

**IRINÉIA PAULINA BARETTA**

**EFEITO ANSIOGÊNICO DA SUBSTÂNCIA P:  
ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO**

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

*Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina  
Monteiro de Lima Nogueira*

**Florianópolis - SC**

**1998**

**“EFEITO ANSIOGÊNICO DA SUBSTÂNCIA P:  
ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO”**

**POR**

**IRINÉIA PAULINA BARETTA**

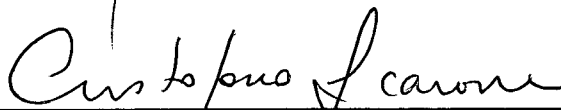
**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pela Banca Examinadora em  
sessão de defesa pública em 02 de Julho  
de 1998.**

**Banca Examinadora:**



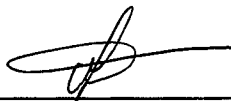
---

**Thereza Christina M. De Lima Nogueira  
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



---

**Cristóforo Scavone  
(ICB-USP -Membro Titular)**



---

**Tadeu Lemos  
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



---

**Prof. Dr. Giles Alexander Rae  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

**Florianópolis, 02 de Julho de 1998.**

**BARETTA, Irinéia Paulina. Efeito ansiogênico da substância P: envolvimento do óxido nítrico.** Florianópolis, 1998, 122 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira

Defesa: 02/07/1998

Nesse estudo foi avaliado o envolvimento do [óxido nítrico] (NO) no efeito ansiogênico da [substância P] (SP) em camundongos, avaliados no [labirinto em cruz elevado] (LCE). Os resultados mostram que os inibidores de NO sintase (NOS) não alteram os parâmetros comportamentais observados no LCE, mas revertem a ação ansiogênica da SP nesse paradigma experimental. Doadores de NO, assim como um inibidor de fosfodiesterase (IBMX), não apresentaram efeitos *per se*, mas também reverteram o efeito ansiogênico da SP. O 8-Br-GMPc, um análogo permeante de GMPc, promove efeito ansiogênico e amplia a ação ansiogênica da SP no LCE. Os resultados do presente estudo sugerem a participação do NO no efeito ansiogênico da SP em camundongos avaliados no LCE.

"O importante não é estar aqui ou ali, mas ser....  
Ser é uma ciência delicada, feita de pequenas grandes  
observações do cotidiano, dentro e fora da gente.....  
Se não executamos estas observações, não chegamos a  
ser; apenas estamos e desaparecemos."

(Carlos Drummond de Andrade)

## AGRADECIMENTOS

Muitos foram importantes para a realização deste trabalho, o que me faz ser eternamente grata a todos que, direta ou indiretamente, participaram desta caminhada:

À Deus que permitiu a realização de todos os planos.

À Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira pela orientação para a realização deste trabalho e, principalmente, por sua atenção e carinho na minha formação científica e humana.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho pela dedicação, atenção e participação direta na realização deste trabalho e, principalmente, por ser mestre e amigo em todas as horas.

A todos os outros professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, principalmente àqueles que me ensinaram o verdadeiro papel do “mestre” e se fizeram presentes em todos os momentos de dúvidas, angústias e de conquistas.

À Profa. Dra. Tânia B. Creczynski-Pasa, CCB/UFSC, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Universidade Paranaense (UNIPAR), em especial à Magnífica Reitora, Profa. Neiva Pavan Machado Garcia, e ao M.D. Vice-Reitor, Dr. Cândido Garcia, que possibilitaram o meu afastamento, permitindo minha formação científica.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Rosana, Sandra, Terezinha, Juarez, Regina e Patrícia.

À direção do Biotério Central e aos funcionários do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Pedro, João e Zeri, sem os quais não haveria possibilidade de trabalhar.

Aos amigos da Pós-graduação, em especial, à Daniela, Monique, Alessandra, Alcibia e Márcia pela amizade, colaboração e companheirismo. À Vânia, Maria Cláudia e José Eduardo pelos mesmos motivos e também pela ajuda técnica neste trabalho.

Aos amigos da Iniciação Científica, em especial, à Melani e Karla pela amizade e ao Vilson Ramon que, além de amigo, colaborou tecnicamente para realização deste trabalho.

Aos amigos da "turma 96" : Josélia, Martha, Rose, Tânia, Gilboé, Marcos e Rubens, foi muito bom conviver com vocês e cada um com seu jeito especial conquistou um espaço único e exclusivo em meu coração. VALEU !!!

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia: Sandro, Paulo, Filipe Pereira, Rodrigo, Maísa, Elaine, Rafaela, Marco, Fábio, Raquel, Filipe Silveira, Patrícia e Viviane, aos mais antigos que foram os companheiros iniciais das fases boas e ruins, pelas quais passamos e aos mais novos pela amizade e entusiasmo.

Um agradecimento especial aos amigos da UNIPAR, Profs. Marla Regina Celi de Oliveira, Nelson Luiz Posseti, Ricardo Delfine Perci e Marina Gimenes, que acreditaram e deram suporte para minha conquista.

À família de João e Soeli Hanel que me acolheram com amor e carinho no início desta jornada. À Jadna que conviveu comigo em todos os bons e maus momentos durante esta jornada.

À CAPES, ao CNPq e a UNIPAR pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Algumas pessoas foram essenciais no decorrer deste trabalho e, principalmente, da minha vida. Certamente sem elas tudo teria sido mais difícil ou talvez impossível:

Ao meu pai e à minha mãe, a minha eterna gratidão e amor por nunca terem deixado que as dificuldades do dia-a-dia se tornassem grandes a ponto de impedirem a realização deste sonho. Amo vocês !!!

À minha irmã, ao meu irmão, à minha cunhada e aos meus sobrinhos, que sempre se fizeram presentes, me incentivando e estimulando, principalmente nos momentos difíceis. Amo vocês !!!

Ao Newton, que sempre foi companheiro e que, com sua dedicação e amor, em qualquer hora do dia ou da noite, me fazia esquecer os problemas e acreditar que eu seria capaz de vencer. Te amo !!!

Finalmente, agradeço a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

**“Grande é a tarefa que nos espera.....**

**Para todos os seres humanos constitui quase um dever pensar que, o que já estiver realizado é sempre pouco em comparação com o que resta por fazer”.**

**(João XXIII)**

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	vi
1 - INTRODUÇÃO.....	1
<u>Óxido nítrico (NO)</u>	
- Histórico.....	1
- Síntese e inativação do NO.....	2
- Participação do NO em processos fisiopatológicos.....	8
- NO e sistema nervoso central .....	10
- NO e ansiedade.....	16
<u>Neurocininas</u>	
- Histórico.....	17
- Síntese e inativação das neurocininas.....	18
- Participação das neurocininas em processos fisiopatológicos.....	20
- Neurocininas e sistema nervoso central.....	23
- Neurocininas e ansiedade.....	30
<u>Neurocininas e Óxido Nítrico</u>	31
2 - OBJETIVOS.....	33
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
- Animais .....	34
- Drogas e soluções.....	34
- Administração de drogas.....	35
- Equipamentos e procedimentos.....	36
- Análise Estatística.....	42
4 - RESULTADOS.....	43
- Influência do pré-tratamento sistêmico com L-NOARG.....	43
- Influência do pré-tratamento central com L-NAME .....	44
- Influência do pré-tratamento central com 7-NI.....	48
- Determinação da atividade da NOS <i>in vitro</i> .....	50
- Influência do pré-tratamento central com SNAP.....	51
- Influência do pré-tratamento central com NAP.....	54



- Influência do pré-tratamento de inibidores de NOS sobre o efeito da substância P (SP).....	56
- Influência do pré-tratamento de inibidor da NOSn sobre o efeito da SP .....	61
- Influência do pré-tratamento com doador de NO sobre o efeito da SP .....	64
- Influência do pré-tratamento com NAP sobre o efeito da SP .....	67
- Influência do pré-tratamento central com 8-Br-GMPc sobre o efeito da SP ...	70
- Influência do pré-tratamento central com IBMX sobre o efeito da SP .....	72
- Determinação da atividade da NOS <i>ex vivo</i> .....	75
5 - DISCUSSÃO.....	87
6 - CONCLUSÕES.....	97
RESUMO.....	99
ABSTRACT.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

## LISTA DE ABREVIÇÕES

$O_2^-$ - Anion superóxido	LPS - Lipopolissacarídeo de parede bacteriana
ACh - Acetilcolina	NADPH - Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina, forma reduzida
8-Br-GMPc - 8-Bromoguanosina-3':5'- monofosfato cíclico	NaNO <sub>3</sub> - Nitrato de sódio
CaM - Calmodulina	NAP - N-acetil-DL-penicilamina
CCK - Colecistocinina	NBT - "Nitro blue tetrazole"
DA - Dopamina	7-NI - 7-nitroindazol
dPAG - Substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral	NKs - Neurocininas
EDRF - Fator relaxante derivado do endotélio	NMDA - N-metil-D-aspartato
FAD - Adenina dinucleotídeo de flavina	NO - Óxido nítrico
FMN - Adenina mononucleotídeo de flavina	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - nitrato
GABA - ácido gama-aminobutírico	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - nitrito
GCS - Guanilato ciclase solúvel	NOS - Óxido nítrico sintase
GMPc - Monofosfato de guanosina cíclico	NOS <sub>e</sub> - Óxido nítrico sintase endotelial
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio	NOS <sub>i</sub> - Óxido nítrico sintase induzida
IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina	NOS <sub>n</sub> - Óxido nítrico sintase neuronal
i.c.v. - intracerebroventricular	NPY - Neuropeptídeo Y
i.p. - intraperitoneal	PAG - Substância cinzenta periaquedutal
LCE - Labirinto em cruz elevado	5-HT - Serotonina
L-NAME - N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil-éster	SNAP - S-nitroso-acetil-DL-penicilamina
L-NMMA - N <sup>G</sup> -mono-metil-L-arginina	SNC - Sistema nervoso central
L-NOARG - N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina	SP - Substância P
	THB <sub>4</sub> - Tetrahidrobiopterina

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> - Estrutura primária das NOS humanas.....	2
<b>Figura 2</b> – Biossíntese do NO.....	3
<b>Figura 3</b> - Modelo ilustrativo das duas principais vias de formação do GMPc e seus efeitos biológicos diversos.....	6
<b>Figura 4</b> - Formação e degradação do NO.....	8
<b>Figura 5</b> - Síntese e efeitos do NO produzido pela NOS neuronal.....	12
<b>Figura 6</b> - Esquema de origem das neurocininas e seus precursores em mamíferos.....	19
<b>Figura 7</b> - Sítios de degradação da SP <i>in vitro</i> .....	20
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática do receptor NK <sub>1</sub> de rato e humano.....	21
<b>Figura 9</b> - Mecanismo de ação de receptores neurocinérgicos vasculares: NK <sub>1</sub> no endotélio e NK <sub>2</sub> no músculo liso.....	22
<b>Figura 10</b> - Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 12.1 até A 3.8) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro - caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP.....	26
<b>Figura 11</b> - Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 1.3 até P 7.4) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro - caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP.....	27
<b>Figura 12</b> - Efeito da injeção i.p. de concentrações crescentes de L-NOARG sobre a freqüência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	42
<b>Figura 13</b> - Efeito da L-NOARG, injetada i.p. em concentrações crescentes, sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B; braços abertos + braços fechados) no LCE, em camundongos.....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de L-NAME na freqüência de entradas nos braços abertos do LCE (A) e no tempo despendido nesses braços (B), em camundongos.....	45

<b>Figura 15</b> - Efeito da injeção i.c.v. de L-NAME, em concentrações crescentes, sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do LCE (B), em camundongos.....	45
<b>Figura 16</b> - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de 7-NI nas medidas de exploração (frequência de entradas nos braços abertos = A; tempo de permanência nos braços abertos = B) do LCE, em camundongos.....	47
<b>Figura 17</b> - Efeito de concentrações crescentes de 7-NI (i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B), em camundongos no LCE.....	48
<b>Figura 18</b> - Efeito de doses crescentes de 7-NI sobre a conversão de [ <sup>3</sup> H] L-citrulina <i>in vitro</i> .....	50
<b>Figura 19</b> - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SNAP na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nesses braços (B), em camundongos, no LCE.....	51
<b>Figura 20</b> - Efeito de concentrações crescentes de SNAP, injetado i.c.v. em camundongos, sobre o número total de entradas nos braços fechados (A), o número total de entradas (B) e o número de imersões de cabeça, no LCE.....	52
<b>Figura 21</b> - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de NAP na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nesses braços (B), em camundongos, no LCE.....	54
<b>Figura 22</b> - Efeito de concentrações crescentes de NAP, injetado i.c.v. em camundongos, sobre o número total de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B), no LCE.....	55
<b>Figura 23</b> - Influência da injeção i.p. de L-NOARG (20 nmol) no efeito promovido pela injeção i.c.v. de SP (10 pmol), em camundongos, na frequência de entradas nos braços abertos (A) e o tempo despendido nestes braços (B), no LCE.....	56

<b>Figura 24</b> - Influência da injeção i.p. de L-NOARG (20 nmol) sobre o efeito da injeção i.c.v. de SP (10 pmol) no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) do LCE, em camundongos.....	57
<b>Figura 25</b> - Influência da injeção i.c.v. de L-NAME (3 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos avaliado no LCE, em camundongos.....	58
<b>Figura 26</b> - Influência do pré-tratamento de L-NAME (3 nmol) no efeito da SP (10 pmol), ambas as drogas injetadas i.c.v., no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), avaliados no LCE, em camundongos.....	59
<b>Figura 27</b> - Influência da injeção i.c.v. de 7-NI (0,25 nmol) sobre o efeito promovido pela injeção i.c.v. de SP (10 pmol) na frequência de entradas nos braços abertos (A), tempo de permanência nesses braços (B) e número de imersões de cabeça (C) no LCE, em camundongos.....	63
<b>Figura 28</b> - Influência do pré-tratamento com 7-NI (0,25 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas em ambos os braços (B) do LCE, em camundongos.....	64
<b>Figura 29</b> - Influência da injeção i.c.v. de SNAP (2,0 pmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c. v.) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) avaliados, em camundongos, no LCE.....	66
<b>Figura 30</b> - Influência do pré-tratamento com SNAP (2,0 pmol, i.c.v.) no efeito da (SP 10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) em ambos os braços (B) do LCE, em camundongos.....	67
<b>Figura 31</b> - Influência da injeção central com NAP (2,0 pmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B), no LCE.....	69

