquiátrico; 3) validade teórica ou homologia considera a correspondência entre processos fisiológicos, bioquímicos, psicológicos e/ou substratos neuroanatômicos mobilizados na patogenia do transtorno e no comportamento animal medido no teste.

Neste contexto, o labirinto em T (LT) foi desenvolvido baseado na hipótese de Deakin e Graeff (1991) sobre os efeitos opostos da serotonina nos distúrbios de ansiedade generalizada e pânico. Segundo esses autores existem dois sistemas serotoninérgicos separados, ambos partindo do núcleo dorsal da rafe, que regulam comportamentos defensivos. Em um sistema, a ativação da via serotoninérgica, que inerva a substância cinzenta periaquedutal dorsal, inibe reações de fuga ou luta, que estão associadas a respostas de pânico; enquanto que no outro a ativação da via serotoninérgica que inerva a amígdala e o córtex frontal, facilita comportamentos defensivos aprendidos, como a esquiva inibitória, e pode ser relacionada, em termos clínicos, ao distúrbio de ansiedade generalizada (Graeff *et al.*, 1998; Graeff *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 1994; Zangrossi *et al.*, 2001).

O LT ou *elevated T-maze* (ETM) é derivado do *elevated plus-maze* (EPM) ou labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo de ansiedade amplamente utilizado e validado para ratos e camundongos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987). O aparelho possui três braços de dimensões iguais, elevados a 50 cm do chão, sendo que um dos braços é fechado por paredes laterais e é perpendicular aos outros dois braços abertos, formando assim um labirinto em forma de “T” (Graeff *et al.*, 1993).

Na sessão experimental são avaliadas duas espécies de comportamentos motivados aversivamente: a esquiva inibitória e a fuga dos braços abertos. O primeiro corresponde ao tempo que os animais levam para deixar o braço fechado, sendo que a exposição repetida dos animais dentro deste braço para explorar o aparelho permite que eles aprendam a esquivar-se dos braços abertos, num comportamento conhecido como resposta condicionada de medo (esquiva inibitória). O último corresponde ao tempo que os animais levam para deixar um dos braços abertos em direção ao braço fechado, num comportamento conhecido como resposta de fuga. Além disso, a memória desses procedimentos pode ser avaliada pela re-exposição dos animais ao aparelho, após um determinado tempo, pelos mesmos parâmetros (Conde *et al.*, 1999; Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997).

A tendência natural dos roedores de esquivarem-se de lugares abertos (Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993) faz com que as medidas de latência de saída do braço fechado do labirinto sejam crescentes e duradouras, pois podem ser recuperadas até três meses após a primeira exposição (Sanson e Carobrez, 1999). Além disso, pelo fato do condicionamento ser uma forma de aprendizado, o medo gerado no labirinto pode ser avaliado como medida de ansiedade, bem como de memória. De fato, várias evidências experimentais indicam que as estruturas cerebrais envolvidas na ansiedade e na modulação da memória, particularmente da memória emocional, sobrepõem-se extensivamente (Graeff *et al.*, 1993; Tomaz *et al.*, 1992 *apud* Graeff *et al.*, 1993).

A SP e o DZP parecem modificar tanto as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, como aquelas relacionadas à aprendizagem e memória. Além disso, em animais, foi estabelecida uma relação entre as TKs e o DZP na avaliação desses comportamentos, em diferentes modelos experimentais. Na ansiedade, esta relação foi obtida através do bloqueio da ação ansiolítica do DZP com a administração i.c.v. de NKA e Trp-7 (antagonista peptídico seletivo do receptor NK<sub>3</sub>; Drapeau *et al.*, 1990), mas não com SP, em camundongos avaliados no LCE, sendo que o mecanismo de ação desses compostos taquicinérgicos não parece envolver uma ação direta no sítio de ligação dos BZDs

no complexo receptor GABA<sub>A</sub>, porque o pré-tratamento com flumazenil, antagonista BZD, não foi capaz de bloquear o efeito ansiolítico promovido pela administração central do antagonista NK<sub>2</sub> SR48968 (Emonds-Alt *et al.*, 1992; Ribeiro e De Lima, 2002). Na memória, esta relação foi obtida através do bloqueio do efeito amnésico promovido pelo DZP, i.p. pré-treino, com a administração de SP e de seu fragmento N-terminal (SP1-7), i.p. pós-treino, mas não com a sua seqüência C-terminal ([pGlu<sup>6</sup>]-SP6-11), em ratos avaliados no *step-down* (Costa e Tomaz, 1998).

O presente trabalho procura verificar a relação existente entre as TKs, em especial a SP, e o DZP nos parâmetros de medo e ansiedade, bem como nos processos mnemônicos, utilizando um único modelo experimental – o labirinto em T.

## **Objetivos**

### **Geral**

O objetivo do presente estudo foi investigar a relação entre a substância P (SP) e o diazepam (DZP) nos comportamentos de ansiedade e memória avaliados no teste do labirinto em T elevado (LT), em ratos.

### **Específicos**

Para que o objetivo geral fosse atingido, tornou-se necessário estabelecer alguns objetivos intermediários como:

- Caracterizar os efeitos comportamentais da injeção intraperitoneal (i.p.) de DZP, pentilenotetrazol (PTZ) e SP na ansiedade e nos processos mnemônicos em ratos avaliados no LT.
- Verificar se a administração i.p. de SP e PTZ interfere nos efeitos comportamentais produzidos pela injeção i.p. de DZP no LT.
- Verificar se a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de SP interfere nos efeitos comportamentais produzidos pela injeção i.p. de DZP no LT.
- Verificar se o efeito da substância P i.c.v. no LT em reverter o efeito tipo ansiolítico e/ou amnésico do DZP i.p. é mediado por receptores taquicinérgicos do tipo NK<sub>1</sub>, receptores preferenciais da SP.

## Material e Métodos

### Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos adultos (280 a 350 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais, alojados em caixas plásticas (60 x 60 x 35 cm) em grupos de 4-6, foram mantidos em uma sala com temperatura ( $23 \pm 2$  °C) e ciclo de luz claro-escuro de 12 horas controlado automaticamente (luzes ligadas às 07:00 h). Todos os experimentos foram realizados durante o ciclo claro entre 14:00 e 18:00h. Os grupos controles e experimentais foram escolhidos de maneira aleatória, com cada animal sendo utilizado somente uma vez. Água e comida estavam disponíveis à vontade. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA 23080.001156/2001-50/UFSC e 23080.027554/2004-49/UFSC). O número mínimo de animais foi utilizado para obtenção de dados confiáveis.

### Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

- **Solução de cloreto de sódio a 0,9%** (salina, Laborasa Indústria Farmacêutica Ltda, Brasil), solução controle, injetada intraperitonealmente (i.p.) 20 ou 30 min antes dos animais serem submetidos ao LT.
- **PBS** (“phosphate buffer solution” – solução de tampão fosfatada; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), composto por: NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, utilizado como solução controle, quando

injetado intracerebroventricular (i.c.v.) 5 min antes dos animais serem submetidos ao LT, ou como veículo, para dissolver a solução estoque de substância P na concentração de 1 mM.

- **Substância P (SP = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK<sub>1</sub> (Chang *et al.*, 1971). A SP foi preparada como solução estoque (1mM) em PBS e posteriormente dissolvida em salina ou PBS, para administração i.p. ou i.c.v., respectivamente, nas doses desejadas.
- **Diazepam (DZP)** (Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda, Brasil), agonista do receptor GABA<sub>A</sub> (Rang *et al.*, 2001). O DZP foi diluído em salina nas doses desejadas e injetado i.p. 30 min antes dos animais serem submetidos ao LT.
- **Pentilenetetrazol (PTZ = 6, 7, 8, 9, - tetrahydro – 5H – tetrazol – [1, 5 – a] azepina)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), antagonista do receptor GABA<sub>A</sub> e droga ansiogênica prototípica (Jung *et al.*, 2002). O PTZ foi diluído em salina nas doses desejadas e injetado i.p. 15 min antes dos animais serem submetidos ao LT.
- **FK 888 {(4R)-4-hidróxi-1-[1-metil-1 H-indol-3 l] carbonil-propil-L-N-benzil-N-metil-3-2-2-(naftil)-L-alaninamida}**, (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japão), antagonista seletivo dos receptores NK<sub>1</sub> (Fuji *et al.*, 1992). O FK 888 foi diluído em etanol na concentração de 1 mM e estocado a -20°C em tubos de Eppendorf siliconizados. Essa droga foi posteriormente diluída em PBS + etanol 10% na concentração desejada. A solução controle do antagonista neurocinérgico (veículo) foi preparada com PBS + etanol 10%, para evitar qualquer interferência do solvente do FK 888 na avaliação experimental.

As doses e os tempos de tratamento para as diferentes drogas utilizadas neste estudo foram selecionados através da literatura e/ou estudos preliminares (De Souza *et al.*, 1998; Gavioli *et al.*, 1999; Hasenöhrl *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 1996).

As drogas anestésicas tiopental sódico (Thionembital ®, ABBOTT Laboratories; Illinois, EUA) e hidrato de cloral (Merck; Darmstadt, Alemanha) foram diluídas em solução fisiológica de NaCl 0,9%. O hidrato de cloral foi armazenado na geladeira (4 °C) e ao abrigo da luz, enquanto que o tiopental sódico foi mantido à temperatura ambiente.

## **Procedimentos Gerais**

### **Aparelho**

Na tentativa de analisar diferentes tipos de ansiedade e ao mesmo tempo avaliar memória, um novo modelo experimental foi desenvolvido por Viana e colaboradores (1994), chamado de Labirinto em T (LT). O aparelho recebe esse nome porque é derivado do labirinto em cruz elevado (Handley e Mithani, 1984) pela obstrução da entrada de um dos braços fechados. Esse modelo foi validado para ratos por Graeff e colaboradores (1998) e, posteriormente para camundongos, com algumas alterações procedurais e estruturais, por Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza (2004).

O LT de ratos foi construído em acrílico transparente e possui três braços de dimensões iguais (50 x 10 cm), elevados a 50 cm do chão. O braço fechado do LT é formado por paredes com 40 cm de altura, enquanto que os braços abertos são circundados por uma borda de 1cm de altura, para evitar a queda dos animais do aparelho. Os braços abertos e o fechado são conectados por uma plataforma central (10 x10 cm) e todo o chão do aparelho é confeccionado em acrílico preto. O aparelho está localizado em uma sala com luz vermelha (15 W) e a intensidade luminosa sobre todos os braços do LT é de 3 lux.

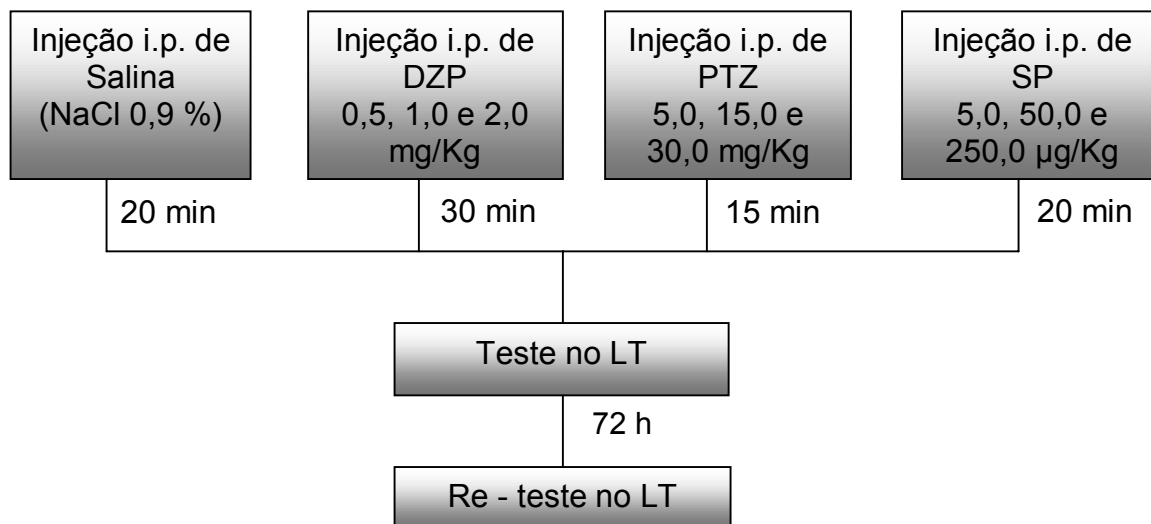
Nas sessões de teste, cada animal foi colocado no final do braço fechado do LT, com a cabeça voltada para a plataforma central, e o tempo necessário para

sair com as quatro patas deste braço pela primeira vez foi registrado e adotado como Linha de Base (LB). Em seguida, duas novas medidas (Esquiva 1 e Esquiva 2), com intervalos de 30 s, foram tomadas. Após novamente 30 s, cada animal foi colocado no final do braço aberto direito e o tempo necessário para entrar com as quatro patas no braço fechado foi registrado (Fuga 1). Nas sessões de re-teste, realizadas 72 h após o teste, a latência para sair (Esquiva 3) e entrar no braço fechado (Fuga 2) foram registradas novamente, com intervalo de 30 s, para cada animal (Viana *et al.*, 1994).

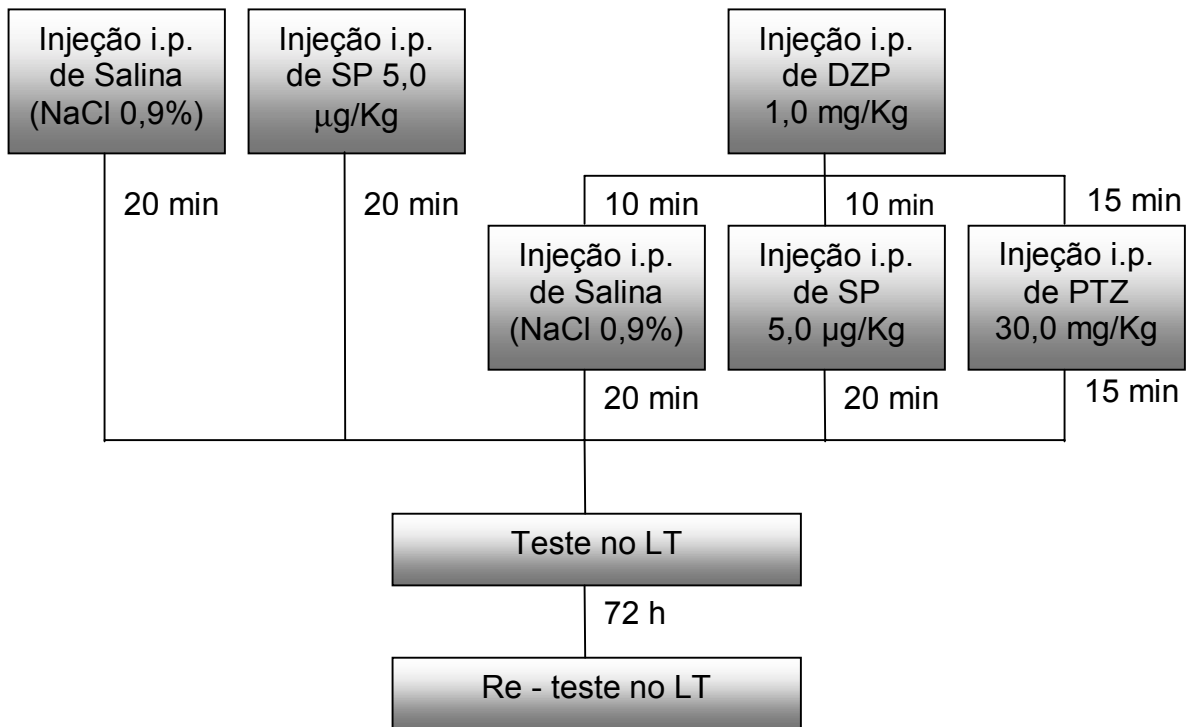
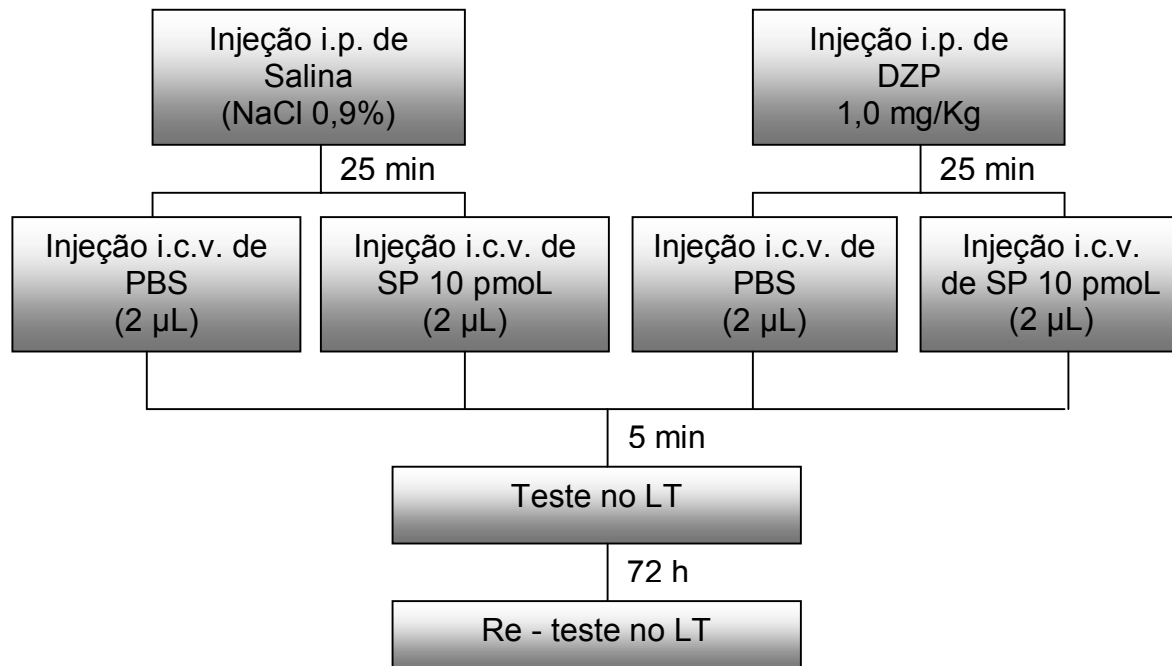
Durante os intervalos no teste e no re-teste, cada animal permanecia numa caixa plástica (60 x 60 x 35 cm), dentro da própria sala de experimento. Ao final das avaliações de cada animal, o aparelho era limpo com uma solução de etanol 10%.

