



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

BIANCA ROMANÓ DE ORTE

Envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK1 do septo lateral na modulação da ansiedade experimental avaliada no teste do odor de gato.

Florianópolis

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

BIANCA ROMANÓ DE ORTE

**Envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK1 do septo lateral na
modulação da ansiedade experimental avaliada no teste do odor de gato**

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

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

Florianópolis

2009

DE ORTE, BIANCA ROMANO. Envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK1 do septo lateral na modulação da ansiedade experimental avaliada no teste do odor de gato. Florianópolis, 2009, p.86
Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Defesa: 27/02/2009

O presente estudo investigou a participação dos receptores NK1 do septo lateral de ratos avaliados no modelo experimental de odor de gato. Para realizar este objetivo primeiramente o teste foi padronizado nas condições experimentais do nosso laboratório. Nesta etapa foi feita a padronização farmacológica do teste do odor de gato com o benzodiazepínico midazolam, sendo escolhida a dose de 0,25 mg/Kg i.p. a mais eficaz em inibir os comportamentos de defesa dos animais após a exposição ao odor. Na etapa seguinte, foi realizada uma curva dose-resposta ao antagonista de receptores taquicinérgicos do tipo NK1, o WIN51,708. A dose de 10 pmol, administrada centralmente (icv) antes da exposição ao odor, mostrou-se eficaz na diminuição do comportamento defensivo de ratos frente ao odor de gato. A última etapa de nosso trabalho consistiu na administração de 10 pmol do WIN51,708 no septo lateral de ratos antes da exposição ao odor. Este tratamento foi capaz de modificar todos os parâmetros comportamentais dos ratos expostos ao odor de gato, indicando uma atividade do tipo ansiolítica. Este resultado evidencia a participação dos receptores NK1 presentes no septo lateral na modulação do comportamento de defesa de ratos e um papel tônico da substância P endógena na modulação destes comportamentos.

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Professora Thereza Christina Monteiro de Lima, pela grande oportunidade cedida em seu laboratório, pela excelente convivência e amizade, pelo voto de confiança depositado em mim, e por sua imensa dedicação na orientação da realização do presente trabalho;
- ❖ A todos os professores do Departamento de Farmacologia que me concederam seus ensinamentos;
- ❖ A todos colegas do Laboratório de Neurofarmacologia pela excelente convivência, troca de informações e amizade;
- ❖ Em especial ao Marcelo, por sua colaboração na parte experimental e intelectual. E pelo seu grande incentivo nos momentos difíceis;
- ❖ Ao Filipe, pela sua grande contribuição intelectual e sugestões;
- ❖ À Ligia, por sua contribuição ao meu crescimento profissional e pessoal, e pela grande amizade demonstrada nestes anos;
- ❖ À Rebeca pela amizade e sua contribuição ao meu crescimento profissional, e por me disponibilizar o odor de gato!
- ❖ Ao Biotério Central pelos animais concedidos;
- ❖ A todos os funcionários do departamento de Farmacologia pela dedicação aos serviços e favores prestados;
- ❖ Ao Rimenez e ao Fabrício do laboratório de Neurobiologia do Comportamento pela troca de informações sobre o teste do odor de gato. A Eloísa, deste mesmo laboratório, pelo incentivo, e ajuda na histologia.
- ❖ Ao CNPq pelo apoio financeiro;

- ❖ À minha Família I: Cecilia, Manoela, Queensland e Byron Bay, pelo apoio e carinho durante esta jornada (a ordem das famílias não corresponde ao grau de importância em minha vida)
- ❖ À minha Família II: Alfonso, Silvely, Serginho, Anna Paula, vó Lydia e vô Juan, pelo apoio e carinho sempre;
- ❖ Ao meu namorado, amigo e colega de profissão Gilliard, por seu companheirismo, apoio e carinho.

“Se você pode sonhar, você pode fazer”.

Walter Elias Disney

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviações.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiii

INTRODUÇÃO

Neuropeptídeos e Taquicininas.....	2
Receptores de Taquicininas.....	4
Taquicininas e ansiedade.....	8
Comportamento Defensivo e Ansiedade.....	10
Medo e Ansiedade.....	10
Substrato Neural do Comportamento Defensivo.....	12
Testes de Ansiedade em Animais.....	14
Teste do Odor de Gato.....	15

OBJETIVOS

Geral.....	21
Específico.....	21

MATERIAL E MÉTODOS

Animais.....	23
Drogas e Soluções.....	23
Cirurgia Estereotáxica.....	24
Microinjeção Intraventricular e Intraseptal.....	26
Aparato para Análise Comportamental.....	26
Protocolo Experimental Geral.....	27
Experimento I.....	30
Experimento II.....	30
Experimento III.....	31

Perfusão e Histologia.....	32
Análise Estatística.....	33

RESULTADOS

Experimento 1 – Padronização farmacológica do teste do odor de gato com midazolam, droga ansiolítica padrão.....	35
---	----

Experimento 2 – Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de WIN 51,708.....	40
--	----

Experimento 3 – Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intra-septal de WIN 51,708.....	43
--	----

DISCUSSÃO.....	46
----------------	----

CONCLUSÕES.....	63
-----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
---------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de receptores NK1 de ratos e humanos	06
Figura 2: Diagrama ilustrando o sistema cerebral de defesa.	13
Figura 3: Diagrama ilustrando o sistema de inibição comportamental.	14
Figura 4: Caixa de esquiva ao odor, utilizada no protocolo experimental.	27
Figura 5: Comportamentos avaliados na caixa de esquiva ao odor	29
Figura 6: Esquema ilustrativo representando o experimento I.	30
Figura 7: Esquema ilustrativo representando o experimento II.	31
Figura 8: Esquema ilustrativo representando o experimento III.	32
Figura 9: Tempo de aproximação e tempo escondido de ratos tratados com MDZ nas doses 0,25; 0,50; ou 0,75 mg/Kg, ou salina, expostos ao odor de gato e ao odor neutro.	38
Figura 10: Número de aproximações, número de cruzamentos e tempo de <i>head-out</i> de ratos tratados com MDZ nas doses 0,25; 0,50; ou 0,75 mg/Kg, ou salina, expostos ao odor de gato e ao odor neutro.	39
Figura 11: Tempo de aproximação e tempo escondido de animais tratados i.c.v com PBS, ou WIN nas doses 1,10 e 100 pmol.	41
Figura 12: Número de aproximações, número de cruzamentos e tempo de <i>head-out</i> de animais tratados i.c.v com PBS, ou WIN nas doses 1,10 e 100 pmol	42
Figura 13: Tempo de aproximação e tempo escondido de animais tratados com WIN ou com PBS no septo lateral	44
Figura 14: Número de aproximação e número de cruzamentos de animais tratados com WIN ou com PBS no septo lateral	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de células positivas para <i>c-fos</i> em uma área de 0,25 mm ² nos circuitos neurais de ratos expostos ao odor de gato, odor neutro e o terceiro grupo que permanece na gaiola (controle).....	18
Tabela 2: Coordenadas estereotáxicas para implantação de cânulas guias.....	25

LISTA DE ABREVIações

Aas	Aminoácidos
ANOVA	Análise de Variância
Ca²⁺	Íons cálcio
COOH	Carboxi
DAG	Diacilglicerol
DSM IV	Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria - quarta edição
EL I	Alça extracelular I
EL II	Alça extracelular II
EL III	Alça extracelular III
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HPA	Eixo hipotálamo – pituitária/hipófise – adrenal.
HK-1	Hemocinina 1
IL I	Alça Intracelular I
IL II	Alça Intracelular II
IL III	Alça Intracelular III
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Trifosfato de inositol
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i> (solução fisiológica tamponada)
LCE	Labirinto em cruz elevado
MDZ	Midazolam
NH₂	Grupo funcional amino
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NK1	Receptor taquicinérgico do tipo 1
NK2	Receptor taquicinérgico do tipo 2
NK3	Receptor taquicinérgico do tipo 3
NKs	Neurocininas
PIP 2	Fosfatidilinositol-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SL	Septo lateral
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TMT	2,5-dihidro-2,4,5-trimetiltiazolina

RESUMO

Envolvimento dos receptores neurocinérgicos NK1 do septo lateral na modulação da ansiedade experimental avaliada no teste do odor de gato

A substância P (SP) e os receptores NK1 encontram-se amplamente distribuídos em diferentes estruturas que compõem o sistema cerebral de defesa e estão envolvidos na modulação do comportamento aversivo. Já foi demonstrado em testes animais para avaliação de atividade ansiolítica/ansio gênica, o possível envolvimento dos receptores NK1 na modulação da ansiedade experimental. Estudos têm demonstrado que o odor do predador é um potente estímulo ansio gênico, fornecendo uma condição favorável para a ativação do comportamento defensivo natural em roedores. Estudos imunohistoquímicos mostram que, entre as diferentes estruturas cerebrais ativadas pelo odor de gato, o septo lateral apresenta uma grande marcação. Esta estrutura anatômica é rica em inervações de SP e apresenta uma grande densidade de receptores NK1. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a participação dos receptores NK1 do septo lateral no modelo experimental de odor de gato. A utilização deste teste de ansiedade para avaliar o papel modulatório dos receptores NK1 na ansiedade experimental é inédita. Para realizar este objetivo, primeiramente, o teste foi padronizado nas condições experimentais do nosso laboratório. Nesta etapa foi feita a padronização farmacológica do teste do odor de gato com o benzodiazepínico midazolam, sendo escolhida a dose de 0,25 mg/Kg i.p. a mais eficaz em inibir os comportamentos de defesa dos animais após a exposição ao odor. Na etapa seguinte, foi realizada uma curva dose-resposta ao antagonista de receptores taquicinérgicos do tipo NK1, o WIN51,708. A dose de 10 pmol, administrada centralmente (icv) antes da exposição ao odor, mostrou-se eficaz na diminuição do comportamento defensivo de ratos frente ao odor de gato. A última etapa de nosso trabalho consistiu na administração de 10 pmol do WIN51,708 no septo lateral de ratos antes da exposição ao odor. Este tratamento foi capaz de modificar todos os parâmetros comportamentais dos ratos expostos ao odor de gato, indicando uma atividade do tipo ansiolítica. Este resultado evidencia a participação dos receptores NK1 presentes no septo lateral na modulação de comportamentos de defesa e de avaliação de risco e o papel tônico da substância P na modulação destes comportamentos.

ABSTRACT**Involvement of the neurokinergic receptors NK1 in the modulation of the experimental anxiety as evaluated by the cat odor test**

Substance P and the NK1 receptors are found all over the brain structures that are part of the defense brain system and they are involved with the modulation of the aversive behavior. It was already showed elsewhere the putative involvement of the NK1 receptors in the modulation of the experimental anxiety in several different animal tests. Various studies have shown that the predator odor is a powerful anxiogenic stimulus, generating elements to evaluate the natural defensive behavior in rodents. Immunohistochemical studies show that among all the brain structures activated by the cat's odor the lateral septum is the one that demonstrates the highest activity of c-fos. This anatomic structure is rich in SP nerves and shows high density of NK1 receptors. In this study, the role of the NK1 receptors present in the lateral septum was investigated on the cat odor experimental model. The use of this anxiety test to evaluate the modulatory role of the NK1 receptors in the experimental anxiety is new. To reach this aim, firstly, the test was standardized to the experimental conditions of the laboratory. The cat odor test was pharmacologically standardized with the benzodiazepine midazolam. Results showed that 0.25 mg/Kg i.p., administered before the contact with the cat's odor had higher efficacy in inhibiting the animals defense behavior. After this, a dose-response curve to the NK1 antagonist, WIN51708, was carried out. Before the exposure of the animal to the cat odor, animals' were i.c.v. injected with 10 pmol of WIN51708 that showed high efficiency in lowering the defensive behavior of the rats. In the last part of the present study, the same treatment (WIN51708) was injected into the lateral septum of the animals, before their exposure to the cat odor. This treatment was capable of modifying the behavior of the rats, reducing all parameters of the cat odor exposure, indicating an anxiolytic activity to this NK1 antagonist. These results indicate that the NK1 receptors present in the lateral septum have an important role in the modulation of the defense behavior of animals as well the risk assesment. Moreover, they indicate that substance P is tonically involved in the modulation of aversive behavior in this brain area.

INTRODUÇÃO

Neuropeptídeos e Taquicininas

Neuropeptídeos são moléculas com uma cadeia relativamente curta de aminoácidos (até 20 aas) que podem ser liberados por um neurônio e atuar como uma molécula sinalizadora. Esta molécula exercerá seus efeitos como transmissor ou modulador em uma célula excitável. Os neuropeptídeos são expressos no sistema nervoso central (SNC) e em nervos periféricos ocorrendo em todos os grupos animais que possuem um sistema nervoso (para revisão, ver Holmgren e Jensen, 2001).

As taquicininas compreendem uma família de peptídeos com uma ampla distribuição no SNC e periférico de vertebrados. Inúmeros estudos farmacológicos e fisiológicos sugerem que as taquicininas estão envolvidas em um grande espectro de funções fisiológicas, incluindo o controle gastrintestinal, controle vascular e respiratório, a transmissão da dor, a secreção salivar, além de estarem envolvidas na modulação de outros neurotransmissores (Otsuka e Yoshioka, 1993).

A denominação taquicinina provém da observação da similaridade farmacológica desses peptídeos com a bradicinina, que age como mediador inflamatório endógeno induzindo uma contração lenta do íleo isolado de cobaias, enquanto que as taquicininas produzem uma contração rápida (Bertacini, 1976).

A característica comum entre as taquicininas é a similaridade estrutural em sua seqüência de aminoácidos da fração C - terminal: Phe-**X**-Gly-Leu-Met-NH₂ sendo que “**X**” pode ser tanto um resíduo aromático (Phe, Tyr) quanto uma cadeia alifática dos aminoácidos valina e isoleucina (Chang et al, 1971; Nawa et al., 1984;

Tatemoto et al., 1985.; Zhang et al., 2000). Sob a denominação de taquicininas está agrupada uma série de peptídeos com prováveis funções de neurotransmissão e neuromodulação central. No SNC de mamíferos são encontradas a substância P (SP), a neurocinina A (NKA ou substância K), e a neurocinina B (NKB ou neuromedina K). Estas foram descritas por quatro grupos de pesquisadores diferentes no ano de 1983 (Kangawa et al., 1983; Kimura et al., 1983; Maggio et al., 1983; Schimada et al., 1987; Ferguson, 2000). Posteriormente, Tatemoto e colaboradores (1985) isolaram a neurocinina K (NPK, neuropeptídeo K) e Kage e seu grupo de pesquisa (1988) identificou a neurocinina γ (NP- γ , neuropeptídeo γ). Mais recentemente foi descrita a hemocinina 1 (Zhang et al., 2000).

A nomenclatura utilizada atualmente para estes peptídeos foi sugerida no encontro de Maidstone e aprovada num simpósio realizado em Montreal/Canadá, em 1986. Assim, o termo *taquicininas* é utilizado quando se refere aos peptídeos de espécies não-mamíferas, enquanto *neurocininas* (NKs) é a designação genérica utilizada para os peptídeos presentes em mamíferos (Maggi, 2000).

A estrutura da primeira taquicininina isolada, o undecapeptídeo SP, foi determinada em 1971 a partir do hipotálamo bovino, por Leeman e seu grupo de pesquisadores (Chang et al., 1971; Otsuka e Yoshioka, 1993). porém, em 1931, Von Euler e Gaddum já haviam relatado a presença deste peptídeo como o elemento espasmogênico em extratos de cérebro e intestino de eqüinos. O nome SP provém das palavras *preparação* ou pó, pois Von Euler relatou ter usado uma

preparação padrão na forma de pó seco com a abreviação “P” (Ferguson e Leeman, 2000).

No SNC, a SP não está apenas envolvida na regulação de funções fisiológicas e autonômicas como a nocicepção e transmissão da dor, respiração, termorregulação e controle cardiovascular, mas também na modulação de várias funções cognitivas e emocionais, como o comportamento relacionado à ansiedade (Otsuka e Yoshioka, 1993; Severini et al., 2002).

Receptores de Taquicininas

Por volta de 1986 vários grupos de pesquisa desenvolveram trabalhos farmacológicos mostrando evidências da existência de três receptores distintos que medeiam as ações biológicas codificadas pela seqüência comum entre as taquicininas, a sua fração C terminal. Na conferência de Montreal deste mesmo ano, um acordo em relação à nomenclatura dos receptores para esta família de peptídeos foi também elaborado, sendo que os receptores foram denominados NK1, NK2 e NK3. Os critérios que levaram o reconhecimento de três receptores foram: 1) a ordem de potência natural das taquicininas (mamíferos ou não); 2) as diferentes atividades dos fragmentos C-terminais das neurocininas; e 3) a síntese de agonistas seletivos para um dos receptores. Hoje, sabe-se que nem todos os efeitos da SP são decorrentes deste fragmento. Existem tipos de receptores que reconhecem a fração N-terminal e a partir desta ligação induzem o efeito farmacológico (Maggi, 1994). A existência de três receptores distintos para mediar as ações das taquicininas foi fortemente confirmada com o desenvolvimento de

antagonistas seletivos, seguido da clonagem molecular das proteínas dos receptores (Maggi, 1994). Nakanishi e seu grupo de pesquisadores, em 1993, estabeleceram as estruturas primárias dos três receptores, descrevendo as similaridades e diferenças entre as três moléculas que exibem atividades biológicas diferentes, produzindo novas ferramentas para o estudo da distribuição e função dos receptores NK1, NK2 e NK3 (Nakanishi, 1993; Regoli, 1994).

Os três receptores pertencem à família de receptores de membrana acoplados à proteína G. Este grupo de proteínas inclui um grande número de receptores de membrana, que possuem sete domínios hidrofóbicos (TM I-IV), com três alças extracelulares (EL 1, EL 2, e EL 3); três alças intracelulares (IL1, IL2, e IL 3); um grupo amino-terminal extracelular e um carboxi-terminal, citoplasmático. Os receptores NK1 e NK2 são proteínas de 407 e 398 aminoácidos, respectivamente, e o receptor NK3 é o maior deles possuindo 465 aminoácidos, estendendo-se na região amino-terminal (Regoli et al., 1994; Maggi, 1995; Pennefather et al., 2004).

A descrição farmacológica dos três receptores segue critérios de ordem da potência de agonistas endógenos, e de afinidade de antagonistas. O receptor NK1 é caracterizado por uma alta sensibilidade à substância P, seguido da seguinte ordem de potência das neurocininas SP > NKA > NKB (Regoli, 1994).