<b>Figura 32</b> - Influência do pré-tratamento com NAP (2,0 pmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B), em camundongos, no LCE.....	70
<b>Figura 33</b> - Influência do tratamento com 8-Br-GMPc (2,0 e 20 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre a frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) avaliados no LCE, em camundongos.....	71
<b>Figura 34</b> - Influência do tratamento com 8-Br-GMPc (2,0 e 20 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B) do LCE, em camundongos.....	72
<b>Figura 35</b> - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2,0 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre a frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) avaliados no LCE, em camundongos.....	74
<b>Figura 36</b> - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2,0 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B), em camundongos, no LCE.....	75
<b>Figura 37</b> - Atividade da NOS em membranas sinápticas cerebrais isoladas de animais pré-tratados com SP (10 pmol, i.c.v.).....	76

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> - Similaridades e diferenças entre as NOS.....	5
<b>Tabela 2</b> - Principais alvos do NO.....	7
<b>Tabela 3</b> - Localização central de células imunorreativas à NOS.....	14
<b>Tabela 4</b> - Efeito da L-NOARG, injetada i.p. em concentrações crescentes, nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos.....	44
<b>Tabela 5</b> - Efeito de concentrações crescentes de L-NAME, injetada i.c.v., nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos.....	46
<b>Tabela 6</b> - Efeito do pré-tratamento i.c.v. com concentrações crescentes de 7-NI nos parâmetros etológicos avaliados, em camundongos, no LCE.....	49
<b>Tabela 7</b> - Efeito do pré-tratamento i.c.v. com concentrações crescentes de SNAP nos parâmetros etológicos avaliados, em camundongos, no LCE.....	53
<b>Tabela 8</b> - Efeito do NAP, injetado i.c.v. em doses crescentes nos parâmetros etológicos avaliados, em camundongos, no LCE.....	55
<b>Tabela 9</b> - Influência do tratamento de L-NOARG (20 nmol, i.p.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v. ), em camundongos, no LCE.....	57
<b>Tabela 10</b> - Influência do pré-tratamento de L-NAME (3 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE.....	60
<b>Tabela 11</b> - Influência do pré-tratamento com L-NAME (1,0 e 30 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no LCE, em camundongos.....	61
<b>Tabela 12</b> - Influência do pré-tratamento com L-NAME (1,0 e 30 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nas medidas comportamentais do LCE, em camundongos.....	62
<b>Tabela 13</b> - Influência do pré-tratamento de 7-NI (0,025 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no LCE, em camundongos.....	65
<b>Tabela 14</b> - Influência do pré-tratamento de 7-NI (0,025 e 0,25 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE.....	65

<b>Tabela 15</b> - Influência do pré-tratamento de SNAP (0,02 pmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nas medidas comportamentais do LCE, em camundongos.....	68
<b>Tabela 16</b> - Influência do pré-tratamento de SNAP (0,02 e 2,0 pmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE.....	68
<b>Tabela 17</b> - Influência do pré-tratamento de NAP (0,02 pmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nas medidas comportamentais do LCE, em camundongos.....	70
<b>Tabela 18</b> - Influência do pré-tratamento com 8-Br-GMPc (2 e 20 nmol, i.c.v.) e sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE.....	73
<b>Tabela 19</b> - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE.....	75
<b>Tabela 20</b> - Efeito do tratamento i.p. com doses crescentes de L-NOARG nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	77
<b>Tabela 21</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com doses crescentes de L-NAME nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	78
<b>Tabela 22</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com doses crescentes de 7-NI nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	78
<b>Tabela 23</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com doses crescentes de SNAP nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	79
<b>Tabela 24</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com doses crescentes de NAP nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	80
<b>Tabela 25</b> - Influência do tratamento i.p. com L-NOARG (20 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	80
<b>Tabela 26</b> - Influência do tratamento i.c.v. com L-NAME (3 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	81
<b>Tabela 27</b> - Influência do tratamento i.c.v. com 7-NI (0,25 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	82



<b>Tabela 28</b> - Influência do tratamento i.c.v. com SNAP (0,02 e 2 pmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	83
<b>Tabela 29</b> - Influência do tratamento i.c.v. com NAP (0,02 e 2 pmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	84
<b>Tabela 30</b> - Influência do tratamento i.c.v. com 8-Br-GMPc (2 e 20 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	85
<b>Tabela 31</b> - Influência do tratamento i.c.v. com IBMX (0,2 e 2 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto, em camundongos.....	86

# 1 - INTRODUÇÃO

## ÓXIDO NÍTRICO

### Histórico

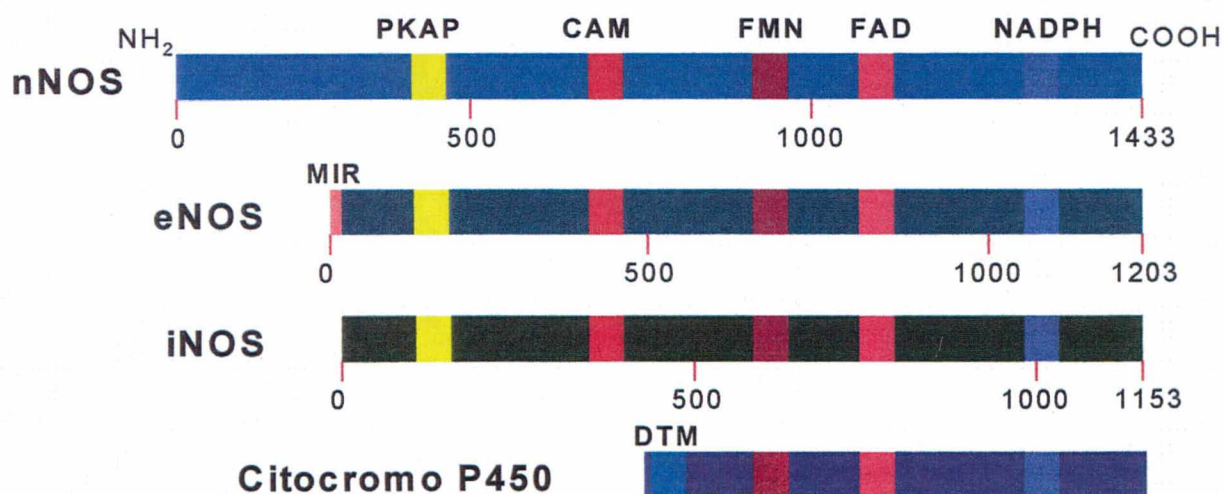
É difícil estabelecer o momento em que a pesquisa sobre o óxido nítrico (NO, incluindo NO<sup>•</sup>, NO<sup>+</sup> e NO<sup>-</sup>) foi iniciada. A biossíntese de óxidos de nitrogênio por microorganismos (vias de nitrificação e denitrificação) foi descrita muito antes de qualquer referência sobre a geração desses compostos por mamíferos (Hooper, *apud* Strogl *et al.*, 1984). Entretanto, já no início do século 20 era conhecido que a urina de animais e seres humanos continha mais nitrato que o esperado pela quantidade ingerida em suas dietas (Mitchell *et al.*, 1916). Os primeiros dados sobre a biossíntese de óxidos de nitrogênio em mamíferos provém do trabalho de Green *et al.* (1981). A importância que é dada atualmente ao papel do NO nos mais diferentes sistemas e processos decorre principalmente de duas linhas de pesquisa. A primeira diz respeito aos mecanismos de citotoxicidade de macrófagos. Stuehr e Marletta (1985) e Hibbs *et al.* (1987) mostraram evidências de que o mecanismo de citostase / citotoxicidade induzido por citocinas de macrófagos de roedores em células alvo estava associado à liberação de nitrito e era dependente da presença de L-arginina (L-Arg). O fato de ambos os processos, biossíntese de nitritos e citotoxicidade, serem inibidos de uma maneira estereosseletiva por um análogo metilado da arginina sugeriu o envolvimento de uma via enzimática nessas reações.

Em 1980, Furchgott e Zawadzki verificaram que a interação da acetilcolina (Ach) com receptores muscarínicos localizados nas células endoteliais levava à liberação de uma substância lábil, que induzia o relaxamento do músculo liso vascular. Esta substância foi então denominada de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF = "endothelium-derived relaxing factor"). Em 1986, dois grupos independentes sugeriram que o EDRF guardava similaridades com o NO, um gás considerado até então um poluente atmosférico (Furchgott *et al.* e Ignarro *et al.*). Plamer *et al.* (1987) demonstraram a identidade química entre o EDRF e NO, enquanto uma comparação detalhada entre as ações biológicas do EDRF e do NO foi feita em

preparações vasculares e em plaquetas, demonstrando que os dois compostos possuíam também as mesmas propriedades biológicas (Moncada *et al.*, 1988). Embora ainda exista certa controvérsia a respeito da identidade química do EDRF, a importância da via endógena para geração de NO está bem estabelecida (Radomski, 1995).

### Síntese e inativação do óxido nítrico

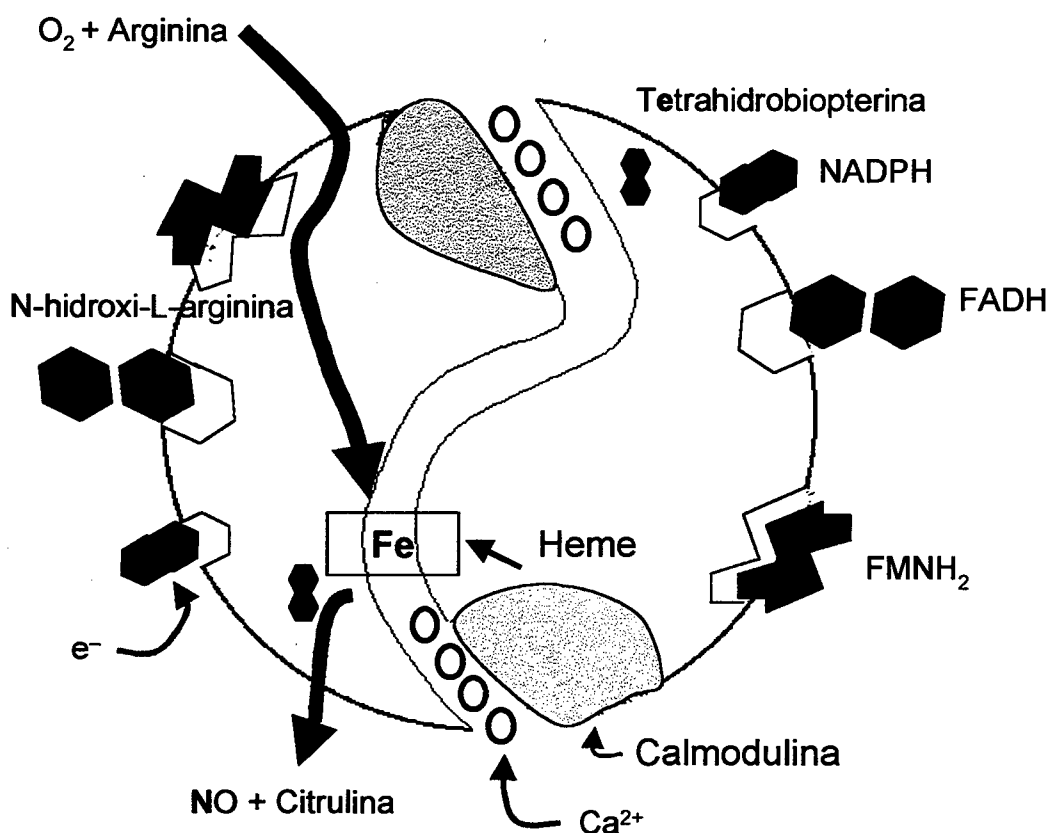
O NO é sintetizado a partir do nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-Arg, através da NOS (Palmer *et al.*, 1988), que apresenta grande homologia estrutural com a enzima citocromo P-450 redutase (Bredt *et al.*, 1991; Figura 1).



**Figura 1 - Estrutura primária das NOS humanas mapeadas (retirado de Knowles e Moncada, 1994).**

Essa reação envolve a transferência de elétrons de diversos co-fatores tais como o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN), o dinucleotídeo de nicotinamida e o fosfato de adenina (NADPH), a tetrahydrobiopterina (THB<sub>4</sub>), a calmodulina e o heme (Bredt e Snyder, 1990; Klatt *et al.*, 1992). Esta conversão de arginina à NO realiza-se em dois passos:

- Inicialmente ocorre uma oxidação, com transferência de dois elétrons, da arginina originando a N<sup>G</sup>-hidroxiarginina, que permanece ligada a NOS;
- Seqüencialmente, ocorre uma nova oxidação, envolvendo a transferência de três elétrons, originando quantidades equimolares de NO e citrulina. Para que esta segunda oxidação ocorra é necessário a presença de oxigênio (O<sub>2</sub>), cálcio-calmodulina, THB<sub>4</sub> e NADPH (Figura 2).