## Protocolos experimentais

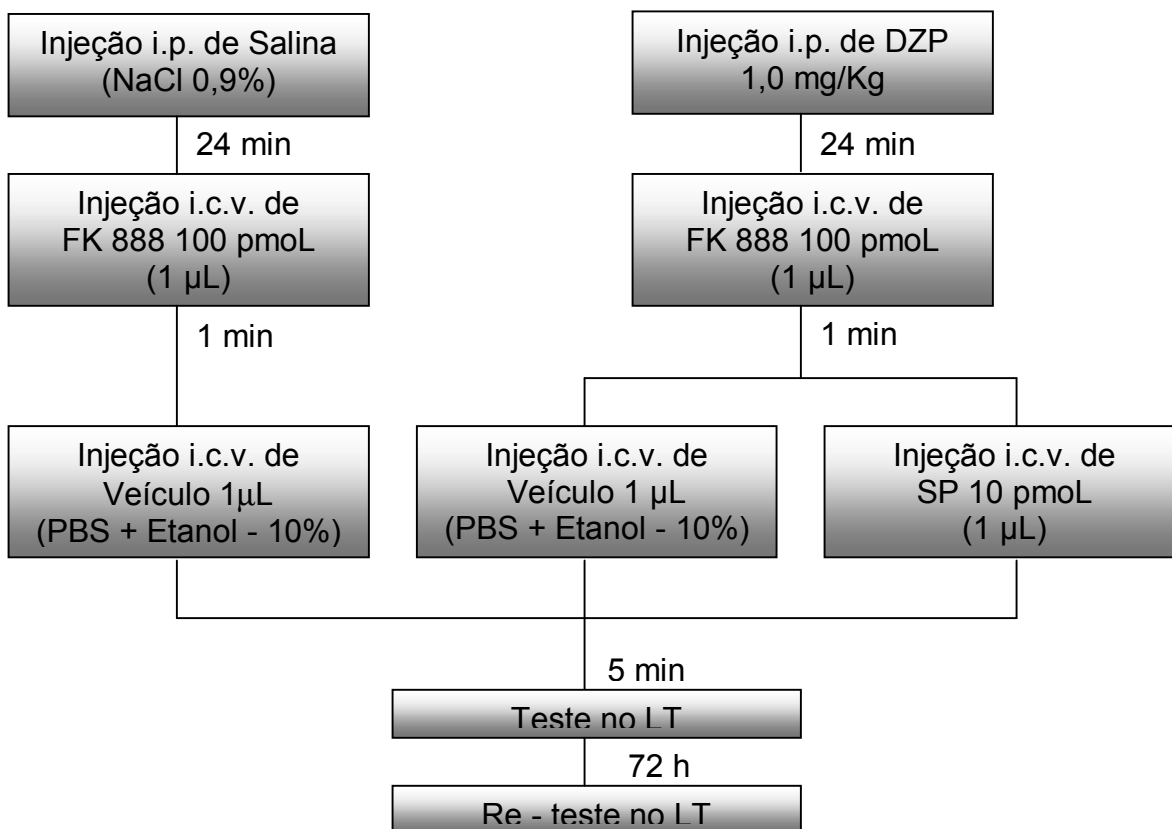
### Protocolo experimental 1





**Protocolo experimental 2****Protocolo experimental 3**

#### Protocolo experimental 4



#### Procedimentos para administração central de drogas

##### Cirurgias estereotáxicas

Cada animal foi anestesiado com tiopental sódico (20 mg/Kg, i.p.) e hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.) e, depois de verificada a perda total dos reflexos, imobilizado em um aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA) com a ajuda de duas barras auriculares colocadas nos meatos auditivos e uma presilha nasal, fixada nos incisivos e no osso nasal. Em seguida, procedeu-se a tricotomia, a assepsia com álcool iodado e a injeção com lidocaína (com 2 % de vasoconstritor, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo no momento da incisão) na parte posterior da cabeça de cada animal. Ao final, a calota craniana foi exposta, após a raspagem do periósteo, e perfurada com uma

broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e inserção de uma cânula-guia (0,22 mm de diâmetro interno e 0,28 mm externo) no ventrículo lateral esquerdo (0,8 e 1,5 mm posterior e lateral ao bregma, respectivamente; 2,5 mm abaixo da superfície do crânio), conforme as coordenadas de Paxinos e Watson (1986).

A área aberta, feita para fixação dos parafusos e introdução da cânula-guia, foi preenchida com acrílico auto-polimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Por fim, um estilete foi introduzido na cânula-guia para evitar a oclusão da mesma, que só foi retirado segundos antes da infusão das drogas.

Cada animal, após o término da cirurgia, foi aquecido por uma lâmpada de 40 W, a fim de amenizar a hipotermia induzida pela anestesia geral. Após a recuperação total, cada animal, foi reconduzido a sua caixa moradia, aonde permanecia, recebendo água e ração à vontade, por 5 a 7 dias antes do teste experimental, sendo que durante esse período de recuperação foi manipulado somente durante a troca da caixa.

### **Cânulas, estiletos, parafusos e agulhas injetoras**

As cânulas-guia utilizadas para as injeções intracerebroventriculares foram confeccionadas manualmente no Laboratório de Neurofarmacologia a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm (calibre 22 interno/28 externo) e com o auxílio de um paquímetro (General Hardware MFG. Inc., New York, EUA) e um disco de *carbúndum* conectado a uma broca odontológica. As cânulas foram cortadas no comprimento de 17,0 mm.

Os estiletos foram confeccionados com fios de aço inoxidável (n° 26), introduzidos no interior das cânulas-guia e presos ao cimento dentário.

Os parafusos utilizados foram de aço inoxidável com 4,6 mm de comprimento total, 1,8 mm de diâmetro de cabeça e 1,4 mm de diâmetro de rosca (Insight Equipamentos Ltda EPP, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

As agulhas injetoras foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais odontológicas, cortadas no comprimento de 18,0 mm, ou seja, 1,0 mm maiores que as cânulas-guia.

### **Administração central de drogas**

Cada animal, após a retirada do estilete adaptado à cânula-guia, foi infundido manualmente com a(s) droga(s) em estudo, através de uma agulha injetora, conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA) a uma microseringa Hamilton 701 N (10  $\mu$ L). Cada solução foi injetada num volume de 1 ou 2  $\mu$ L, por um período de 30 s, sendo que a agulha injetora permaneceu por mais um período de 30 s dentro da cânula-guia para que todo seu conteúdo se difundisse para os tecidos adjacentes.

### **Histologia**

Para a confirmação da localização das cânulas, após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formaldeído 4%. Em seguida, os animais foram decapitados e receberam uma micro-injeção de solução de Azul de Evans 0,5% (2  $\mu$ L) intraventricularmente. Os cérebros foram retirados e checados quanto à localização das cânulas. Animais que não apresentavam localização correta das cânulas foram descartados da análise estatística dos dados.

### **Análise estatística**

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa *Statistic* versão 6.0. Testes não-paramétricos foram usados para analisar todos os resultados experimentais, pois em nenhum dos grupos tratados a distribuição dos dados, obtidos para o teste e o re-teste obedeceu à normalidade. Os resultados foram

expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. As comparações dentro dos grupos ao longo das variáveis foram feitas com os testes de Friedman (múltiplas variáveis) e Wilcoxon (duas variáveis), enquanto que os testes de Kruskal-Wallis (múltiplos grupos) e Mann-Whitney (dois grupos) foram utilizados para detectar diferenças significativas entre os grupos de tratamento dentro da mesma variável. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o nível de probabilidade ( $p$ ) foi menor que 0,05.

## RESULTADOS

### **Experimento 1 - Caracterização dos efeitos comportamentais da injeção intraperitoneal de diazepam, pentilenotetrazol e substância P na ansiedade e nos processos mnemônicos em ratos avaliados no labirinto em T.**

Os dados das latências para sair e entrar nos braços fechados do LT dos animais tratados com Salina (NaCl 0,9%) são os mesmos para os experimentos 1 (Figuras 1, 2 e 3) e 2 (Figura 4), pois os valores obtidos das latências para os animais do grupo controle, ao longo desses experimentos, foram agrupados.

Na figura 1A, o teste de Friedman detectou mudanças significativas na latência da esQUIVA INIBITÓRIA ao longo das variáveis (Linha de Base, EsQUIVA 1, EsQUIVA 2 e EsQUIVA 3) para os animais tratados com Salina ( $\chi^2_{17}(3) = 34,77; p < 0,001$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que as EsQUIVAS 1 ( $T_{17} = 15,50; p < 0,05$ ) e 2 ( $T_{17} = 0,00; p < 0,001$ ) foram estatisticamente superiores à Linha de Base, indicando que os animais adquiriram o comportamento de esQUIVA INIBITÓRIA. Além disso, a EsQUIVA 3 foi semelhante à EsQUIVA 2 ( $T_{17} = 12,00, p = 0,11$ ) e estatisticamente maior que a Linha de Base ( $T_{17} = 2,00, p < 0,001$ ), demonstrando que os animais lembraram desse procedimento.

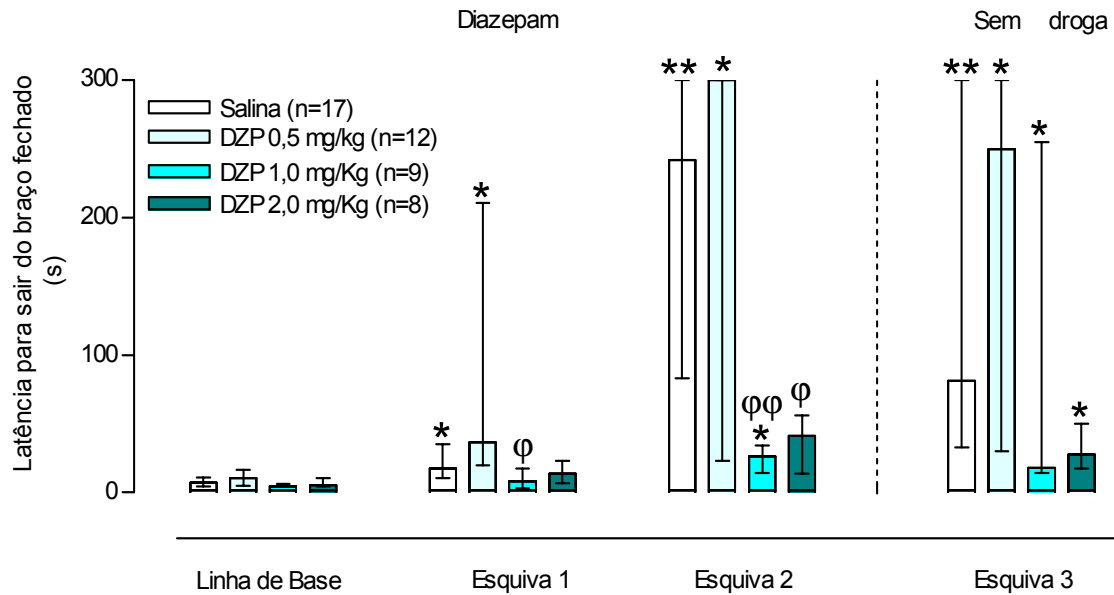
Na figura 1A, o teste de Friedman também detectou mudanças significativas na latência da esQUIVA INIBITÓRIA ao longo das variáveis para os animais tratados com DZP 0,5 mg/Kg ( $\chi^2_{12}(3) = 17,69; p < 0,001$ ), 1,0 mg/Kg ( $\chi^2_9(3) = 12,91; p < 0,05$ ) e 2,0 mg/Kg ( $\chi^2_8(3) = 12,15; p < 0,05$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que a EsQUIVA 1 dos animais tratados com DZP 0,5 mg/Kg ( $T_{12} = 0,00; p < 0,05$ ) e a EsQUIVA 2 dos tratados com DZP 0,5 mg/Kg ( $T_{12} = 1,00; p < 0,05$ ) e 1,0 mg/Kg ( $T_9 = 0,00; p < 0,05$ ) foram estatisticamente maiores que a Linha de Base, indicando que o tratamento com DZP, nessas doses, não interferiu na aquisição da esQUIVA INIBITÓRIA. A EsQUIVA 2 dos animais tratados com DZP 2,0 mg/Kg não foi estatisticamente significativa, quando comparada à Linha de Base ( $T_8 = 4,50, p = 0,058$ ), apesar da tendência a ser maior. Nenhuma das doses de DZP interferiu na retenção dessa tarefa – memória de longa duração, pois a EsQUIVA 3 dos animais

tratados com DZP, nas diferentes doses, foi estatisticamente maior que a Linha de Base (DZP 0,5 mg/Kg,  $T_{12} = 1,00$ ;  $p < 0,05$ ; 1,0 mg/Kg,  $T_9 = 3,50$ ;  $p < 0,05$  e 2,0 mg/Kg,  $T_8 = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ) e semelhante à Esquiva 2 (DZP 0,5 mg/Kg,  $T_{12} = 16,00$ ;  $p = 0,78$ ; 1,0 mg/Kg,  $T_9 = 21,00$ ;  $p = 0,86$  e 2,0 mg/Kg,  $T_8 = 13,50$ ;  $p = 0,52$ ). Além disso, o teste de Kruskal-Wallis não detectou nenhuma diferença significativa entre os grupos de tratamento na Esquiva 3 ( $H_{46}(3) = 6,77$ ;  $p = 0,08$ ). O valor da Esquiva 3 para os animais tratados com a maior dose de DZP confirma a tendência, anteriormente observada, da Esquiva 2 ser maior que a Linha de Base.