Os receptores NK1, NK2 e NK3 possuem aproximadamente 40% de sequências idênticas entre si (Gerard et al., 1993). Entre as sequências citoplasmáticas, cerca de 75% apresentam homologia, enquanto aproximadamente 70% apresentam similaridade entre os domínios transmembrânicos. As diferentes espécies de mamíferos apresentam sequências

homólogas, em geral para o receptor NK1. No rato e no homem, este receptor apresenta cerca de 95% de homologia, diferindo apenas em 22 dos 407 aminoácidos que os constituem (Fong et al., 1992), como mostrado na Figura 1.

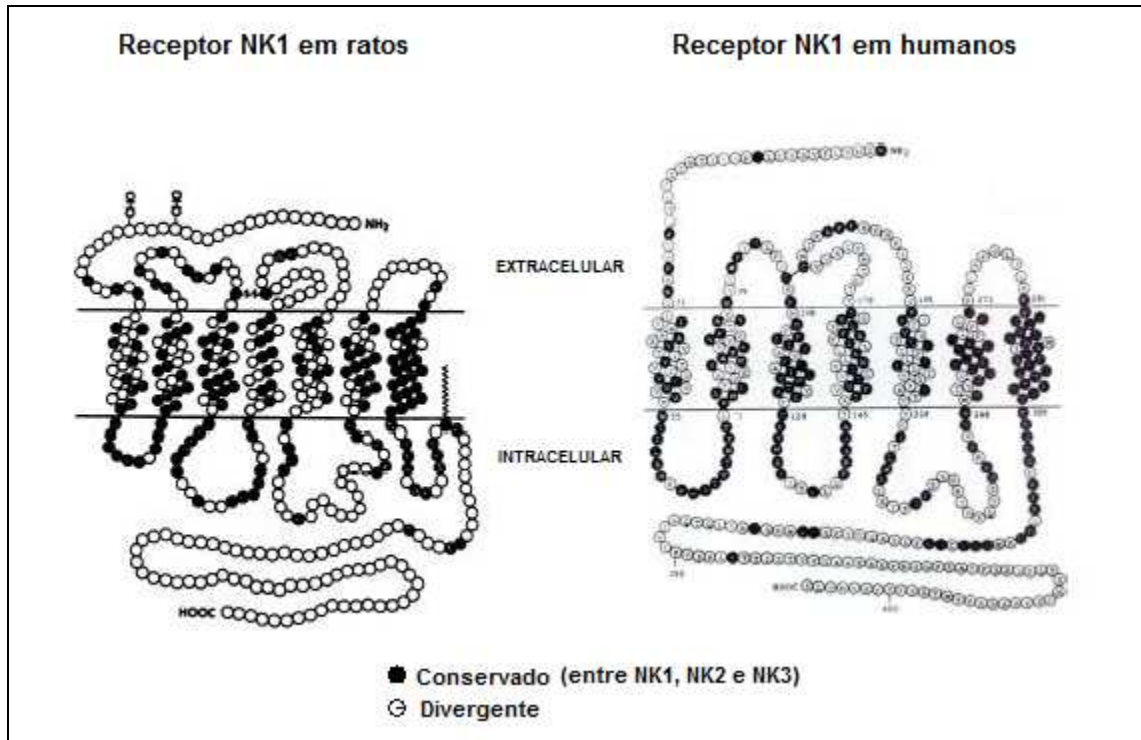


Figura 1. Representação esquemática de receptores NK1 de ratos e humanos. Adaptado de Regoli e colaboradores (1994).

De maior relevância entre as estruturas dos receptores NK1 entre ratos e humanos, observa-se: 1) a presença de um terminal NH₂, 2) a sequência caracterizada pela presença de locais glicosilados e, 3) um terminal COOH, que contém vários resíduos de aminoácidos Ser (Serina) e Thr (Treonina), sítios de fosforilação. São encontrados também três resíduos de Cis (Cisteína) co-localizados na posição extracelular (Cis 105 e Cis 180), e o terceiro (Cis 306) no local estratégico para ancorar o receptor à membrana plasmática (Regoli, 1994).

A demonstração de tal homologia entre os três receptores de neurocininas é de particular importância, pois ambos são discriminatórios aos agonistas e, certamente, aos antagonistas, porém não em relação ao segundo-mensageiro, pois todos interagem com a proteína G, especificamente proteínas da família Gq, que promovem a ativação de fosfolipase C. Esta enzima, por sua vez, hidrolisa lipídeos de membrana (PIP₂) à diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃). O IP₃, via receptores específicos da membrana do retículo endoplasmático, estimula a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, enquanto o DAG, através da ativação da proteína quinase C (PKC), promove a abertura de canais de Ca²⁺ do tipo L na membrana plasmática. O conseqüente aumento nas concentrações de Ca²⁺ intracelular induz as respostas celulares (para revisão ver Ju et al., 1991; Maggi *et al.*, 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993; Regoli et al., 1994). Pode haver também a mobilização de ácido aracdônico, via fosfolipase A₂ e o acúmulo de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), via adenilato-ciclase (Nakajima et al., 1992; Takeda et al., 1992; Seabrook e Fong, 1993; Garcia et al., 1994; Mitsuhashi et al., 1994).

Os receptores NK1 foram isolados do cérebro e de glândulas salivares de rato (Yokota et al., 1989; Hershey e Krause, 1990), em linfoblastos IM-9 (Gerard et al., 1991; Takeda et al., 1991), no pulmão humano (Gerard et al., 1991; Hopkins et al., 1991) e no genoma de camundongo (Sundelin et al., 1992). No SNC, esses receptores estão localizados principalmente no hipotálamo, sendo sua distribuição nesta região variável entre espécies distintas de mamíferos (Kanazawa *et al.*, 1976; Cuello e Kanazawa, 1978; Hökfelt et al., 1978; Stoeckel et al., 1982; Buck et al., 1986; Jessop et al., 1991; Debeljuk et al., 1992). Outras áreas límbicas em que

a SP foi identificada incluem a amígdala, o *locus coeruleus*, o hipocampo, a substância cinzenta periaquedutal e o septo lateral (Hökfelt et al., 1978; Shults et al., 1984; O'Donohue et al., 1987).

Neurocininas e Ansiedade

Durante quase trinta anos a substância P e seu receptor preferencial NK1 foram alvos de muitas pesquisas farmacêuticas. Propostas para a eficácia do antagonismo NK1 em várias condições clínicas, como enxaqueca, dor, asma e ansiedade, foram avaliadas (Wahlestedt, 1998). Pesquisas envolvendo estes receptores, e especialmente a SP, nos mecanismos da ansiedade têm sido justificadas pelo fato de que a SP e seu receptor preferencial são encontrados em áreas cerebrais criticamente envolvidas tanto na regulação do comportamento afetivo, quanto nas respostas neuroquímicas ao estresse (Saria, 1999). Além disso, nestas regiões anatômicas, a SP encontra-se co-localizada com sistemas monoaminérgicos envolvidos com a ansiedade (Kramer, 1998). Estes fatos indicam que a SP regula respostas a estímulos estressantes e possui participação no comportamento defensivo (Saria, 1999).

Embora a SP possa induzir efeitos do tipo ansiolítico após a administração em algumas áreas cerebrais específicas tais como o núcleo basal magnocelular, o núcleo pálido ventral (Hasenohrl et al., 1998; Nikolaus et al., 1999) e o hipocampo dorsal (Carvalho et al., 2008), a ativação de receptores NK1 pela SP produz um efeito do tipo ansiogênico em outras estruturas cerebrais de roedores, como a substância cinzenta periaquedutal dorsal, o núcleo do septo lateral e a amígdala medial, como demonstrado em diferentes testes comportamentais: labirinto em

cruz elevado (LCE) (Teixeira et al., 1996, 2004; Aguiar e Brandão, 1996; Gavioli et al., 1999; 2002; De Araújo et al., 1999; Baretta et al., 2001; Duarte et al., 2004; Ebner et al., 2004), condicionamento aversivo de lugar (Aguiar e Brandão, 1994), sobressalto acústico potencializado pelo medo (Krase et al., 1994; Zhao et al., 2009) e esquiva passiva (Lenard e Kertes, 2002).

Por outro lado, o bloqueio farmacológico ou a deleção genética de receptores NK1 diminui comportamentos relacionados à ansiedade (Santarelli et al., 2001; Rupniak et al., 2000; Ebner e Singewald, 2006). Estes achados sugerem que a SP tem participação na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos relacionados ao estresse, como ansiedade e depressão, fato que abre a possibilidade de um efeito terapêutico para antagonistas NK1 no tratamento destes transtornos (Holmes et al., 2003; Herpfer e Lieb, 2005; Ebner e Singewald, 2006; Millan, 2006; Mathew et al., 2008). Um exemplo é o antagonista do receptor NK1 GR205171, que promoveu uma diminuição de sintomas relacionados à fobia social (Furmark et al., 2005). Foram também relatados benefícios do antagonismo NK1 em indivíduos dependentes de álcool com alto nível de ansiedade (George et al., 2008). Na depressão, embora antagonistas NK1 promovam um alívio dos sintomas da depressão (Kramer et al., 1998; 2004), existem resultados divergentes na literatura (Keller et al., 2006; Hafizi et al., 2007) que necessitam ser melhor entendidos no contexto pré-clínico e clínico.

Comportamento Defensivo e Ansiedade

Medo e Ansiedade

O medo e a ansiedade são processos fisiológicos que possuem um grande valor adaptativo, uma vez que participam de processos como detecção de perigo, organização e emissão de respostas comportamentais relacionadas com o comportamento de defesa. Dentro de uma perspectiva evolucionista, as raízes biológicas da ansiedade e do medo encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a estímulos ou situações de perigo (Graeff, 1999a). Ressaltando-se variações intra e interespecíficas, o perigo ou ameaça para os animais podem estar representados, por exemplo, por predadores ou por estímulos associados a estes, por estímulos ambientais como altura e iluminação, por estímulos nociceptivos ou pelo ataque ou confronto com animais da mesma espécie (Blanchard et al.; 1993; Graeff, 1999a; Zangrossi, 1997). Frente a estes estímulos, os animais respondem segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilização, ataque defensivo e/ou submissão (Adams, 1979; Marks, 1987; Blanchard et. al., 1993).

Existe uma distinção teórica entre estes dois estados emocionais e comportamentais. Com relação à presença ou ausência do perigo, diferentes grupos de pesquisa divergem com relação a quais são os aspectos que diferenciam o medo da ansiedade. De acordo com alguns autores, o medo seria a reação comportamental desencadeada em situações onde o perigo é evidente, externo, definido e inescapável, enquanto a ansiedade seria desencadeada por

um perigo potencial e incerto. Ou seja, neste caso o medo se diferenciaria da ansiedade apenas pela presença de um estímulo objetivo (Jaspers, 1979; Pichot, 1985). Entretanto, esta distinção é considerada por outros autores muito simplista, uma vez que as fobias possuem um objeto a provocar o pavor e, no entanto, os transtornos fóbicos estão inseridos entre os subtipos de ansiedade classificados pelo DSM-IV (DSM-IV) (Peregrino, 1997).

Para McNaughton e Corr (2004), o medo e a ansiedade podem ser compreendidos quando analisados sobre duas dimensões diferentes, porém interligadas: a direção defensiva e a distância defensiva. Esta proposição deriva da teoria de Gray e McNaughton (2000) que, por sua vez, baseia-se nos padrões comportamentais relatados por Blanchard e Blanchard, os quais, a partir de resultados obtidos em testes comportamentais de defesa frente a um predador, propuseram que as estruturas cerebrais envolvidas nos diferentes padrões de comportamentos de defesa variam em função da distância do estímulo aversivo, assim como variam também as estratégias elaboradas pelos animais (Blanchard e Blanchard, 1988; 1989b; Blanchard et al, 1997). Portanto, sob esta proposta, o medo e a ansiedade diferem de uma maneira comportamental e farmacológica. No primeiro caso, o medo tem a função de mover o animal para longe da fonte aversiva, com comportamentos de luta, fuga e congelamento. Estes comportamentos não seriam sensíveis a drogas ansiolíticas. Já a ansiedade se manifestaria em estratégias comportamentais elaboradas para levar o animal ao encontro do perigo, em um comportamento de avaliação de risco, que é sensível a drogas ansiolíticas. Estas duas dimensões (distância defensiva e direção defensiva) podem definir, por parâmetros comportamentais, o medo e a

ansiedade, sendo que estas duas emoções são regidas por sistemas neurais distintos: o sistema cerebral de defesa e o sistema de inibição comportamental (McNaughton e Corr, 2004).

Substrato Neural do Comportamento Defensivo

Conhecendo-se o repertório de defesa de uma dada espécie, pode-se explorar o substrato neural subjacente a cada modalidade de defesa pelos métodos clássicos da Neurofisiologia, e por imagens funcionais do cérebro. Entre as principais estruturas cerebrais que regulam o comportamento de defesa e emoções associadas está a amígdala e o sistema septo-hipocampal, encontrando-se envolvidos no tipo de estratégia comportamental denominado de *avaliação de risco*. O comportamento de congelamento envolve também a amígdala e a matéria cinzenta periaquedutal ventral. Os comportamentos de ameaça, luta ou fuga, por sua vez, são coordenados pela amígdala, hipotálamo, e substância cinzenta periaquedutal dorsal (Graeff, 1999). Entre as estruturas citadas, o hipotálamo, a amígdala, assim como a substância cinzenta periaquedutal, constituem o sistema cerebral de defesa (Figura 2).

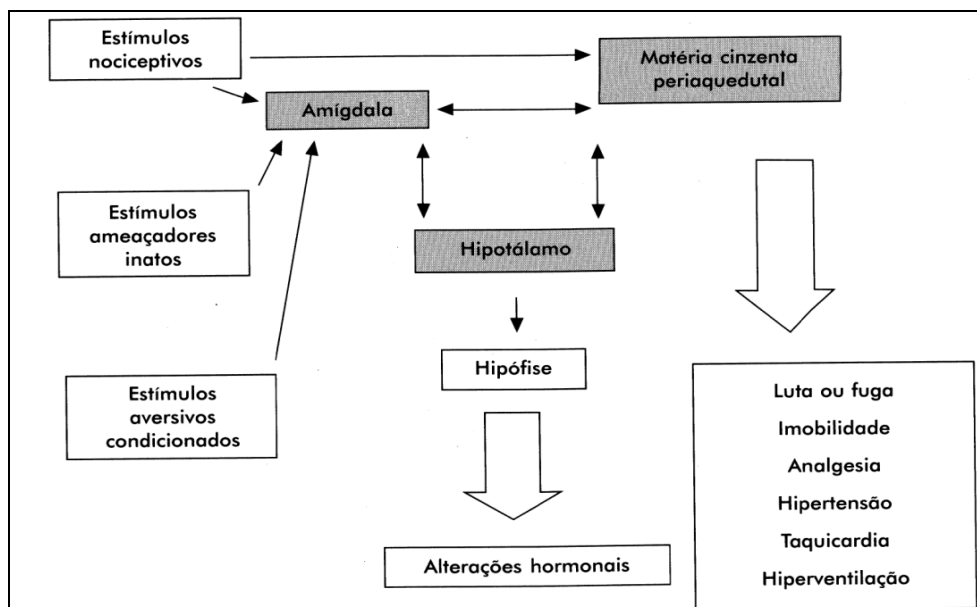


Figura 2: Diagrama ilustrando o sistema cerebral de defesa (Retirado de Graeff, 1999b).

Além do sistema cerebral de defesa, descrito primeiramente por Walter Rudolph, na década de 30 (Graeff, 1999), estudos posteriores envolvendo lesões no sistema septo-hipocampal, estudos farmacológicos com benzodiazepínicos, e evidências provenientes de estudos eletrofisiológicos, levaram Jeffrey Gray, em 1982, a propor o sistema de inibição comportamental (Figura 3).

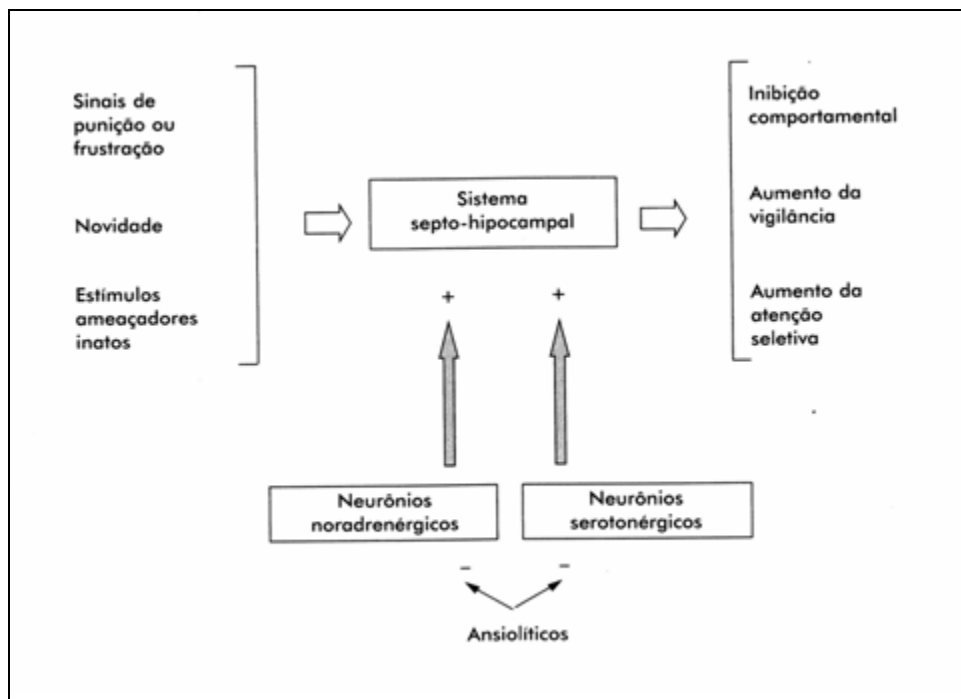


Figura 3: Diagrama ilustrando o sistema de inibição comportamental (Retirado de Graeff, 1999 b).

De acordo com o diagrama acima, o sistema septo-hipocampal, facilitado por aferências de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos provenientes do mesencéfalo, seria o componente principal do chamado “sistema de inibição comportamental”.

Testes animais de ansiedade

A elaboração de tais teorias somente foi possível em função do uso de testes animais. Para a caracterização dos estados de ansiedade, e sua modulação, testes comportamentais são utilizados para avaliar propriedades ansiolíticas e ansiogênicas de drogas, bem como para a elucidação dos mecanismos químicos e neurais envolvidos no comportamento de medo e

ansiedade (Zangrossi, 1997). Portanto, os testes animais que avaliam a atividade ansiolítica/ansiogênica de drogas e/ou situações são úteis para reproduzir em laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia ou do tratamento da ansiedade (Zangrossi, 1997).