**Figura 2- Biossíntese do óxido nítrico (adaptado de Marletta e Maxey, 1995).**

Várias isoformas de NOS, a enzima passo limitante na síntese de NO, foram isoladas, sendo todas homólogas e dividindo-se em duas categorias básicas: NOS constitutiva e induzida (Scuiz e Triggle, 1994; Dominiczack e Bohr, 1995). A NOS constitutiva subdivide-se em neuronal (NOS<sub>n</sub>, isoforma I) e endotelial (NOS<sub>e</sub>, isoforma III), localizadas principalmente no sistema nervoso e células endoteliais, respectivamente (Tabela 1). Essas enzimas

encontram-se sob forma inativa até que o complexo cálcio-calmodulina ligue-se às mesmas, ativando-as. Esta ativação determina a liberação contínua de pequenas quantidades (pmol) de NO, que atua como um mecanismo de transdução de sinal, resultando em várias respostas fisiológicas como efeito final. A forma induzida (NOS<sub>i</sub>, isoforma II; Tabela 1) é expressa após a ação de determinados estímulos, tais como citocinas (interleucina-1, fator de necrose tumoral, interferon- $\gamma$ ) e o lipopolissacarídeo de parede bacteriana (LPS) em macrófagos, além de células endoteliais, células da musculatura lisa vascular, miócitos e hepatócitos, entre outras células (para revisão ver Stuehr, 1987). A NOS<sub>i</sub>, uma vez expressa, é independente do complexo Ca<sup>++</sup>- calmodulina, libera grandes quantidades (nmol) de NO e pode permanecer ativa por várias horas (Schuman e Madison, 1994).

Atualmente, acredita-se que a NOS constitutiva (neuronal e endotelial) esteja relacionada à processos fisiológicos, enquanto que a NOS induzida estaria mais relacionada a processos patológicos (Petros *et al.*, 1994). Neste sentido, agentes que inibem seletivamente as diferentes isoformas de NOS podem ser de extremo valor terapêutico. Inicialmente, observou-se que a N<sup>G</sup>-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) era capaz de inibir a síntese de NO e que este efeito caracterizava-se pelo fato de ser dependente da dose e de ser específico para a forma levógira, ou seja, a forma dextrógira do composto não desencadeia a mesma resposta (Palmer *et al.*, 1988; Rees *et al.*, 1989). Posteriormente, outros compostos foram sintetizados e, dentre eles, destacam-se a N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), sua forma metilada e mais lipossolúvel, a N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Moore *et al.*, 1990), a N-iminoetil-L-ornitina (Mülsch and Busse, 1990) e o 7-nitroindazol (7-NI, Garthwaite *et al.*, 1991).

**Tabela 1 - Similaridades e diferenças entre as óxido nítrico sintases (NOS).**

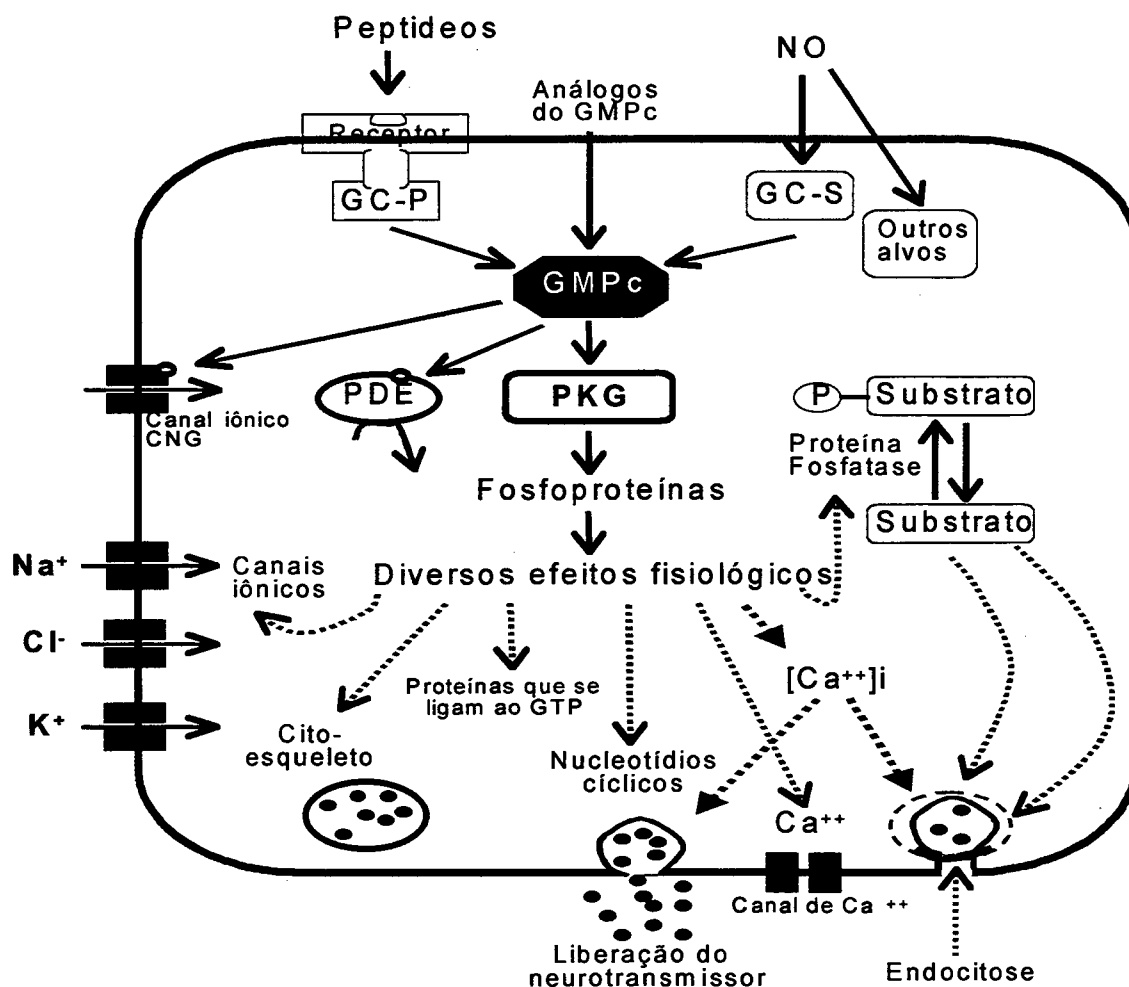
	Enzimas Constitutivas		Enzima Induzida
	NOS <sub>e</sub>	NOS <sub>n</sub> *	NOS <sub>i</sub>
<b>Localização celular</b>	Ligada a membrana	Citosólica e ligada a membrana	Citosólica
<b>Co-fatores</b>	Dependente de NADPH e de THB <sub>4</sub>	Dependente de NADPH e de THB <sub>4</sub>	Dependente de NADPH e de THB <sub>4</sub>
<b>Atividade</b>	Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica	Atividade dioxigenásica
	Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina	Inibida por análogos da L-arginina
	Dependente de cálcio/calmodulina	Dependente de cálcio/calmodulina	Independente de cálcio/calmodulina
	pmol de NO produzido	pmol de NO produzido	nmol de NO produzido
	Liberação curta (s)	Liberação curta (s)	Liberação longa (h)
<b>Localização cromossômica</b>	Cromossoma 7 (7q35-7q36)	Cromossoma 12 (12q24.2)	Cromossoma 17 (17cen-q11.2; 17 cen-17q11; 17q11.2-q12)
<b>Tamanho RNA</b>	4,4Kb	10,5Kb	4Kb

\*NOS<sub>μ</sub> = isoforma da NOS<sub>n</sub> (Magee et al., 1996)

(Adaptado de Fernandes, 1996).

Assim, compostos estruturalmente análogos à L-Arg, o precursor de NO, inibem competitivamente a enzima NOS. Entretanto, algumas isotiouréias, compostos não análogos à L-Arg, vêm sendo descritas como inibidores ainda mais seletivos da NOS induzida (Southan *et al.*, 1995). Um outro modo de regulação da via L-Arg/NO é através de um mecanismo de inibição retrógrada ultra curta. Uma vez produzido, o NO é capaz de inibir a NOS<sub>i</sub>, reduzindo-se assim os níveis de NO produzidos por macrófagos ativados (Assreuy *et al.*, 1993). Este mecanismo foi demonstrado e validado para as enzimas neuronal (Rogers e Ignarro, 1992) e endotelial (Buga *et al.*, 1993).

vizinhas, onde pode interagir com moléculas específicas. Dentre estas, destaca-se o ferro na forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) no grupo heme contido em determinadas proteínas como, por exemplo, a guanilato ciclase solúvel (GCS) cuja interação aumenta os níveis intracelulares de guanidil monofosfato cíclico (GMPc). A ligação do NO ao grupamento heme da GCS causa aumento drástico e imediato da sua atividade catalítica, o que altera vários processos intracelulares, incluindo a ativação de canais de potássio via proteínas quinases dependentes de GMPc (Figura 3).



**Figura 3 - Modelo ilustrativo das duas principais vias de formação do GMPc seus efeitos biológicos diversos (retirado de Wang e Robinson, 1997).**

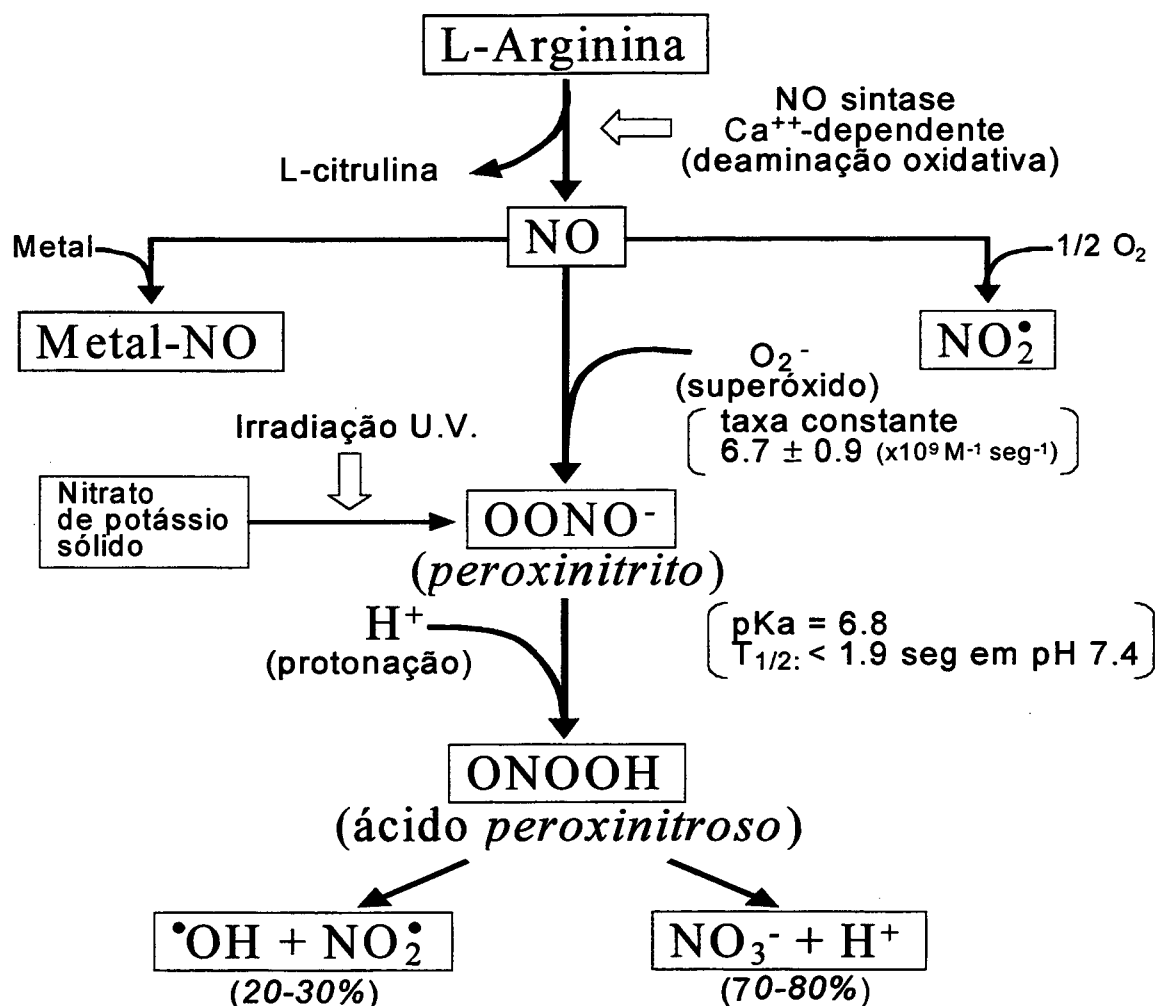
Semelhante ao que ocorre com a GCS, a hemoglobina presente nas hemácias é outra molécula que contém  $\text{Fe}^{++}$  (Tabela 2). Conseqüentemente, no momento em que o NO se difunde da célula endotelial para o lúmen do vaso, ele é rapidamente captado pelas hemácias. A reação com a hemoglobina, ou com a oxihemoglobina, origina o nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ) que será eliminado por filtração glomerular. O nitrito ( $\text{NO}^{-2}$ ) também constitui produto da degradação do NO, no entanto, é rapidamente convertido a nitrato por meio de reação oxidativa que pode ser realizada pela própria oxihemoglobina (Spagnuolo *et al.*, 1987). Em decorrência desta rápida inativação, o NO tem uma meia-vida de aproximadamente 3 a 5 s (Gryglewski *et al.*, 1986; Warner *et al.*, 1989). A maior parte do NO formado no organismo, portanto, decai à nitrito e, subseqüentemente, a nitrato, como mostra a Figura 4.

**Tabela 2 - Principais alvos do óxido nítrico.**

Classe Molecular	Atividade	
	Aumentada	Reduzida
Heme proteínas	Guanilato ciclase	Hemoglobina e mioglobina
Proteínas Fe-S	-	Aconitase, complexo I e II
Outras proteínas não Fe-S	-	Ferritina
Radical tirosil de proteínas	-	Ribonucleotídeo redutase
Grupo tiol	Ativador tecidual de plasminogênio	Dehidrogenases
DNA	Mutações	Mutações
Ânion superóxido	Produção de radical hidroxila e anion peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ )	Deposição de superóxido

(Retirado de Fernandes, 1996)





**Figura 4 - Formação e degradação de NO e peroxinitrito (retirado de Kuriyama e Ohkuma, 1995).**

### Participação do óxido nítrico em processos fisopatológicos

Apesar do NO ser uma molécula quimicamente simples, pode agir de forma específica controlando funções vitais como neurotransmissão, tônus vascular, contração de órgãos gastrintestinais (Förstermann *et al.*, 1994). Além disso, o NO também pode afetar a transcrição genética (Kröncke *et al.*, 1994) e, quando utilizado em altas doses, tem efeito citotóxico sobre bactérias, parasitas e células tumorais (Nathan e Hibbs, 1991).