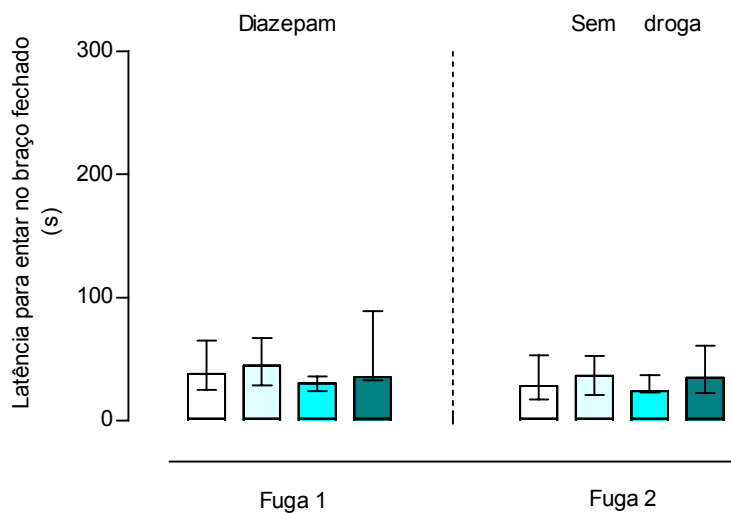
O teste de Kruskal-Wallis detectou uma diferença significativa entre os grupos de tratamento na Esquiva 1 ( $H_{46}(3) = 10,62$ ;  $p < 0,05$ ) e Esquiva 2 ( $H_{46}(3) = 15,40$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que o desempenho dos animais foi afetado pelo tratamento com DZP nessas variáveis. O teste de Mann-Whitney mostrou que o tratamento com DZP, na dose de 1,0 mg/Kg na Esquiva 1 ( $U = 38,50$ ;  $p < 0,05$ ) e nas doses de 1,0 e 2,0 mg/Kg na Esquiva 2 ( $U = 11,00$ ;  $p < 0,001$  e  $U = 19,00$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente), reduziu significativamente o tempo para os animais saírem do braço fechado do aparelho, quando comparado ao grupo Salina, indicando um efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração em ratos no LT.

Em relação à latência para entrar no braço fechado, figura 1B, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{46}(3) = 1,60$ ;  $p = 0,66$ ) e 2 ( $H_{46}(3) = 0,16$ ;  $p = 0,98$ ), bem como entre os animais do mesmo grupo entre as sessões com droga e sem droga, indicando que as doses utilizadas de DZP não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

A)



B)



**Figura 1** - Efeito do diazepam (DZP) na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. A Linha de Base, Esquiva 1, Esquiva 2 e Fuga 1 foram medidos 20 e 30 min após a administração i.p. de Salina e DZP, respectivamente. A Esquiva 3 e a Fuga 2 foram medidas 72 h após (sem droga). As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,001$  em relação a Linha de Base (teste  $t$  de Wilcoxon);  $\phi$   $p < 0,05$  e  $\phi\phi$   $p < 0,001$  em relação ao grupo Salina (teste  $U$  de Mann-Whitney).



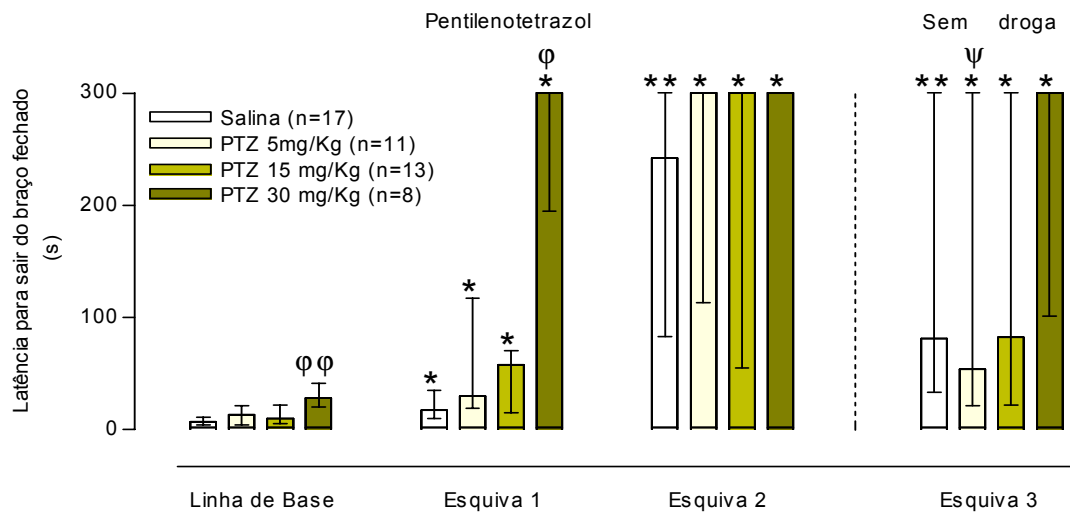
Na figura 2A, o teste de Friedman mostrou mudanças significantes na latência da esQUIVA inibitória ao longo das variáveis para os animais tratados com PTZ 5 mg/Kg ( $\chi^2_{11}(3) = 22,27$ ;  $p < 0,001$ ), 15 mg/Kg ( $\chi^2_{13}(3) = 23,05$ ;  $p < 0,001$ ) e 30 mg/Kg ( $\chi^2_8(3) = 13,1$ ;  $p < 0,05$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que a EsQUIVA 1 dos animais tratados com PTZ 5 mg/Kg ( $T_{11} = 2,50$ ;  $p < 0,05$ ), 15 mg/Kg ( $T_{13} = 7,00$ ;  $p < 0,05$ ) e 30 mg/Kg ( $T_8 = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ), bem como a EsQUIVA 2 para os tratados com PTZ 5 mg/Kg ( $T_{11} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ), 15 mg/Kg ( $T_{13} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ) e 30 mg/Kg ( $T_8 = 1,00$ ;  $p < 0,05$ ) foram estatisticamente superiores em relação à Linha de Base, indicando que esses tratamentos não interferiram na aquisição da esQUIVA inibitória. Nenhuma das doses de PTZ interferiu na retenção dessa tarefa – memória de longa duração, pois a EsQUIVA 3 dos animais tratados com PTZ, nas diferentes doses, foi estatisticamente maior que a Linha de Base (PTZ 5 mg/Kg,  $T_{11} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ; PTZ 15 mg/Kg,  $T_{13} = 7,00$ ;  $p < 0,05$  e PTZ 30 mg/Kg,  $T_8 = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) e semelhante à EsQUIVA 2, somente para a dose intermediária e maior de PTZ ( $T_{13} = 9,00$ ;  $p = 0,11$  e  $T_8 = 0,00$ ;  $p = 0,11$ , respectivamente). Além disso, o teste de Kruskal-Wallis não detectou nenhuma diferença significativa entre os grupos de tratamento na EsQUIVA 3 ( $H_{49}(3) = 1,63$ ;  $p = 0,65$ ). Apesar da EsQUIVA 3 dos animais tratados com PTZ 5 mg/Kg ( $T_{11} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ) ter sido estatisticamente menor que a EsQUIVA 2, essa dose de PTZ não prejudicou a retenção da memória.

O teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos de tratamento na Linha de Base ( $H_{49}(3) = 14,84$ ;  $p < 0,05$ ) e EsQUIVA 1 ( $H_{49}(3) = 13,80$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que o desempenho dos animais foi afetado pelo tratamento com PTZ nessas variáveis. O teste de Mann-Whitney mostrou que a Linha de Base ( $U = 8,0$ ;  $p < 0,001$ ) e a EsQUIVA 1 ( $U = 14,5$ ;  $p < 0,05$ ) para os animais tratados com PTZ 30 mg/Kg foram estatisticamente maiores que a do grupo Salina, indicando um efeito ansiogênico e/ou facilitador da aquisição da esQUIVA inibitória em ratos no LT.

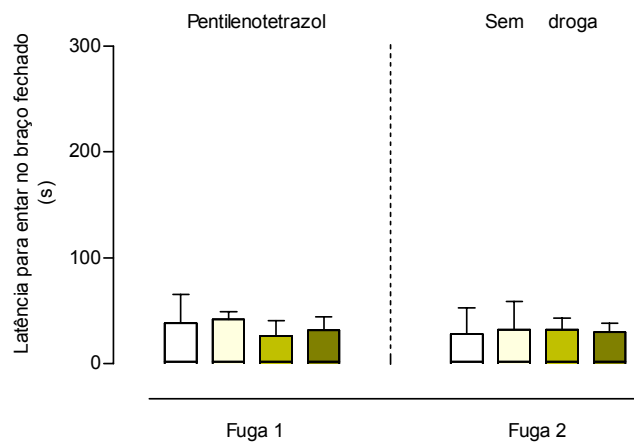
Em relação à latência para entrar no braço fechado (Figura 2B), não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{49}(3) = 1,77$ ;  $p = 0,62$ ) e 2 ( $H_{49}(3) = 0,56$ ;  $p = 0,91$ ), bem como entre os animais do

mesmo grupo entre as sessões com droga e sem droga, indicando que as doses utilizadas de PTZ não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

A)



B)



**Figura 2** - Efeito do pentilenotetrazol (PTZ) na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. A Linha de Base, Esquivas 1 e 2 e Fuga 1 foram medidos 15 e 20 min após a administração i.p. de PTZ e Salina, respectivamente. A Esquiva 3 e a Fuga 2 foram medidas 72 h após (sem droga). As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  em relação à Linha de Base;  $\Psi$   $p < 0,05$  em relação à Esquiva 2 (teste  $t$  de Wilcoxon).  $\phi$   $p < 0,05$  e  $\phi\phi$   $p < 0,001$  em relação ao grupo Salina (teste  $U$  de Mann-Whitney).

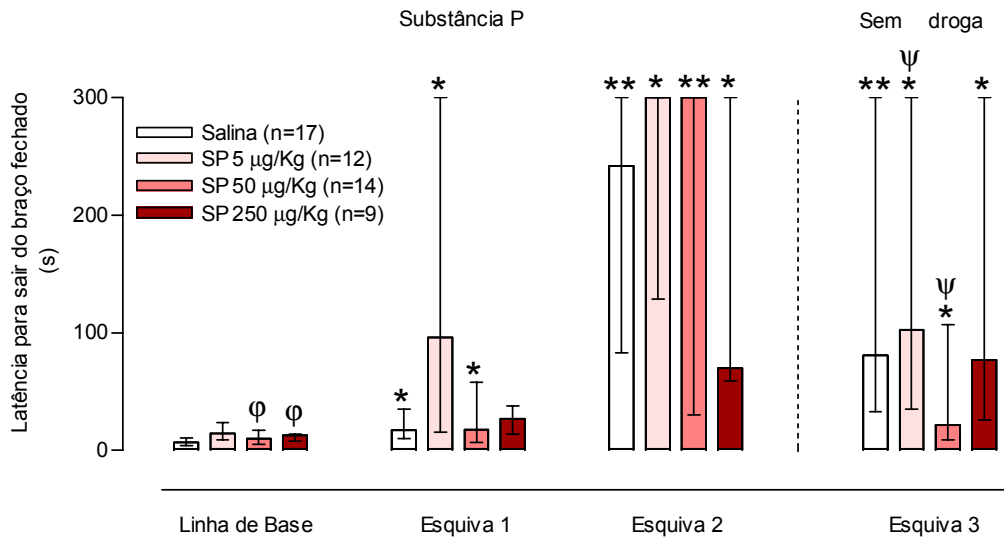
Na figura 3A, o teste de Friedman mostrou mudanças significantes na latência da esquiva inibitória ao longo das variáveis para os animais tratados com SP 5 µg/Kg ( $\chi^2_{12}(3) = 22,27$ ;  $p < 0,001$ ), 50 µg/Kg ( $\chi^2_{14}(3) = 24,30$ ;  $p < 0,001$ ) e 250 µg/Kg ( $\chi^2_9(3) = 15,80$ ;  $p < 0,05$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que a Esquiva 1 dos animais tratados com SP 5 e 50 µg/Kg ( $T_{12} = 6,00$ ;  $p < 0,05$  e  $T_{14} = 8,00$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente), bem como a Esquiva 2 para os tratados com SP 5 µg/Kg ( $T_{12} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ), 50 µg/Kg ( $T_{14} = 0,00$ ;  $p < 0,001$ ) e 250 µg/Kg ( $T_9 = 3,00$ ;  $p < 0,05$ ) foram estatisticamente maiores que a Linha de Base, indicando que o tratamento com SP, nessas doses, não interferiu na aquisição da esquiva inibitória. Nenhuma das doses de SP interferiu na retenção dessa tarefa – memória de longa duração, pois a Esquiva 3 dos animais tratados com SP, nas diferentes doses, foi estatisticamente maior que a Linha de Base (SP 5 µg/Kg,  $T_{12} = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ; SP 50 µg/Kg,  $T_{14} = 15,50$ ;  $p < 0,05$  e SP 250 µg/Kg,  $T_9 = 4,00$ ;  $p < 0,05$ ) e semelhante à Esquiva 2, somente para a dose maior ( $T_9 = 7,00$ ;  $p = 0,24$ ) de SP. Além disso, o teste de Kruskal-Wallis não detectou nenhuma diferença significativa entre os tratamentos na Esquiva 3 ( $H_{52}(3) = 4,94$ ;  $p = 0,18$ ). Apesar da Esquiva 3 dos animais tratados com SP 5 e 50 µg/Kg ( $T_{12} = 1,00$ ;  $p < 0,05$  e  $T_{14} = 7,00$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) ter sido estatisticamente menor que a Esquiva 2, essas doses de SP não prejudicaram a retenção da memória.

O teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos de tratamento somente na Linha de Base ( $H_{52}(3) = 9,16$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que o desempenho dos animais foi afetado pelo tratamento com SP nessa variável. O teste de Mann-Whitney mostrou que a Linha de Base dos animais tratados com SP 50 µg/Kg ( $U = 42,50$ ;  $p < 0,05$ ) e 250 µg/Kg ( $U = 38,50$ ;  $p < 0,05$ ) foi estatisticamente superior em relação aos tratados com Salina, indicando um possível efeito ansiogênico e/ou facilitador da aquisição da esquiva inibitória para essas doses de SP no LT. Entretanto, esse efeito não é confirmado porque as Esquivas 1 e 2, desses tratamentos são semelhantes a do grupo controle.

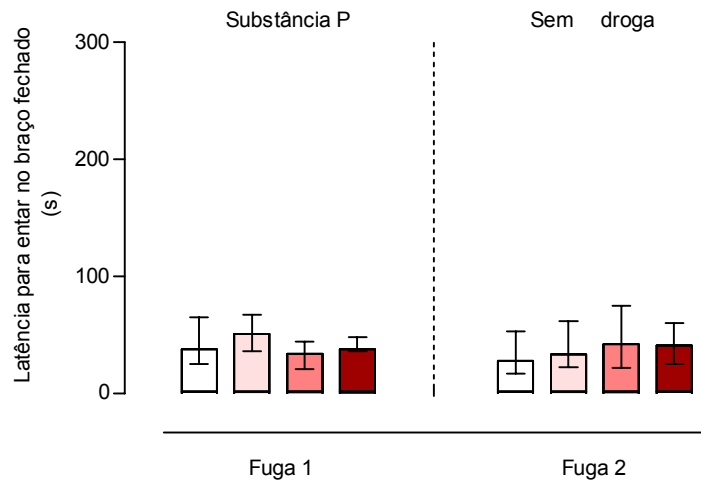
Em relação à latência para entrar no braço fechado (figura 3B) não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{52}(3) = 4,08$ ;  $p = 0,25$ ) e 2 ( $H_{52}(3) = 0,60$ ;  $p = 0,90$ ), bem como entre os animais do

mesmo grupo entre as sessões com droga e sem droga, indicando que as doses utilizadas de SP não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

**A)**



**B)**



**Figura 3** - Efeito da substância P (SP) na latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. A Linha de Base, Esquivas 1 e 2 e Fuga 1 foram medidos 20 min após a administração i.p. de SP ou Salina. A Esquina 3 e Fuga 2 foram medidas 72 h após (sem droga). As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  em relação à Linha de Base;  $\Psi$   $p < 0,05$  em relação à Esquina 2 (teste  $t$  de Wilcoxon).  $\phi$   $p < 0,05$  em relação ao grupo Salina (teste  $U$  de Mann-Whitney).

**Experimento 2 - Efeito comportamental da administração intraperitoneal de pentilenotetrazol e substância P no efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T.**

Na figura 4A, o teste de Friedman detectou mudanças significantes na latência da esQUIVA inibitória ao longo das variáveis para os animais tratados com Salina ( $\chi^2_{17}(3) = 34,77; p < 0,001$ ), DZP + Salina ( $\chi^2_{11}(3) = 8,56; p < 0,05$ ), SP 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  ( $\chi^2_{12}(3) = 22,27; p < 0,001$ ), DZP + SP ( $\chi^2_9(3) = 21,16; p < 0,001$ ) e DZP + PTZ ( $\chi^2_{10}(3) = 14,72; p < 0,05$ ). O teste de Kruskal-Wallis também detectou mudanças significantes entre os grupos de tratamento na Linha de Base ( $H_{59}(4) = 24,31; p < 0,001$ ), EsQUIVA 1 ( $H_{59}(4) = 21,18; p < 0,001$ ), EsQUIVA 2 ( $H_{59}(4) = 30,98; p < 0,001$ ) e EsQUIVA 3 ( $H_{59}(4) = 13,72; p < 0,001$ ), demonstrando que os diferentes tratamentos interferiram no desempenho dos animais na resposta de esQUIVA inibitória no LT.