É possível agrupar os modelos animais de ansiedade existentes sob dos paradigmas: 1) modelos que envolvem comportamentos condicionados; 2) modelos que envolvem comportamentos naturais chamados de testes etológicos de ansiedade (Millan, 2003).

Até a década de 1970 o paradigma dominante constituía-se do emprego de modelos que utilizavam comportamentos condicionados a estímulos aversivos para o estudo da ansiedade, como o teste de Geller-Seifter, testes de esquiva ativa e passiva, o sobressalto acústico potencializado pelo medo, entre outros. (Rodgers et al., 1997; Millan, 2003).

A partir da década de 80 entrou em vigor a utilização de testes etologicamente fundamentados, isto é, testes que utilizam comportamentos adaptados ao nicho ecológico de cada espécie através de mecanismos evolutivos. Estes modelos baseiam-se em respostas inatas de medo e ansiedade de diferentes espécies animais. Diante de situações naturalmente aversivas, como o confronto com um intruso, lugares novos ou a exposição a lugares com uma iluminação intensa (Pellow et al., 1985; Lister, 1987). Neste contexto encontra-se o modelo do odor de predador.

Teste do Odor de Gato

A relação presa-predador, entre roedores e gatos, permitiu evolutivamente que os roedores desenvolvessem sensibilidade a pistas de felinos e,

consequentemente, ao desenvolvimento de comportamentos específicos antipredador frente à apresentação destas pistas (Blanchard e Blanchard, 1971, 1989a). Este tipo de comportamento defensivo é inato, o que implica que as respostas defensivas podem ser evocadas em ratos selvagens ou de laboratório sem experiência prévia, fato que permitiu aos pesquisadores uma excelente oportunidade no estudo do estresse e emoção sob aspectos neurocomportamentais (Dielenberg e McGregor, 2001a). Um estímulo parcial do predador, como seu odor, pode representar uma ameaça e estimular a realização de um repertório de respostas defensivas. Quando expostos ao odor de gato, ratos exibem diversos comportamentos de defesa, incluindo congelamento, esquiva, comportamentos de avaliação de risco como *head – out*, diminuição da atividade locomotora e de comportamentos não relacionados com a resposta defensiva, como o de auto-limpeza (Blanchard e Blanchard, 1971, 1989a). A re-exposição ao mesmo ambiente na ausência do odor de gato, vinte e quatro horas após uma exposição de dez minutos ao odor, induz a expressão de comportamentos também relacionados à resposta defensiva, o que sugere a expressão do medo condicionado (Hubbard et al, 2004).

A resposta de ratos ao odor de gato é imediata, profunda e duradoura, e ocorre apesar de ratos de laboratório nunca terem encontrado com um gato (Dielenberg McGregor, 2001a). A primeira descrição detalhada da resposta comportamental de ratos à exposição ao odor de gato ocorreu na década de 80 (Blanchard e Blanchard, 1989b). Para tal experimento, um sistema de tocas, que permitia a observação dos animais em uma área aberta, e um comportamento de esquiva foram utilizados. A apresentação de um bloco de madeira recoberto por

um pano previamente friccionado contra a pele de um gato funcionou como estímulo aversivo (odor de gato). Ratos foram analisados sob o aspecto comportamental em três sessões: antes, durante e após a exposição ao odor de gato, ou ao gato vivo. Os animais permaneceram por mais tempo no esconderijo, e posturas de avaliação de risco (*head-out*) foram registradas. Este comportamento, o *head-out*, seria uma posição estratégica que permite aos animais uma maior obtenção de informações acerca do ambiente e do estímulo. Já quando o rato é exposto a um gato vivo, comportamentos distintos, como o congelamento acompanhado de vocalizações ultrasônicas, prevalecem. Para os Blanchard, a exposição do animal ao gato vivo relaciona-se com o medo, enquanto a exposição ao odor de gato com a ansiedade (Blanchard e Blanchard 1989b). Com relação às estruturas ativadas durante a exposição ao odor de gato um estudo com *c-fos* realizado por Dielenberg e colaboradores, (2001b) identificaram as seguintes áreas relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Número de células positivas para *c-fos* em uma área de 0,25 mm² nos circuitos neurais de ratos expostos ao odor de gato, odor neutro e o terceiro grupo que permanece na gaiola (controle), conforme adaptado de Dielenberg e colaboradores (2001b). A última coluna mostra a presença ou ausência de substância P (SP) e/ou seus receptores NK1 nas mesmas regiões cerebrais.

Região	Controle Gaiola	Controle Odor	Odor de Gato	Presença de NK1/SP
Núcleo olfatório anterior ventral	3±0,9	24± 2,8	38±4,5	ND
Núcleo do septo lateral (ventral)	5±2,2	37±8,1	96±11	+ (Otsuka e Yoshioka, 1993)
Núcleo do leito da estria terminal	0,6±0,4	7±1,2	22±2,9	ND
Área pré óptica medial	0,4±0,2	3±0,7	8±1,1	+ (Holmes et al., 2003)
Área pré óptica lateral	3±1,8	10±2,4	21±3,0	+ (Holmes et al., 2003)
Núcleo hipotalâmico para ventricular	4±1,5	10±1,6	34±7,5	ND
Área hipotalâmica anterior	6±1,3	20±3,1	41±4,9	+ (Otsuka e Yoshioka, 1993)
Hipotálamo dorso-medial	10±3,6	26±6,4	79±7,9	ND
Núcleo hipotalâmico ventromedial (dorsomedial)	2±0,6	7±2,7	65±4,4	+ (Otsuka e Yoshioka, 1993)
Núcleo hipotalâmico pré mamilar dorsal	0,4±0,4	9±1,7	63±9,1	ND
Núcleo amigdalóide medial (posteroventral)	3±0,8	14±4,1	50±7,6	+ (Singewald, 2008)
SCP dorso-medial	3±0,8	11±1,3	53±8,7	+ (Aguiar e Brandão, 1996)
SCP dorso-lateral	0,8±0,6	9±1,7	48±5,9	+ (Aguiar e Brandão, 1996)
SCP ventro-lateral	3±1	6±1,4	38±5,8	ND
Núcleo cuneiforme da SCP	4±1,6	11±3,4	24±4,9	ND

(+) Expressão de receptores NK1 ou de neurônios contendo SP.

ND = não descrito na literatura.

Como mostrado na tabela acima, em todas as regiões listadas o grupo submetido ao odor de gato obteve, comparativamente, a marcação para *c-fos* mais evidente. Além disso, as regiões circunjacentes ao ventrículo lateral encontram-se ativadas na exposição do rato ao teste comportamental do odor de

gato. Essas regiões, e em particular o septo lateral, contêm uma grande densidade de inervações de SP e de receptores taquicinérgicos (Otsuka e Yoshioka, 1993). Os trabalhos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que os receptores NK1 presentes no septo lateral estão envolvidos na mediação dos efeitos ansiogênicos induzidos pela SP (Gavioli et al., 2002). No entanto, até o presente momento, não há descrição na literatura sobre o papel modulatório dos receptores NK1 no septo lateral, ou em qualquer outra região cerebral, nas respostas comportamentais emitidas por ratos quando expostos ao teste do odor de gato.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar a participação dos receptores NK1 do septo lateral na ansiedade experimental em ratos expostos ao odor de gato.

Específicos

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

- 1) Validar e padronizar o teste do odor de gato dentro das condições experimentais de nosso laboratório, permitindo desta forma a utilização de um modelo com valores preditivos confiáveis;
- 2) Caracterizar os efeitos comportamentais da administração central (intracerebroventricular, i.c.v.) de WIN 51,708 (antagonista dos receptores taquicinérgicos do tipo NK1) no comportamento de ratos expostos ao teste do odor de gato;
- 3) Investigar os efeitos comportamentais da administração intraseptal (septo lateral) do antagonista NK1 WIN 51,708 no comportamento de ratos expostos ao teste do odor de gato.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados durante este trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (# 23080.080072244/2006-70/CEUA/UFSC) e estão de acordo com os padrões internacionais de bem estar animal recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (1992). Além disso, procurou-se utilizar o menor número de animais, mas suficiente para a obtenção de dados consistentes.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com idade entre 12-16 semanas, pesando entre 300 – 420g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em caixas plásticas (50 x 30 x 15 cm) em grupos experimentais de 3 -6 animais por caixa, onde foram mantidos sob temperatura constante ($23^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas a partir de 7:00 AM) e livre acesso a comida e água.

Drogas e soluções

As seguintes drogas e doses foram utilizadas para a realização dos protocolos experimentais:

- Solução controle: PBS (*phosphate buffer solution*; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), injetado intracerebroventricularmente (i.c.v.) no volume de 2 μL ou intra septo lateral (SL) no volume de 0,3 μL ;
- WIN 51,708 (Sigma, MO, USA), antagonista não peptídico de receptores NK1 (Kawana, 2006), nas doses de 1, 10 e 100 pmoL, injetado i.c.v. no volume de 2 μL

ou intra SL no volume de 0,3 μ L; As doses utilizadas tem como referências trabalhos prévios de nosso laboratório com o antagonista de receptores NK1, FK 888 (Teixeira, 1996).

- Xilazina 2 % (Dopaser®, Calier, Espanha) e Quetamina 10 % (Dopalen®, Vetbrands, Brasil), 1:1, em um volume de injeção de 1mL/Kg;

- Cloridrato de Lidocaína 3% (Probem®, Brasil), anestésico e vasoconstritor local, injetado no volume de 0,2 mL;

- Midazolam (Dormonid®, Roche, Brasil), diluído em solução salina (NaCl 0,9%) nas doses de 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg e 0,75 mg/kg e injetado em um volume de 1mL/Kg; (McGregor et al., 2001; McGragor et al., 2004).

- Azul de Evans 0,5% (Sigma-Aldrich, EUA), diluído em água destilada.

Cirurgia Estereotáxica

Para a realização da cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com uma solução de Quetamina 10% e Xilazina 2%. Após verificada a perda total de reflexos, os animais foram fixados ao aparelho estereotáxico (Stoeliting, mod. 300, EUA), e procedeu-se a tricotomia de toda parte superior da cabeça do animal. Injetou-se, então, uma solução de xilocaína com adrenalina 2% subcutaneamente, visando à formação de uma pápula, não só pelo seu efeito anestésico local, como também para orientar a retirada de uma pequena área ovalada de pele, para a abertura do campo cirúrgico. Em seguida, realizou-se a raspagem do periósteo, deixando a calota craniana exposta. O crânio foi posicionado no aparelho esterotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem

situados num mesmo plano horizontal. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos de aço inoxidável e de uma cânula guia de 16 mm de comprimento, confeccionada a partir de agulhas 0,7 x 25 mm (Becton Dickinson, Brasil).

As coordenadas para colocação das cânulas-guias foram estabelecidas de acordo com o atlas do cérebro de rato (Paxinos & Watson, 1998) e descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Coordenadas estereotáxicas para implantação de cânulas-guias.

Plano	Ventrículo lateral	Septo lateral
<i>Antero posterior: AP</i>	-0,8 mm em relação ao bregma	+1,0 mm em relação ao bregma
<i>Médio lateral: ML</i>	±1,5 mm em relação à sutura sagital	±0,3 mm em relação à sutura sagital
<i>Dorso ventral: DV</i>	-2,5 mm em relação à superfície externa do crânio	-3,3 mm em relação à superfície externa do crânio

Com o objetivo de impedir a obstrução das cânulas, foi adaptado um mandril de aço inox nº 26 (Comercial Rio Verde, Brasil) que era retirado no momento da infusão das drogas. Por fim, a superfície craniana foi coberta por uma camada de acrílico auto-polimerizante, fixando todo o conjunto numa prótese sólida. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram alojados em um ambiente aquecido até a recuperação da anestesia e transferência ao biotério do laboratório. Foi adotado um período de sete dias de recuperação até o início do protocolo experimental, durante o qual foram observados sinais de dor,

sangramento local e bem-estar físico dos animais (alterações na ingestão alimentar ou consumo de água, comportamentais, ou sinais físicos de estresse).

Microinjeção intraventricular e intraseptal

As drogas foram infundidas (2 μ L i.c.v ou 0,3 μ L intra SL) pela conexão da cânula injetora através de tubo de polietileno PE-20, com uma micro-seringa Hamilton 701 N (10 μ L), com o auxílio de uma bomba infusão (B1200, Insight, Brasil). Após a infusão, as cânulas injetoras permaneceram por mais 30 s dentro das cânulas guias para permitir a difusão das drogas pelos tecidos adjacentes. Foi adotado um período de cinco minutos entre a administração da solução e a exposição ao protocolo experimental.

Aparato para análise comportamental

Os registros comportamentais foram obtidos em uma caixa de esquiva ao odor, confeccionada a partir do modelo proposto por Blanchard e Blanchard (1989) e, posteriormente, adaptado por Dielenberg e colaboradores (1999), que visa simular o sistema de tocas utilizado por roedores, e suas respostas ao odor de predador. O aparato é composto de um compartimento fechado (20 x 26 x 36 cm) e outro maior (40 x 26 x 36 cm), que se conectam por uma abertura (6 x 6 cm), conforme mostrado na Figura 2. Uma flanela de algodão impregnada ou não com odor de gato, conforme descrito adiante, foi afixada na parede oposta à porta de acesso ao espaço fechado, com o auxílio de um arame, e uma linha marcada no assoalho da caixa, a 7cm da parede em que se encontra a flanela, permite a avaliação dos parâmetros de aproximação, descritos adiante.

O estímulo, odor de gato, foi obtido através da fricção da flanela em um gato doméstico macho e adulto durante 10 minutos, especialmente sobre as regiões torácica, cervical e lombar. Uma flanela idêntica, porém limpa, foi utilizada nas sessões de familiarização e contexto como controle negativo do odor de gato. Os registros comportamentais foram gravados em uma câmera modelo HM 21 para posterior análise. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo claro-escuro em uma sala com som atenuado e iluminação de 4 lux.

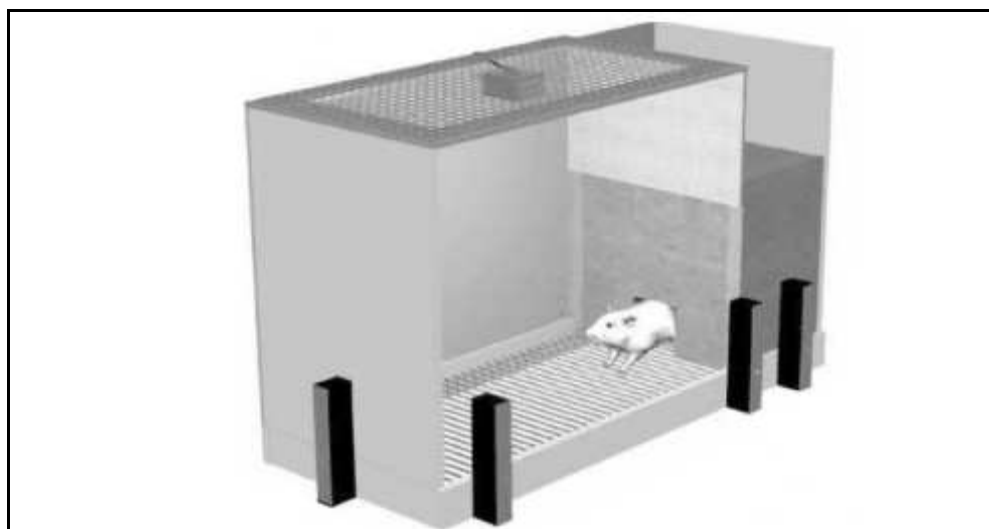


Figura 4 – Caixa de esquia ao odor, utilizada no protocolo experimental. O Esquema representativo ilustra o rato na posição de *head-out*. (Retirado de Dielenberg e McGregor, 2001a).

Protocolo experimental geral

Todos os experimentos obedeceram ao seguinte protocolo:

a) *Familiarização* (primeira etapa): Exposição do animal à caixa sem odor. Neste caso, a flanela possui odor neutro e o animal pode explorar o local durante 10 min,

o que os possibilita conhecer os compartimentos e obter as demais informações acerca do ambiente.

b) *Exposição ao odor de gato* (segunda etapa): Ocorre 24 h depois da primeira etapa, e consiste na exposição do animal na mesma caixa, porém com a flanela impregnada com odor de gato. Para o experimento de padronização com Midazolam, os animais foram colocados no aparato trinta minutos após a respectiva injeção intraperitoneal (salina ou midazolam). No caso da injeção de WIN 51,708 ou PBS, os animais foram colocados cinco minutos após a injeção intracerebral. Na exposição ao odor de gato, os animais permaneceram durante 10 min no aparato.

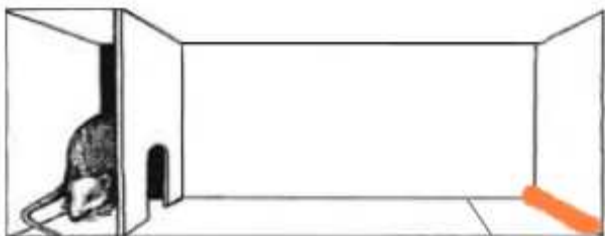
c) *Exposição ao contexto* (terceira etapa). O animal foi exposto na mesma caixa de esQUIVA ao odor, porém com uma flanela com odor neutro. Igualmente às duas primeiras etapas, esta também tem duração de 10 minutos.

As etapas a, b e c foram realizadas em dias consecutivos.

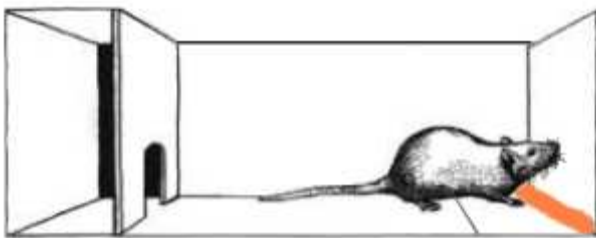
Durante cada uma destas submissões ao aparato foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: 1) tempo que o animal fica escondido no compartimento fechado, 2) número de aproximações, bem como 3) tempo de aproximação e 4) tempo escondido. Estes parâmetros foram utilizados como indicativos de comportamento defensivo dos animais. O tempo de *head-out* serviu para registrar o comportamento de avaliação de risco. Foram analisados ainda, o número de cruzamentos, e o número de vezes em que o animal se aproxima da fonte de odor, que por sua vez se relacionam com a atividade locomotora e exploratória do animal (Dielenberg e McGreagor, 2001). Os

parâmetros acima descritos podem ser melhor visualizados na ilustração adaptada de Dielenberg e McGregor (2001a) a seguir.

Parâmetros relacionados com o Comportamento Defensivo



Tempo Escondido: Tempo em que o animal permanece com pelo menos duas patas no interior do compartimento fechado.