Estímulos químicos ou físicos, como hipoxia e estresse de cisalhamento (*shear stress*), também induzem a liberação de NO e podem ser considerados os sinais fisiológicos mais importantes de uma vasodilatação endotélio-

dependente. Esses estímulos promovem abertura dos canais de  $Ca^{++}$  presentes na membrana endotelial, levando a um aumento transitório na sua concentração intracelular, permitindo sua ligação à calmodulina. O complexo  $Ca^{++}$ - calmodulina ativado estimula a NOSe, gerando NO que, desta forma, é liberado continuamente pelas células endoteliais e se difunde para a luz dos vasos ou para as células musculares lisas, e mantêm um estado constante de vasodilatação ativa (Moncada e Higgs, 1993).

A inibição aguda da síntese de NO *in vivo* determina um aumento da resistência vascular e hipertensão, efeitos estes geralmente acompanhados por redução do débito cardíaco e bradicardia (Rees *et al.*, 1989; Gardiner *et al.*, 1990). Estas alterações indicam que o NO, em condições basais, é liberado a fim de modular o tônus da célula muscular lisa vascular, bem como o fluxo sanguíneo dos diferentes leitos vasculares. São várias as evidências de que a deficiência na produção de NO contribui para a patogênese da hipertensão (Vane *et al.*, 1990). O contrário, um excesso da produção de NO, observado em casos de choque séptico, é lesivo ao organismo. Este excesso leva a extensa vasodilatação e hipotensão decorrentes do NO originado pela NOSi (Palmer, 1993).

A ativação plaquetária também é regulada pela síntese e liberação de NO. Tanto a adesão, quanto a agregação plaquetária são fenômenos inibidos pelo NO proveniente tanto da célula endotelial como da própria plaqueta. Como as plaquetas são elementos que tendem a aderir à parede dos vasos e se agregarem formando trombos, o NO liberado pela célula endotelial difunde-se rapidamente para o interior das plaquetas impedindo sua agregação à parede dos vasos. A modulação da ativação plaquetária não é um fenômeno regulado exclusivamente pelo NO. Na verdade, a via L-Arg/NO age como um mecanismo de controle negativo que regula a atividade plaquetária.

O NO parece também estar envolvido no desenvolvimento e progressão da placa ateromatosa, pois as células endoteliais perdem sua capacidade de produção de NO em níveis normais na disfunção endotelial, causada por deposição de colesterol (lipoproteína de baixa densidade - LDL), lesão física e/ou química.

Observa-se ainda uma complexidade de regulação do processo inflamatório pelo NO, que desempenha um papel multifacetado em todas as

fases da resposta inflamatória, dependendo da fonte e da quantidade produzida. O processo inflamatório é uma resposta que envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por inúmeros estímulos. A reação ocorre em fases distintas, cada uma mediada por diversos mecanismos e mediadores químicos. Na fase inicial ocorrem alterações vasculares, como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, seguida de migração celular (leucócitos) para o tecido alvo. Em uma fase tardia (aproximadamente 48 h), os macrófagos alcançam o tecido lesado e quando ativados produzem NO (Seljelid e Eskeland, 1993). Devido a suas propriedades pró- ou anti-inflamatórias, variando de acordo com sua concentração, formação de peroxinitrito e com a resposta adaptativa das células alvo, o NO desempenha um papel importante na inflamação.

Além disso, sabe-se que o NO produzido por diversos estímulos pode reagir com aminas originando nitrosaminas, que são potentes agentes carcinogênicos, podendo causar mutações importantes no DNA, levando a danos e/ou alterações no desenvolvimento celular (Lyons, 1995).

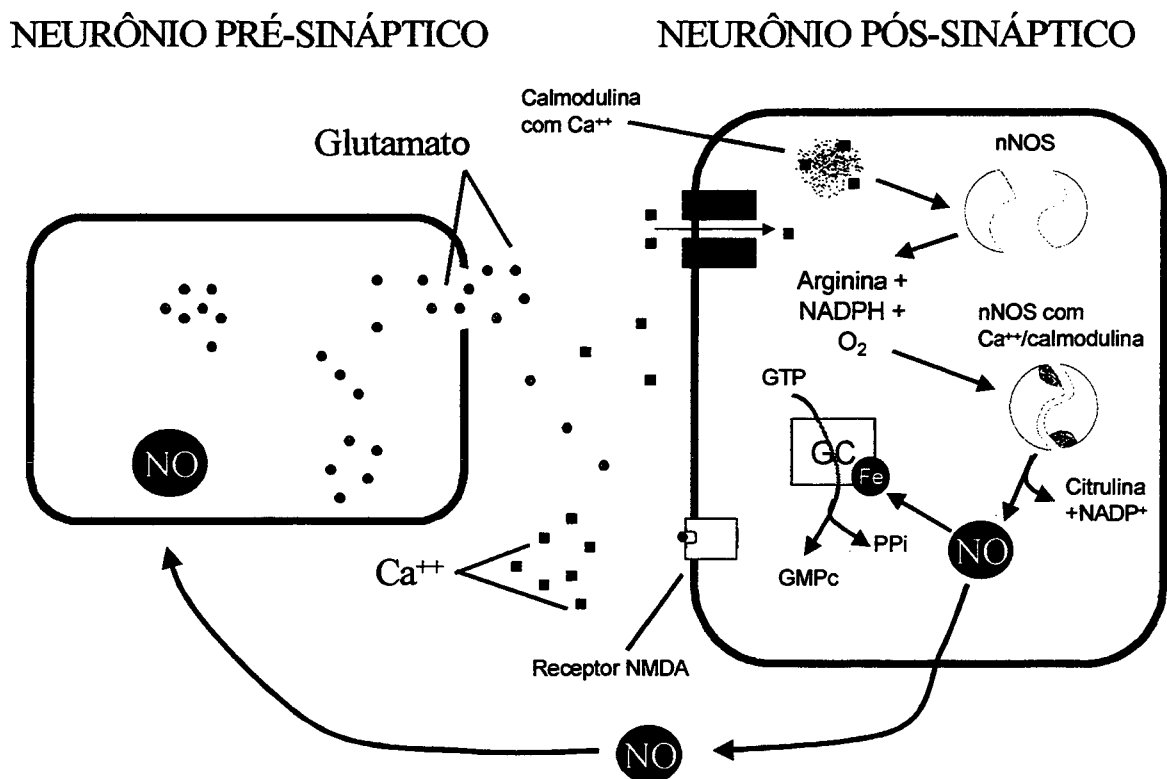
### **Óxido nítrico e sistema nervoso central**

A observação de que células do cerebelo de rato estimuladas com N-metil-D-aspartato (NMDA), um agonista para o receptor do aminoácido excitatório (AAE) glutamato, liberavam uma substância semelhante ao EDRF, estabeleceu a existência do sistema L-Arg/NO no SNC (Garthwaite *et al.*, 1988; Figura 5). No entanto, somente em 1990 Bredt e Snyder purificaram e caracterizaram a NOS<sub>n</sub>. Devido a homologia do domínio redutase (extremo C-terminal) com a enzima citocromo P450 redutase, sugeriu-se ser este o sítio para oxidação da L-Arg (Moncada *et al.*, 1991). Na ausência de L-Arg, o domínio redutase pode transferir elétrons do NADPH para o O<sub>2</sub> formando assim o anion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o que poderia explicar, por exemplo, as características neurotóxicas e neurodegenerativas dos AAEs. Manzoni *et al.* (1992) propuseram que o NO bloquearia receptores NMDA, baseados nos efeitos de substâncias doadoras de NO sobre as correntes iônicas, propondo mecanismos de retro-alimentação negativa, ao passo que Lei *et al.* (1992) sugeriram que esse efeito poderia estar relacionado

com grupamentos nitrosotíóis associados aos receptores, uma vez que os doadores de NO reagem liberando NO e nitrosotíóis.

O NO formado no SNC participaria então de eventos celulares desencadeados por AAEs (Zhang e Snyder, 1995), tais como transmissão sináptica anterógrada ou retrógrada (Garthwaite, 1991) e processos de plasticidade neural (Medina e Izquierdo, 1995). A síntese excessiva de NO, por ativação de NOS<sub>n</sub> e/ou NOS<sub>i</sub>, por outro lado, poderia levar à epilepsia (Dawson *et al.*, 1991), além de contribuir para processos degenerativos do SNC, como demência senil do tipo Alzheimer, doença de Parkinson e coréia de Huntington (Moncada e Higgs, 1993; Garthwaite e Boulton, 1995).

Karanth *et al.* (1993) relataram ainda que o NO parece regular a liberação de hormônios no eixo hipotálamo-hipófise, uma vez que o uso de inibidores da NOS no hipotálamo aumenta a liberação de hormônio liberador de corticotrofinas. Lornat *et al.* (1992) demonstraram que doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio e hidroxilamina, estimulam de maneira dose-dependente a liberação de noradrenalina e acetilcolina em fatias de hipocampo. Estudos de microdiálise, porém, demonstraram que a perfusão de L-NMMA (N<sup>G</sup>-mono-metil-L-arginina), um inibidor da síntese de NO, aumenta a concentração do ácido gama-aminobutírico (GABA) no estriado, indicando que o NO pode inibir a liberação desse neurotransmissor nessa região em particular (Semba *et al.*, 1995). Em conjunto, essas observações experimentais mostram que o NO pode, portanto, atuar antagonicamente sobre o processo de exocitose de neurotransmissores, modulando tanto a liberação vesicular quanto a recaptação de neurotransmissores (Wolosker *et al.*, 1996). O NO tem uma meia-vida de poucos segundos e se difunde rapidamente através de células. Ao ser produzido, é capaz de influenciar diversas funções dentro de uma esfera com diâmetro de aproximadamente 0,3 mm (300 µm), espaço este muito grande quando comparado com a dimensão de uma sinapse (1 µm), cuja fenda sináptica é de aproximadamente 20 nm (Garthwaite e Boulton, 1995).



**Figura 5 - Síntese e efeitos do NO produzido pela NOS neuronal (retirado de Fernandes, 1996).**

A parte de sua participação no processo de neurotransmissão, o NO parece controlar o fluxo sanguíneo local através da dilatação de vasos de resistência no SNC (Gally *et al.*, 1990). A literatura tem relatado ainda que o NO pode servir como um sinal para a organização celular no córtex ou como indicador inicial de um processo apoptótico, além de causar danos ao DNA em resposta à depleção de estoques intracelulares energéticos (Dawson e Snyder, 1994; Dawson e Dawson, 1995). O NO é, portanto, um mensageiro intercelular atípico e com amplas funções neurais, propondo-se seu envolvimento em diferentes processos como cognição, aprendizado, regulação sensorial e motora e comportamento sexual.

### **Localização da óxido nítrico sintase no sistema nervoso central**

Os neurônios do córtex cerebral e dos gânglios da base foram marcados para diaforase-fosfato de nucleotídeo adenina reduzido (NADPH-diaforase; Thomas e Pearse, 1961) e identificados por apresentarem-se

corados de azul escuro na presença de sais de tetrazólio ( do tipo 'nitroblue tetrazole', NBT) e NADPH (Thomas e Pearse, 1964). O emprego dessas técnicas de marcação permitiu a co-localização desses co-fatores com as NOS, uma vez que as enzimas apresentam atividade dependente dos mesmos, como descrito anteriormente. Através de reações histoquímicas, a co-localização de NADPH diaforase e NOS foi mapeada no SNC de ratos (para revisão ver Vincent e Kimura, 1992). Foi ainda demonstrado que sítios de formação de GMPc no cérebro de ratos apresentavam-se NADPH-diaforase positivos, após o uso de doadores de NO (Southam e Garthwaite, 1993).

Como mostrado na Tabela 3, corpos celulares imunorreativos à NOS foram identificados em diversos sítios do neuro-eixo (Mizukawa *et al.*, 1989; Kinjo *et al.*, 1989; Snyder e Bredt, 1991; Vincent e Kimura, 1992; Brady, *et al.*, 1992). Em particular, destacamos a presença de um número substancial de pericários que expressam a NOS em regiões do SNC que sabidamente estão envolvidas na organização do comportamento de defesa, constituindo-se no substrato anatômico dos estados de medo e ansiedade (Davis, 1992; Graeff, 1994; Canteras *et al.*, 1997), tais como: porção ventral posterior do núcleo da amígdala, divisão lateral posterior do núcleo intersticial da estria terminal, setor medial rostro-dorsal da região perifomical, setor intermédio-lateral da área hipotalâmica lateral, núcleo pré-mamilar dorsal, camadas intermediárias e profundas do colículo superior e coluna lateral dorsal da substância cinzenta periaquedutal.