Na figura 4A, o teste de Wilcoxon mostrou que a EsQUIVA 2 dos animais tratados com DZP + Salina foi estatisticamente maior que a Linha de Base ( $T_{11} = 8,00; p < 0,05$ ), indicando que esse tratamento não interferiu na aquisição da esQUIVA inibitória. As EsQUIVAS 1 ( $U = 43,50; p < 0,05$ ) e 2 ( $U = 15,50; p < 0,001$ ) do mesmo grupo (conforme o teste de Mann-Whitney) foram significativamente menores que a do grupo Salina, demonstrando um efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração. O teste de Mann-Whitney também mostrou que a EsQUIVA 3 do grupo DZP + Salina foi estatisticamente menor que a do grupo Salina ( $U = 48,00; p < 0,05$ ), sendo que esse resultado pode ser proveniente de um efeito amnésico da memória de longa duração do tratamento DZP + Salina, ou não, já que a EsQUIVA 3 desse grupo foi significativamente maior que a Linha de Base e similar à EsQUIVA 2 ( $T_{11} = 10,00; p < 0,05; T_{11} = 27,00; p = 0,59$ , respectivamente).

As EsQUIVAS 1 e 2 ( $T_{12} = 6,00; p < 0,05$  e  $T_{12} = 0,00; p < 0,05$ , respectivamente) dos animais tratados com SP 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  foram estatisticamente maiores que a Linha de Base (conforme o teste de Wilcoxon, figura 4A), indicando

que essa dose de SP não interferiu na aquisição da esQUIVA inibitória. Embora, a EsQUIVA 3 desses animais tenha sido estatisticamente menor que a EsQUIVA 2 ( $T_{12} = 1,00$ ;  $p < 0,05$ ), essa dose de SP não interferiu na retenção da memória, pois a EsQUIVA 3 ( $T_{12} = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ) foi estatisticamente maior que Linha de Base e similar à EsQUIVA 3 do grupo tratado com Salina ( $U=48,00$ ;  $p = 0,12$ ; teste de Mann-Whitney). Esses resultados já haviam sido descritos no experimento 1 (figura 3A), porque os dados coletados ao longo desses experimentos (1 e 2) foram agrupados. O teste de Mann-Whitney mostrou que a latência do grupo SP 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  é estatisticamente maior que a do grupo DZP + Salina nas EsQUIVAS 1 ( $U = 18,50$ ;  $p < 0,05$ ), 2 ( $U = 1,00$ ;  $p < 0,001$ ) e 3 ( $U = 27,00$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que essa dose de SP não apresenta um efeito ansiolítico e/ou amnésico em ratos no LT.

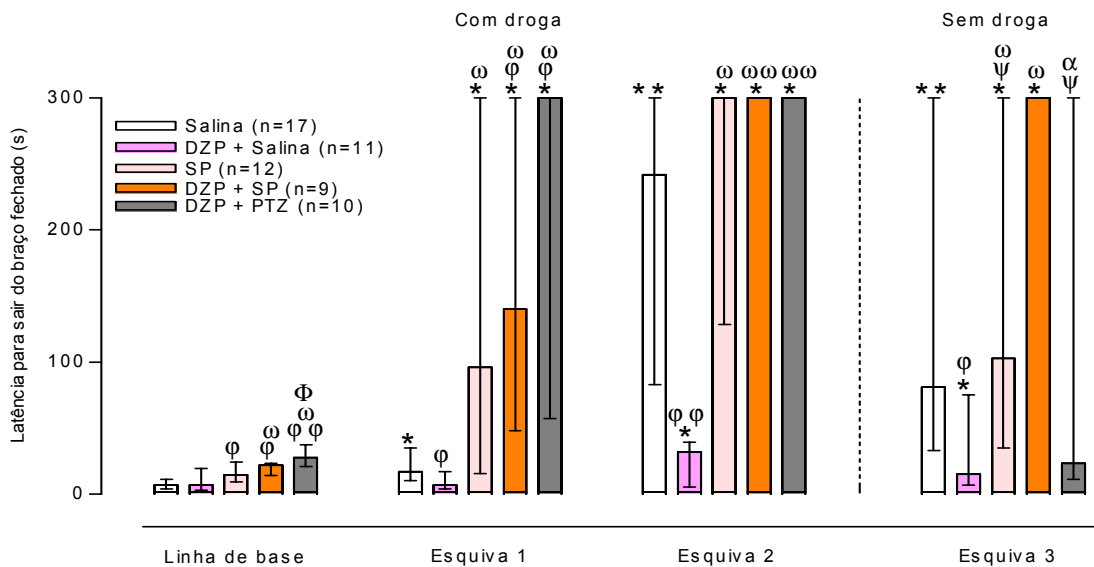
O teste de Wilcoxon (figura 4A) mostrou que as EsQUIVAS 1, 2 e 3 do grupo DZP + SP foram estatisticamente maiores que a Linha de Base ( $T_9 = 2,00$ ;  $p < 0,05$ ,  $T_9 = 0,00$ ;  $p < 0,05$  e  $T_9 = 0,00$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente) e que as EsQUIVAS 2 e 3 são iguais, indicando que esse tratamento não interferiu na aquisição e retenção da esQUIVA inibitória. O teste de Mann-Whitney mostrou que o grupo DZP + SP aumentou, de forma significativa, a latência para sair do braço fechado na Linha de Base ( $U = 16,00$ ;  $p < 0,05$ ) e EsQUIVA 1 ( $U = 30,50$ ;  $p < 0,05$ ) em relação aos animais tratados com Salina, indicando um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aquisição dessa tarefa. O mesmo teste mostrou que a latência para sair do braço fechado do grupo DZP + SP na Linha de Base ( $U = 20,50$ ;  $p < 0,05$ ), EsQUIVA 1 ( $U = 7,50$ ;  $p < 0,05$ ), EsQUIVA 2 ( $U = 0,00$ ;  $p < 0,001$ ) e EsQUIVA 3 ( $U = 12,00$ ;  $p < 0,05$ ) foi maior que a do grupo DZP + Salina, indicando que a SP reverteu (EsQUIVA 1) e bloqueou (EsQUIVA 2 e 3) o efeito ansiolítico e/ou amnésico do DZP. O teste de Mann-Whitney também mostrou que não houve nenhuma diferença significativa ao longo das variáveis entre os tratamentos com SP 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  e DZP + SP, demonstrando que esses dois grupos são semelhantes.

Também na figura 4A, o teste de Wilcoxon mostrou que as EsQUIVAS 1 e 2 dos animais tratados com DZP + PTZ foram estatisticamente maiores que a Linha de Base ( $T_{10} = 4,00$ ;  $p < 0,05$  e  $T_{10} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente), indicando

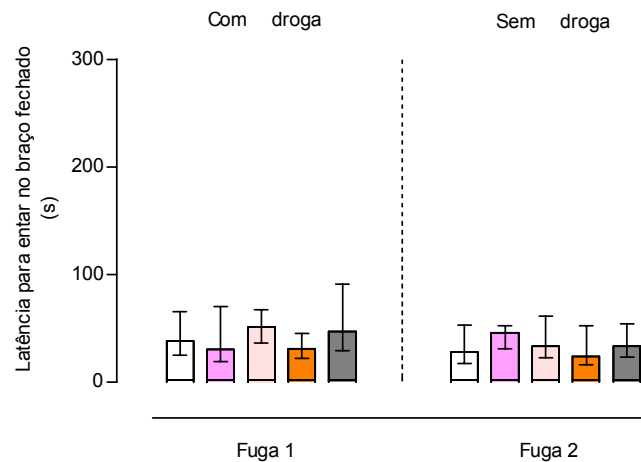
que esse tratamento não interferiu na aquisição da esQUIVA INIBITÓRIA. Apesar da latência na EsQUIVA 3 ter sido estatisticamente menor que a EsQUIVA 2 ( $T_{10} = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ) e semelhante à Linha de Base ( $T_{10} = 18,50$ ;  $p = 0,36$ ), não houve prejuízo na retenção dessa tarefa, pois a EsQUIVA 3 do grupo DZP + PTZ foi similar (teste de Mann-Whitney) àquela apresentada pelo grupo Salina ( $U = 60,00$ ;  $p = 0,21$ ). O teste de Mann-Whitney também mostrou que o grupo DZP + PTZ aumentou de forma significativa à latência para sair do braço fechado na Linha de Base ( $U = 9,00$ ;  $p < 0,001$ ) e EsQUIVA 1 ( $U = 32,50$ ;  $p < 0,05$ ), em relação aos animais tratados com Salina, indicando um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aquisição dessa tarefa. O mesmo teste também mostrou que as latências na Linha de Base ( $U = 10,00$ ;  $p < 0,05$ ), EsQUIVA 1 ( $U = 9,50$ ;  $p < 0,05$ ) e EsQUIVA 2 ( $U = 6,50$ ;  $p < 0,001$ ) do grupo DZP + PTZ foram estatisticamente maiores que a do grupo DZP + Salina, indicando que esse tratamento reverte (EsQUIVA 1) e bloqueia (EsQUIVA 2) o efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração do DZP. Além disso, a latência do grupo DZP + PTZ, somente na Linha de Base ( $U = 26,00$ ;  $p < 0,05$ ), foi estatisticamente maior que a do grupo SP 5 µg/Kg, confirmando, mais uma vez, que a SP 5 µg/Kg não é ansiogênica no LT (Figura 3A). Na EsQUIVA 3 não houve diferença significativa do tratamento DZP + PTZ em relação aos animais tratados com DZP + Salina ( $U = 43,00$ ;  $p = 0,40$ ), mas houve em relação aos tratados com DZP + SP ( $U = 17,50$ ;  $p < 0,05$ ), sendo estatisticamente menor. Tomados juntos, esses resultados mostram que o tratamento com PTZ interfere no nível de ansiedade dos animais de forma similar à SP, aumentando-o (ver EsQUIVA 1), mas esses tratamentos diferem quanto a sua influência nos processos mnemônicos (ver EsQUIVA 3), onde apresentam efeitos contrários, com o PTZ tendendo a promover amnésia e a SP tendendo a produzir uma facilitação na retenção da tarefa.

Em relação à latência para entrar no braço fechado, figura 4B, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{59}(4) = 4,60$ ;  $p = 0,33$ ) e 2 ( $H_{59}(4) = 2,16$ ;  $p = 0,70$ ), bem como entre os animais do mesmo grupo, entre as sessões com droga e sem droga, indicando que esses tratamentos não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

A)



B)



**Figura 4** – Influência da administração sistêmica de substância P (SP) e pentilenotetrazol (PTZ) no efeito ansiolítico e/ou amnésico do diazepam (DZP) medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. Todas as drogas foram injetadas i.p. e as barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,001$  em relação à Linha de Base;  $\Psi$   $p < 0,05$  em relação à Esquina 2 (teste  $t$  de Wilcoxon).  $\phi$   $p < 0,05$  e  $\phi\phi$   $p < 0,001$  em relação ao grupo Salina;  $\omega$   $p < 0,05$  e  $\omega\omega$   $p < 0,001$  em relação ao grupo DZP + Salina;  $\phi$   $p < 0,05$  em relação a SP 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ;  $\alpha$   $p < 0,05$  em relação ao grupo DZP + SP (teste  $U$  de Mann-Whitney).



### **Experimento 3 – Efeito comportamental da administração central de substância P no efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T.**

Na figura 5A, o teste de Friedman detectou mudanças significantes na latência da esQUIVA inibitória ao longo das variáveis para os animais tratados com Salina + PBS ( $\chi^2_8(3) = 13,80; p < 0,05$ ), Salina + SP ( $\chi^2_9(3) = 21,73; p < 0,001$ ) e DZP + SP ( $\chi^2_6(3) = 16,50; p < 0,001$ ), mas não para os animais tratados com DZP + PBS ( $\chi^2_6(3) = 7,30; p < 0,06$ ). O teste de Kruskal-Wallis também detectou diferença significativa entre os grupos de tratamento na EsQUIVA 1 ( $H_{29}(3) = 14,96; p < 0,05$ ), EsQUIVA 2 ( $H_{29}(3) = 18,95; p < 0,001$ ) e EsQUIVA 3 ( $H_{29}(3) = 12,89; p < 0,05$ ), demonstrando que os diferentes tratamentos interferiram no desempenho dos animais na resposta de esQUIVA inibitória no LT.

O teste de Wilcoxon (figura 5A) mostrou que as EsQUIVAS 1 ( $T_8 = 3,00; p < 0,05$ ) e 2 ( $T_8 = 0,00; p < 0,05$ ) dos animais tratados com Salina + PBS, a EsQUIVA 2 dos tratados com Salina + SP ( $T_9 = 0,00; p < 0,05$ ) e as EsQUIVAS 1 e 2 ( $T_6 = 0,00; p < 0,05$ ) dos tratados com DZP + SP foram estatisticamente maiores que a Linha de Base, indicando que os animais adquiriram o comportamento de esQUIVA inibitória. O mesmo teste detectou que a EsQUIVA 3 do grupo Salina + PBS ( $T_8 = 18,00, p = 1,00$ ) foi semelhante à EsQUIVA 2 e estatisticamente maior que a Linha de Base ( $T_8 = 4,00, p < 0,05$ ), demonstrando que os animais lembraram desse procedimento. Também na figura 5A (teste de Wilcoxon) a EsQUIVA 3 do grupo Salina + SP ( $T_9 = 5,00, p = 1,00$ ) foi semelhante à EsQUIVA 2, enquanto que a do grupo DZP + SP foi igual. Além disso, a EsQUIVA 3 do grupo Salina + SP ( $T_9 = 0,00, p < 0,05$ ) e DZP + SP ( $T_6 = 0,00, p < 0,05$ ) foi estatisticamente maior que a Linha de Base e similar a EsQUIVA 3 do grupo Salina + PBS (Salina + SP,  $U = 17,5; p = 0,075$ ; DZP + SP,  $U = 9,00; p = 0,06$ , conforme o teste de Mann-Whitney), indicando que os animais lembraram dessa tarefa avaliada no LT.

O teste de Mann-Whitney (Figura 5A) mostrou que a latência do grupo DZP + PBS nas EsQUIVAS 1 ( $U = 5,00; p < 0,05$ ) e 2 ( $U = 7,50; p < 0,05$ ) foi estatisticamente menor que a do grupo Salina + PBS, indicando um efeito

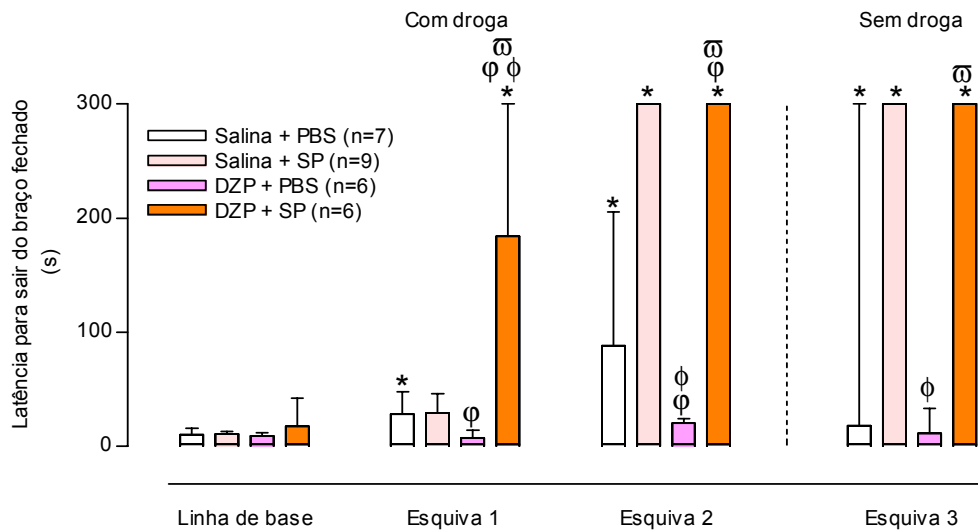
amnésico da memória de curta duração, já que os animais não adquiriram o comportamento de esquiva inibitória (conforme o teste de Friedman), e/ou um efeito ansiolítico. O mesmo teste na Esquiva 3 demonstrou que a latência do grupo DZP + PBS é estatisticamente menor que a do grupo Salina + SP ( $U = 6,50$ ;  $p < 0,05$ ).