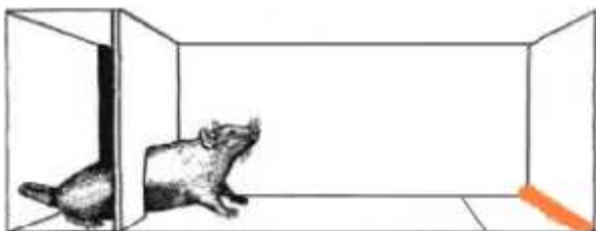
Tempo de Aproximação : Tempo em que o animal se aproxima da flanela. A marcação localizada a 7 cm da flanela facilita a visualização deste parâmetro.

Parâmetros relacionados à Atividade Exploratória Geral

Número de Aproximações: Número de vezes em que o animal se aproximou da flanela.

Número de Cruzamentos: Número de vezes em que o animal aproximou-se da flanela, somado ao número de entradas no compartimento fechado.

Parâmetros relacionados à avaliação de risco



Tempo de *head-out*: Tempo em que o animal permanece no interior do compartimento fechado com a cabeça (com ou sem as patas dianteiras) para fora do compartimento.

Figura 5 – Parâmetros comportamentais de ratos avaliados na caixa de esquiwa ao odor, utilizada no protocolo experimental. Os esquemas representativos foram adaptados de Dielenberg e McGregor (2001a).

Experimento I - Padronização farmacológica do teste do odor de gato com midazolam, droga ansiolítica padrão.

Grupos Experimentais:

- Grupo exposto ao odor neutro, nas três etapas experimentais, sem prévio tratamento.
- Grupo tratado com salina, e exposto à Familiarização, odor de gato e contexto.
- Grupo tratado com Midazolam nas doses 0,25 mg/Kg; 0,50 mg/Kg ou 0,75 mg/Kg, exposto à Familiarização, odor de gato e contexto.

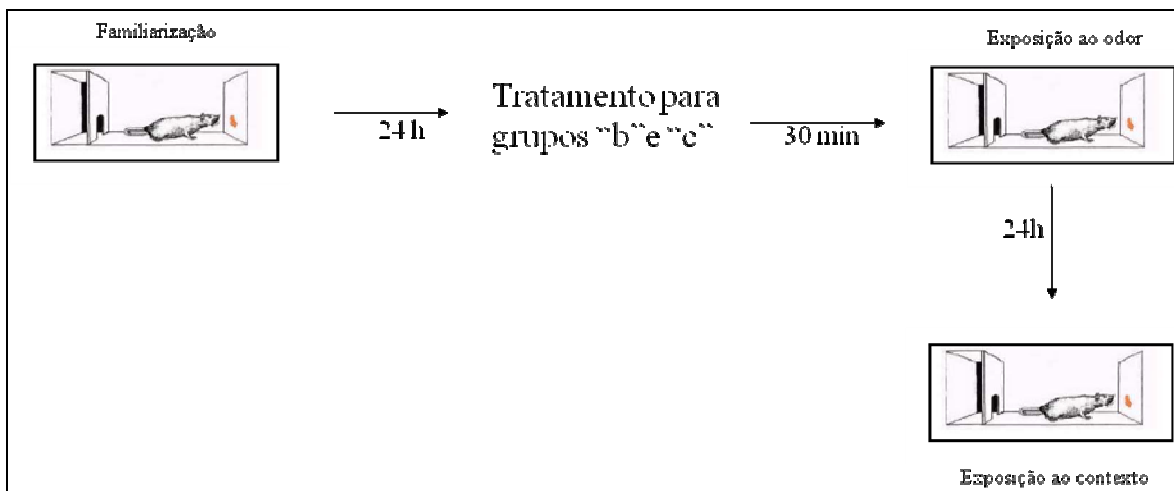


Figura 6 – Esquema ilustrativo representando o experimento I.

Experimento II - Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de WIN 51,708

Para a curva dose-resposta com as injeções intracerebroventriculares de 2 μ L do WIN 51,708 foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- a) grupo que recebeu WIN 1 pmol;
- b) grupo que recebeu WIN 10 pmol;
- c) grupo que recebeu WIN 100 pmol;
- e) PBS

Os animais dos grupos a,b,c e d foram expostos ao odor de gato 5 min após o respectivo tratamento.

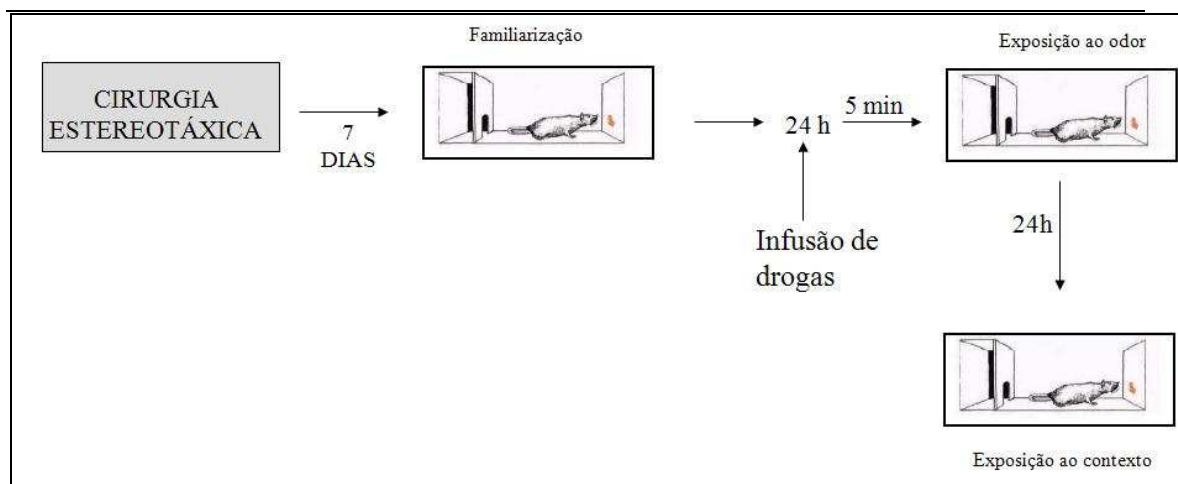


Figura 7 – Esquema ilustrativo representando o experimento II.

Experimento III - Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intra-septal de WIN 51,708

A seguir, foi feita a administração de 0,3 μ L intra-septal da dose de maior eficácia do antagonista taquicinérgico WIN 51,708. Os grupos experimentais foram: PBS e WIN dose 10 pmol. Após 5 min, os animais foram submetidos ao teste do odor de gato.

Grupos Experimentais:

- a) Grupo que recebeu WIN 10 pmol;
- b) Grupo que recebeu PBS.

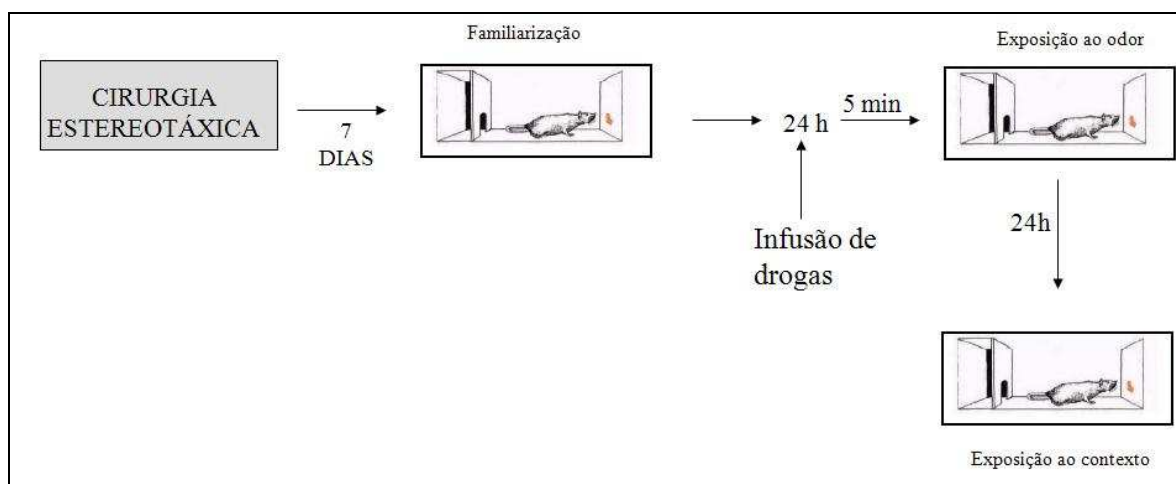


Figura 8 – Esquema ilustrativo representando o experimento III.

Perfusão e Histologia

Terminados os procedimentos experimentais, os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 15%, 2ml/kg, por via i.p. e, posteriormente, micro-injetados com uma solução de azul de Evans 0,5%, de maneira igual à realizada no momento de injeção das drogas. Posteriormente, os

animais foram perfundidos por via transcardíaca com uma solução salina (NaCl 0,9%), seguida de formaldeído 10% durante 5 min cada.

Ao término da perfusão, os animais foram decapitados. Os encéfalos perfundidos foram removidos e acondicionados em uma solução de sacarose 30% e mantidos em geladeira durante 3-4 dias. Foram realizados cortes histológicos em um criostato (LEICA CM 1850), em secções de 50 μ m, nas proximidades cerebrais demarcadas pelo corante. Nas fatias dispostas em lâminas de vidro, o sítio de injeção foi analisado com o auxílio de um estereoscópio, segundo os diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1998), para a verificação do local de injeção.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo programa *Statistica 6.0*® e representados em gráficos usando-se o programa GraphPad Prism 4.0®. Os dados paramétricos com distribuição normal observados no modelo do odor de gato (tempo de aproximação, tempo escondido e tempo de *head-out*) foram analisados pelo teste *t* de Student não-pareado, no caso de duas amostras, ou pela análise da variância (ANOVA) de uma via, no caso de três ou mais amostras, seguida de teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Os valores foram representados através de média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

O teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste U de Mann-Whitney, foi utilizado para analisar variáveis não-paramétricas, como número de aproximações e de cruzamentos. Os dados foram representados por mediana e interval interquartil positivo.

RESULTADOS

Experimento 1 – Padronização farmacológica do teste do odor de gato com midazolam, droga ansiolítica padrão.

Esta etapa foi realizada com o intuito de validar e padronizar o modelo experimental do odor de gato dentro das condições ambientais de nosso laboratório.

Na familiarização, conforme mostrado nas figuras 9 (A e B) e 10 (A, B e C), não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados no teste do odor de gato.

No odor, a ANOVA revelou diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo [tempo de aproximação (Figura 9A) e tempo escondido (Figura 9B), $F_{(4,45)} = 5,64$; $p < 0,05$ e $F_{(4,45)} = 12,49$; $p < 0,001$, respectivamente] e ao comportamento de avaliação de risco, tempo de *head-out* (Figura 10C), $F_{(4,45)} = 6,66$; $p < 0,001$]. O teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados à atividade exploratória geral, número de aproximações (Figura 10A) e número de cruzamentos (Figura 10B), $\chi^2_{50}(4) = 10,60$; $p < 0,05$ e $\chi^2_{50}(4) = 9,59$; $p < 0,05$, respectivamente]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou uma diminuição no tempo de aproximação, bem como um aumento no tempo escondido e no tempo de *head-out* no grupo salina, em relação ao grupo neutro, mostrando aversão ao odor do predador, como esperado. Diferenças entre esses grupos também foram visualizadas nos parâmetros indicativos de atividade exploratória geral. Os animais do grupo salina apresentaram uma diminuição no

número de aproximações ($U = 10,0$; $p < 0,05$) e de cruzamentos ($U = 11,0$; $p < 0,05$), quando comparados ao grupo neutro (teste de Mann Whitney). Em relação aos animais tratados com MDZ, o teste de Newman-Keuls, *a posteriori*, demonstrou que todas as doses de MDZ (0,25, 0,5 e 0,75 mg/Kg) promoveram um aumento no tempo de aproximação e uma redução no tempo escondido e no tempo de *head-out*, quando comparados ao grupo salina, indicando, como esperado, um efeito do tipo ansiolítico. Além disso, o teste de Mann Whitney demonstrou que os animais tratados com MDZ apresentaram um aumento no número de aproximações (nas doses de 0,25 e 0,75 mg/Kg; $U = 31,5$; $p < 0,05$ e $U = 14,5$; $p < 0,05$, respectivamente) e no número de cruzamentos (somente na dose de 0,25 mg/Kg; $U = 27,5$; $p < 0,05$), confirmando o efeito do tipo ansiolítico.

No contexto, a ANOVA detectou diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo, tempo de aproximação (Figura 9A) e tempo escondido (Figura 9B), $F_{(4,45)} = 4,09$; $p < 0,05$ e $F_{(4,45)} = 4,37$; $p < 0,05$, respectivamente]. O teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados à atividade exploratória geral, número de aproximações (Figura 10A) e número de cruzamentos (Figura 10B), $\chi^2_{50}(4) = 12,92$; $p < 0,05$ e $\chi^2_{50}(4) = 24,70$; $p < 0,001$, respectivamente]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou uma diminuição no tempo de aproximação e um aumento no tempo escondido no grupo salina quando comparado ao grupo neutro. Além disso, o grupo salina apresentou valores estatisticamente menores que o grupo neutro no número de aproximações ($U = 10,5$; $p < 0,05$) e de cruzamentos ($U = 9,0$; $p < 0,001$). Em relação aos animais

tratados com MDZ, o teste de Newman-Keuls, *a posteriori*, demonstrou que o MDZ promoveu um aumento no tempo de aproximação (nas doses de 0,25 e 0,75 mg/Kg) e uma redução no tempo escondido (somente na dose de 0,25 mg/Kg) quando comparados ao grupo salina. Além disso, o teste de Mann Whitney demonstrou que os animais tratados com MDZ apresentaram um aumento significativo no número de aproximações (0,25, 0,5 e 0,75 mg/Kg; $U = 16,5$; $p < 0,001$, $U = 10,0$; $p < 0,05$ e $U = 13,5$; $p < 0,05$, respectivamente) e no número de cruzamentos (nas doses de 0,25 e 0,5 mg/Kg; $U = 15,0$; $p < 0,001$ e $U = 6,0$; $p < 0,001$) em relação ao grupo salina.

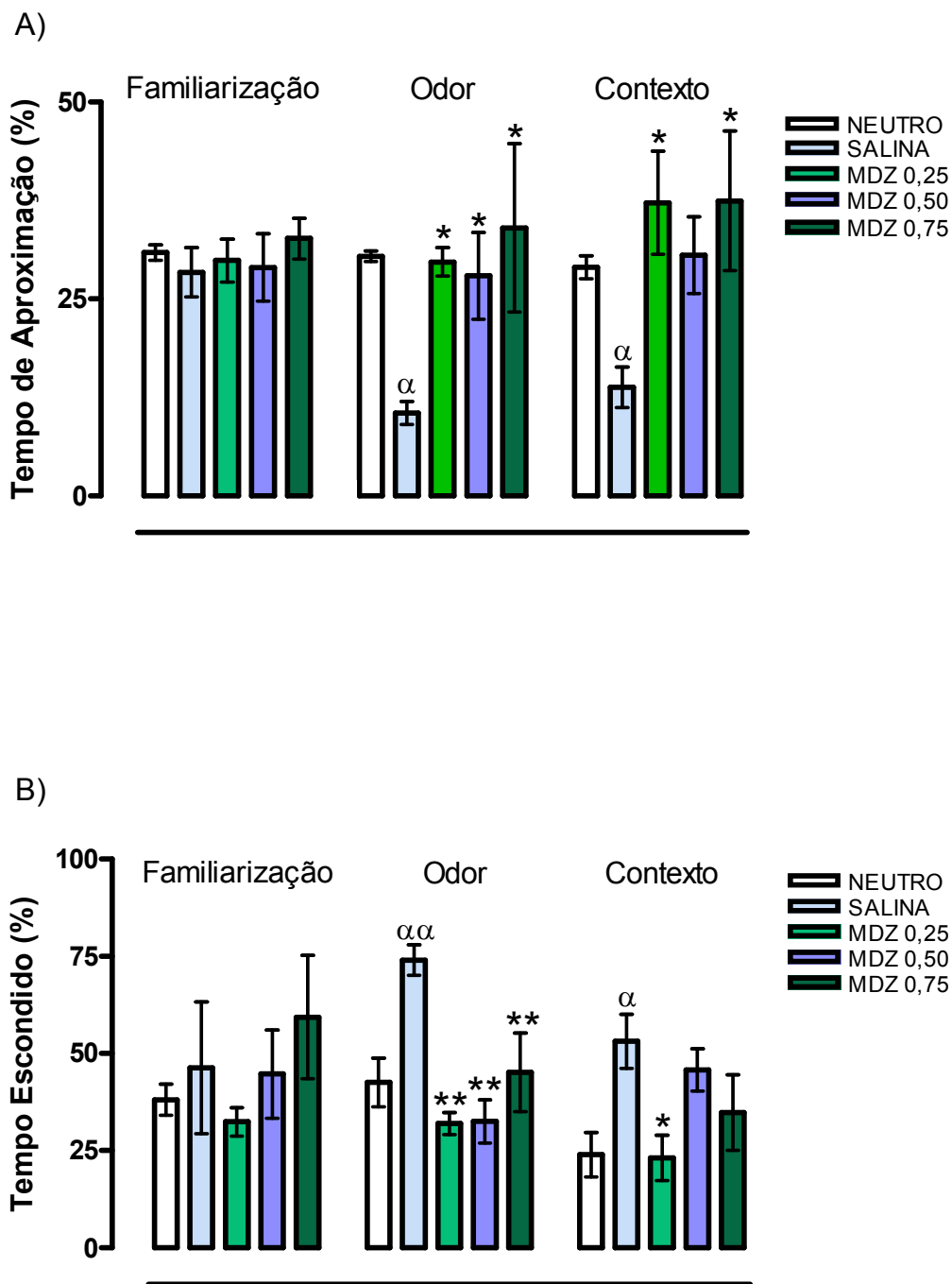


Figura 9 – Avaliação da resposta defensiva dos grupos neutro, salina e midazolam (MDZ; 0,25, 0,5 e 0,75 mg/Kg, i.p., 30 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros tempo de aproximação, A, e tempo escondido, B. ANOVA seguido teste de Newmann-Keuls. Valores expressos em média ± E.P.M.. α $p < 0,05$ e αα $p < 0,001$ comparado ao

grupo neutro; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo salina; $n = 7-13$.