**Tabela 3 - Localização central de células imunorreativas à NOS**

Localização	Células Imunorreativas à NOS	Localização	Células Imunorreativas à NOS
<u>Isocórtex</u>		<u>Hipotálamo</u>	
Córtex Frontal	++	Núcleo Septo-hipotalâmico	++
Córtex Cingulado	++	Lamina Terminal	+++
<u>Córtex Olfativo</u>		N. Periventricular Anterior	++
Bulbo Olfativo Principal		Região Periformical (rosto dorsal medial)	+++
- camada glomerular	++	N. Hipotalâmico Anterior	+
- c. plexiforme externa	+	Área Hipotalâmica Lateral (setor intermédio lateral)	++++
- c. plexiforme interna	++	Núcleo supra-óptico	++++
- c. de céls. mitrais	-	Região retroquiasmática	++/+++
- c. granular	++	Núcleo Magno Acessório	++++
Bulbo Olfativo Acessorio		N. Magno Paraventricular	++++
- camada glomerular	-	N. Entromedial	+
- c. de céls. mitrais	-	N. ventromedial (porção ventrolateral)	++++
- c. granular	++++	N. Tuberal	+++
N. Olfativo Anterior	++	N. Dorsomedial	++
Córtex Piriforme	++	Área Hipotalâmica Dorsal	+
N. Endopiriforme (parte ventral)	++	N. Hipotalâmico Dorsal	+
Tubérculo Olfativo		Núcleo Pré-mamilar Dorsal	+++
- camada polimorfica	++	N. Supramamilar	++
- ilhotas de Calleja	+	N. Pré-mamilar ventral	+++
<u>Formação Hipocampal</u>		N. Mamilar Lateral	-
- induseum griseum	++	N. Mamilar Mediai	+++
- córtex etorrinal	++	<u>Pré-tecto</u>	
- parassubiculo	+++	N. Pré-comissural	+
- pré-subiculo	+++	N. Pré-tectal Posterior	+
- subiculo	+++	N. do Trato Óptico	+
- campo CA1	+	N. Olivar	+++
- campo CA2	+	N. Magno da Comissura Posterior	++++
- campo CA3	+	<u>Mesencéfalo</u>	
- giro denteado	++	Área Tegmental Ventral	+++

Tabela 3 - Continuação

<u>Amígdala</u>			
N. Medial (porção póstero ventral)	++++	N. Peripeduncular	++
N. Basolateral	+ / ++	N. Terminal Lateral	++
Córtex periamigdalóide	+ / ++	N. Interpeduncular	++++
<u>Região Septal</u>		N. Mediano da Rafe	++
N. Septal Medial	++++	N. Dorsal da Rafe	++++
N. da Banda Diagonal de Broca	++++	Colículo Superior	++++
Órgão Subfornical	++++	Coluna Dorsal da PAG	++++
N. Intersticial da Estria Terminal (posterior lateral)	+++	Colículo Inferior (n. cortical)	++++
<u>Corpus Striatum</u>		Colículo Inferior (n. central)	+
Caudoputamen	++	<u>Ponte e Bulbo</u>	
N. <i>Accumbens</i>	++	N. Tegmental Pedunculo Pontino	+++++
Globo Pálido	-	N. Tegmental Lateral Dorsal	+++++
N. Endopeduncular	+	N. do Lemnisco Lateral	++
<u>Tálamo Dorsal</u>		N. Parabraquial	++
N. Paraventricular	++	<i>Locus Coeruleus</i>	-
N. Centralmedial	+	N. Paraleminiscal	++
N. <i>Reuniens</i>	+	N. Reticular Pontino	+
N. Geniculado Lateral Dorsal	+	N. do Corpo Trapezóide	+
N. Retroetmoidal	++	N. Coclear Posterior	+
N. Intralaminar Posterior	++	Cerebelo (molecular, granular)	+++
<u>Tálamo Ventral</u>		N. <i>Supragenualis</i>	+++
N. Geniculado Lateral Ventral	++++	N. Prepósito do Hipoglosso	+++
Zona Incerta	+	N. Magno da Rafe	+++
N. Subtalâmico	++	N. Paragigantocelular Lateral	+++
		N. do Tracto Solitário	++++
		N. Ambíguo	++
		N. Vestibular Mediai	++
		N. Paratrigeminal	+++
		N. Motor Dorsal do Vago	++
		N. Grácil	+++
		N. Espinal do Trigêmllo	+++

(Adaptado de Vincent e Kimura, 1992).



## Óxido nítrico e ansiedade

A ansiedade está entre os vários processos fisiopatológicos do SNC envolvendo o NO como um dos fatores moduladores. A este respeito, Guimarães *et al.* (1994) propuseram que o NO seria importante na modulação da ansiedade experimental, visto que a administração de inibidores da NOS na PAG induzem efeitos do tipo ansiolítico em ratos, no modelo experimental etológico do labirinto em cruz elevado (LCE) (Rodgers, 1996). Resultados similares foram obtidos por Volke *et al.* (1995, 1997) utilizando inibidores da NOS administrados sistemicamente nos modelos do LCE e da interação social, em ratos. Recentemente, Faria *et al.* (1997) e Faria (1998) demonstraram que a inibição aguda sistêmica de NOS diminui a ansiedade experimental em ratos avaliada no mesmo paradigma experimental. No entanto, resultados contrários foram obtidos por Quock e Nugyen (1992) ao demonstrarem que o tratamento sistêmico com inibidor da NOS (L-NOARG) bloqueava o efeito ansiolítico do clordiazepóxido em camundongos submetidos ao teste do LCE. Esse bloqueio era revertido pela administração i.c.v. de L-Arg, indicando que o NO poderia exercer um efeito ansiolítico e não ansiogênico, como proposto nos trabalhos citados anteriormente. Essa proposição estaria de acordo com os achados eletrofisiológicos de Lovick e Key (1996) que sugerem que o NO inibe a atividade neuronal na PAG. Essas aparentes contradições indicam que o papel do NO na modulação da ansiedade experimental em roedores deve ser melhor investigado. A existência do sistema NO-GMPc foi previamente estabelecida em diversos experimentos que mostram a correlação entre o aumento da síntese de NO e o acúmulo de GMPc (Knowles, *et al.*, 1989; Southam e Garthwaite, 1993; Garthwaite, 1995; Lizasoain *et al.*, 1995 ). Chiavegatto *et al.* (1998) demonstraram um aumento da atividade da NOS e acúmulo de GMPc na PAG, após exposição de ratos ao seu predador natural, o gato, sugerindo o envolvimento da via NO-GMPc em respostas de medo inato.

## NEUROKININAS

### Histórico

Nos últimos anos demonstrou-se a existência de uma quantidade significativa de neuropeptídeos nos neurônios do SNC. Desde então tem sido discutido o provável papel dos neuropeptídeos como neurotransmissores. Snyder (1980) sugeriu a existência de mais de 200 neuropeptídeos ativos no SNC e, posteriormente, vários trabalhos foram confirmando esta suposição, bem como mostrando a importância dos neuropeptídeos em diversas funções fisiopatológicas (Myers, 1994; Hokfelt *et al.*, 1987). Estas substâncias agem como neuromediadores e/ou moduladores, alterando a atividade elétrica e a permeabilidade iônica das células nervosas podendo ainda influenciar a secreção de hormônios, o metabolismo, a termoregulação e a circulação, entre outros processos fisiológicos (Klavdieva, 1995). Os neuropeptídeos são encontrados em quantidades significativas nos terminais sinápticos do SNC e entre eles podemos citar a substância P (SP), a colecistocinina (CCK), a neurotensina, o neuropeptídeo Y (NPY) e a somatostatina (Stone, 1995). Muitos destes peptídeos coexistem com neurotransmissores clássicos como a Ach, a serotonina (5-HT), o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a dopamina (DA), em diferentes regiões do SNC (Pemow, 1983; Chang, 1988; Smith *et al.*, 1994).

A SP (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) foi o primeiro neuropeptídeo a ser descoberto, sendo identificado por von Euler e Gaddum (1931) no cérebro e intestino de cavalos. Uma das explicações para a origem da denominação “substância P” vem das palavras “pó” ou “preparação”, visto que von Euler relatou ter usado uma preparação padrão na forma de pó seco, convenientemente abreviada por “P” (Otsuka e Yoshioka, 1993). Nas décadas de 50 e 60 foram feitas várias tentativas de estudos com a SP, embora somente entre os anos 70-71 é que sua estrutura primária foi purificada, determinada (Chang e Leeman, 1970; Chang *et al.*, 1971) e sintetizada (Tregear *et al.*, 1971). A caracterização da SP, a partir de hipotálamo de bovinos, evidenciou que esse peptídeo pertence à família das taucininas, que possui a mesma seqüência de aminoácidos no carbono (C) terminal: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, onde X= resíduo aromático (fenilalanina – Phe - e treonina - Try) ou resíduo alifático hidrofóbico (valina – Val - e

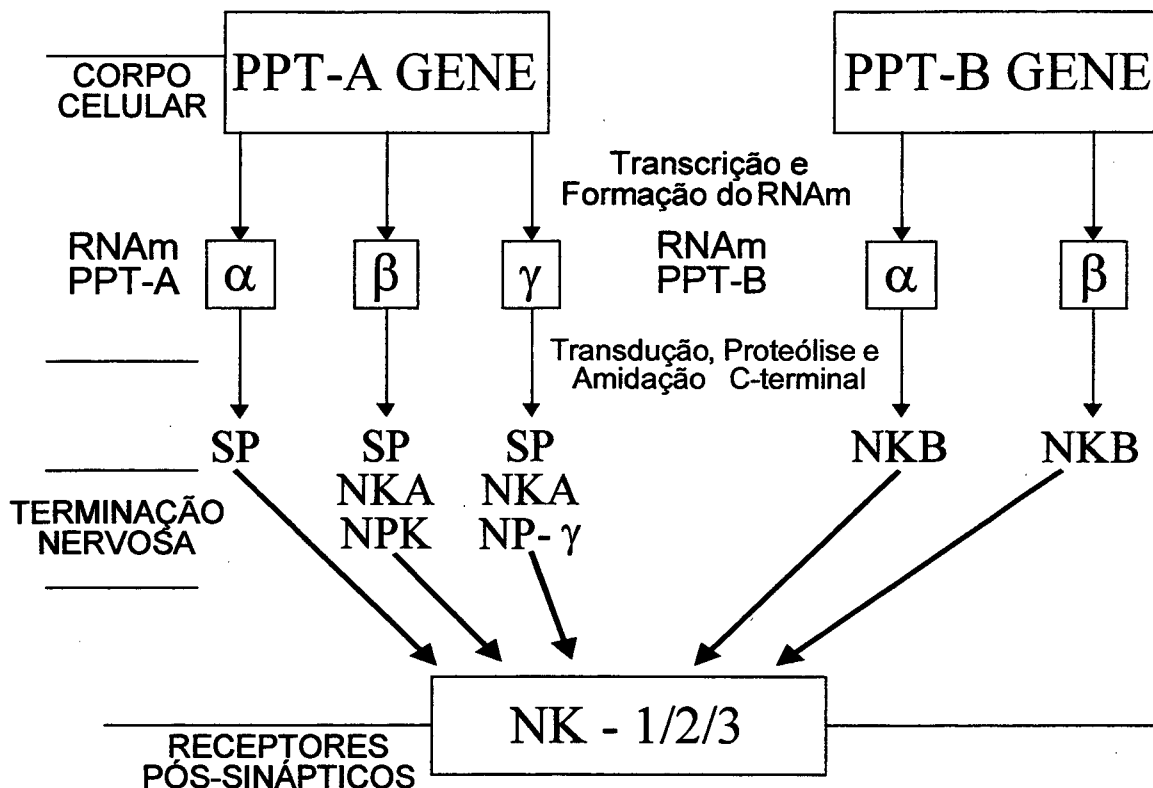
isoleucina - Ile; Erspamer, 1981).

Devido às similaridades farmacológicas entre a SP e a bradicinina, estudos comparativos destes compostos levaram à descoberta de atividades adicionais. O estudo das cininas favoreceu o estudo de substâncias biologicamente ativas da pele de anfíbios e moluscos, os quais juntamente com a SP, passaram a formar uma nova família de peptídeos, as taquicininas (Klavdieva, 1995). Atualmente vários grupos de pesquisadores agrupam os neuropeptídeos presentes em mamíferos sob a designação genérica de neurocininas (NKs), conforme acordo sugerido no encontro de Maidstone, USA e confirmado no Simpósio de Montreal (Regoli *et al.*, 1994). Em 1983, quatro grupos de pesquisadores independentes (Kanawaga *et al.*; Kimura *et al.*; Maggio *et al.*; Shimada *et al.*) relataram a existência de outras NKs no SNC: a neurocinina A (NKA, substância A, neuromedina  $\alpha$ ) e a neurocinina B (NKB, neuromedina K). Tatemoto *et al.* (1985) isolaram a neurocinina K (neuropeptídeo K) e, em 1988, Kage *et al.* identificaram a neurocinina  $\gamma$  (neuropeptídeo  $\gamma$ ). As atividades agonísticas das NKs estão associadas ao domínio carboxi terminal, descrito anteriormente, que é comum entre esses peptídeos (Mussap *et al.*, 1993). O domínio amino terminal, por sua vez, confere seletividade aos diferentes tipos de receptores (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994; Otsuka e Yoshioka, 1993).