Na figura 5A, o teste de Mann-Whitney mostrou que a latência do grupo DZP + SP nas Esquivas 1 ( $U = 1,50$ ;  $p < 0,05$ ) e 2 ( $U = 3,00$ ;  $p < 0,05$ ) foi estatisticamente maior que a do grupo Salina + PBS, indicando um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aquisição da esquiva inibitória. O mesmo teste também detectou diferença significativa do grupo DZP + SP em relação ao grupo DZP + PBS nas Esquivas 1 ( $U = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ), 2 ( $U = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ) e 3 ( $U = 3,00$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que a SP reverteu o efeito amnésico da memória de curta duração e/ou ansiolítico do DZP.

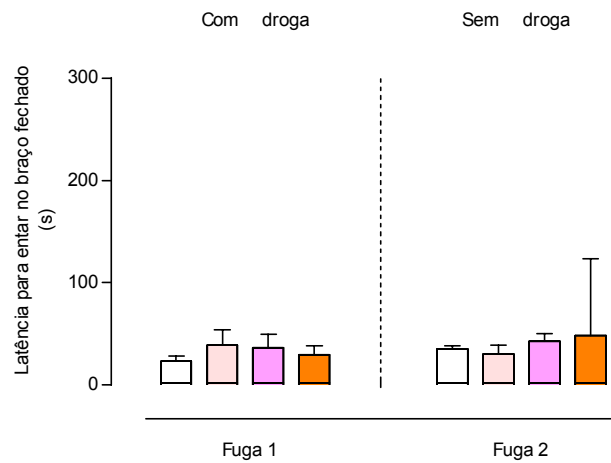
Ainda na figura 5A, o teste de Mann-Whitney não detectou nenhuma diferença significativa entre os animais tratados com Salina + SP nas Esquivas 1 ( $U = 34,50$ ;  $p = 0,89$ ) e 2 ( $U = 16$ ;  $p = 0,055$ ), em relação aos animais tratados com Salina + PBS, indicando, novamente, que o tratamento direto com SP não interfere no desempenho dos animais nesse tipo de comportamento avaliado no LT. Além disso, o grupo Salina + SP apresentou dois comportamentos distintos nas Esquivas 1 e 2; este grupo foi estatisticamente menor que o grupo tratado com DZP + SP na Esquiva 1 ( $U = 7,00$ ;  $p < 0,05$ ) e maior que o grupo tratado com DZP + PBS na Esquiva 2 ( $U = 0,00$ ;  $p < 0,05$ ), conforme o teste de Mann-Whitney, ratificando os dados obtidos anteriormente que a SP diretamente não apresenta perfil ansiogênico ou ansiolítico, bem como um efeito facilitador ou amnésico dessa tarefa no LT.

Em relação à latência para entrar no braço fechado (Figura 5B), não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{29}(3) = 4,53$ ;  $p = 0,21$ ) e 2 ( $H_{29}(3) = 6,57$ ;  $p = 0,09$ ), bem como entre os animais do mesmo grupo entre as sessões com droga e sem droga, indicando que esses tratamentos não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

A)



B)



**Figura 5** – Influência da administração i.c.v. de substância P (SP) no efeito amnésico e/ou ansiolítico da injeção i.p. de diazepam (DZP) medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*  $p < 0,05$  em relação à Linha de Base (teste  $t$  de Wilcoxon).  $\phi$   $p < 0,05$  em relação ao grupo Salina;  $\omega$   $p < 0,05$  em relação ao grupo DZP + PBS;  $\phi$   $p < 0,05$  em relação ao grupo Salina + SP (teste  $U$  de Mann-Whitney).

#### **Experimento 4 – Avaliação da participação do receptor NK<sub>1</sub> na influência da substância P sobre o efeito ansiolítico e/ou amnésico da memória de curta duração promovidos pelo diazepam em ratos avaliados no labirinto em T.**

Na figura 6A, o teste de Friedman detectou mudanças significantes somente na latência da esQUIVA inibitória, ao longo das variáveis, para os animais tratados com Salina + FK 888 + Veículo ( $\chi^2_6 (3) = 16,29; p < 0,001$ ). O teste de Wilcoxon mostrou que a EsQUIVA 2, desse tratamento, foi estatisticamente maior que a Linha de Base ( $T_6 = 0,00; p < 0,05$ ), indicando que o FK 888 não interferiu na aquisição da esQUIVA inibitória e memória avaliada no LT, pois a EsQUIVA 3 foi igual à EsQUIVA 2 e estatisticamente maior que a Linha de Base ( $T_6 = 0,00; p < 0,05$ ).

Na figura 6A, o teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos de animais tratados com Salina + FK 888 + Veículo, DZP + FK 888 + Veículo e DZP + FK 888 + SP nas EsQUIVAS 2 ( $H_{18} (2) = 12,80; p < 0,05$ ) e 3 ( $H_{18} (2) = 8,07; p < 0,05$ ), indicando que os diferentes tratamentos interferiram no desempenho dos animais nessas variáveis.

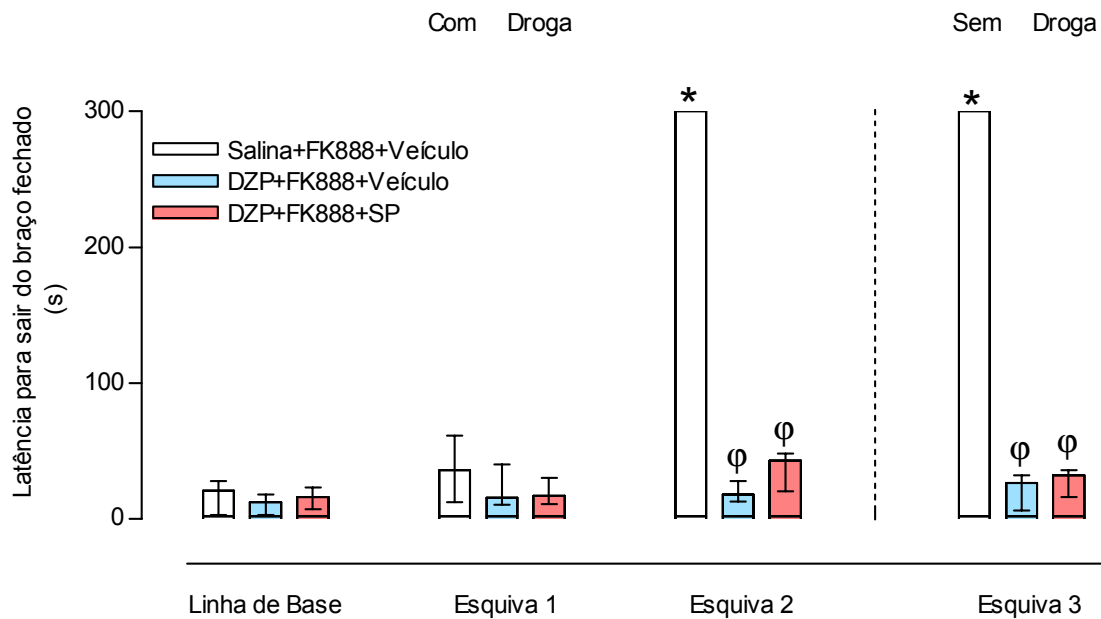
O teste de Mann-Whitney mostrou que a EsQUIVA 2 (figura 6A) dos animais tratados com DZP + FK 888 + Veículo ( $U = 0,00; p < 0,05$ ) e DZP + FK 888 + SP ( $U = 0,00; p < 0,05$ ) foi estatisticamente menor que a dos animais tratados com Salina + FK 888 + Veículo. Esses resultados indicam: no primeiro caso, que o FK 888 não interferiu no efeito amnésico do DZP, já que os animais não adquiriram o comportamento de esQUIVA inibitória ( $\chi^2_6 (3) = 5,84; p = 0,12$ , conforme o teste de Friedman), e/ou ansiolítico; no segundo, que a reversão, promovida pela injeção i.c.v. de SP do efeito amnésico e/ou ansiolítico do DZP, ocorre via receptores NK<sub>1</sub>, pois a administração do antagonista NK<sub>1</sub> (FK 888) aboliu esse efeito.

Também na figura 6A, o teste de Mann-Whitney mostrou que a EsQUIVA 3 dos animais tratados com DZP + FK 888 + Veículo ( $U = 3,00; p < 0,05$ ) e DZP + FK 888 + SP ( $U = 4,00; p < 0,05$ ) foi estatisticamente menor que a dos animais tratados com Salina + FK 888 + Veículo como resultado de um déficit na aprendizagem dessa tarefa, mais que um efeito do tipo amnésico da memória de

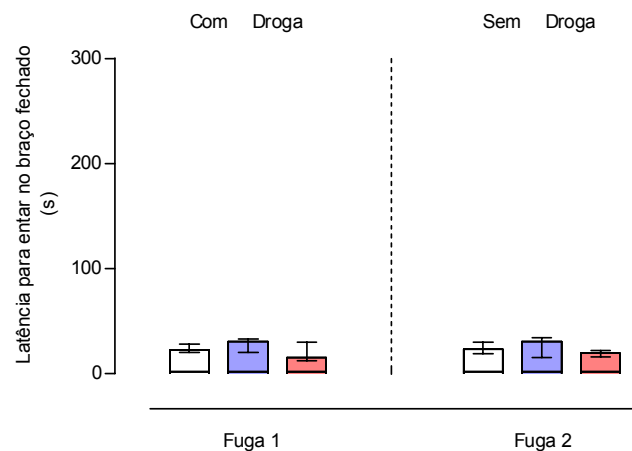
longa duração, já que o teste de Friedman não detectou mudanças significantes na latência da esquiva inibitória, ao longo das variáveis, para os animais tratados com DZP + FK 888 + Veículo ( $\chi^2_6 (3) = 5,84; p = 0,12$ ) e DZP + FK 888 + SP ( $\chi^2_6 (3) = 5,40; p = 0,14$ ).

Em relação à latência para entrar no braço fechado (figura 6B), não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento nas Fugas 1 ( $H_{18} (2) = 3,22; p = 0,20$ ) e 2 ( $H_{18} (2) = 0,64; p = 0,73$ ), bem como entre os animais do mesmo grupo entre as sessões com droga e sem droga, indicando que esses tratamentos não interferiram no comportamento de fuga dos braços abertos do LT.

A)



B)



**Figura 6** – Efeito do antagonista  $NK_1$ , FK 888, na influência do tratamento central (i.c.v.) com substância P (SP) sobre o efeito amnésico e/ou ansiolítico do diazepam (DZP) medido pela latência para sair (A) e entrar (B) no braço fechado do LT. As barras representam a mediana  $\pm$  intervalo interquartil. \*  $p < 0,05$  em relação à Linha de Base (teste  $t$  de Wilcoxon).  $\phi$   $p < 0,05$  em relação ao grupo Salina + FK 888 + Veículo (teste  $U$  de Mann-Whitney).

## DISCUSSÃO

Várias evidências indicam uma íntima relação entre ansiedade e memória. Assim, a esQUIVA passiva ou inibitória, um modelo amplamente usado para o estudo da memória, é também um modelo de ansiedade. Além disso, as estruturas cerebrais envolvidas na modulação da ansiedade e da memória, particularmente da memória emocional, sobrepõem-se extensivamente. O uso do labirinto em T tenta direcionar estas questões, pois teoricamente permite a avaliação simultânea de dois tipos de medo, o adquirido (Linha de Base, EsQUIVA 1 e EsQUIVA 2) e o inato (Fuga 1) e da memória, isto é, do aprendizado de uma “tarefa” (EsQUIVA 3 e Fuga 2) no mesmo animal (Tomaz *et al.*, 1992 *apud* Graeff *et al.*, 1993).

Em nossos experimentos, o ansiolítico clássico DZP prejudicou a aquisição da esQUIVA inibitória, enquanto que a droga ansiogênica prototípica PTZ, em doses subconvulsivas, facilitou este comportamento. O prejuízo na aquisição da esQUIVA inibitória, promovido pelo DZP, pode ser visto como um efeito ansiolítico e/ou amnésico da STM. Por outro lado à facilitação da esQUIVA inibitória, promovida pelo PTZ, pode ser vista como um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aprendizagem. Por outro lado, as duas drogas falharam em alterar a latência de fuga, tomada como um índice de pânico.

Nossos resultados obtidos com o DZP vão de encontro aos obtidos em estudos prévios no LT, que demonstraram que o DZP prejudicou seletivamente a aquisição da esQUIVA inibitória sem influenciar a resposta de fuga em ratos (Graeff *et al.*, 1998; Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994) e em camundongos (Carvalho-Netto e Nunes-de-Souza, 2004). Entretanto, o efeito amnésico da STM pode ser questionado, uma vez que Conde e colaboradores (1999) demonstraram, através da exposição repetida nos braços fechados (mais algumas sessões além das três tradicionais), que os animais tratados com DZP adquirem o comportamento de esQUIVA inibitória, ou seja, permanecem 300 s no braço fechado. Similarmente, nossos resultados obtidos com o PTZ corroboram com os obtidos em outros modelos experimentais de ansiedade e memória (Jung *et al.*, 2002; Chapouthier e

Venault, 2004), já que somos os pioneiros em utilizar o PTZ no LT. O PTZ, antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, é bastante usado como droga ansiogênica padrão em modelos animais de ansiedade. Em animais experimentais, seus efeitos ansiogênicos têm sido mostrados em uma variedade de modelos experimentais, incluindo o LCE (De Souza *et al.*, 1998) e o teste de Vogel (Giusti *et al.*, 1991). Em seres humanos, o PTZ foi inicialmente descrito como uma droga convulsivante e mais tarde como uma droga ansiogênica, em doses subconvulsivas, além de panicolítica em doses convulsivas (Jung *et al.*, 2002; Schenberg *et al.*, 2001). O PTZ também precipita “ataques de pânico” em animais na dose de 50 mg/Kg (i.p.), que é substancialmente maior que a dose usada em modelos de ansiedade (Schenberg *et al.*, 2001). Nos processos mnemônicos, de modo geral, os achados das várias situações de aprendizagem demonstram que o PTZ, em doses não convulsivas, melhora os processos mnemônicos (Chapouthier e Venault, 2004). Venault e colaboradores (1986 e 1992) demonstraram que a administração pré-treino de PTZ, mas não pós-treino ou pré-teste de uma dose subconvulsivante e não ansiogênica, em camundongos, aumentou a retenção da habituação a um novo ambiente. Sendo assim, os resultados obtidos com as doses subconvulsivas de PTZ no LT estão de acordo com os dados da literatura, pois o PTZ promoveu um aumento significativo na latência da esquia inibitória, que pode ser visto como um efeito ansiogênico e/ou facilitador da aprendizagem dessa tarefa, e não interferiu na latência de fuga, associada a uma resposta de pânico.

A administração periférica de SP, diferente das drogas padrão DZP e PTZ, não interferiu na aquisição da esquia inibitória no LT, apesar de diversos estudos sugerirem fortemente que a ansiedade experimental e os processos de aprendizagem e memória podem ser modulados pela SP e seus fragmentos N- e C-terminal em outros modelos experimentais (para revisão ver Hasenöhrl *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2004; Gavioli *et al.*, 2002; Gavioli *et al.*, 1999; Huston e Hasenöhrl, 1995; Teixeira *et al.*, 1996). A exemplo dessas drogas padrão, a SP não interferiu na latência de fuga avaliada no teste e re-teste no LT. Dessa forma, a falta de efeito ou a não confirmação dos resultados obtidos para a dose intermediária e maior de SP na Linha de Base, que indicavam um possível efeito



ansio gênico e/ou facilitador da aquisição da esquiv a inibitória, aliada aos dados da literatura seria surpreendente se não fossem as observações recentes de Echeverry e colaboradores (2001) que também não obtiveram resultados significativos para a injeção i.p. de SP no LT. Sendo assim, poderíamos supor que o efeito da SP nos parâmetros de medo e memória pode ser dependente do modelo experimental utilizado, uma vez que já foram observados efeitos ansiolíticos e ansio gênicos da SP no LCE e no teste de interação social (Hasenöhrl *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2004; Gavioli *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 1996) e facilitadores e reforçadores da memória em uma tarefa de esquiv a inibitória (*up-hill*; Hasenöhrl *et al.*, 1990a; Tomaz e Huston, 1986) e de preferência condicionada de lugar (*open-field*; Hasenöhrl *et al.*, 1990b; Oitzl *et al.*, 1990).