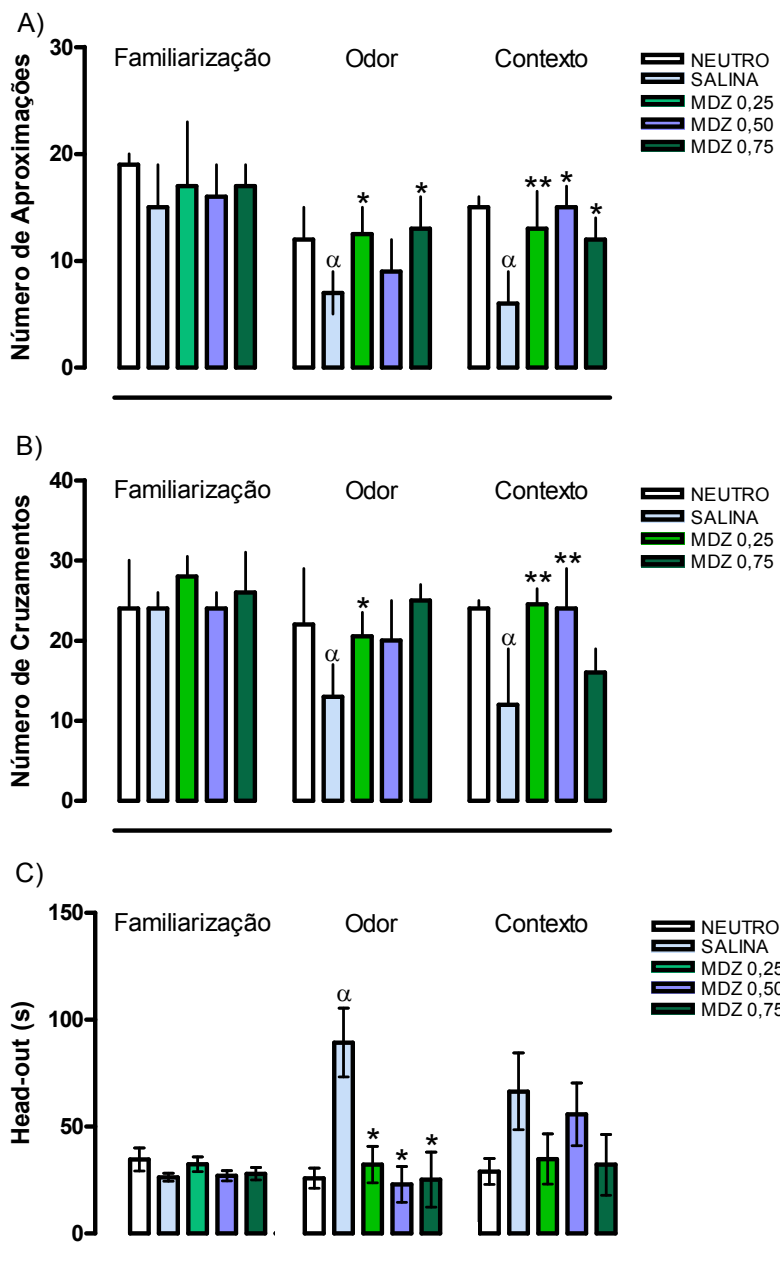


Figura 10 – Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco nos grupos neutro, salina e midazolam (MDZ; 0,25, 0,5 e 0,75 mg/Kg, i.p., 30 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros número de aproximações (A), número de cruzamentos (B) – Teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann Whitney; valores expressos em mediana + I.I., e tempo de *head-out* (C) – ANOVA seguida do teste de Newmann-Keuls; valores expressos em média ± E.P.M.. $\alpha p < 0,05$

comparado ao grupo neutro; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo salina. n = 7-13.

Experimento 2 – Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intracerebroventricular (i.c.v.) de WIN 51,708

Na familiarização, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados no teste do odor de gato [Figuras 11 (A e B) e 12 (A, B e C)].

No odor, a ANOVA revelou diferenças significantes entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados ao comportamento defensivo, tempo de aproximação (Figura 11A) e tempo escondido (Figura 11B) [$F_{(3,39)} = 4,22$; $p < 0,05$ e $F_{(3,39)} = 6,25$; $p < 0,05$, respectivamente]. O teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais nos parâmetros relacionados à atividade exploratória geral, número de aproximações (Figura 12A) e número de cruzamentos (Figura 12B), $\chi^2_{43}(3) = 10,97$; $p < 0,05$ e $\chi^2_{43}(3) = 17,44$; $p < 0,001$, respectivamente]. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que a administração i.c.v. de WIN promoveu um aumento no tempo de aproximação (na dose de 10 pmoL) e uma redução no tempo escondido (nas doses de 1, 10 e 100 pmoL), quando comparado ao grupo PBS. Além disso, o teste de Mann Whitney demonstrou que os animais tratados i.c.v. com WIN (nas doses de 1 e 10 pmoL) apresentaram um aumento significativo no número de aproximações ($U = 26,0$; $p < 0,05$ e $U = 12,0$; $p < 0,05$; respectivamente) e de cruzamentos ($U = 23,0$; $p < 0,05$ e $U = 18,0$; $p < 0,05$) em relação ao grupo PBS.

No contexto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados no teste do odor de gato [Figuras 11 (A e B) e 12 (A, B e C)].

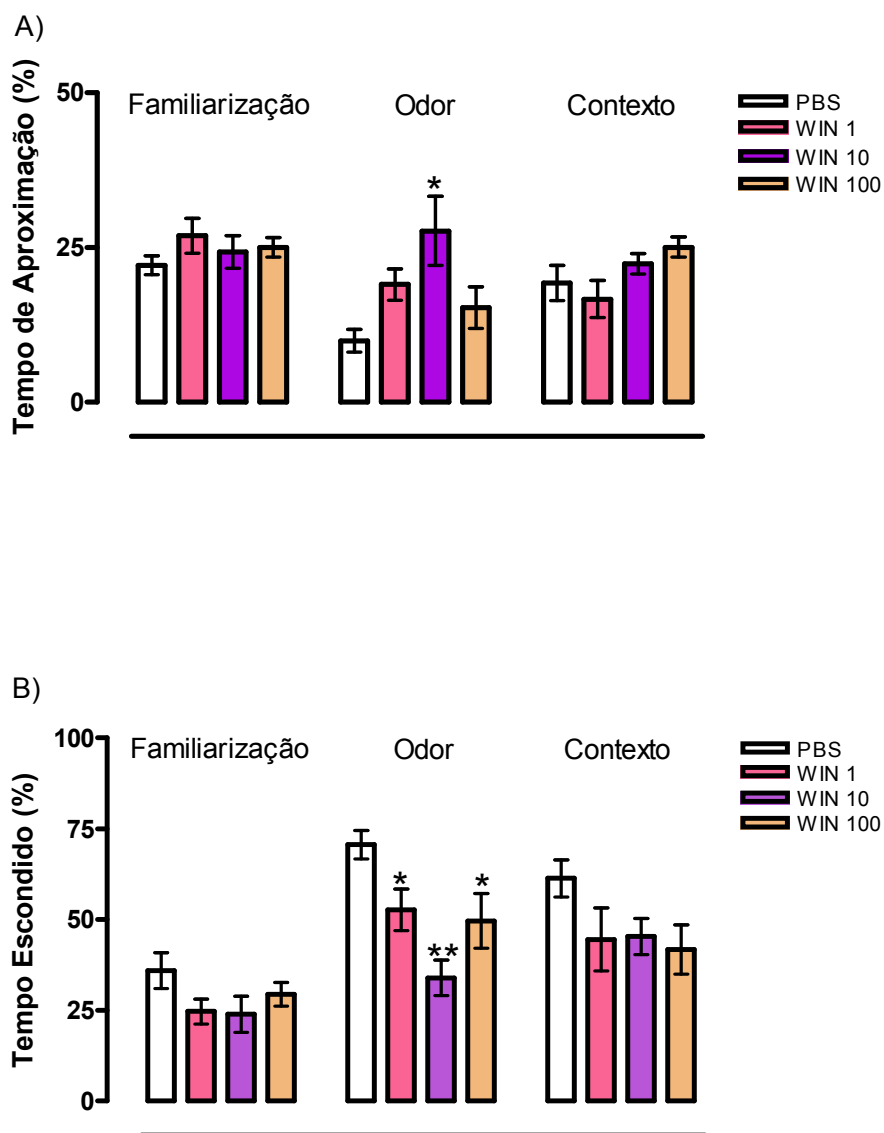


Figura 11 – Avaliação da resposta defensiva dos grupos PBS e WIN 51,708 (WIN; 1, 10 e 100 pmol, i.c.v., 5 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros tempo de aproximação, A, e tempo escondido, B. ANOVA seguida do teste de Newmann-Keuls. Valores expressos em média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo PBS; $n = 10-12$.

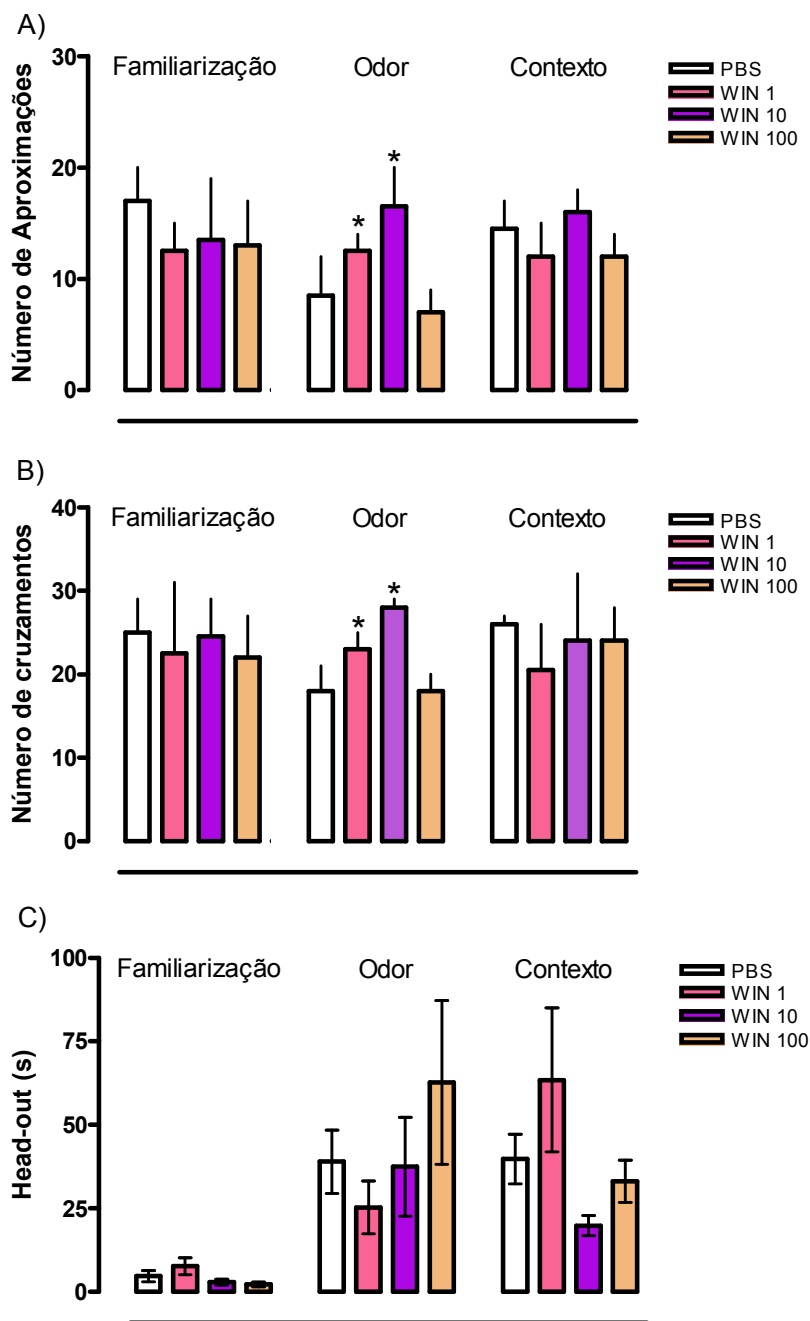


Figura 12 – Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco nos grupos PBS e WIN 51,708 (WIN; 1, 10 e 100 pmol, i.c.v., 5 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros número de aproximações (A) e cruzamentos (B) – Teste de Kruskal-Wallis seguido teste U de Mann Whitney; valores expressos em mediana +I.I., e tempo de *head-out* (C) – ANOVA seguida de Newmann Keuls; valores expressos em média ± E.P.M.. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PBS; $n = 10-12$.

Experimento 3 – Caracterização dos efeitos comportamentais da administração intra-septal de WIN 51,708

Na familiarização, não foram observadas diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados no teste do odor de gato [Figuras 13 (A e B) e 14 (A, B e C)].

No odor, a administração intra septo lateral de WIN (10 pmol) aumentou o tempo de aproximação (Figura 13A; $t = -5,34$, $p < 0,001$), reduziu o tempo escondido (Figura 13B; $t = 4,58$, $p < 0,001$) e o tempo de *head-out* (Figura 14C; $t = 4,51$, $p < 0,001$) e aumentou o número de aproximações (Figura 14A, $U = 29,5$, $p < 0,05$) e de cruzamentos (Figura 14B, $U = 26,0$, $p < 0,05$), em relação ao grupo PBS.

No contexto, a administração intra septo lateral de WIN (10 pmol) aumentou o tempo de aproximação (Figura 13A; $t = -2,22$, $p < 0,05$), reduziu o tempo escondido (Figura 13B; $t = 2,39$, $p < 0,05$) e o tempo de *head-out* (Figura 14C; $t = 2,80$, $p < 0,05$) e aumentou o número de aproximações (Figura 14A, $U = 36$, $p < 0,05$), comparados ao grupo PBS.

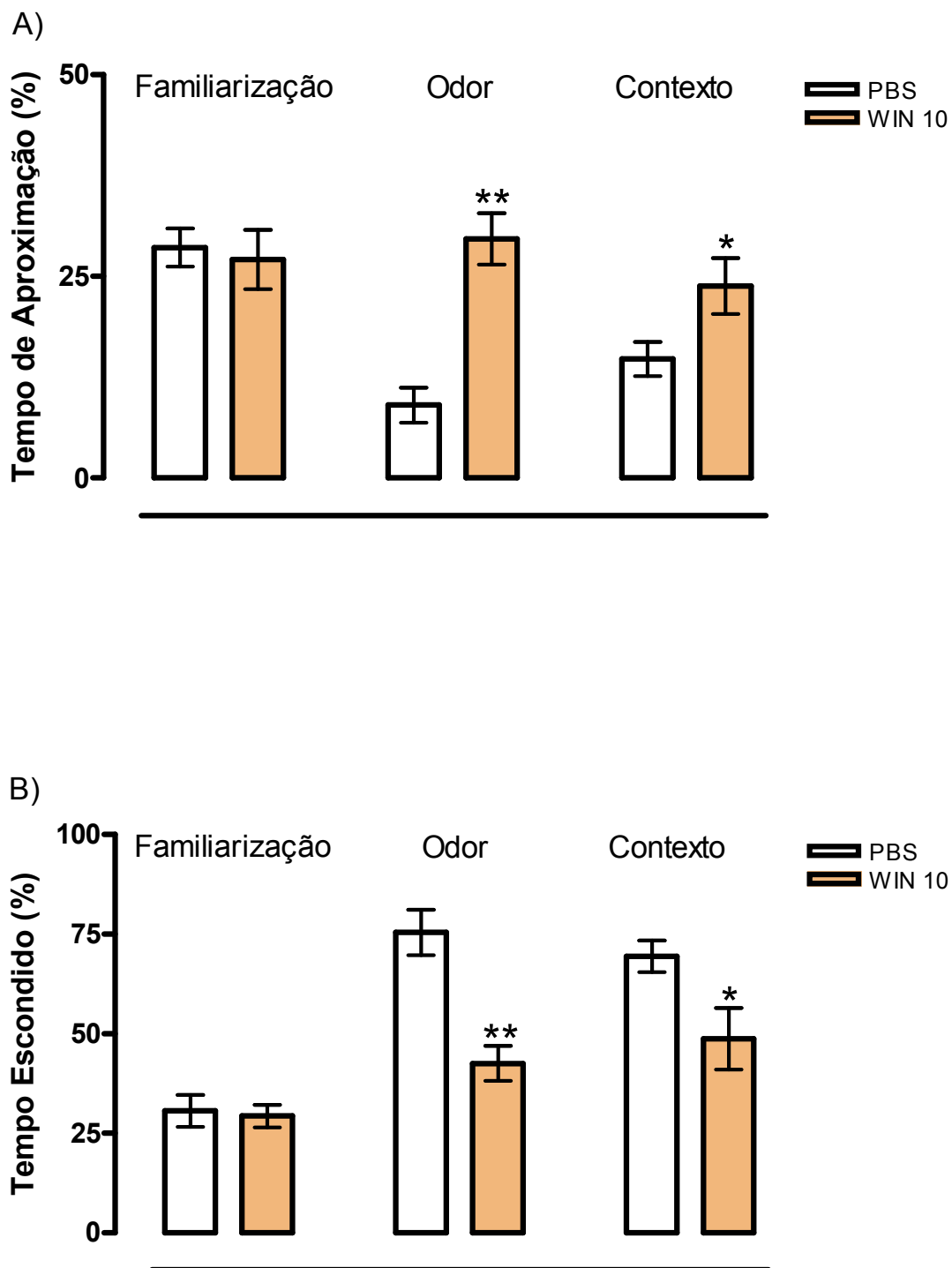


Figura 13 – Avaliação da resposta defensiva dos grupos PBS e WIN 51,708 (WIN; 10 pmoL, após a injeção intra-septal, 5 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros tempo de aproximação, A, e tempo escondido, B. Teste *t* Student. Valores expressos em média \pm E.P.M.. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo PBS; $n = 12$.