### Síntese e inativação das neurocininas

Estudos de biologia molecular e análise seqüencial de DNA, revelaram que as NKs são sintetizadas a partir de dois genes distintos: o gene da PPT-I ou PPT-A (pré-protaquicininina A) e o gene da PPT-II ou PPT-B (pré-prótaquicininina B), no corpo celular. A transcrição do gene da PPT-A produz três RNAm de NKs distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -pré-prótaquicinininas). A PPT-I- $\alpha$  origina a SP, enquanto a PPT-I- $\beta$  origina a SP e a NKA, e ainda um análogo da NKA expandido na porção amino-terminal, o NPK. A PPT-I- $\gamma$  origina a SP, NKA, e ainda um análogo da NKA expandido na porção amino-terminal, o NP $\gamma$  (Nawa *et al.*, 1983, 1984; Kotani *et al.*, 1986; Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987; Maggio *et al.*, 1988; Guard e Watson, 1991). A PPT-II, por sua vez, codifica a

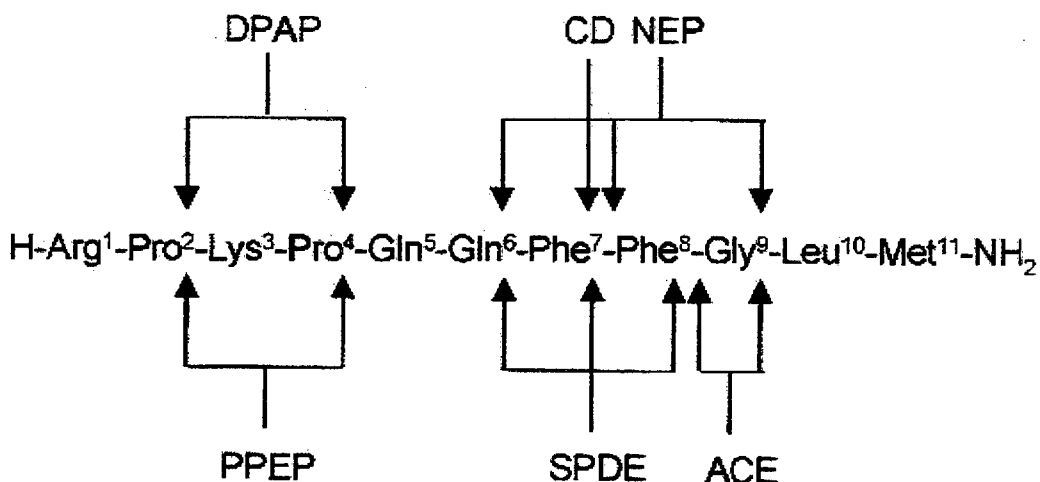
informação para a síntese de uma proteína precursora da NKB (Dorman *et al.*, 1993), conforme esquema abaixo:



**Figura 6 - Esquema de origem das neurocininas e seus precursores em mamíferos (adaptado de Guard e Watson, 1991).**

As NKs são armazenadas em grandes vesículas sinápticas (100 nm) localizadas na região axo-terminal (Maggi *et al.*, 1993). A exocitose das NKs é cálcio-dependente (Otsuka e Yoshioka, 1993), independente do tipo de estímulo fisiopatológico. A SP é sintetizada em forma de precursor, onde as aminas do carbono terminal são derivadas de alfa-aminogrupos de resíduos do aminoácido glicina adjacentes e o processo de amidacão ocorre em presença de peptidilglicina alfa-amidase (monoxigenase) dependente de cobre (Marchand *et al.*, 1990). As NKs, e particularmente a SP, são substratos para várias enzimas proteolíticas. A endopeptidase SPDE (enzima de degradação da SP) hidrolisa especificamente ligações peptídicas internas nas posições 7-8 e 8-9, enquanto que a PPEP (endopeptidase pós-prolina) cliva a SP e libera os fragmentos SP (3-11) e SP (5-11). As NEP (endopeptidase neutra) e ACE

(enzima conversora de angiotensina) promovem a liberação do fragmento SP (1-7), com maior ação sobre o SNC. Essas enzimas, portanto, aumentam as ações da SP no SNC (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994). Os sítios de clivagem e as enzimas envolvidas no metabolismo das NKs estão demonstrados a seguir:

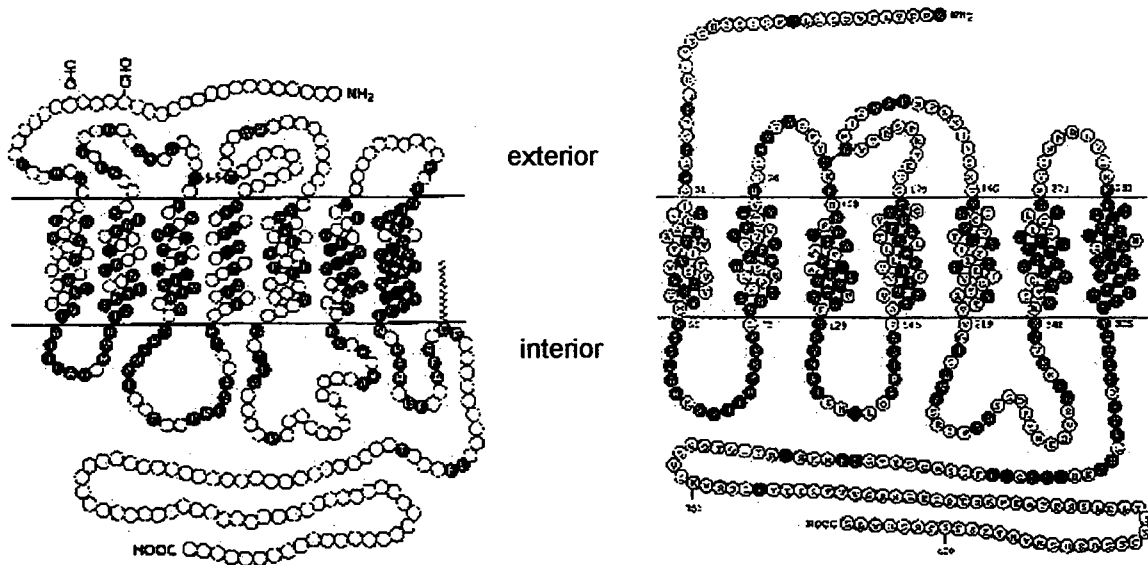


**Figura 7 - Sítios de degradação da SP *in vitro*. DPAP (dieptidii-aminopeptidase), PPEP (pró-prolina endopeptidase), CD (catepsina D), SPDE (enzima de degradação da SP), NEP (endopeptidase neutra) e ACE (enzima conversora de angiotensina). Adaptado de Regoli *et al.* (1994).**

### Participação das neurocininas em processos fisiopatológicos

As NKs estão envolvidas em diversas funções biológicas, muitas das quais determinadas pela sua seqüência comum no carbono terminal (Muneka *et al.*, 1987; Quartara *et al.*, 1992) e mediadas por um ou mais dos três receptores conhecidos: NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> (Regoli *et al.*, 1989). As NKs podem interagir com os três tipos de receptores, porém sua afinidade por cada um dos tipos difere: a SP é o agonista natural preferencial do receptor neurocinérgico do tipo NK<sub>1</sub> (Figura 8), a NKA do receptor NK<sub>2</sub> e a NKB do receptor do tipo NK<sub>3</sub>

(Maggi et al., 1993; Stables et al., 1994; Culman e Unger, 1995; Patacchini e Maggi, 1995).



- - Aminoácidos conservados nos receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>
- - Aminoácidos alterados nos receptores NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>

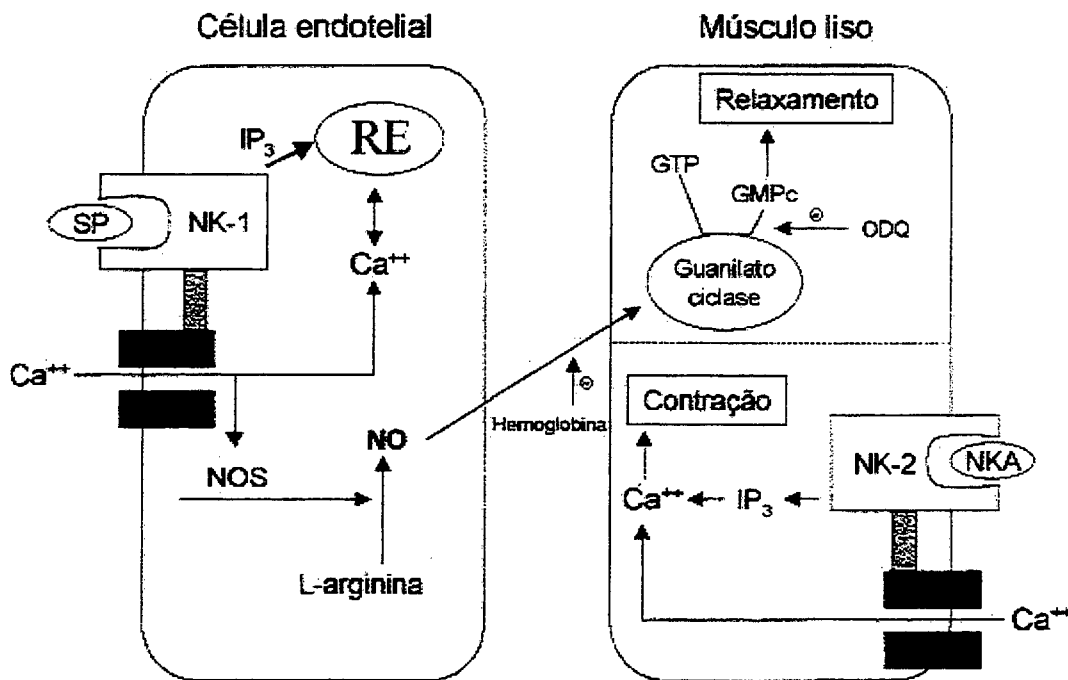
**Figura 8 - Representação esquemática do receptor NK<sub>1</sub> de rato (esquerda) e humano (direita; adaptado de Regoli et al., 1994).**

As NKs, interagindo com esses três tipos de receptores, regulam inúmeros processos fisiopatológicos tais como transmissão dolorosa, vasodilatação, broncoconstrição, contração da musculatura lisa, ativação do sistema imunológico, inflamação neurogênica e respostas comportamentais (Pernow, 1983; Maggio et al., 1988; Nakanishi, 1991; Patacchini e Maggi, 1995).

Vários dos efeitos da SP, decorrentes de sua interação com os receptores NK<sub>1</sub>, estão relacionados à ativação de proteínas G, com conseqüente ativação de fosfolipase C, acúmulo de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e subsequente aumento de Ca<sup>++</sup> citoplasmático.

A primeira atividade *in vivo* descrita para a SP foi demonstrada por von Euler e Gaddum (1931) ao reduzir a pressão arterial de coelhos, após sua administração sistêmica. Esse efeito hipotensor foi observado em várias

espécies animais e também em humanos (para revisão ver Pernow, 1983), sendo atribuído à ativação de receptores  $NK_1$  presentes no endotélio arterial (D'Orleans-Juste *et al.*, 1985). A SP promove também liberação de um agente relaxante da musculatura lisa (Zawadzki, *et al.*, 1981), identificado como óxido nítrico (Cherry *et al.*, 1982; Palmer *et al.*, 1987), conforme mostrado na Figura 9 abaixo.



**Figura 9 - Mecanismo de ação de receptores neurocinérgicos vasculares:  $NK_1$  no endotélio e  $NK_2$  no músculo liso (adaptado de Regoli *et al.*, 1994).**

A SP e demais NKs liberadas são potentes estimulantes da musculatura lisa vascular do intestino, vias aéreas, sistema urinário, útero entre outros órgãos; levando assim à uma variedade de efeitos periféricos como ativação da motilidade intestinal, broncoconstrição, contração da bexiga, do ureter, útero, entre outros (para revisão ver Maggi *et al.*, 1987, 1993); bem como ao estímulo secretório de várias glândulas, como as salivares e intestinais (para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993). Uma vez liberadas, as NKs podem atuar modulando a liberação de outros transmissores, como a noradrenalina, a acetilcolina, a dopamina e a serotonina (Fosbraey *et al.*, 1984; Zhou e Livett, 1990; Boix *et al.*,

1994; Brent *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1995;) e muitos outros presentes na periferia e no SNC (Jessel, 1983; Iversen, 1986; Saphier *et al.*, 1994).

Os outros tipos de receptores neurocinérgicos, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>, estão ainda envolvidos na atividade simpática no ducto deferente (Lee *et al.*, 1982) e no plexo mioentérico (Laüfer *et al.*, 1985), respectivamente. Os receptores NK<sub>2</sub> favorecem a liberação de noradrenalina e induzem a taquicardia, enquanto que os NK<sub>3</sub> reduzem a frequência cardíaca por promoverem a liberação de acetilcolina (Regoli *et al.*, 1988).

### **Neurocininas e sistema nervoso central**

de Wied e van Ree (1989) sugeriram que as desordens psiquiátricas e neurológicas apresentam como fatores etiológicos alterações nos sistemas neuropeptidérgicos. Uma característica particular dos neuropeptídeos é a capacidade de exercerem ação direta sobre diferentes tipos de comportamento (Klavdieva, 1995). O mesmo parece ocorrer com as neurocininas, pois todas as NKs estão amplamente distribuídas no SNC e várias ações farmacológicas foram descritas para estes peptídeos (Itoi *et al.*, 1988, 1992; Unger *et al.*, 1988). Estudos em animais têm demonstrado que as NKs modulam diversas funções no SNC, como a transmissão da dor, memória e secreções neuroendócrinas (dopamina, hormônios hipofisários, por exemplo; para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993). O segundo mensageiro envolvido nesses processos centrais não está ainda bem definido, porém, de acordo com Guard e Watson (1991), as "NKs induzem a formação de IP<sub>3</sub> no SNC, sendo esta ação mediada principalmente por receptores NK<sub>1</sub>". Isso parece ocorrer no hipotálamo de ratos (Watson e Downes, 1983) e colículo superior de coelhos (Osborne e Ghazi, 1989), enquanto na medula espinhal de ratos este estímulo ocorre via receptores NK<sub>3</sub> (Guard e Watson, 1991). As ações centrais mediadas pelas NKs merecem atenção especial no que diz respeito a estímulos sensoriais ao nível da medula espinhal, além da regulação central do sistema cardiovascular (Regoli *et al.*, 1994).