Além disso, a não observação ou confirmação de um possível efeito ansio gênico e/ou facilitador da aquisição da esquiv a inibitória para a administração i.p. de SP no LT pode ser devida ao alto nível basal de reatividade emocional dos animais, pois o “traço de ansiedade” é uma característica durável e persistente da personalidade do indivíduo/animal e reflete a forma como ele interage com seu ambiente físico e social (Sandford *et al.*, 2000). No LCE, modelo amplamente utilizado para investigar comportamentos relacionados com ansiedade (Dawson e Tricklebank, 1995; Hogg, 1996; Rodgers *et al.*, 1997), vários experimentos têm mostrado que ratos, embora idênticos na linhagem, sexo e idade, podem diferir sistematicamente em sua resposta comportamental (Henniger *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2002). Como o traço de ansiedade independe do teste utilizado (Henniger *et al.*, 2000), Conde e colaboradores (2000) demonstraram que há uma diferença emocional interindividual no LT para os animais da linhagem Wistar de sua colônia no desempenho da esquiv a inibitória, que permite dividi-los em animais com comportamentos de alta e baixa reatividade, utilizando um procedimento de critério para o treino (isto é, recolocar o animal no braço fechado até que permaneça 300 s; Conde *et al.*, 1999), com os animais de alta reatividade adquirindo o comportamento de esquiv a inibitória com três ou menos sessões, enquanto os de baixa reatividade adquirem o comportamento com quatro ou mais sessões. Portanto, poderíamos supor que o possível efeito ansio gênico e/ou

facilitador da aquisição da esquiva inibitória, promovido pela injeção i.p. de SP, pode estar sendo mascarado por um efeito teto dos animais do grupo controle na Esquiva 2, devido à presença de animais com alta reatividade neste grupo.

O sítio de ação pelo qual a SP modula os processos de ansiedade e memória, quando administrada periféricamente, não está determinado com precisão, mas sabe-se que a SP pode atravessar a barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *blood-brain barrier*) e agir em estruturas centrais. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a SP pode penetrar a BBB (Banks e Kastin, 1985; Freed *et al.*, 2002) e, portanto, modular os comportamentos relacionados à ansiedade e os processos mnemônicos por agir em estruturas centrais quando administrada periféricamente. Entretanto, é também possível que efeitos periféricos diretos da SP, tais como efeitos cardiovasculares, possam ser responsáveis por esses resultados. Estudos anatômicos, imunohistoquímicos e com radioautografia mostram uma alta concentração de SP e dos receptores de TKs nos terminais vagais e no núcleo do trato solitário (NTS, Cuello e Kanazawa, 1978; Funakoshi *et al.*, 1989; Helke e Seagard, 2004; Mazzone e Geragty, 2000). Além disso, Nogueira e colaboradores (1994) demonstraram que o efeito facilitatório observado na tarefa de esquiva inibitória (*step-down*) pela administração periférica pós-treino de SP é bloqueado por vagotomia sub-diafragmática, indicando que a integridade funcional do nervo vago é importante para o efeito mnemônico exercido pela SP.

Tradicionalmente, a LTM no LT tem sido avaliada durante a Esquiva 3, comparando os diferentes grupos de tratamento com o grupo controle; onde uma redução ou um aumento na latência para deixar o braço fechado pode ser interpretado como um efeito amnésico ou facilitador na retenção desta tarefa, respectivamente (Echeverry *et al.*, 2001; Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994). Esse mesmo tipo de avaliação também é feito em outros modelos experimentais que avaliam, especificamente, os processos mnemônicos como, por exemplo, o *step-down* (Izquierdo *et al.*, 1999). Entretanto, nesses modelos os animais são expostos ao aparelho durante o treino geralmente uma única vez e as drogas testadas não interferem no desempenho dos animais na aprendizagem.

Diferentemente, os animais no LT são expostos no treino (teste) três vezes consecutivas, em intervalos de 30 s e, dependendo da droga, o desempenho poderá ser afetado, ou seja, aumentado ou reduzido, indicando, além dos efeitos na ansiedade, um efeito facilitador ou amnésico dessa tarefa. Conseqüentemente, a avaliação da retenção da memória (Esquiva 3) ficará prejudicada, pois não se sabe até que ponto o nível de ansiedade estará interferindo na aprendizagem deste comportamento ou vice-versa. Na tentativa de minimizar essa relação resolvemos estabelecer mais outro critério para ajudar na discriminação desses efeitos (ansiolítico/amnésico ou ansiogênico/facilitador), isto é, comparar a Esquiva 3 com a Linha de Base e com a Esquiva 2 do mesmo grupo. Dessa forma, para que uma droga cause, por exemplo, um efeito amnésico da LTM, primeiro, ela não poderá interferir no aprendizado da esquiva inibitória e, segundo, no re-teste, deverá reduzir a latência da esquiva inibitória a ponto de ser menor que a sua própria Linha de Base e Esquiva 2, além da tradicional redução em relação ao grupo controle na Esquiva 3. Como em nenhum dos experimentos esses critérios foram encontrados, não foi possível detectar com segurança nenhum efeito amnésico ou facilitador da LTM no presente estudo.

Além desses resultados, nossos dados mostraram ainda que o efeito amnésico da STM e/ou ansiolítico produzido pelo DZP na latência da esquiva inibitória foi revertido e bloqueado pela injeção sistêmica de PTZ e SP e bloqueado com a administração central de SP, confirmando a relação previamente estabelecida em modelos experimentais distintos entre as TKs, em particular a SP, e o DZP na ansiedade e memória (Costa e Tomaz, 1998; Ribeiro e De Lima, 2002). Além disso, nossos resultados mostraram também que o bloqueio, com a administração central de SP, do efeito amnésico da STM e/ou ansiolítico produzido pelo DZP na latência da esquiva inibitória ocorre via receptores NK<sub>1</sub>, pois o tratamento central com o antagonista preferencial deste receptor – FK 888, que *per se* não apresentou efeito – foi capaz de abolir este efeito.

Evidências das ações antagônicas do DZP e PTZ vêm de estudos com macacos *Rhesus* (*Macaca mulatta*), onde as mudanças comportamentais e bioquímicas provocadas pela administração de PTZ (30 mg/Kg, i.m.),

caracterizadas por hipervigilância, agressividade, taquipnéia, piloereção, freqüentes mudanças na postura e aumento significativo no nível de cortisol plasmático, podem ser bloqueadas pelo tratamento intravenoso com DZP (1,0 mg/Kg; Palit *et al.*, 1998).

O mecanismo pelo qual a SP bloqueia e reverte o efeito comportamental produzido pelo DZP é ainda desconhecido. Como a SP e os receptores GABA<sub>A</sub> estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central é possível que estejam atuando e/ou modulando outros sistemas de neurotransmissores. Além da investigação do possível mecanismo responsável pela relação entre os sistemas GABAérgico e taquicinérgico, torna-se importante saber se essa relação é específica para a ansiedade e memória ou se pode ser estendida para o efeito anticonvulsivante, hipotérmico e na coordenação motora (ataxia) promovida pelo DZP.

Em resumo, nossos resultados mostraram que a administração periférica e central de SP não interferiu diretamente na esquiva inibitória de ratos avaliados no LT, ao contrário do DZP, que apresentou um efeito ansiolítico e/ou amnésico da STM, e do PTZ, que apresentou um efeito ansiogênico e/ou facilitador na aprendizagem dessa tarefa. Entretanto, a SP foi capaz de bloquear e reverter, quando administrada periféricamente, e reverter, quando administrada centralmente, o(s) efeito(s) promovido(s) pelo DZP; com este último efeito ocorrendo via receptores NK<sub>1</sub>. Dessa forma, conseguimos verificar a relação existente entre os sistemas GABAérgico e taquicinérgico na ansiedade e memória em outros modelos experimentais, utilizando um único modelo – o LT. Além disso, observamos que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar as respostas de fuga e a LTM da tarefa de esquiva inibitória no LT.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho ratificam o efeito ansiolítico ou o possível efeito amnésico da STM da droga padrão DZP e o efeito ansiogênico ou o possível efeito facilitador da STM da droga padrão PTZ no LT, aonde modificaram seletivamente a medida da esQUIVA inibitória (Linha de Base e Esquivas 1 e 2), associadas ao distúrbio de ansiedade generalizada; sem interferir na latência de fuga, que é relacionada com o distúrbio de pânico.

Os nossos dados mostraram também que a SP não interfere na medida da esQUIVA inibitória no LT, quando administrada i.p. (5, 50 e 250  $\mu\text{g/Kg}$ ) e i.c.v. (10 pmol), em doses que demonstraram influenciar os comportamentos de ansiedade e memória em outros modelos experimentais. Entretanto, a administração i.p. de SP (5  $\mu\text{g/Kg}$ ) foi capaz de bloquear e reverter, enquanto que a administração i.c.v. de SP (10 pmol) foi capaz de reverter o efeito ansiolítico ou o possível efeito amnésico da STM promovido pelo tratamento agudo com DZP (1 mg/Kg, i.p.) na latência da esQUIVA inibitória. Estes resultados ratificam a interação existente entre os sistemas GABAérgico e taquicinérgico na modulação da ansiedade e memória, já mostrada em outros modelos experimentais. O PTZ (30 mg/Kg, i.p.) também foi capaz de bloquear e reverter esse efeito promovido pelo DZP, confirmando as ações antagônicas dessas drogas.

O tratamento i.c.v. com o antagonista seletivo do receptor  $\text{NK}_1$ , FK 888 na dose de 100 pmol, foi capaz de bloquear a reversão, promovida pela administração i.c.v. de SP 10 pmol, do efeito ansiolítico ou do possível efeito amnésico da STM induzido pelo DZP (1 mg/Kg, i.p.). Em contraste, a avaliação da LTM no LT não sofreu influência de nenhum dos tratamentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T. e LATTAL, K. M.; Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval; **Curr. Opin. Neurobiol.**; 11:180-187, 2001.

AGUIAR, M. S. e BRANDÃO, M. L.; Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test; **Physiol. Behav.**; 60:1183-6, 1996.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 4<sup>a</sup> ed.; Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

APPELL, K. C.; FRAGALE, B. J.; LOSCIG, J.; SINGH, S.; TOMCZUK, B. E.; Antagonists that demonstrate species differences in neurokinin 1 receptors; **Mol. Pharmacol.**; 41:772-778, 1992.

ARGYROPOULOS, S. V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J.; The psychobiology of anxiolytic drugs part 2: pharmacological treatments of anxiety; **Pharmacol. Ther.**; 88:213-227, 2000.

BANKS, W. A. e KASTIN, A. J.; Peptides and the blood-brain barrier: lipophilicity as a predictor of permeability; **Brain Res. Bulletin**; 15:287-292, 1985.

BARROS, M.; DE SOUZA SILVA, M. A.; HUSTON, J. P.; TOMAZ, C.; Anxiolytic-like effects of substance P fragment (SP<sub>1-7</sub>) in non-human primates (*Callithrix penicillata*); **Peptides**; 23:967-973, 2002.

BEAUDET, A.; NOUEL, D.; STROH, T.; VANDENBULCKE, F.; DAL-FARRA, C.; VINCENT, J. P.; Fluorescent ligands for studying neuropeptide receptors by confocal microscopy; **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 31:1479-1489, 1998.

BEAUJOUAN, J. C.; SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; GLOWINSKI, J.; Different subtypes of tachykinin NK1 receptor binding sites are present in the rat brain; **J. Neurochem.**;75:1015-1026, 2000.

BEVILAQUA, L. R. M.; KERR, D. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; Inhibition of hippocampal *jun* N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task; **Eur. J. Neurosci.**; 17:897-902, 2003.

BIANCHIN, M.; SOUZA, T. M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory; **Neurobiol. Learn. Mem.**; 71:127-131, 1999.

BILKEI-GORZO, A.; RACZ, I.; MICHEL, K.; ZIMMER, A.; Diminished anxiety- and depression-related behaviors in mice with selective deletion of the *Tac1* gene; **J. Neurosci.**; 22:10046-10052, 2002.

BOIX, F.; HUSTON, J. P.; SCHWARTING, R. K. W.; The C-terminal fragment of substance P enhances dopamine release in nucleus accumbens but not neostriatum in freely moving rats; **Brain Res.**; 592:181-186, 1992.

BOYCE, S.; SMITH, D.; CARLSON, E.; HEWSON, L.; RIGBY, M.; O'DONNELL, R.; HARRISON, T.; RUPNIAK, N. M. J.; Intra-amygdala injection of the substance P (NK<sub>1</sub> receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs; **Neuropharmacology**; 41:130-137, 2001.

BRANDÃO, M. L.; **Psicofisiologia – as bases fisiológicas do comportamento**; SP; Ed. Atheneu, p. 107-149, 2001.

BURT, D. R.; Reducing GABA receptors; **Life Sci.**; 43:1741-1758, 2003.

CABERLOTTO, L.; HURD, Y. L.; MURDOCK, P.; WAHLIN, J. P.; MELOTTO, S.; CORSI, M.; CARLETTI, R.; Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain; **Eur. J. Neurosci.**; 17:1736-1746, 2003.

CARPENTIER, C. e BAUDE, A.; Immunocytochemical localisation of NK3 receptors in the dorsal vagal complex of rat; **Brain Res.**; 734:327-331, 1996.

CARVALHO-NETTO, E. F. e NUNES-DE-SOUZA, R. L.; Use to the elevated T-maze to study anxiety in mice; **Behav. Brain Res.**; 148:119-132, 2004.

CHANG, M.; LEEMAN, S.; NIALL, M.; Amino acid sequence of substance P. **Nature**; 232: 86-87, 1971.

CHAPOUTHIER, G. e VENAULT, P.; GABA-A receptor complex and memory processes; **Med. Chem. Reviews**; 1:91-99, 2004.

CHEETA, S.; TUCCI, S.; SANDHU, J.; WILLIAMS, A. R.; RUPNIAK, N. M. J.; FILE, S. E.; Anxiolytic actions of the substance P (NK<sub>1</sub>) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils; **Brain Res.**; 915:170-175, 2001.

CLEMENT, Y. e CHAPOUTHIER, G.; Biological bases of anxiety; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 22:623-633, 1998.

CONDE, C. A.; COSTA, V.; TOMAZ, C.; Effects of emotional reactivity on inhibitory avoidance in the elevated T-maze; **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 33:233-236, 2000.

CONDE, C. A.; COSTA, V.; TOMAZ, C.; Measuring emotional memory in the elevated T-maze using a training-to-criterion procedure; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 63:63-69, 1999.



COSTA, J. C. e TOMAZ, C.; Posttraining administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnestic effects of diazepam; **Neurobiol. Learn. Mem.**; 69:65-70, 1998.

COTTRELL, G. A.; The first peptide-gated ion channel; **J. Exp. Biol.**; 200:2377-2386, 1997.

CUELLO, A. C. e KANAZAWA, I.; The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system; **J. Comp. Neur.**; 178:129-156, 1978.

DAM, T. V.; ESCHER, E.; QUIRION, R.; Visualization of neurokinin-3 receptors sites in rat brain using the highly selective ligand [<sup>3</sup>H]senktide; **Brain Res.**; 506:175-179, 1990.

DAWSON, G. R. e TRICKLEBANK, M. D.; Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents; **Trends Pharmacol. Sci.**; 16:33-36, 1995.

DEAKIN, J. W. F.; GRAEFF, F. G.; 5-HT and mechanisms of defence; **J. Psychopharmacol.**; 5:305-315, 1991.

DE ARAUJO, J. E.; HUSTON, J. P.; BRANDAO, M. L.; Opposite effects of substance P fragments C (anxiogenic) and N (anxiolytic) injected into dorsal periaqueductal gray; **Eur. J. Pharmacol.**; 432:43-51, 2001.

DE ARAUJO, J. E.; SILVA, R. C. B.; HUSTON, J. P.; BRANDAO, M. L.; Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray; **Peptides**; 20:1437-1443, 1999.

DE LIMA, T. C. M.; TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; Behavioral effects of intracerebroventricular injection of selective tachykinin agonists and antagonists; **Soc. Neurosci. Abstr.**; 21:1696, 1995.