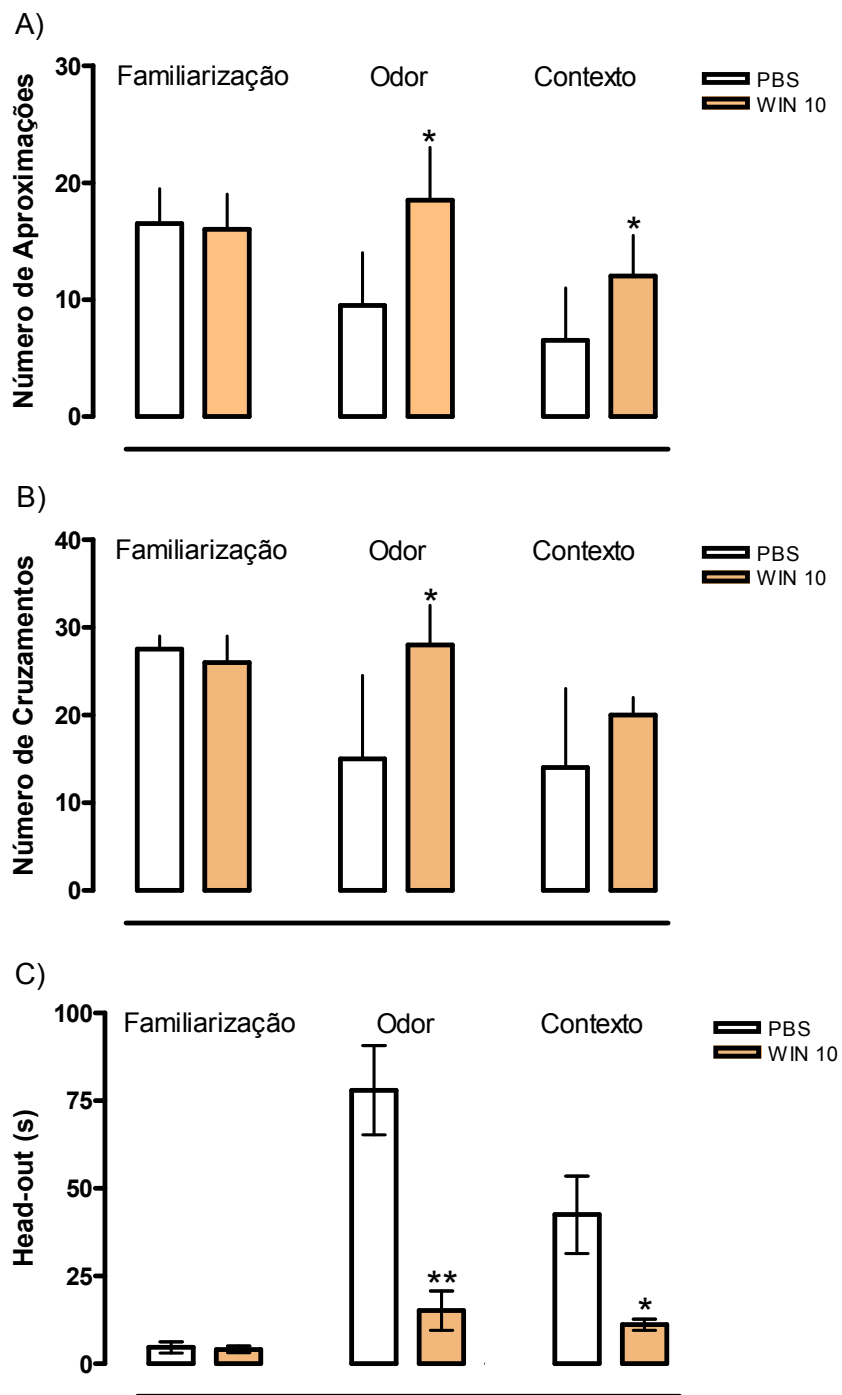


Figura 14 – Atividade exploratória geral e comportamento de avaliação de risco nos grupos PBS e WIN 51,708 (WIN; 10 pmol, após a injeção intra-septal, 5 min antes da exposição ao odor) nos parâmetros número de aproximações (A) e cruzamentos (B) – Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney; valores expressos em mediana + I.I., e tempo de *head-out* (C) – teste *t* Student; valores expressos em média ± E.P.M.. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$, comparado ao grupo PBS; $n = 12$.

DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a participação da substância P via receptores taquicinérgicos do tipo NK1 no septo lateral, de ratos expostos ao teste experimental do odor de gato. Para realizar este objetivo, primeiramente, o teste foi validado nas condições experimentais do nosso laboratório. Este primeiro experimento consistiu na avaliação das respostas comportamentais de ratos expostos 1) às três etapas experimentais: familiarização, odor e contexto; 2) com odor neutro nas três etapas ou 3) ao odor de gato na etapa de exposição ao odor.

A padronização farmacológica do teste do odor de gato foi realizada pela administração intraperitoneal de diferentes doses do benzodiazepínico midazolam, ansiolítico padrão. Nossos resultados mostraram que, o midazolam administrado antes da exposição ao odor de gato, em todas as doses testadas, foi eficaz em inibir os comportamentos de defesa dos animais, evidenciando, como esperado, seu efeito do tipo ansiolítico, sendo a dose de 0,25 mg/Kg, a mais eficaz. Além de promover efeitos do tipo ansiolítico nos padrões comportamentais de ratos avaliados no dia da exposição ao estímulo aversivo, o midazolam, nesta dose, impediu o aparecimento de comportamentos ansiogênicos durante a exposição ao contexto.

Em seguida, a curva dose-resposta ao antagonista do receptor NK1 WIN51,708 mostrou que esta droga também apresentou um efeito do tipo ansiolítico, evidenciando, pela primeira vez, a modulação tônica da substância P endógena no comportamento aversivo ao odor de gato. A dose de 10 pmol, injetada antes da exposição ao odor, mostrou-se eficaz na diminuição do comportamento defensivo de ratos frente ao odor de gato. E por último, a administração intra-septal de WIN51,708 10 pmol antes da exposição dos ratos ao

odor de gato modificou todos os parâmetros comportamentais avaliados no teste, indicando novamente, uma atividade do tipo ansiolítica. Este resultado também evidencia a participação dos receptores NK1 presentes no septo lateral na modulação de comportamentos de defesa e de avaliação de risco, assim como reforça o papel da substância P na modulação tônica destes comportamentos. No entanto, o antagonista NK1 não foi capaz de alterar os comportamentos relativos ao contexto, conforme discutiremos mais adiante.

Estudos prévios de nosso laboratório têm postulado que antagonistas de receptores neurocinérgicos têm potencial como drogas do tipo ansiolíticas (Teixeira et al., 1996; Gavioli et al., 2002, Teixeira et al., 2004), fato que tem sido corroborado por outros grupos que investigam o papel modulatório da SP e de receptores NK1 em testes de ansiedade, como o LCE (Teixeira et al., 1996; 2004; Aguiar e Brandão, 1996; Gavioli et al., 1999; De Araújo et al., 1999; Baretta et al., 2001; Duarte et al., 2004; Ebner et al., 2004), condicionamento aversivo de lugar (Elliot, 1988; Aguiar e Brandão, 1994); sobressalto acústico potencializado pelo medo (Krase et al., 1994; Zhao, 2009); esquiva passiva, (Lenard e Kertes, 2002), e vocalizações induzidas por estresse (Kramer et al., 1988; Rupniak et al., 2000). Nosso grupo também mostrou o envolvimento dos receptores NK1 do septo lateral no efeito ansiogênico da substância P (Gavioli et al., 2002).

Vários estudos utilizam a marcação imunohistoquímica para atividade de *c-fos* no mapeamento da ativação funcional de regiões do cérebro de ratos expostos a diferentes modelos de ansiedade tais como aversão ao choque nas patas, LCE e vocalização ultrassônica (Duncan et al., 1996; Silveira et al., 1993), estresse de imobilização (Pezzone et al., 1992; 1993; Silveira et al., 1993; Campeau e Davis,

1995; Duncan et al., 1996; Kovacs,1998; Li e Sawchenko, 1998; Bubser e Deutch,1990) e o teste do odor de gato (Dielenberg, 2001b; Blanchard et al., 2005). Estes estudos sugerem que, apesar de existirem muitas estruturas em comum ativadas por cada modelo, as vias neurais são diferentes e dependem do estímulo ansiogênico, ou seja, do teste de ansiedade aplicado (Dielenberg, 2001b). A literatura descreve ainda a redução das respostas comportamentais de defesa em ratos e camundongos tratados com o antagonista NK2 SR48968 expostos a estímulos aversivos como o encontro com um predador natural, por exemplo: o gato e o rato, respectivamente (Griebel et al., 2001). Posto isso, e considerando-se que não existem estudos sobre a avaliação do papel modulatório dos receptores NK1 no teste do odor de gato, o presente trabalho mostrou, pela primeira vez, que o antagonista NK1 WIN 51,708 administrado por via intracerebroventricular ou intra-septal induziu uma atividade do tipo ansiolítica no teste do odor de gato.

Na primeira etapa de padronização do teste do odor de gato nas condições experimentais do nosso laboratório, nossos resultados mostraram que a exposição do animal ao conjunto caixa/flanela sem odor (ou flanela de odor neutro) não foi capaz de evocar padrões comportamentais de resposta defensiva, i.e, o tempo de aproximação ficou em torno de 30 % e o tempo escondido foi menor que 50% nas três etapas experimentais (familiarização, odor e contexto). Em contrapartida, os animais do grupo controle (salina) permaneceram menos de 20% do tempo perto da fonte de odor e exibiram uma preferência em permanecer no compartimento fechado, demonstrada pela diferença estatística entre o grupo salina e grupo neutro. Este padrão comportamental se repetiu 24 h após, na exposição ao

contexto. Some-se a isso o aumento significativo do tempo de *head-out*, parâmetro relacionado com a atividade de avaliação de risco, de ratos tratados com salina expostos ao odor e ao contexto, corroboram com o padrão comportamental de defesa exibidos por ratos expostos ao odor de gato, já descritos na literatura. (Blanchard et al., 1990; Zangrossi e File, 1992; 1994; McGregor, 1999; McGregor e Dielenberg, 1999). Estas respostas comportamentais características do comportamento defensivo são específicas e não ocorrem na exposição a estímulos olfatórios novos, nocivos ou com odores de animais não predadores, como coelhos (Avaliers et al., 1994; McGregor et al., 2002).

Estudos realizados com odores sintéticos, em especial o TMT (2,5 dihidro-2,4,5-trimetiltiazolína) e o odor de raposa, revelaram-se eficazes na indução de respostas defensivas de roedores. Porém, esta resposta é menos clara e robusta do que aquela verificada quando os animais são expostos ao odor de gato ou ao próprio gato (Endres et al., 2005; Fendt et al., 2005; McGreagor et al., 2002; Blanchard et al., 2003). A exposição a odores sintéticos como o TMT não induz mudanças no comportamento de avaliação de risco e nem na atividade locomotora, como faz o odor de gato (Endres et al., 2005; Fendt et al., 2005; McGreagor et al., 2002; Blanchard et al., 2003). A ineficácia do TMT também se revela na falta do aparecimento do medo condicionado contextual, caracterizado pela emissão de respostas comportamentais de defesa quando os ratos são expostos ao mesmo ambiente em que foram apresentados ao odor do predador, porém na ausência deste (Dielenberg et al., 1999; Blanchard et al., 2001a; McGreagor et al., 2002). É importante relatar que, apesar de bem caracterizada, a

resposta defensiva de ratos controles antes da exposição ao odor de gato perante as condições experimentais de nosso laboratório, e de outros, a deficiência de uma técnica eficaz para a quantificação da intensidade do estímulo olfatório muitas vezes ocasiona o aparecimento de resultados distintos, o que pode levar a diferentes conclusões entre grupos de pesquisa (Takahashi et al., 2005).

As respostas defensivas relatadas acima podem ser moduladas por diversas drogas, sendo que os benzodiazepínicos apresentam efeitos muito evidentes. Ratos tratados com midazolam antes da exposição ao odor de gato pela primeira vez exibem uma diminuição no tempo escondido, aumento do tempo de aproximação e alteração do comportamento de avaliação de risco. (Dielenberg et al., 1999; McGregor e Dielenberg, 1999; McGregor et al., 2002; 2004). Nossos dados corroboram estes resultados descritos na literatura. A dose de 0,25 mg/Kg de midazolam administrado i.p. foi a mais eficaz em reduzir os parâmetros relacionados ao comportamento de defesa. O grupo tratado com esta dose diferiu estatisticamente do grupo que recebeu injeção sistêmica de salina, aumentando o tempo de aproximação e diminuindo o tempo escondido na etapa de exposição ao odor e ao contexto. Este resultado indica uma resposta do tipo ansiolítica tanto na exposição ao estímulo aversivo (medo inato), como na abolição do medo condicionado. No segundo caso, a resposta apresentada quando da exposição ao contexto depende basicamente de processos de aprendizagem e memória. A este respeito, muitos estudos têm apontado o envolvimento do complexo receptor GABA_A nos processos mnemônicos. Compostos que aumentam a ação do GABA, como o midazolam, prejudicam o processamento da memória. (Chapouthier e Venault, 2004). Estudos experimentais e clínicos mostraram ainda um efeito

amnésico para os benzodiazepínicos. Em animais experimentais, estes fármacos demonstraram causar amnésia, em diferentes variantes de uma tarefa de esquiva passiva (Costa e Tomaz, 1998, Izquierdo et al., 1999; Zarrindast et al., 2002). Diante dessas evidências é possível afirmar que o efeito do tipo ansiolítico relatado acima, seja decorrente de um prejuízo mnemônico ocorrido durante a exposição ao odor de gato, nos animais tratados com midazolam. Isto é, a falha de uma resposta aversiva na situação de exposição ao contexto pode ser devida não a um efeito ansiolítico, mas sim ao fato do animal não se lembrar da situação aversiva a que foi exposto e isto deve ser verificado em experimentos posteriores.

No parâmetro relacionado à avaliação de risco, o tratamento prévio com midazolam reduziu o tempo de *head-out* na exposição ao odor de gato, porém esta resposta não difere estatisticamente daquela dos outros grupos na etapa de exposição ao contexto. A dose de 0,50 mg/kg reduziu apenas os parâmetros número de aproximações e número de cruzamentos na exposição ao contexto, parâmetros relacionados à atividade locomotora e não necessariamente à atividade do tipo ansiolítica. Por sua vez, a dose de 0,75 mg/kg aumentou o tempo de aproximação tanto na etapa de exposição ao odor, quanto na exposição ao contexto, o que descarta a possibilidade de uma interferência motora promovida pela dose menor ser a responsável pelo efeito observado. No que diz respeito ao parâmetro tempo escondido, esta dose reduziu a permanência do animal no compartimento fechado na etapa de exposição ao odor, porém não foi capaz de reduzir este parâmetro na exposição ao contexto. A mesma dose promoveu um aumento no número de aproximações tanto na etapa de exposição ao odor, quanto na exposição ao contexto. Esta dose também aumentou o número de

cruzamentos na etapa da exposição ao odor. Assim, nas doses maiores, o midazolam modificou a atividade motora dos animais, o que pode ser confundido com o efeito ansiolítico.

Acerca da atividade ansiolítica do midazolam no teste do odor de gato, McGregor e colaboradores (2004) demonstraram, através de estudos imunohistoquímicos, que as alterações comportamentais de ratos tratados com midazolam associam-se a uma redução na expressão de proteína *fos* em diversas estruturas neurais envolvidas na resposta defensiva durante a exposição ao odor de gato (McGregor et al., 2004). Nesse estudo, a simples exposição de ratos controle ao odor de gato induziu alteração na expressão da proteína *fos* nas camadas glomerular, mitral e granular do bulbo acessório olfatório posterior. A camada granular desta estrutura mostrou uma atenuação da expressão de proteína *fos* após o tratamento midazolam. Este fato colocou uma questão crítica em debate: a atenuação da resposta defensiva causada pelo midazolam seria devido a uma deficiência no processamento sensorial olfatório dos ratos? Os pesquisadores chegaram à conclusão de que as deficiências sensoriais seriam incapazes de justificar os resultados, uma vez que as principais áreas de projeções neuronais do bulbo olfatório acessório exibem apenas uma pequena redução na expressão de proteína *fos* após a administração de midazolam (McGregor et al., 2004). Assim, por apresentar uma modificação na grande maioria dos parâmetros analisados, os efeitos comportamentais eliciados pela dose de 0,25 mg/kg de midazolam foram tomados como padrão de atividade ansiolítica nas outras etapas experimentais do presente estudo.

Avaliando os parâmetros comportamentais de ratos tratados por via i.c.v com o antagonista NK1, WIN51,708 antes da exposição ao odor de gato, observamos um efeito do tipo ansiolítico para este antagonista, evidenciado pela expressiva redução do comportamento de defesa, mostrado no aumento do tempo de aproximação nos ratos tratados com 10 pmol do antagonista NK. E somado a isso, a redução do tempo escondido nas doses de 1,10 e 100 pmol durante a exposição ao odor de gato (medo inato) também sugere um efeito do tipo ansiolítico para este antagonista no paradigma do odor do gato. No que diz respeito aos parâmetros relacionados à locomoção, as doses de 1 e 10 pmol do antagonista NK1 foram capazes de aumentar tanto o número de aproximações à fonte de odor, quanto o número de cruzamentos durante a exposição ao odor de gato, indicando um aumento da locomoção nos animais tratados com WIN. Estes efeitos comportamentais não se repetiram na exposição ao contexto (medo condicionado). Adicionalmente, nenhuma das doses de WIN51,708 diminuiu o tempo de *head-out*, parâmetro relacionado à avaliação de risco. A etapa de exposição ao contexto pressupõe processos de aprendizado e memória plenamente operantes. A este respeito, sabe-se que a SP participa destes processos, envolvendo receptores NK1, mas os resultados são conflitantes.

Alterações nesses processos poderiam ser responsáveis pelos efeitos aqui observados para o antagonista NK1. No entanto, a ausência de efeitos deste composto na situação de contexto, descarta esta possibilidade e reforça a sugestão de um efeito do tipo ansiolítico envolvendo o bloqueio de receptores NK1 avaliado neste paradigma experimental.

Assim, a curva dose-resposta ao antagonista NK1 apresenta um formato em U invertido, principalmente no parâmetro tempo de aproximação. Estudos com neuropeptídeos, particularmente com a SP, apresentaram este mesmo padrão de curva dose-resposta (Teixeira, 1996; Varty et al., 2002a; 2002b) e, em geral, são devidos à ação dos neuropeptídeos em diferentes tipos de receptores (no caso, NK1, NK2 e NK3), que quando ativados podem eliciar efeitos opostos, como ansiolítico (NK3) e ansiogênico (NK1 e NK2), mostrado nos estudos prévios de nosso grupo (Teixeira et al., 1996; Ribeiro et al., 1998; Gavioli et al., 1999; Duarte et al., 2004).

A efetividade do antagonista NK1 WIN51,708 em induzir respostas do tipo ansiolítica nos parâmetros comportamentais avaliados demonstra a participação deste sistema, SP/receptores NK1, na modulação do medo/aversão avaliada pelo teste do odor de gato. Portanto, pode-se afirmar que a SP é, em parte, responsável pelas respostas comportamentais exibidas por ratos expostos ao odor de predador, desempenhando provavelmente um papel tônico na modulação do medo/aversão, como evidenciado no teste de exposição ao odor do gato. A este respeito e relacionado ao nosso estudo, a administração sistêmica do antagonista de receptor NK₂ SR 48968, em ratos previamente expostos a um gato, reduziu as respostas de esquiva quando os animais foram expostos ao odor de gatos. Efeitos similares foram observados em camundongos expostos a ratos após o tratamento repetido com o mesmo antagonista, um efeito do tipo ansiolítico desprovido de prejuízo da atividade motora (Griebel et al., 2001).