Em 1980, Oehme *et al.* observaram a influência modulatória dos neuropeptídeos na resposta fisiológica ao estresse. Alguns estudos mostraram que a agressão induzida por isolamento (Hall e Stewart, 1984) e o

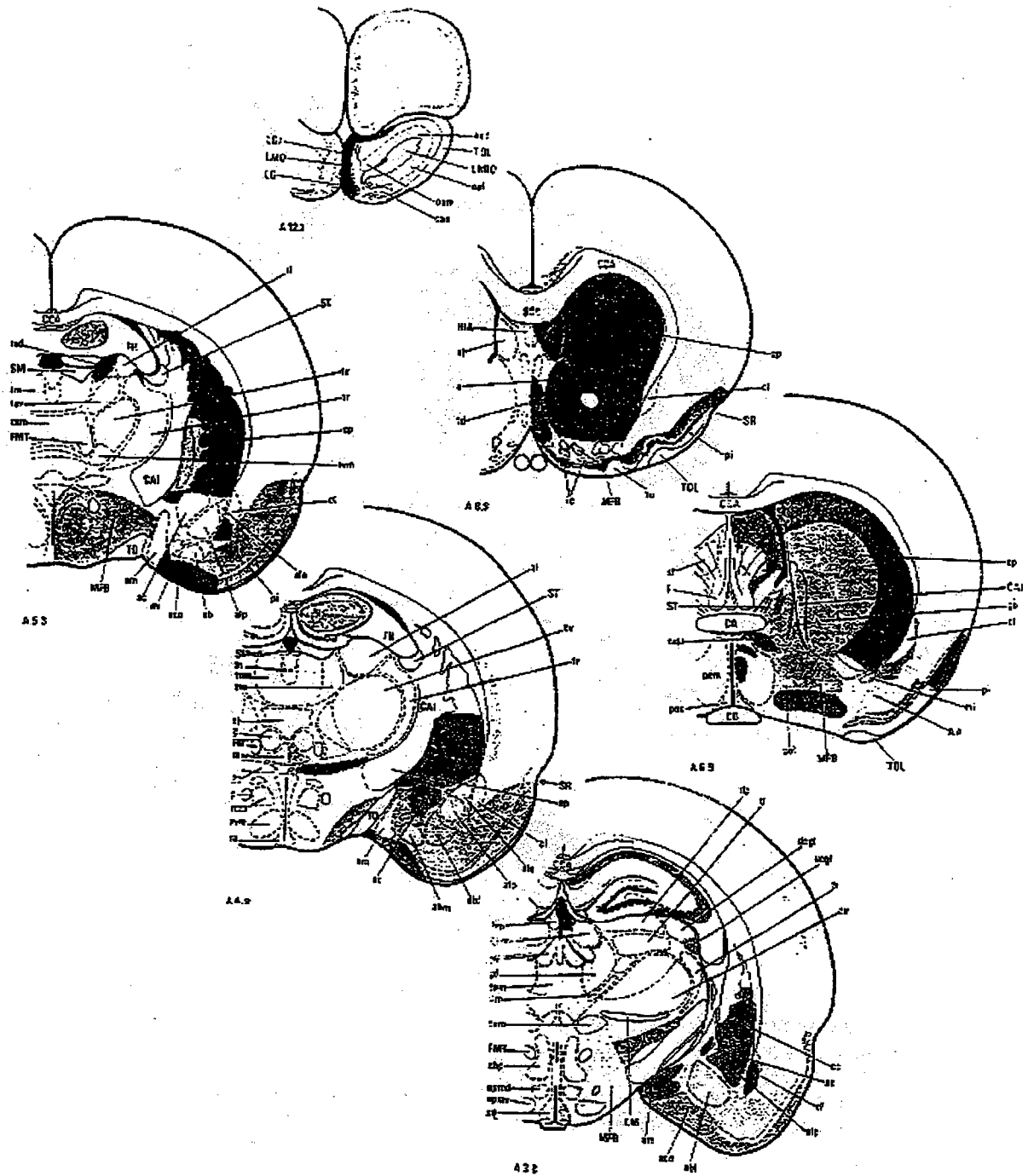


comportamento consumatório (De Caro *et al.*, 1988) parecem envolver uma importante participação neurocinérgica, em roedores. Outros estudos têm sugerido o envolvimento da SP em processos de aprendizado e memória, tanto no desenvolvimento quanto no reforço dos mesmos (Huston e Stäubli, 1981; Huston *et al.*, 1993; Hasenöhr *et al.*, 1994; Kovács e de Wied, 1994).

A administração central de SP ou de outros agonistas seletivos do receptor neurocinérgico do tipo NK<sub>1</sub> promove uma exacerbação na atividade locomotora, na atenção e nos comportamentos de auto-limpeza (Sakurada *et al.*, 1989; Brent *et al.*, 1994), além de um aumento na pressão arterial, na frequência e débito cardíacos, atividades comportamentais e fisiológicas típicas da reação de defesa, em ratos conscientes (Unger *et al.*, 1988; Tschöpe *et al.*, 1992; Culman e Unger, 1995). Também em cobaias foi observada uma hiperatividade locomotora, além de comportamentos do tipo “wet-dog shaking” (‘sacudir de cachorro molhado’), após a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de agonistas seletivos NK<sub>1</sub> (Piot *et al.*, 1995). Agonistas seletivos de NK<sub>1</sub> produzem ainda respostas comportamentais nociceptivas, incluindo comportamentos compulsivos de coçar, morder e lambe os membros posteriores ou o abdômen e o tórax, em ratos e camundongos, quando administrados i.c.v. ou na substância negra (Laneuville *et al.*, 1988; Ravard *et al.*, 1994; Stoessl *et al.*, 1995). A ativação de receptores neurocinérgicos NK<sub>1</sub> centrais pode promover também um bater repetitivo das patas posteriores (Bristow e Young, 1994). Zernig *et al.* (1992; 1993) observaram ainda que a administração periférica de CP-96345 e RP 67580, antagonistas seletivos NK<sub>1</sub>, reduz a atividade locomotora, provavelmente devido à sedação, no teste da caixa claro-escuro. Assim, face à importância das NKs na regulação de diversas funções vitais, o desenvolvimento de antagonistas dos receptores neurocinérgicos pode ser útil para o tratamento de distúrbios psiquiátricos como esquizofrenia e ansiedade (Otsuka e Yoshioka, 1993; Longmore *et al.*, 1995), além de outras doenças humanas, tais como dor, artrite, asma, emese (Maggi *et al.*, 1993; Regoli *et al.*, 1994).

## Localização da substância P no sistema nervoso central

As NKs estão amplamente distribuídas no SNC. A SP, em particular, parece ser um neurotransmissor bastante comum no SNC (Cuello e Kanazawa, 1978). Segundo O'Donohue *et al.* (1990), áreas que apresentam sítios de ligação para SP, principalmente, o núcleo central da amígdala, os corpos mamilares, o núcleo interpeduncular, os colículos superiores, a PAG, o núcleo do trato solitário e o corno dorsal da medula espinhal. Foram ainda detectados sítios de ligação específicos para SP no núcleo *accumbens*, estriado, núcleo periventricular do tálamo, habênula lateral, núcleo inferior de oliva, corno ventral e núcleo central da medula espinhal. Terminações nervosas contendo altas concentrações de SP estão presentes ainda em núcleos sensoriais, além de outros não sensoriais, como tálamo, hipotálamo e sistema extrapiramidal. Hökfeit *et al.* (1974), utilizando a técnica de imunofluorescência, demonstrou a existência de fibras ricas em SP no núcleo do trato espinhal do nervo trigêmio, na PAG, no núcleo interpeduncular, no núcleo medial da amígdala e na área medial pré-óptica. Regiões cerebrais implicadas em reações de defesa e ansiedade, como o hipotálamo, amígdala, hipocampo e PAG (Cuello e Kanazawa, 1978; Shaikh and Siegel, 1994) expressam densidades significantes de receptores para NKs, além de fibras nervosas e corpos celulares imunorreativos à SP (para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993). Nas figuras 10 e 11 mostramos em representações esquemáticas os sítios de ligação da SP no SNC de ratos (O'Donohue *et al.*, 1990).



**Figura 10 - Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 12.1 até A 3.8) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro-caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP. A densidade relativa dos sítios de ligação é representada de acordo com uma escala que varia do cinza escuro (++++/+++), cinza (++) e cinza claro (+) correspondendo as áreas de maior até aquelas de menor concentração de receptores para SP (retirado de O'Donohue *et al.*, 1990).**

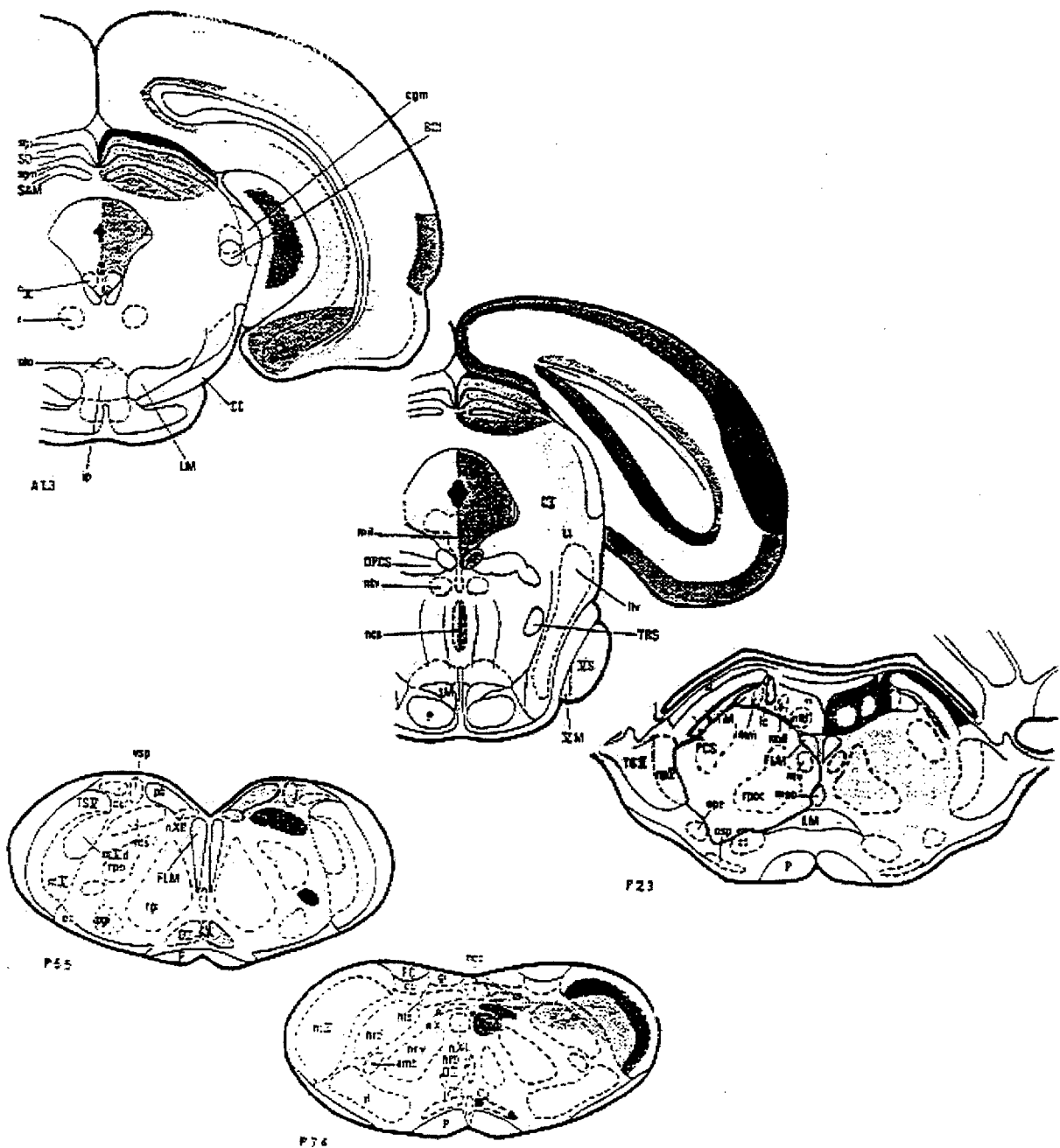


Figura 11 - Representações esquemáticas de cortes frontais (nos níveis que vão de A 1.3 até P 7.4) do SNC de ratos, arranjadas no sentido rostro-caudal, ilustrando a distribuição dos sítios de ligação da SP. A densidade relativa dos sítios de ligação é representada de acordo com uma escala que varia do cinza escuro (++++/+++), cinza (++) e cinza claro (+), correspondendo as áreas de maior até aquelas de menor concentração de receptores para SP (retirado de O'Donohoue *et al.*, 1990).

### Lista de abreviações referentes as figuras 10 e 11

<b>A</b> - Núcleo accumbens	<b>LMO</b> - Camada molecular do bulbo olfativo
<b>AA</b> - Área anterior da amígdala	<b>MFB</b> - Núcleo medial prosencefálico
<b>AB</b> - Núcleo basolateral da amígdala	<b>N-III</b> - Núcleo do nervo oculomotor
<b>AC</b> - Núcleo central amigdalóide	<b>N-X</b> - Núcleo do nervo vago
<b>ACO</b> - Núcleo cortical amigdalóide	<b>N-XII</b> - Núcleo do nervo hipoglosso
<b>ALA</b> - Porção antero-lateral do núcleo amigdalóide	<b>NCO</b> - Núcleo comissural
<b>ALP</b> - Porção postero-lateral do núcleo amigdalóide	<b>NCS</b> - Núcleo central superior
<b>AM</b> - Núcleo medial amigdalóide	<b>NHP</b> - Núcleo hipotalâmico posterior
<b>BCL</b> - Colículo inferior	<b>NIST</b> - Núcleo intersticial da estria terminal
<b>CA</b> -Comissura anterior	<b>NPMD</b> - Núcleo pré-mamilar dorsal
<b>CAI</b> - Cápsula interna	<b>NPMV</b> - Núcleo pré-mamilar ventral
<b>CCA</b> - Corpo caloso	<b>NPV</b> - Núcleo paraventricular hipotalâmico
<b>CGM</b> - Núcleo geniculado medial	<b>NRD</b> - Núcleo reticular pontino (dorsal)
<b>CI</b> - Córtex cingulado	<b>NRV</b> - Núcleo reticular pontino (ventral)
<b>CM</b> - Núcleo centro medial do tálamo	<b>NT-V</b> - Núcleo espinhal (trigêmio)
<b>CO</b> - Quiasma óptico	<b>NT-Vd</b> - Núcleo espinhal dorsomedial
<b>CP</b> - Caudado-putamen	<b>NTD</b> - Núcleo tegmental dorsal
<b>CP</b> - Comissura posterior	<b>NTDL</b> - Núcleo tegmental lateral dorsal
<b>CT</b> - Núcleo trapezóide	<b>NTM</b> - Núcleo do trato mesencefálico
<b>DCGL</b> - Núcleo geniculado lateral dorsal	<b>NTS</b> - Núcleo do trato solitário
<b>EP</b> - Núcleo endopeduncular	<b>NTV</b> - Núcleo tegmental ventral
<b>F</b> - Fórnix	<b>OA</b> - Núcleo olfativo anterior
<b>FH</b> - Fímbria hipocampal	<b>OAD</b> - Núcleo olfativo anterior (dorsal)
<b>FMT</b> - Núcleo mamilar talâmico	<b>OAE</b> - Camada externa do núcleo olfativo anterior
<b>GP</b> - Globo Pálido	<b>OAL</b> - Núcleo olfativo anterior (lateral)
<b>GR</b> - Núcleo grácil	<b>OAM</b> - Núcleo olfativo anterior (medial)
<b>HIA</b> - Hipocampo (porção anterior)	<b>OC</b> - Trato olivar cerebelar
<b>HL</b> - Núcleo lateral da habênula	<b>OI</b> - Núcleo olivar
<b>HM</b> - Núcleo medial da habênula	<b>OPE</b> - Núcleo pré-olivar superior
<b>IC</b> - Núcleo intersticial de Cajal	<b>OSP</b> - Núcleo olivar superior
<b>IP</b> - Núcleo interpeduncular	<b>P</b> - Tracto corticoespinhal
<b>LC</b> - <i>Locus coeruleus</i>	
<b>LG</b> - Camada glomerular do bulbo olfativo	
<b>LGI</b> - Camada granular do bulbo olfativo	
<b>LL</b> - Lemnisco lateral	
<b>LLV</b> - Núcleo do lemnisco lateral	
<b>LM</b> - Núcleo do lemnisco medial	
<b>LMIO</b> - Camada medular do bulbo olfativo	