DE SOUZA, M. M.; SCHENBERG, L. C.; DE PADUA CAROBREZ, A.; NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance; **Behav. Brain Res.**; 90:157-165, 1998.

DRAPEAU, G.; ROUISSI, N.; NANTEL, F.; RHALEB, N. E.; TOUSIGNANT, C.; REGOLI, D.; Antagonists for the tachykinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems; **Regul. Pept.**; 31:125-135, 1990.

DING, Y. Q.; SHIGEMOTO, R.; TAKADA, M.; OHISHI, H.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N.; Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat; **J. Comp. Neurol.**; 364:290-310, 1996.

DOROW, R.; HOROWSKI, R.; PASCHELKE, G.; AMIN, M.; BRAESTRUP, C.; Severe anxiety induced by FG 7142, a benzodiazepine ligand for benzodiazepine receptors; **Lancet**; 2: 98-99, 1983.

DUARTE, F. S.; TESTOLIN, R.; DE LIMA, T. C. M.; Further evidence on the anxiogenic-like effect of substance P evaluated in the elevated plus-maze in rats. **Behav. Brain Res.**; 154:501-510, 2004.

DUFFY, R. A.; HEDRICK, J. A.; RANDOLPH, G.; MORGAN, C. A.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; VASSILEVA, G.; LACHOWICZ, J. E.; LAVERTY, M.; MAGUIRE, M.; SHAN, L. S.; GUSTAFSON, E.; VARTY, G. B.; Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 receptor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbils; **Neuropharmacology**; 45:242-50, 2003.

EBNER, K.; RUPNIAK, N. M.; SARIA, A.; SINGEWALD, N.; Substance P in the medial amygdala: emotional stress-sensitive release and modulation of anxiety-related behavior in rats; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 101:4280-4285, 2004.

ECHEVERRY, M. B.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J. P.; TOMAZ, C.; Comparison of neurokinin SP with diazepam in effects on memory and fear parameters in the elevated T-maze free exploration paradigm; **Peptides**; 22:1031-1036, 2001.

EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; BROECK, D. V.; ADVENIER, C.; NALINE, E.; NELIAT, G.; LE FUR, G.; BRELIERE, J. C.; A potent and selective non-peptide antagonist of the tachykinin A (NK<sub>2</sub>) receptor; **Life Sci.**; 50:101-106, 1992.

ENDLER, N. S. e KOCOVSKI, N. L.; State and trait anxiety revisited; **J. Anxiety Disord.**; 15:231-245, 2001.

FILE, S. E.; Anxiolytic action of a neurokinin-1 receptor antagonist in the social interaction test; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 58:747-752, 1997.

FONG, T. M.; ANDERSON, S. A.; YU, H.; HUANG, R. R.; STRADER, C. D.; Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor; **Mol. Pharmacol.**; 41:24-30, 1992.

FREED, A. L.; AUDUS, K. L.; LUNTE, S. M.; Investigation of substance P transport across the blood-brain barrier; **Peptides**, 23:157-165, 2002.

FUJI, T.; MURAI, M.; MORIMOTO, H.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIRAWARA, D.; MIYAKE, H.; IKARI, N.; MATSUO, M.; Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK<sub>1</sub> receptor antagonist, FK 888; **Br. J. Pharmacol.**; 107:785-789, 1992.

FUNAKOSHI, K.; KUSAKABE, T.; KADOKA e GORIS, R. C.; Substance P immunoreactivity in the vagal nerve of mice; **Neurosci. Res.**; 7:235-248, 1989.

GAFFORI, O.; STEWART, J. M.; DE WIED, D.; Influence of substance P and fragments on passive avoidance behavior; **Experientia**; 40:89-91, 1984.

GARCÍA-LÓPEZ, M. J.; MARTÍNES-MARTOS, J. M.; MAYAS, M. D.; CARRERA, M. P.; RAMÍREZ-EXPÓSITO, M. J.; Fisiología de los neuropéptidos; **Rev. Neurol.**; 35:784-793, 2002.

GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M.; The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P; **Behav. Brain Res.**; 134:411-415, 2002.

GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M.; Anxiogenic-like effects induced by substance P injected into the lateral septal nucleus; **Neuroreport**; 10:3399-3403, 1999.

GENTIL, V.; Ansiedade e transtornos ociosos. In: GENTIL, V. & LOTUFO-NETO, F.; **Pânico, fobia e obsessões**; São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, c. 2, p. 31-45, 1994.

GENTIL FILHO, V.; Psicofármacos. In: ZANINI, A. C. & OGA, S.; **Farmacologia Aplicada**; São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, c. 55, p. 457-479, 1994.

GENTIL, V.; TAVARES, S.; GORENSTEIN, C.; BELLO, C.; MATHIAS, L.; GRONICH, G.; SINGER, J.; Acute reversal of flunitrazepam effects by Ro 15-1788 and Ro 15-3505: inverse agonist, tolerance and rebound; **Psychopharmacology**; 100:54-59, 1990.

GENTSCH, C.; CUTLER, M.; VASSOUT, A.; VEENSTRA, S.; BRUGGER, F.; Anxiolytic effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in the social investigation test in gerbils; **Behav. Brain Res.**; 133:363-368, 2002.

GERARD, N. P.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; GERARD, C.; The human neurokinin A (substance K) receptor: molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues; **J. Biol. Chem.**; 265:20455-20462, 1990.

GERARD, N. P.; GARRAWAY, L. A.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; IIJIMA, H.; PAQUET, J. L.; GERARD, C.; Human substance P receptor (NK<sub>1</sub>): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones; **Biochemistry**; 30:1640-10646, 1991.

GERHARDT, P.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J. P.; Enhanced learning produced by injection of neurokinin substance P into the region of the nucleus basalis magnocellularis: mediation by the N-terminal sequence; **Exp. Neurol.**; 118:302-308, 1992.

GIUSTI, P.; GUIDETTI, G.; COSTA, E.; GUIDOTTI, A.; The preferential antagonism of pentylentetrazole proconflict responses differentiates a class of anxiolytic benzodiazepines with potential antipanic action; **J. Pharmacol. Exp. Ther.**; 257:1062-1068, 1991.

GRAEFF, F. G.; BRANDAO, M. L.; GUIMARAES, F. S.; VIANA, G. S. B.; VIANA, M. B.; **Neurobiologia das doenças mentais**; 5<sup>a</sup> ed.; SP; Ed. Lemos Editorial; p. 135-178, 1999.

GRAEFF, F. G. e GUIMARAES, F. S.; **Fundamentos de psicofarmacologia**; SP, Ed. Atheneu, p. 43-67, 2001.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H.; O elevated T-maze as an experimental model of anxiety; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 23:237-246, 1998.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; MORA, P.; Dual role of 5-HT in defense and anxiety; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 21:791-799, 1997.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam; **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 26:67-70, 1993.

GROSS, C. e HEN, R.; The developmental origins of anxiety; **Nature Rev. Neurosci.**; 5:545-552, 2004.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SOUBRIE, P.; Effects of SR48968, a selective non-peptide NK<sub>2</sub> receptor antagonist on emotional processes in rodents; **Psychopharmacology**; 158:241-251, 2001.

HAGAN, R. M.; BERESFORD, I. J.; STABLES, J.; DUPERE, J.; STUBBS, C. M.; ELLIOTT, P. J.; SHELDRIK, R. L.; CHOLLET, A.; KAWASHIMA, E.; MCELROY, A. B.; WARD, P; Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studied using potent NK2 receptor antagonists; **Regul. Pept.**; 46:9-19,1993.

HANDLEY, S. L. e MITHANI, S.; Effects of alpha 2-adrenoceptor agonists and antagonists in maze-exploration model of fear motivated behavior; **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**; 327:1-5, 1984.

HARLAN, R. E.; GARCIA, M. M.; KRAUSE, J. E.; Cellular localization of substance P- and neurokinin A- encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain; **J. Comp. Neurol.**; 287:179-212, 1989.

HARMAR, A. J.; HYDE, V.; CHAPMAN, K.; Identification and cDNA sequence of  $\delta$ -preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor; **FEBS Lett**; 275:22-24; 1990.

HASENOHRL, R. U.; DE SOUZA SILVA, M. A.; NIKOLAUS, S.; TOMAZ, C.; BRANDAO, M.L.; SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P.; Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery **Neuropeptides**; 34(5): 272–280, 2000.

HASENOHRL, R. U.; GERHARDT, P.; HUSTON, J. P.; Positively reinforcing effects of the neurokinin substance P in the basal forebrain: mediation by its C-terminal sequence; **Exp. Neurol.**; 115:282-291, 1992.

HASENOHRL, R. U.; GERHARDT, P.; HUSTON, J. P.; Substance P enhancement of inhibitory avoidance learning: mediation by the N-terminal sequence; **Peptides**; 11:163-167, 1990a.

HASENOHRL, R. U.; GERHARDT, P.; HUSTON, J. P.; Evidence for dose dependent positively and negatively reinforcing effects of the substance P C-terminal analog DiMe-C7; **Neuropeptides**; 17:205-211, 1990b.

HASENOHRL, R. U.; JENTJENS, O.; DE SOUZA SILVA, M. A.; TOMAZ, C.; HUSTON, J. P.; Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region; **Eur. J. Pharmacol.**; 354:123-133,1998.

HAUSER, K.; HEID, J.; CRISCIONE, L.; BRUGGER, F.; OFNER, S.; VEENTRA, S.; SCHILLING, W.; P7/8 CGP 49823, a novel, non-peptidic NK-1 receptor antagonist: in vitro pharmacology; **Neuropeptides**; 26 (suppl. 1):37, 1994.

HELKE, C. J. e SEAGARD, J. L.; Substance P in the baroreceptor reflex: 25 years; **Peptides**; 25:413-423, 2004.

HENNIGER, M. S. H.; OHL, F.; HOLTER, S. M.; WEIßENBACHER, P.; TOSCHI, N.; LORSCHER, P.; WIGGER, A.; SPANAGEL, R.; LANDGRAF, R.; Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour; **Behav. Brain Res.**; 111:153-163, 2000.

HO, Y. -J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. W.; Individual response profiles of male Wistar rats in animals models for anxiety and depression; **Behav. Brain Res.**; 136:1-12, 2002.

HOGG, S; A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 54:21–30, 1996.

HOKFELT, T.; BARTFAI, T.; BLOOM, F.; Neuropeptides: opportunities for drug discovery; **Lancet Neurol.**; 2:463-472, 2003.

HOKFELT, T.; BROBERGER, C.; XU, Z-Q. D.; SERGEYEV, V.; UBINK, R.; DIEZ, M.; Neuropeptides – an overview; **Neuropharmacology**; 39:1337-1356, 2000.

HOKFELT, T.; PERNOW, B.; WAHREN, J.; Substance P: a pioneer amongst neuropeptides; **J. Intern. Med.**; 249:27-40, 2001.

HOLMGREN, S. e JENSEN, J.; Evolution of vertebrate neuropeptides; **Brain Res. Bulletin**; 55:723-735, 2001.

HOLZHAUER-OITZL, M. –S.; BOUCKE, K.; HUSTON, J. P.; Reinforcing properties of substance P in the lateral hypothalamus revealed by conditioned place preference; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 28:511-515, 1987.

HOLZHAUER-OITZL, M. –S.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J. P.; Reinforcing properties of substance P in the region of the nucleus basalis magnocellularis in rats; **Neuropharmacology**; 27:149-759, 1988.



HUSTON, J. P.; HASENOHRL, R. U.; BOIX, F.; GERHARDT, P.; SCHWARTING, R. K. W.; Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement, and brain dopamine activity; **Psychopharmacology**; 112:147-162, 1993.

HUSTON, J. P. e HASENOHRL, R. U.; The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P; **Behav. Brain Res.**; 66:117-127, 1995.

HUSTON, J. P.; MUELLER, C. C.; MONDADORI, C.; Memory facilitation by posttrial hypothalamic stimulation and other reinforcers: a central theory of reinforcement; **Biobehav. Rev.**; 1:143-150, 1977.

HUSTON, J. P. e OITZL, M. -S.; The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effects of the neuropeptide substance P; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 13:171-180, 1989.

HUSTON, J. P. e STAUBLI, U.; Retrograde amnesia produced by posttrial injection of substance P into substantia nigra; **Brain Res.**; 159:468-472, 1978.

HUSTON, J. P. e STAUBLI, U.; Post-trial injection of substance P into lateral hypothalamus and amygdala, respectively, facilitates and impairs learning; **Behav. Biol.**; 27:244-248, 1979.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H.; Mechanisms for memory types differ; **Nature**; 393:635-636, 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANNA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; Separate mechanisms for short- and long-term memory; **Behav. Brain Res.**; 103:1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. e MEDINA, J. H.; Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures; **Neurobiol. Learn. Mem.**; 68:285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. e MEDINA, J. H.; GABA<sub>A</sub> receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines; **Trends Pharmacol. Sci.**; 12:260-265, 1991.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B.; The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 26:429-439, 2002.

KAGE, R.; MCGREGOR, G. P.; THIM, L.; CONLON, J. M.; Neuropeptide  $\gamma$ : a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from  $\gamma$ -preprotachykinin; **J. Neurochem.**; 50:1412-1417, 1988.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I.; **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**; RS; Ed. Artes Médicas Sul, p. 101-108, 2000.

KHAWAJA, A. M. e ROGERS, D. F.; Tachykinins: receptor to effector; **In. J. Biochem. Cell Biol.**; 28:721-738, 1996.

KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y., KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E.; Novel neuropeptides, neurokinin  $\alpha$  and  $\beta$ , isolated from porcine spinal cord; **Proc. Jpn. Acad.**; 59:101-104, 1983.

KOLB, B. e WHISHAW, I.; **Neurociências do comportamento**; SP, Ed. Manole, p. 488-527, 2002.

KOOB, G. F.; Dopamine, addiction and reward; **Semin. Neurosci.**; 4:139-148, 1992.

KOOB, G. F. e BLOOM, F. E.; Cellular and molecular mechanisms of drug dependence; **Science**; 242:715-723, 1988.

KORPI, E. R.; GRUNDER, G.; LUDDENS, H.; Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors; **Prog. Neurobiol.**; 67:113-159, 2002.

KRAMER, M. S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J.; SRAMEK, J. J.; REINES, S. A.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT-KNOWLES, E.; HALE, J. J.; MILLS, S. G.; MacCOSS, M.; SWAIN, C. J.; HARRISON, T.; HILL, R. G.; HEFTI, F.; SCOLNICK, E. M.; CASCIERI, M. A.; CHICCHI, G. G.; SADOWSKI, S.; WILLIAMS, A. R.; HEWSON, L.; SMITH, D.; CARLSON, E. J.; HARGREAVES, R. J.; RUPNIAK, N. M. J.; Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors; **Science**; 281:16040-1645, 1998.

KRAUSE, J. E.; CHIRGWIN, J. M.; CARTER, M. S.; XU, Z. S.; HERSHEY, A. D.; Three rat preprotachykinin mRNA encode the neuropeptides substance P and neurokinin A; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 84:881-885, 1987.

KRIS, R. M.; SOUTH, V.; SALZMAN, A.; FELDER, S.; RICCA, G. A.; JAYE, M.; HUEBNER, K.; KAGAN, J.; CROCE, C. M.; SCHLESSINGER, J.; Cloning and expression of the human substance K receptor and analysis of its role in mitogenesis; **Cell Growth Differ.**; 2:15-22, 1991.

KURTZ, M. M.; WANG, R.; CLEMENTS, M. K.; CASCIERI, M. A.; AUSTIN, C. P.; CUNNINGHAM, B. R.; CHICCHI, G. G.; LIU, Q.; Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides; **Gene**; 296:205-212, 2002.

LEEMAN, S. E. e FERGUSON, S. L.; Substance P: an historical perspective; **Neuropeptides**; 34(5):249-254, 2000.

LENARD, L. e KERTES, E.; Influence of passive avoidance learning by substance P in the basolateral amygdala; **Acta Biol. Hung.**; 53:95-104, 2002.

LENT, R.; **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**; SP; Ed. Atheneu, p. 587-617, 2004.

LEONE, P. e DI CHIARA, G.; Blockade of D-1 receptors by SCH 23390 antagonizes morphine- and amphetamine- induced place preference conditioning; **Eur. J. Pharmacol.**; 135:251-254, 1987.

LEVER, I. J.; GRANT, A. D.; PEZET, S.; GERARD, N. P.; BRAIN, S. D.; MALCANGIO, M.; Basal and activity-induced release of substance P from primary afferent fibres in NK<sub>1</sub> receptor knockout mice: evidence for negative feedback; **Neuropharmacology**; 45:1101-1110, 2003.