De uma maneira geral, os neuropeptídeos, particularmente a SP, têm sido envolvidos na modulação das reações de defesa (Rupniack e Kramer, 1999). Várias evidências do envolvimento da SP nas respostas a estímulos aversivos já foram descritas após a administração central de SP em ratos. Essa administração induz um conjunto de respostas cardiovasculares e comportamentais que representa muito proximamente respostas a estímulos estressantes (Unger et al., 1988; Culman et al., 1995; Mello et al, 2007). A SP controla várias respostas comportamentais, neuroquímicas e cardiovasculares do estresse (para revisão ver Rupniak e Kramer, 1999). Estudos neuroquímicos têm mostrado mudanças na quantidade de SP em distintas regiões do cérebro em resposta a estímulos estressantes e tanto o aumento quanto a diminuição da concentração de SP têm sido relatados. Ratos imobilizados e posteriormente colocados em gaiolas isoladas mostraram um aumento nas fibras imunorreativas à SP na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Brodin et al., 1994; Rosén et al., 2004). Aumentos na concentração de SP foram encontrados no septo e no hipocampo após o animal ter sido submetido a uma sessão de choque nas patas (Siegel *et al.*, 1987). Takamaya e colaboradores (1986) demonstraram haver uma diminuição na quantidade de SP no septo, hipocampo e corpo estriado de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Estes estudos têm sugerido que a SP presente nas vias cerebrais envolvidas com processos de defesa são ativadas pelo estresse e, deste modo, o bloqueio farmacológico dos receptores NK₁ poderia fornecer uma nova ferramenta para o tratamento de distúrbios da ansiedade e depressão (Rupniak *et al.*, 1999).

Outro estudo demonstrou que um antagonista seletivo do receptor NK₁, administrado no ventrículo lateral, é capaz de atenuar a expressão de *c-fos* no loco cerúleo de ratos submetidos ao estresse por imobilização, sugerindo que a substância P está envolvida nas respostas centrais ao estresse e que o receptor NK₁ pode mediar efeitos terapêuticos em casos de distúrbios psiquiátricos relacionados a situações estressantes, como a ansiedade e a depressão (Hanh & Bannon, 1999). Estes dados estão de acordo com evidências de que a exposição a estímulos estressantes e aversivos induz mudanças na quantidade de SP, e da sua ligação com respectivos receptores em áreas cerebrais envolvidas no processamento de emoções de reações ao estresse como a amígdala e a região septal (Herpfer et al., 2005).

Embora o mecanismo preciso da atividade do tipo ansiolítica promovida pelo antagonismo do receptor NK1 não esteja totalmente esclarecido, uma das possíveis explicações se baseia no fato de que existe uma sobreposição anatômica substancial entre neurônios monoaminérgicos e receptores NK1, e destes receptores com neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos. (Kramer et al., 1998; McLean et al., 1991; Sergejev et al., 1999; Szabo et al., 2001; Chen et al., 2000; Santarelli et al., 2001; Liu et al., 2002; Merigui, 2002; Hokfelt et al., 1987), neurotransmissores clássicos na modulação do medo/aversão (Graeff, 1994). O sistema GABAérgico está inequivocamente envolvido na modulação da ansiedade. Ribeiro e De Lima (2001), investigando se havia uma inter-relação entre esses dois sistemas, ou seja, o neurocinérgico e o GABAérgico, na modulação da ansiedade experimental em camundongos, avaliada no LCE,

observaram que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com diazepam era revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK₂ e antagonista NK₃, respectivamente, mas não pela substância P, agonista NK₁. Por outro lado, a administração central dos antagonistas NK₁ e NK₂, mas não do agonista NK₃, revertia a atividade ansiogênica observada após o tratamento agudo sistêmico com pentilenotretazol em camundongos avaliados observada no mesmo paradigma experimental. A administração central de antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂, FK 888 e SR 48968, respectivamente, produziu efeitos ansiolíticos tanto nos animais controle, como naqueles onde o diazepam, administrado repetidamente, foi retirado abruptamente. No entanto, o agonista de receptores NK₃, senktide, só apresentava seu efeito ansiolítico nos animais do grupo controle, sugerindo que existe uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico na modulação da ansiedade experimental, envolvendo especialmente os receptores dos tipos NK₁ e NK₂, mas o papel dos receptores NK₃ parece não ser relevante a não ser no efeito ansiolítico agudo do diazepam. Uma possibilidade para explicar esses achados seria a de que as neurocininas, interagindo com seus receptores (NK₁, NK₂ e NK₃), modulariam a ansiedade experimental em áreas específicas do SNC, enquanto os compostos que atuam no complexo receptor GABA_A atuariam independentemente nessa modulação e nossos resultados nada mais seriam que a somatória dessas modulações específicas, sem qualquer correlação entre os dois sistemas de neurotransmissores, o neurocinérgico e o GABAérgico. Em estudo recente em nosso laboratório Duzzioni e colaboradores (2008) estudaram a inter-relação da

SP e do diazepam na modulação do comportamento de ratos avaliados no labirinto em T, verificando que o sistema GABAérgico interfere com a modulação da ansiedade pela SP.

Além de modular a atividade monoaminérgica, principalmente no que diz respeito à noradrenalina e à serotonina, outro mecanismo pelo qual a SP pode participar da eliciação de respostas defensivas frente a estressores é a sua co-localização com neurônios do eixo HPA. Uma evidência com base histológica desta participação é o fato de que a injeção central de antagonistas NK1 diminui a atividade de *c-fos* no núcleo paraventricular do hipotálamo, considerado um dos principais pontos de ativação do eixo HPA (Sawchenko et al., 1996; Li et al., 1998). Drogas ansiolíticas como os benzodiazepínicos exercem efeitos similares na supressão da excitabilidade do eixo HPA induzida por estresse (Kalman et al., 1997; Imaki et al., 1995). A respeito da possível atividade da SP no eixo HPA, recentemente, mostramos um aumento de marcadores bioquímicos de estresse (corticoesterona, ácidos graxos livres e glicose) após a administração central i.c.v. da SP (Mello et al., 2007).

Com relação às áreas envolvidas na atividade do tipo ansiolítica desencadeada pela SP, Ebner e colaboradores descreveram que vários estímulos estressores aumentam o efluxo de SP em regiões da amígdala e do septo lateral (Ebner et al., 2008). A área septal é vista como uma interface entre regiões límbicas telencefálicas, regiões hipotalâmicas e áreas do tronco cerebral, relacionadas com funções autonômicas e endócrinas (para revisão ver Paxinos, 1998). Estas

conexões sugerem que a área septal possui um envolvimento direto na expressão da ansiedade.

Em particular, o septo lateral contém terminais axônicos com uma grande expressão de receptores para neurotransmissores e neuromoduladores que estão relacionados ao estresse e à ansiedade. É possível que o efeito ansiolítico de alguns compostos esteja relacionado com interações com estes neurotransmissores e neuromoduladores no septo lateral. Além disso, uma longa literatura de estudos com lesões no septo lateral sugere que esta região anatômica esteja relacionada ao controle do medo (Sheehan et al., 2004). Estudos prévios do nosso laboratório demonstravam que o septo lateral é um importante local na mediação de respostas ansiogênicas induzidas pela SP via receptores NK1. Gavioli e colaboradores, em 1999, observaram que a administração de (SP) no septo lateral, em ratos submetidos ao LCE, induzia dois tipos de comportamentos conhecidos como “darting” e “freezing”, reações que refletem um comportamento de defesa frente a uma situação aversiva e, como proposto por Blanchard et al. (1989), um comportamento de luta ou fuga. Na verdade, os receptores NK₁ e NK₂ parecem modular o efeito ansiogênico da SP no septo lateral (Gavioli et al., 2002). Estes estudos confirmam a relevância do septo lateral como substrato neuroanatômico envolvido no efeito ansiogênico da SP.

Em nossos experimentos o antagonista WIN51,708, apresentou uma atividade do tipo ansiolítica por induzir um aumento do tempo de aproximação do animal ao estímulo aversivo, tanto na etapa de exposição ao odor, quanto na exposição ao contexto. O antagonista taquicinérgico NK1 também reduziu o tempo

em que o animal permaneceu escondido no compartimento fechado nas duas etapas (odor e contexto), fortalecendo a idéia da participação dos receptores NK1 na modulação do medo/aversão pela SP, em ratos avaliados no teste de odor de gato, em concordância com os resultados observados em outros testes comportamentais já descritos. Com relação aos parâmetros relacionados à atividade locomotora, o antagonista NK1 promove um aumento do número de aproximações dos animais ao odor de gato, quando comparados com o grupo controle. Esta resposta se repete na exposição do animal ao contexto. O número de cruzamentos também aumenta nos animais tratados com WIN51,708. Por sua vez, o tempo de *head-out* também diminui nos ratos tratados com o antagonista NK1, resposta esta que se repete na exposição ao contexto, confirmando o efeito do tipo ansiolítico deste antagonista NK1. Como demonstrado previamente, este parâmetro não sofreu alterações quando o WIN51,708 foi administrado i.c.v., o que sugere que a administração intra-septal elicie respostas mais seletivas. Este resultado vai de encontro à proposta de envolvimento do septo lateral com o comportamento de avaliação de risco, proposta por outros autores (McNaughton e Corr, 2004).

Em resumo, nossos resultados indicam que o sistema SP/receptores NK1 tem uma importante participação na elaboração de respostas comportamentais de defesa emitidas por ratos expostos ao odor de gato e que a área do septo lateral desempenha um papel fundamental na expressão destes comportamentos, principalmente no comportamento de avaliação de risco.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O conjunto odor neutro/caixa de esQUIVA ao odor não foi capaz de eliciar comportamentos de defesa em ratos expostos a este sistema. Por sua vez, a flanela impregnada com odor de gato funciona como estímulo aversivo capaz de induzir respostas comportamentais de defesa nos ratos tratados com salina.
- O benzodiazepínico midazolam, administrado sistemicamente antes da exposição ao odor, impediu os efeitos comportamentais da exposição ao odor de gato, mostrando, como esperado, um efeito ansiolítico.
- A administração i.c.v. de WIN 51,708, antagonista neurocinérgico NK1, impediu os efeitos comportamentais defensivos de ratos expostos ao odor de gato, indicando o envolvimento tônico do neuropeptídeo SP nas respostas comportamentais ocasionadas pelo estresse ao odor de gato.
- A administração intra-septal (septo lateral) de WIN 51,708 impediu os efeitos comportamentais defensivos de ratos expostos ao odor de gato, de maneira mais eficiente que a administração i.c.v., demonstrando o envolvimento desta estrutura nas reações de defesa e de avaliação de risco em ratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behav. Brain. Sci.** 2:201-241, 1979.

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, 1183–1186, 1996.

AGUIAR, M. S., BRANDÃO, M. L., Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behav Pharmacol** 369-373, 1994

ALMAY, B. G., JOHANSSON, F., VON KNORRING, L., LE GREVÉS, P., TERENIUS, L., Substance P in CSF of patients with chronic pain syndromes. **Pain** 33(1):3-9, 1988.

BARETTA, I. P., ASSREUY, J., DE LIMA, T. C. Nitric oxide involvement in the anxiogenic-like effect of substance P. **Behav Brain Res** 121(1-2):199-205, 2001.

BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. **Pharmacol. Rev.** 28: 127-177, 1976.

BERNATZKY, G., SARIA, A. Behavioral effect of the NK2 antagonist SR 48968 but not of the NK1 antagonist SR 140333 in the mouse black and white box model. **Soc Neurosci Abstr.** 21: 1696, 1995.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; Defensive reactions in the albino rat. **Learn Motiv** 21:351-362, 1971.

BLANCHARD, D. C., MARKHAM, C., YANG, M., HUBBARD, D., MADARANG, E., BLANCHARD, R.J. Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. **Behav Neurosci** 117, 268–360, 2003.

BLANCHARD, D. C., CANTERAS, N. S., MARKHAM, C. M., PENTKOWSK, N. S., BLANCHARD, R. J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehav Reviews**, 29:1243–53, 2005.

BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, C. D. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology an Biological Psychiatry**. 13: S3-S14. 1989a.

BLANCHARD, R. J., BLANCHARD, D. C. Antipredator defense behaviors in a visible burrow system. **J Comp Psychol** 103:70-82. 1989b.

BLANCHARD R. J., GRIEBEL G., HENRIE J., A, BLANCHARD D., C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci Biobehav Rev** 21:783–9., 1997.

BLANCHARD D. C, BLANCHARD R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol** 1988;39:43–68., 1988.

BLANCHARD, R. J., YUDKO, E. B., RODGERS, R. J., BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav and Brain Res** 58:155-166. 1993.

BRODIN, E. ROSÉN, A., THEODORSSON, E., JONCZYK, A., SANDBERG, B. E., BRODIN, K. Multiple molecular forms of tachykinins in rat spinal cord: a study comparing different extraction methods. **Regul Pept.**14;52(2):97-110, 1994.

BUBSER, M. e DEURCH, A. Y. Stress induces Fos expression in neurons of the thalamic paraventricular nucleus that innervate limbic forebrain sites. **Synapse** 32, pp. 13–22, 1999.

BUCK, S. H., HELKE, C. J., BURCHER, E., SHULTS, C. W., O'DONOHUE, T. L. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. **Peptides**, 7: 1109-1120, 1986.

CAMPEAU, S. e DAVIS, M. Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **J. Neurosci.** 15, pp. 2301–2311, 1995.

CARVALHO, M. C., MASSON, S., BRANDÃO, M. L., DE SOUZA SILVA, M. A. Anxiolytic-like effects of substance P administration into the dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. **Peptides** 29(7):1191-200, 2008.

CHANDRA, P., HAFIZI, S., MASSEY-CHASE, R., GOODWIN, G., COWEN, P., HARMER, C. NK1 receptor antagonism and emotional processing in healthy volunteers. **J Psychopharmacol.** 2009 (in press)

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

CHEN, L. W., WEI, L. C., LIU, H. L., RAO, Z. R. Noradrenergic neurons expressing substance P receptor (NK1) in the locus coeruleus complex: a double immunofluorescence study in the rat. **Brain Res.** 873:155-9, 2000.

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

DE ARAÚJO, J. E., HUSTON, J. P., BRANDÃO, M. L. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Exp. Brain Res.**, 123(1-2): 84-89, 1998.

DE ARAÚJO, J. E., SILVA, R. C., HUSTON, J. P., BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not 1-7 N terminal injected into the dorsal periaqueductal gray matter. **Peptides**, 20(12): 1437-1443, 1999.

DEBELJUK, L., VILLANUA, M. A., BARTKE, A. Substance P variations in the hypothalamus of golden hamsters at different stages of the estrous cycle. **Neurosci. Lett.** 137: 178-180, 1992.

DIELENBERG, R. A., MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats toward predatory odors: A review. **Neurosci Biobehav Rev.** 25:597-609. 2001a.

DIELENBERG, R. A., HUNT, G. E., MCGREGOR, I. S. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience** 104(4):1085-97. 2001b.

DIELENBERG, R. A., ARNOLD, J. C., MCGREGOR, I. S., Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 62:197-201, 1999.

DUARTE, F. S., TESTOLIN R. e DE LIMA T. C. 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.

DUNAN, G. E., KNAPP, D. J. e BREESE, G. R., 1996. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.** 713, 79–91, 1996.

DUZZIONI, M., CALIXTO, A. V., DUARTE, F. S., DE LIMA, T. C., Modulation of anxiety in rats evaluated in the elevated T-maze: evidence of the relationship

between substance P and diazepam. **Behav Brain Res.** 11;187(1):140-5. , 2008.

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 U S A.** 4280-5. Epub, 2004.

EBNER, K., MUIGG, P., SINGEWALD, G., SINGEWALD, N. Substance P in stress and anxiety NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. **Acad. Sci.** 1144: 61–73, 2008.

ECHEVERRY, M., B., HASENÖHRL, 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.** Jul;22(7):1031-6, 2001.

ELLIOTT, P. J., IVERSEN, S. D., Behavioural effects of tachykinins and related peptides. **Brain Res.** 27;381(1):68-76, 1986.

ENDRES, T., APFELBACH, R., FENDT, M., Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. **Behav Neurosc.** 119 (4) 1004-10, 2005.

EBNER K., e SINGEWALD N. The role of substance P in stress and anxiety responses. **Amino Acids** 31, 251–272, 2006

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

FENDT, M., ENDRES, T., LOWRY C. A., APFELBACH, R., MCGREGOR, I. S., TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. **Neurosci Biobehav Rev** 29(8):1145-56, 2005.

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

FILE, S. E., Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol Biochem Behav**. 58(3):747-52, 1997.

FONG, T. M., YU, H., STRADER, C. D. Molecular bases for species selectivity of the NK1 receptor antagonist CP 96,345 and RP 67,580. **J. Biol. Chem.**, **267**: 25668-25671, 1992.

FURMARK T., APPEL L., MICHELGARD A. WAHLSTELD K., AHS F., ZANCAN S., JACOBSSON E., FLYCKT K, LANGSTROM B., FREDRIKSON M. Cerebral blood flow changes after treatment of social phobia with the neurokinin-1 antagonist GR205171, citalopram, or placebo. **Biol. Psychiatry** 58, 132–142., 2005.

GARCIA, M., SAKAMOTO, K., SHIGEKAWA, M., NAKANISHI, S., ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochem. Pharmacol.**,48: 1735-1741, 1994.

GAVIOLI, E. C., CANTERAS, N. S., DE LIMA, T. C. Anxiogenic-like effect induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. **Neuroreport**. ,1999 .

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.

GEORGE, D. T., GILMAN, J., HERSH, J., THORSELL, A., HERION, D., GEYER, C., PENG, X., KIELBASA, W., RAWLINGS, R., BRANDT, J. E., GEHRLERT, D. R., TAUSCHER, J. T., HUNT, S. P., HOMMER, D., HEILIG, M. Neurokinin 1 receptor antagonism as a possible therapy for alcoholism. **Science** 319, 1536–1539. , 2008.

GERARD, N. P., BAO, L., PING, H. X., GERARD, C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. **Regul Pept.** 43: 21-35, 1993.

GERARD, N. P., GARRAWAY, L. A., EDDY, R., SHOWS, T. B., IJIMA, H., PAQUET, J. L., GERARD, C. Human substance P receptor (NK1): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. **Biochemistry** 30: 10640-10646, 1991.

GRAEFF, F., G., Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz J Med Biol Res.** 27(4):811-29, 1999 a.