LINGUEGLIA, E.; CHAMPIGNY, G.; LAZDUNSKI, M.; BARBRY, P.; Cloning of the amiloride-sensitive FMRFamide peptide-gated sodium channel; **Nature**; 378:730-733, 1995. *Abstract*.

LISTER, R. G.; The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse; **Psychopharmacology**; 92:180-185, 1987.

MCGAUGH, J. L.; The amygdala modulates consolidation of memories of emotionally arousing experiences; **Annu. Rev. Neurosci.**; 27:1-28, 2004.

MCGAUGH, J. L.; Memory consolidation and the amygdala: a system perspective; **Trends Neurosci.**; 25:456-461, 2002a.

MCGAUGH, J. L. e ROOZENDAAL, B.; Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain; **Curr. Opin. Neurobiol.**; 12:205-210, 2002b.

MCGAUGH, J. L.; Memory-a century of consolidation; **Science**; 287:248-251, 2000.

MAENO, H.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M.; Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system; **Mol. Brain Res.**; 18:43-58, 1993.

MAGGI, C. A.; The mammalian tachykinin receptors; **Gen. Pharmacol.**; 26:911-944, 1995.

MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B. E. B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L. L.; SANTIKAN, S.; WILLIAMS, B. H.; HUNTER, J. C.; HANLEY, M. R.; Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. *In*: Skrabanek P. e Powel D. (Eds.) **Substance P**. Dublin: Boole, p. 20-21, 1983.

MALCANGIO, M. e BOWERY, N. G.; Peptide autoreceptors: does an autoreceptor for substance P exist?; **Trends Pharmacol. Sci.**; 20:405-407, 1999.

MALENKA, R. C. e BEAR, M. F.; LTP and LTD: an embarrassment of riches; **Neuron**; 44:5-21; 2004.

MASSI, M.; PANOCCA, I.; DE CARO, G.; The psychopharmacology of tachykinin NK-3 receptors in laboratory animals; **Peptides**; 21:1597-1609, 2000.

MAUBACH, K. A.; MARTIN, K.; SMITH, D. W.; HEWSON, L.; FRANKSHUN, R. A.; HARRISON, T.; SEABROOK, G. R.; Substance P stimulates inhibitory synaptic transmission in the guinea pig basolateral amygdala in vitro; **Neuropharmacology**; 40:806-817, 2001.

MAZZONE, S. B. e GERAGHTY, D. P.; Characterization and regulation of tachykinin receptors in the nucleus tractus solitarius; **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**; 27:939-942, 2000.

MERIGHI, A.; Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS; **Prog. Neurobiol.**; 66:161-190, 2002.

MORI, M.; YOKOTA, Y.; YASUE, M.; SERIKAWA, T.; YAADA, J.; Assignment of the rat genes coding for substance P receptor, substance k receptor, and neuromedin k receptor to chromosomes 4, 20 and 2, respectively; **Cytogenet. Cell Genet.**; 60:222-223, 1992.

MUSSAP, C. J. e BURCHER, E.; [<sup>125</sup>I]-Bolton-Hunter Scyliorhinin II: a novel, selective radioligand for the tachykinin NK3 receptor in the brain; **Peptides**; 11:827-836, 1990.

MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P.; BURCHER, E.; Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective; **J. Neurochem.**; 60:1987-2009, 1993.

NAKANISHI, S.; Mammalian tachykinin receptors; **Annu. Rev. Neurosci.**; 14:123-136, 1991.

NAKAYA, Y.; KANEKO, T.; SHIGEMOTO, R.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N.; Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat; **J. Comp. Neurol.**; 347:249-274, 1994.

NAWA, H.; HIROSE, T.; TAKASHIMA, H.; INAYAMA, S.; NAKANISHI, S.; Nucleotide sequence of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor; **Nature**; 306:32-36, 1983.

NIKOLAUS, S.; HUSTON, J. P.; HASENOHRL, R. U.; Anxiolytic-like effects in rats produced by ventral pallidal injection of both N- and C-terminal fragments of substance P; **Neurosci. Lett.**; 283:37-40, 2000.

NOGUEIRA, P. J. C.; TOMAZ, C.; WILLIAMS, C. L.; Contribution of the vagus nerve in mediating the memory-facilitating effects of substance P; **Behav. Brain Res.**; 62:165-169, 1994.

NUSBAUM, M. P.; BLITZ, D. M.; SWENSEN, A. M.; WOOD, D.; MARDER, E.; The roles of co-transmission in neural network modulation; **TRENDS Neurosci.**; 24:146-154, 2001.

OITZL, M. -S.; HASENOHRL, R. U.; HUSTON, J. P.; Reinforcing effects of peripherally administered substance P and its C-terminal sequence pGlu<sup>6</sup>-SP6-11 in the rat; **Psychopharmacology**; 100:308-315, 1990.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, L.; Neurotransmitter functions of mammalian tachykinin; **Physiol. Rev.**; 73:229-308, 1993.

OWENS, D. F. e KRIEGSTEIN, A. R.; Is there more to GABA than synaptic inhibition?; **Nature Rev. Neurosci.**; 3:715-727, 2002.

PAGE, N. M.; BELL, N. J.; GARDINER, S. M.; MANYONDA, I. T.; BRAYLEY, K. J.; STRANGE, P. G.; LOWRY, P. J.; Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity; **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**; 100:6245-6250, 2003.

PALIT, G.; KUMAR, R.; CHOWDHURY, S. R.; GUPTA, M. B.; SAXENA, R. C.; SRIMAL, R. C.; DHAWAN, B. N.; A primate model of anxiety; **Eur. Neuropsychopharmacol.**; 8:195-201, 1998.

PATACCHINI, R.; LECCI, A.; HOLZER, P.; MAGGI, C. A.; Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature; **Trends Pharmacol. Sci.**; 25:1-3, 2004.

PAXINOS, G. e WATSON, C.; **The rat brain** – in stereotaxic coordinates. 2 ed. Australia: Academic Press, 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M.; Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat; **J. Neurosci. Methods**; 14:149-167, 1985.

PENNEFATHER, J. N.; LECCI, A.; CANDENAS, M. L.; PATAK, E.; PINTO, F. M.; MAGGI, C. A.; Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family; **Life Sciences**; 74:1445–1463, 2004.

PORSOLT, R. D.; MCARTUR, R. A.; LENEGRE, A.; Psychotropic screening procedures. In: Haaren, F. V. **Methods in behavioral pharmacology**, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, v 10, 23-51, 1993.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A. S.; MCNAMARA, J. O.; **Neuroscience**; Sinauer Associates, Inc., MA, p. 549-562, 1997.

QUEVEDO, J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; MARTINS, M. R.; ROESLER, R.; Consolidação da memória e estresse pós-traumático; **Rev. Bras. Psiquiatr.**; 25 (Supl I): 25-30, 2003.

QUEVEDO, J.; VIANNA, M. R. M.; MARTINS, M. R.; BARICHELLO, T.; MEDINA, J. H.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I.; Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats; **Behav. Brain Res.**; 154:339–343, 2004.

RAMAMJANEYULU, R.; TICKU, M. H.; Interactions of pentylentetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-inophore complex; **Eur. J. Pharmacol.**; 78:353-6, 1984.



RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; **Farmacologia**; 4 ed.; Ed. Guanabara Koogan S.A.; RJ; p. 147-155 e 442-450, 2001.

RENZETTI, A. R.; BARSACCHI, P.; CRISCUOLI, M.; LUCACCHINI, A.; Characterization of NK-3 binding sites in the rat and guinea-pig cortical membranes by the selective ligand [<sup>3</sup>H]Senktide; **Neuropeptides**; 18:107-114, 1991.

RIBEIRO, S. J.; TEIXEIRA, R. M.; CALIXTO, J. B.; DE LIMA, T. C. M.; Tachykinin NK3 receptor involvement in anxiety; **Neuropeptides**; 33:181-188, 1999.

RIBEIRO-da-SILVA, A. e HOKFELT, T.; Neuroanatomical localisation of substance P in the CNS and sensory neurons; **Neuropeptides**; 34:256-271, 2000.

RIBEIRO, R. L. e DE LIMA, T. C. M.; Participation of GABA<sub>A</sub> receptors in the modulation of experimental anxiety by tachykinin agonists and antagonists in mice; **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**; 26:861-869, 2002.

RODGERS, R. J., CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A.; Animal models of anxiety: an ethological perspective; **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 30:289-304, 1997.

RODGER, R. J.; COLE, J. C.; The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J. e HENDRIE, C. A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacology**. John & Sons, p. 9-44, 1994.

RUDOLPH, U. e ANTKOWIAK, B.; Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics; **Nature Rev. Neurosci.**; 5: 709-720, 2004.

RUPNIAK, N. M. J.; CARLSON, E. C.; HARRISON, T.; OATES, B.; SEWARD, E.; OWEN, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.; WHEELDON, A.; Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK<sub>1</sub>) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea pigs and mice; **Neuropharmacology**; 39:1413-1421, 2000.

SACHAIS, B. S. e KRAUSE, J. E.; Both extracellular and transmembrane residues contribute to the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonist WIN 51708; **Mol. Pharmacol.**; 46:122-128, 1994.

SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; GLOWINSKI, J.; BEAUJOUAN, J. C.; Presence of NK<sub>2</sub> binding sites in the rat brain; **J. Neurochemistry**; 79:985-996, 2001.

SANDFORD, J. J.; ARGYROPOULOS, S. V.; NUTT, D. J.; The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology; **Pharmacol. Therapeutics**; 88:197-212, 2000.

SANSON, L. T. e CAROBREZ, A. P.; Long-lasting inhibitory avoidance acquisition in rats submitted to the elevated T-maze model of anxiety; **Behav. Brain Res.**; 101:59-64, 1999.

SANTARELLI, L.; GOBBI, G.; DEBS, P. C.; SIBILLE, E. T.; BLIER, P.; HEN, R.; HEATH, M. J. S.; Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function; **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 98:1912-1917, 2001.

SANTARELLI, L. e SAXE, M. D.; Substance P antagonists: meet the new drugs, same as the old drugs? Insights from transgenic animal models; **CNS Spectr**; 8:589-596, 2003.

SARIA, A.; The tachykinin NK<sub>1</sub> receptor in the brain: pharmacology and putative functions; **Eur. J. Pharmacol.**; 375:51-60, 1999.

SCHLESINGER, K.; LIPSITZ, D. U.; PECK, P. L.; PELLEYMOUNTER, M. A.; STEWART, J. M.; CHASE, T. N.; Substance P enhancement of passive and active avoidance conditioning in mice; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 19:655-661, 1983a.

SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRE, E. C. M.; VARGAS, L. C.; Modeling panic attacks; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 25:647-659, 2001.

SCHLESINGER, K.; LIPSITZ, D. U.; PECK, P. L.; PELLEYMOUNTER, M. A.; STEWART, J. M.; CHASE, T. N.; Substance P reversal of electroconvulsive shock and cycloheximide-induced retrograde amnesia; **Behav. Neural. Biol.**; 39:30-39, 1983b.

SCHLESINGER, K.; PELLEYMOUNTER, M. A.; VAN DE, K. J.; BADER, D. L.; STEWART, J. M.; CHASE, T. N.; Substance P facilitation of memory: effects in na appetitively motivated learning task; **Behav. Neural. Biol.**; 45:230-239, 1986.

SEVERINI, C.; IMPROTA, G.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; SALVADORI, S.; ERSPAMER, V.; The tachykinin peptide family; **Pharmacol. Rev.**; 54:285–322, 2002.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I.; *In situ* hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system; **J. Comp. Neurol.**; 372:395-414, 1996.

SHULTS, C. W.; QUIRION, R.; CHRONWALL, B.; CHASE, T. N.; O'DONOHUE, T. L.; A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system; **Peptides**; 5:1097-1128, 1984.

SQUIRE, L. R.; Memory systems of the brain: a brief history and current perspective; **Neurobiol. Learn. Mem.**; 82:171-177, 2004.

SQUIRES, R. F.; SAEDERUP, E.; CRAWLEY, J. N.; SKOLNICK, P.; PAUL, S. M.; Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain; **Life Sci.**; 35:1439-1444, 1984.

STAUBLI, U. e HUSTON, J. P.; Facilitation of learning by post-trial injection of substance P into the medial septal nucleus; **Behav. Brain Res.**; 1:245-255, 1980.

STOESSL, A. J. e HILL, D. R.; Autoradiographic visualization of the NK-3 tachykinin binding sites in the rat brain, utilizing [<sup>3</sup>H]senktide; **Brain Res.**; 534:1-7, 1990.

STRATTON, S. C.; BERESFORD, I. J. M.; HARVEY, F. J.; TURPIN, M. P.; HAGAN, R. M.; TYERS, M. B.; Anxiolytic activity of tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonists in the mouse light-dark box; **Eur. J. Pharmacol.**; 250:11-12, 1993.

TATEMOTO, K., LUNDENBERG, J. M., JORNVALL, H.; MUTT, V.; Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin; **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 128:947-953, 1985.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G.; Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 65: 571-576, 2000.

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. M.; Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice; **Eur. J. Pharmacol.**; 311:7-14, 1996.

TOMAZ, C. e HUSTON, J. P.; Facilitation of conditioned inhibitory avoidance by post-trial peripheral injection of substance P; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 25:469-472, 1986.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C.; Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 44:463-469, 1993.

VARTY, G. B.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; MORGAN, C. A.; PYLAK, U.; DUFFY, R. A.; LACHOWICZ, J. E.; CAREY, G. J.; COFFIN, V. L.; The gerbil elevated-plus maze II: Anxiolytic-like of selective neurokinin NK<sub>1</sub> receptor antagonists. **Neuropharmacology**; 27:371-379, 2002.

VASSOUT, A.; VEENSTRA, S.; HAUSER, K.; OFNER, S.; BRUGGER, F.; SCHILLING, W.; GENTSCH, C.; NKP608: a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and exploration test in rats; **Regul. Peptides**; 96:7-16, 2000.

VENAULT, P.; CHAPOUTHIER, G.; PRADO DE CARVALHO, L.; ROSSIER, J.; Effects of convulsant ligands of the GABA-benzodiazepine receptor complex in conflict and learning tasks in mice; **L'Encéphale**; XVIII:655-660, 1992.

VENAULT, P.; PRADO DE CARVALHO, L.; ROSSIER, J.; CHAPOUTHIER, G.; Anxiogenic and memory-enhancing effects of drugs acting at the GABA-benzodiazepine receptor complex. In: **Learning and memory – mechanism of information storage in the nervous system**. H. J. Matthies, Ed. Pergamon Press, Oxford, p. 387-390, 1986.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G.; The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory; **Pharmacol. Biochem. Behav.**; 49:549-554, 1994.

VINCENT, J-P.; MAZELLA, J.; KITABGI, P.; Neurotensin and neurotensin receptors; **Trends Pharmacol. Sci.**; 20:302-309, 1999.

WALSH, D. M.; STRATTON, S. C.; HARVEY, F. J.; BERESFORD, I. J. M.; HAGAN, R. M.; The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK<sub>2</sub> receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety; **Psychopharmacology**; 121:186-191, 1995.

WHITING, P. J.; GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? **DDT**; 8:445-450, 2003.

WISE, R. A. e ROMPRE, P. -P.; Brain dopamine and reward; **Annu. Rev. Psychol.**; 40:191-225, 1989.

YIP, J. e CHAHL, L. A.; Distribution of *fos*-like immunoreactivity in guinea-pig brain following administration of the neurokinin-1receptor agonist, [SAR<sup>9</sup>, MET(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]substance P; **Neuroscience**; 94:663-673, 1999.

ZANGROSSI, H. e GRAEFF, F. G.; Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety; **Brain Res. Bull.**; 44:1-5, 1997.

ZANGROSSI, H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G.; Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze; **Neurosci. Biobehav. Rev.**; 25:637-645, 2001.

ZARRINDAST, M. R.; BAKHSHA, A.; ROSTAMI, P.; SHAFAGHI, B.; Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats; **J. Psychopharmacol.**; 16:313-319, 2002.

ZHANG, Y.; LU, L., FURLONGER, C.; WU, G. E.; PAIGE, C. J.; Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis; **Nat. Immunol.**; 1:392-397, 2000.

ZUPANC, G. K. H.; Peptidergic transmission: from morphological correlates to functional implications; **Micron**; 27:35-91, 1996.