GRAEFF, F.G. Medicamentos Ansiolíticos. In: GRAEFF, F.G. e GUIMARÃES, F.S. (Ed.) **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, p.123-160, 1999 b.

GRAY, J.A., The Neuropsychology of Anxiety. **Oxford. University Press, New York.** 1982.

GRAY, J.A.; McNAUGHTON, N.; The neuropsychology of anxiety. **Second edition. New York: Oxford University Press.** 2000.

GRIEBEL, G., PERRAULT, G., SOUBRIÉ, P. Effects of SR48968, a selective non-peptide NK2 receptor antagonist on emotional processes in rodents. **Psychopharmacology (Berl).** 158(3):241-51, 2001.

HAFIZI, S., CHANDRA, P. e COWEN, J. Neurokinin-1 receptor antagonists as novel antidepressants: trials and tribulations. **Br. J.Psychiatry**. 191, 282–284, 2007.

HANH, M. K., BANNON, M. J., Stress-induced C-fos expression in the rat locus coeruleus is dependent on neurokinin 1 receptor activation. **Neuroscience** 94(4):1183-8., 1999.

HASENÖRL, R. U., JETIENS, O., DE SOUZA, S. 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**. 7;354(2-3):123-33, 1998.

HASENÖHRL RU, SOUZA-SILVA MA, NIKOLAUS S, TOMAZ C, BRANDAO ML, SCHWARTING R., K, HUSTON J., P. Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. Neuropeptides. Oct;34(5):272-80, 2000.

HERPFER, I., KATZEV, M., FEIGE, B., FIEBICH, B. L., VODERHOLZER, U., LIEB, K. Effects of substance P on memory and mood in healthy male subjects. **Hum Psychopharmacol**. 22(8):567-73, 2007.

HERSHEY, A. D. e KRAUSE, J. E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. **Science**. 247: 958-962, 1990.

HERPSER, I., LIEB, K., Substance P receptor antagonists in psychiatry: rationale for development and therapeutic potential. **CNS Drugs**19(4):275-93, 2002.

HÖKFELT, T., PERNOV, B., NILSSON, G., WETTERBERG, L., GOLSTEIN, M., JEFFCOATE, S. L. Dense plexus of substance P immunoreactive nerve terminals in eminentia medialis of the primate hypothalamus. **Proc Natl Acad Sci.**75: 14013-1015, 1978.

HOLMES, A., HEILIG, M., RUPNIAK, N. M., STECKLER, T. e GRIEBEL, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends Pharmacol. Sci.** 24, 580–588., 2003.

HOLMGREN, S. JENSEN, J. Evolution of vertebrate neuropeptides. **Brain Res Bull.** 55(6):723-35, 2001.

HOPKINS, B., POWELL, S. J., DONKS, P., BRIGGS, I., GRAHAM, A. Isolation and characterization of the human lung NK-1 receptor cDNA. **Biochem Biophys Res Commun.** 180: 1110-1117, 1991.

HUBBARD, D., BLANCHARD, D. C., YANG, M., MARKHAM, C. M., GERVACIO, A., CHUN-I, L., BLANCHARD, R. J. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. **Physiol Behav.** 80(4):525-30, 2004.

IMAKI, T. X. Q. WANG, T. SHIBASAKI, HARADA, S., CHEKADA, N., TAKAHASHI, C., NARUSE, M., DEMURA, H., Chlordiazepoxide attenuates stress-induced activation of neurons, corticotropin-releasing factor (CRF) gene transcription and CRF biosynthesis in the paraventricular nucleus (PVN). **Brain Res. Mol.** 32: 261–270, 1995.

JASPERS, K. Psicopatologia Geral. Tradução de Samuel Penna Reis. Segunda edição. Rio de Janeiro, Atheneu IN: HETEM, L.A.B (Ed.). **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade.** Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional Ltda, 1997.

JESSOP, D. S., CHOWDREY, H. S., BISWAS, S., LIGHTMAN, S. L. Substance P and substance K in the rat hypothalamus following monosodium glutamate lesions of the arcuate nucleus. **Neuropeptides**. 18: 165-170, 1991.

JU, G., LIU, S. J., ZHANG, X. Peptidergic innervation of the pars distalis of the adenohypophysis. **Neuroendocrinology**, 53 (Suppl. 1): 41-44, 1991.

KAGE, R., MCGREAGOR, G. P., THIM, L. e CONLON, J. M. Neuropeptide γ : a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from γ -preprotachykinin. **J. Neurochem**. 50:1412-1417, 1988.

KANAZAWA, I. e JESSELL, T. Post-mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. **Brain Res**. 117: 362-367, 1976.

KANGAWA, K., MINAMONO, N., FUKUDA, A. e MATSUO, H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 114 533-540, 1983.

KALMAN, B. A., P. J., Kim, M. A., COLE, M. A., CHI, M. S., SPENCER, R. L., Diazepam attenuation of restraint stress-induced corticosterone levels is enhanced by prior exposure to repeated restraint. **Psychoneuroendocrinology**. 22: 349–360, 1997.

KAWANA, S., LIANG, Z., NAGANO, M., SUZUKI, H. Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice. **J. Dermatol. Sci**. 42(1):47-54, 2006.

KELLER, M., MONTGOMERY, S., MORRISON, M., SNAVELY, D., HARGREAVES, R., HIETALA, J., LINES, C., BEEBE, K., REINES, S. Lack of efficacy of the substance P (neurokinin1 receptor) antagonist aprepitant in the treatment of major depressive disorder. **Biol. Psychiatry**. 59, 216–223., 2006.

KERTES, E., LÁSZLÓ, K., BERTA, B., LÉNÁRD, L. Effects of substance P microinjections into the globus pallidus and central nucleus of amygdala on passive avoidance learning in rats. **Behav Brain Res.** 198(2):397-403, 2009.

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

KOVACS, K. J., c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochem. Int.** 33: 287–297, 1998

KRAMER, M. S., CUTLER, N., FEIGHNER, 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., Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science.** 281, 1640–1645., 1998.

KRAMER, M. S., WINOKUR, A., KELSEY, J. PRESKORN, S. H., ROTHSCHILD, A. J., SNAVELY, D., GHOSH, K., BALL, H. A., REINES, S. A., MUNJACK, D., APTER, J.T., CUNNINGHAM, L., KLING, M., BARI, M., GETSON, A., LEE, Y. Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. **Neuropsychopharmacology.** 29, 385–392., 2004.

KRASE, W. M., KOCK e SCHNITZLER, H. U. Substance P is involved in the sensitization of the acoustic startle response by footshocks in rats. **Behav. Brain Res.** 63: 81–88. 1994.

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

LI, H. Y., e SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in 'neurogenic' stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. **J. Comp. Neurol.** 393, pp. 244–266, 1998.

Li, H.Y. e P.E. SAWCHENKO. Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in "neurogenic" stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. **J. Comp. Neurol.** 393: 244–266, 1998.

LISTER, R., G., The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**. 92(2):180-5, 1987.

LIU, R., DING. Y., Aghajanian G.K. Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacology** 27: 329-40, 2002.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. **J. Autonom. Pharmacol.**, 13: 23-93, 1993.

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

MAGGI, C.A. The troubled story of tachykinins and neurokinins. **Trends Pharmacol.Sci.** 21(5):173-5, 2000.

MAGGIO, J.E., SANDERBERG, B.E.B., BRADLEY, C.V., IVERSEN, L.L., SANTIKAN, S., WILIAMS, B.H., HUNTER, J.C. e HANDLEY, M.R. Substance K:

Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord (Ed.) **Substance P**. Dublin: Boole, p. 20-21, 1983.

MARKS, I. M., Fears, phobias, and rituals: panic, anxiety, and their disorders. Oxford University Press, New York. IN: HETEM, L.A.B (Ed.). **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade**. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional Ltda, pg, 98.1997

MATHEW, S. J., PRICE, R. B. e CHARNEY, D. S. Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders. **Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.** 148C, 89–98., 2008.

McGREGOR, I. S., SCHRAMA L., AMBERMOON, P., DIELENBERG, R.A., Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. **Behav Brain Res.** 129(1-2):1-16, 2001.

McGREGOR, I. S., HARGREAVES, G.A., APFELBACH, R., HUNT, G.E. Neural Correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **The J. of Neuroscience.** 24(17):4134–4144, 2004.

McNAUGHTON, N. e CORR, P.J. A two dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuro Biobehav Rev.** 28:285-305, 2004.

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

MELLO, D. M., MARCINICHEN, D.R., MADRUGA, D., BRANCO, R., PASCHOALINI, M. A., DE LIMA, T. C. Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P. **Behav Brain Res.** 6;181(2):232-8, 2007.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog Neurobiol.** 70:83-244, 2003.

MILLAN, M. J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. **Pharmacol Ther.** 110, 135–370., 2006.

MITSUHASHI, M., OHASHI, Y., SHICHILO, S., CHRISTIAN, C., SUDDUTH, K. J., HARROWE, G., PAYAN, D. G. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor. **J. Neurosci Res.** 32: 437-443, 1994.

MXLEAN, S., GANONG, A.H., SEEGER, T F., BRYCE, D.K., PRATT, K.G., REYNOLDS, L.S., SIOK, C. J., LOWE, J. A. HEYM, J. Activity and distribution of binding sites in brain of a nonpeptide substance P (NK1) receptor antagonist. **Science.** 253:437-9, 1991.

NAWA, H., DOTEUCHI, M., IGANO, K., INOUYE, K., NAKANISHI, S. Substance K: a novel mammalian tachykinin that differs from substance P in its pharmacological profile. **Life Sci.** 19;34(12):1153-60, 1984.

NAKAJIMA, Y., TSUCHIDA, K., NEGISHI, M., ITO, S., NAKANISHI, S. Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of bath phosphatidyl-inositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. **J. Biol.Chem.** 267: 2437-2442, 1992.

NIKOLAUS, S., HUSTON, J. P. e HASENOHRL, R. U. The neurokinin-1receptor antagonist WIN 51,708 attenuates the anxiolytic-like effects of ventralpallidal substance P injection. **Neuroreport.** 10, 2293–2296., 1999.

O'DONOHUE, T. L., HELKE, C. J., BURCHER, E., SHULTS, C. W., BUCK, S. H. Autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. APUD, Substance P and neurokinins. HENRY, J. L.; COUTURE, R.;CUELLO, A. C.; PELLETIER, G.; QUIRION, R. e REGOLI, D. (Eds.), **New York: Springer-Verlag.** 93-95, 1987.

OTSUKA, M. e YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**73(2):229-308, 1993.

PAXINOS, G., e WATSON The rat brain in stereotaxic Coordinates. **Academic Press. New York.**, 1998.

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

PENNEFATHER, J. N., LECCI, A., CANDENAS, M.L., PATAK, E., PINTO.F.M., MAGGI, C.A. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sci.** 74(12):1445-63, 2004.

PEREGRINO, A. Ansiedade Normal e Patológica. In: GRAEFF, F.G. e HETEM, L.A.B. (Ed.). **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade.** Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional Ltda, , p.3-12., 1997

PICHOT, P. Ansiedade: Fenomonologia e Psicometria. IN: **Tratamento atual da ansiedade.** Edição da Hoechst AG, República Federal da Alemanha, v.2, 1985.

REGOLI, D., BOUDON, A., FAUCHERE, J. C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.** 46: 551-589, 1994.

RIBEIRO, S. J., DE LIMA, T. C. Naloxone-induced changes in tachykinin NK3 receptor modulation of experimental anxiety in mice. **Neurosci Lett.** 24;258(3):155-8, 1998.

RIBEIRO, R., L., DE LIMA, T., C., Participation of GABAA receptors in the modulation of experimental anxiety by tachykinin agonists and antagonists in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 26(5):861-9, 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.

ROSÉN, A., ZHANG, Y. X., LUND, I., LUNDEBERG, T., YU, L. C., Substance P microinjected into the periaqueductal gray matter induces antinociception and is released following morphine administration. **Brain Res.** 19;1001(1-2):87-94, 2004.

RUPNIAK, N. M. New insights into the antidepressant actions of substance P (NK1 receptor antagonists. **Can J Physiol Pharmacol.** 80, 489–494., 2002.

RUPNIAK, N. M., KRAMER, M. S., Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK1) antagonists. **Trends Pharmacol Sci.** 20(12):485-90, 1999.

RUPNIAK, N., CARLSON, E. C., HARRISON, T., OATES, B., SEWARD, E., OWEN, S., DE FELIPE, C., HUNT, S. E WHEELDON, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacol**, 39: 1413-1421, 2000.

SANTARELLI, L., GOBBI, G., DEBS, P. C., SIBILLE, E. T., BLIER, P., HEN, R. e HEATH, M. J. 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.

SARIA, A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative Functions. **European Journal of Pharmacology.** 375 1999 51–60, 1999.

SAWCHENKO, P. E, BROWN, E. R., CHAN, R. K., ERICSSON, A., ROLAND, B. L., KOVÁKS, K. J. Paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. **Prog. Brain Res.** 107: 201–222, 1996.

SCHIMADA, S., INAGAKI,S., KOBOTA,Y., KITO,S., SHIOTANI, Y. e TOHYAMA,M. Co-existence of substance P and enkefalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**425:256-262, 1987.

SEABROOK, G. R., FONG, T. M. Thapsigargin blocks the mobilisation of intracellular calcium caused by activation of human NK1 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Neurosci. Lett.**152: 9-12, 1993.

SERGEYEV, V., HOKFELT, T., HURD. Serotonin and substance P coexists in dorsal raphe neurons of the human brain. **Neuroreport** .10:3967-70, 1999.

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

SHAIKH, M. B. e SIEGEL, A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 2759-2779, 1994.

SHEEHAN, T. P., CHAMBERS, R. A. RUSSEL, D. S. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. **Brain Research Reviews** **46**: 71– 117, 2004.

SHULTS, C. W., QUIRION, B., 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.

SILVEIRA, M. C. L., SANDNER, G. e GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.** **56**, pp. 115–118, 1993.

SIEGEL, R. A., DUKER, E. M., PAHNAKE, U., WUTTKE, W. Stress-induced changes in cholecystokinin and substance P concentrations in discrete regions of the rat hypothalamus. **Neuroendocrinology** 46(1):75-81, 1987.

SINGEWALD, N., CHICCHI G. G, THURNER C. C, TSAO K. L, SPETEA M., SCHMIDHAMMER H, SREEPATHI H. K, FERRAGUTI F., SINGEWALD G. M, EBNER K. Modulation of basal and stress-induced amygdaloid substance P release by the potent and selective NK1 receptor antagonist L-822429. **J. Neurochem.** Sep; 106 (6):2476-88. Epub. Jul 30. 2008.

STOECKEL, M. E., PORTE, A., KLEIN, M. J., CUELLO, A. C. Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse compared with the distribution of other neuropeptides. **Cell Tissue Res.** 223: 533-544, 1982.

STRATTON, S. C., BEREFORD, I. J., HARVEY, F. J., TURPIN, M. P., HAGAN, R. M., TYERS, M. B. Anxiolytic activity of tachykinin NK2 receptor antagonists in the mouse light-dark box. **Eur J Pharmacol.**, 250(3), R11-2, 1993.

STRATTON, S. C., BERESFORD, I. J. M. AND HAGAN, R. M. GR159897, a potent non-peptide tachykinin NK2 receptor antagonist, releases suppressed behaviours in a novel aversive environment. **Br. J. Pharmacol.** 112 (Supl.): 49P, 2004.

SUNDELIN, J. B., PROVEDINI, D. M., WAHLESTEDT, C., LAURELL, H., POHL, J. S., PETERSON, P. A. Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. **Eur. J. Biochem.** 203: 625-631, 1992.

STOECKEL, M., E., PORTE, A., KLEIN, M. J., CUELLO, A. C., Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse compared with the distribution of other neuropeptides. **Cell Tissue Res.** 1982;223(3):533-44, 1982.

SWANSON L. W., COWAN, W. M., The connections of the septal region in the rat. **J. Comp. Neurol.** 186: 621-656, 1979.

SZABO, S.T., BLIER, P. Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. **Brain Res.** 922:9-20, 2001.

TAKAHASHI, L.K., NAKASHIMA, B.R., HONG, H., WATANABE, K. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. **Neuroscience Biobehavioral Reviews.** 29(8):1157-67, 2005.

TAKAMAYA, H., OTA, Z., OGAWA, N. Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. **Regulat. Pept.** 15, 239–248, 1986.

TAKEDA, Y., BLOUNT, P., SACHAIS, B. S., HERSHEY, A. D., RADDATZ, R., KRAUSE, J. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate and cyclic AMP second messenger responses. **J. Neurochem.** 59: 740-745, 1992.

TAKEDA, Y., CHOU, K. B., TAKEDA, J., SACHAIS, B. S., KRAUSE, J. E. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 179: 1232-1240, 1992.

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

TEIXEIRA, R. M., SANTOS, A. R. RIBEIRO, S. J., CALIXTO, J. B., RAE, G. A., DE LIMA, T.C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists

and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur J Pharmacol.** 5;311(1):7-14,1996.

TEIXEIRA, R. M., DUARTE, F. S., DE LIMA, T. C., Behavioral and immunological effects of substance P in female and male mice **Pharmacol Biochem Behav.** 79(1):1-9, 2004.

VARTY, G.B., MORGAN, C.A., COHEN-WILLIAMS, M. E., COFFIN, V. L., E CAREY, G.J. (2002a). The Gerbil elevated plus-maze I: behavioral characterization and pharmacological validation. **Neuropsychopharmacology** 27:357–370, 2002 (a).

VARTY, G. B., COHEN- WILLIAMS, M.E., MORGAN, C. A. PYLAK, U., DUFFY, R.A., LACHOWIKZ, J.E., CAREY, G. J., COFFIN, V. L. The gerbil elevated plus-maze II. Anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. **Neuropsychopharmacology** 27:371–379, (2002b).

YOKOTA, Y., SASAI, Y., TANAKA, K., FUJIWARA, T., TSUCHIDA, K., SHIGEMOTO, R., KAKIZUKA, A., OHKUBO, H., NAKANISHI, S. Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. **J. Biol. Chem.**264: 17649-17652, 1989.

WAHLESTEDT, C., Reward for persistence in substance P research. **Science** 11;281(5383):1624-5, 1998.

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.

ZANGROSSI, JR., Modelos animais de ansiedade. In: HETEM, L. F., GRAEFF. F. G. **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade.** Rio de Janeiro: Enc-editora Científica Nacional, p. 85-120, 1997.

ZHAO, Z., YANG, Y., WALKER, D. L., DAVIS, M. Effects of substance P in the amygdala, ventromedial hypothalamus, and periaqueductal gray on fear-potentiated startle. **Neuropsychopharmacology**. 331-40, 2009.