**Continuação da lista de abreviações referentes as figuras 10 e 11**

<b>PCS</b> - Pedúnculo cerebelar superior	tálamo
<b>PF</b> - Núcleo parafascicular	<b>TD</b> - Núcleo da banda diagonal de broca
<b>PH</b> - Núcleo do hipoglosso	<b>TL</b> - Núcleo lateral do tálamo
<b>PI</b> - Córtex piriforme	<b>TM</b> - Núcleo medial do tálamo
<b>POL</b> - Núcleo pré-óptico lateral	<b>TLP</b> - Núcleo posterior do tálamo
<b>POM</b> - Núcleo pré-óptico medial	<b>TMV</b> - Núcleo ventro medial do tálamo
<b>POS</b> - Núcleo pré-óptico supraquiasmático	<b>TO</b> - Trato óptico
<b>PV</b> - Núcleo paraventricular do tálamo	<b>TOL</b> - Trato olfativo lateral
<b>RPOC</b> - Núcleo reticular pontino	<b>TPM</b> - Núcleo postero-medial do tálamo
<b>SGS</b> - Colículo superior	<b>TR</b> - Núcleo reticular do tálamo
<b>SL</b> - Núcleo do septo lateral	<b>TS-V</b> - Núcleo espinhal do trigêmio
<b>SM</b> - Estria medular do tálamo	<b>TU</b> - Tubérculo olfativo
<b>SO</b> - Colículo superior (estrato óptico)	<b>TV</b> - Núcleo ventral do tálamo
<b>SR</b> - sulco etorrinal	<b>VCGL</b> - Núcleo geniculado lateral ventral
<b>ST</b> - Estria terminal	<b>VM</b> - Núcleo motor do trigêmio
<b>TAD</b> - Núcleo anterior do tálamo dorsal	<b>VS</b> - Núcleo sensorial do trigêmio
<b>TAM</b> - Núcleo antero medial do tálamo	<b>VSP</b> - Núcleo vestibular espinhal
<b>TAV</b> - Núcleo antero-ventral do	

## Neurocininas e ansiedade

A SP, agonista natural e preferencial dos receptores NK<sub>1</sub>, induz reações cardiovasculares de defesa em ratos (Unger *et al.*, 1988; Tschöpe *et al.*, 1992; Culman e Unger, 1995) e apresenta efeitos pró-aversivos quando microinjetada na dPAG (Aguiar e Brandão, 1996). Fehder *et al.* (1997), após verificarem um aumento dos níveis sanguíneos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos, propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas pelo estresse. Outros estudos demonstraram que a SP está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa no sistema límbico, em ratos (Brodin *et al.*, 1994) e gatos (Shaikh *et al.*, 1993).

Estudos prévios demonstraram que a ansiedade experimental pode ser modulada pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem receptores neurocinérgicos NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>. A administração i.p. de um antagonista do receptor NK<sub>1</sub>, CP 96345, em camundongos, promove um aumento tanto na latência para a entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro como no tempo despendido no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1992; 1993). Teixeira *et al.* (1996) demonstraram que a estimulação dos receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> promove um efeito do tipo ansiogênico, em camundongos avaliados no LCE. O bloqueio seletivo dos receptores NK<sub>1</sub> pelo FK-888, em contrapartida, produz um efeito contrário, isto é, uma ação do tipo ansiolítica no mesmo modelo experimental (Teixeira *et al.*, 1996). Outro antagonista de receptores NK<sub>1</sub>, o CGP 49823, apresentou um efeito do tipo ansiolítico no teste de interação social em ratos (File, 1997), reforçando a hipótese de que a SP desempenha papel modulatório nos estados de ansiedade experimental.

A administração sistêmica (subcutânea) ou central (núcleo dorsal da rafe) de antagonistas de receptores NK<sub>2</sub> (GR 100679, SR 48969, GR 159897), reduz os comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos animais (teste de interação social, caixa claro-escuro, LCE) e espécies animais (camundongos, ratos e primatas; Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995). A

administração central de agonistas (NKA e  $\beta$ -Ala<sup>8</sup>-NKA) e do antagonista (SR 48968) seletivos de receptores NK<sub>2</sub>, resulta em efeitos do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no LCE, em camundongos (Teixeira *et al.*, 1996). A estimulação de receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub>, portanto, promove efeitos do tipo ansiogênico, enquanto que seu bloqueio exerce efeito contrário, isto é, do tipo ansiolítico.

Estudos preliminares mostraram que o senktide, um agonista seletivo NK<sub>3</sub> (Wörmser *et al.*, 1986), produz um aumento dose-dependente na frequência de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, característico de uma ação do tipo ansiolítica (Teixeira, 1995; Teixeira *et al.*, 1995). Estes dados foram confirmados posteriormente mostrando a participação de receptores neurocinérgicos NK<sub>3</sub> na modulação da ansiedade em camundongos avaliados no LCE, bem como a interação entre os sistemas neurocinérgico e opióide nesta modulação (Ribeiro, 1998; Ribeiro *et al.*, 1998).

## **NEUROKININAS E ÓXIDO NÍTRICO**

Em vários sistemas periféricos e centrais o NO parece mediar alguns efeitos da SP (Mancuso *et al.*, 1994; Ziche *et al.*, 1994; Goettl e Larson, 1996; Sakurada *et al.*, 1996; Hölzer, 1997), além de regular a liberação de SP em algumas preparações (Kamisaki *et al.*, 1995; Inoue *et al.*, 1997).

Entre as diversas evidências encontradas na literatura a esse respeito, dois grupos (Nguyen *et al.* e Ralevic *et al.*), em 1985, atribuíram o aumento da permeabilidade da microvasculatura venular mesentérica perfundida e da microvasculatura da pele, induzidas pela SP, como resultado do aumento da produção de NO. Eutamene *et al.* (1995) mostraram que a hipersecreção colônica induzida pela interleucina IL-1 $\beta$  *in vivo* envolve a ativação em cascata de receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub>, sugerindo a liberação de SP e NKA, conseqüente à liberação de NO. A ação da SP em receptores NK<sub>1</sub> de células endoteliais induz a liberação de NO que se difunde para o lúmen e, conseqüentemente, ativa GC levando ao relaxamento musculatura lisa vascular (Regoli *et al.*, 1994). Outros



estudos mostram que taxas fisiológicas de NO modulam a angiogênese induzida por agentes vasoativos como a SP, por mecanismo de ativação autócrinos e parácrinos (Ziche *et al.*, 1994). O metabólito N-terminal da SP, em áreas periféricas e na medula espinhal, parece modular múltiplos tipos de nocicepção com respostas hiperalgésicas persistentes, envolvendo o NO (Goettl e Larson, 1996). Inoue *et al.* (1997) mostraram ainda que células da medula espinhal dorsal facilitam a despolarização induzida por 5-HT, evocando a liberação de SP via receptores 5-HT<sub>3</sub> acoplados à via NO / GMPc. Holzer (1997) propôs que a SP pode inibir o peristaltismo intestinal via estimulação dos receptores NK<sub>1</sub>, sendo que este efeito envolve vias motoras inibitórias que utilizam o NO como transmissor, uma vez que é bloqueado pelo pré-tratamento com inibidores da NOS.

Em relação ao SNC, Mancuso *et al.* (1994), utilizando a L-NAME, um inibidor da NOS, observaram uma redução nos efeitos da SP sobre a atividade locomotora e a ingesta alimentar de ratos, sugerindo assim que níveis endógenos de NO modulam os efeitos da SP. Kamisaki *et al.* (1995) demonstraram que possivelmente ocorre uma interação entre terminais contendo glutamato e SP, sendo que o NO participa diretamente regulando a transmissão sináptica de fibras contendo SP. Esta ativação seria mediada pela ativação de GC, aumentando os níveis de GMPc.

Assim, a SP e o NO parecem estar relacionados na modulação de vários efeitos em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*. A SP promove uma ação do tipo ansiogênica em animais e os inibidores de NO parecem produzir efeitos contrários, isto é, ansiolíticos, o que sugere portanto, um perfil de atividade similar para a SP e o NO, sendo possível que o efeito “ansiogênico” observado com a SP seja modulado pelo NO e a partir dessa hipótese propusemos o trabalho aqui apresentado.

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar o possível envolvimento do óxido nítrico no efeito ansiogênico da substância P (SP), em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado. Para que o objetivo final fosse atingido, tornou-se necessário estabelecer alguns objetivos específicos como:

- Caracterizar a ação do óxido nítrico no mesmo paradigma experimental, estudando o efeito dose-resposta de:

- inibidores da NOS, como a L-NOARG, L-NAME e 7-NI, seletivo para a NOS<sub>n</sub>;
- doador de NO, como o SNAP, e o NAP, sua molécula precursora.

- Analisar, através de técnicas bioquímicas a atividade dos inibidores de NOS *in vitro*.

Na verificação da participação do óxido nítrico no efeito do tipo ansiogênico da substância P foi necessário pré-tratar animais com:

- inibidores da NOS, como a L-NOARG, L-NAME e 7-NI;
- doador de NO, o SNAP e sua molécula precursora, o NAP;
- análogo da GMPc, 8-Br-GMPc;
- inibidor inespecífico da fosfodiesterase, IBMX.

Foi ainda investigada uma possível relação entre a SP e a ativação de NOS, em ensaios bioquímicos *ex vivo*.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### ANIMAIS

Foram utilizados 584 camundongos albinos Suiços pesando entre 25-30 g. Foram usados animais machos (3,0 meses de idade), nos experimentos com pré-tratamento por via intraperitoneal (i.p.), e fêmeas (2,5 meses de idade), nos experimentos empregando a via intracerebroventricular (i.c.v.). Os animais foram criados no Biotério Central e mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. A temperatura ambiente,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , e o ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz das 7:00 às 19:00 h), foram controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais ( $n= 6 -10/\text{grupo}$ ) foram escolhidos aleatoriamente, sendo que cada animal foi utilizado somente uma vez.

#### DROGAS E SOLUÇÕES

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- **8-Bromoguanosina-3':5'-monofosfato ciclico monossódico (8-Br-GMPc)**, análogo do GMPc (Ignarro *et al.*, 1974; Buchan *et al.*, 1991), adquirido da Research Biochemical International, RBI (Natick, MA, USA);
- **3-isobutll-1-metiixantina (IBMX)**, inibidor inespecífico de fosfodiesterase (Beavo *et al.*, 1970; Montague, 1971), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), gentilmente doado pelo Dr. Antonio José Lapa (Farmacologia, Escola Paulista de Medicina/UNIFESP);
- **N-acetil-DL-penicilamina (NAP)**, molécula precursora do SNAP (Gross *et al.*, 1994), adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), gentilmente doado pelo Dr. Jamil Assreuy Filho (Farmacologia, UFSC);
- **N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG)**, inibidor reversível das óxido nítrico sintases (Ishii *et al.*, 1990; Mulsh *et al.*, 1990; Dwyer *et al.*, 1991.), adquirido da Research Biochemicals International, RBI (Natick, MA, USA);
- **N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME)**, inibidor irreversível das óxido nítrico sintases (Crossin, 1991; Gray *et al.*, 1991; Belsivi *et al.*, 1991),

adquirido da Research Biochemical International, RBI (Natick, MA, USA);

- **7-nitroindazol (7-NI)**, inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (Garthwaite *et al.*, 1991; Babbedge *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1993), adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA);
- **S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP)**, doador de óxido nítrico (Howaluk *et al.*, 1990; Bauer *et al.*, 1991; Southam *et al.*, 1991), sintetizado (método de Field *et al.*, 1978) e gentilmente doado pelo Dr. Jamil Assreyu Filho (Farmacologia, UFSC);
- **Substância P (SP)**, ligante natural seletivo para o receptor neurocinérgico NK<sub>1</sub> (Chang, M. *et al.*, 1971), adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA.);

O agonista NK<sub>1</sub>, **SP**, foi preparado como solução estoque (1 mM) em solução fosfato tamponada, PBS ("phosphate-buffered solution"): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Co.), estocado a -20°C em tubos de Eppendorf siliconizados. A SP foi diluída em PBS (pH=7,4), nas concentrações adequadas, na hora do uso.

As diversas drogas que influenciam a formação de NO (inibidores de NOS e doadores de NO), exceto o 7-NI, foram preparadas em PBS, nas concentrações adequadas, na hora do uso. O 7-NI foi preparado como solução estoque (125 nmol) em mistura de 20 µl de DMSO, 1 µl de NaOH 5M, 15,9 µl de Tween e PBS q.s.p. 100 µl e estocado em câmara fria em tubos de Eppendorf. O 7-NI foi diluído em PBS (pH=7,4), nas concentrações adequadas, na hora do uso. O 8-Br-GMPc, um análogo estável do GMPc e o IBMX, um inibidor inespecífico de fosfodiesterase, foram preparados em PBS e PBS + 0,2% de etanol absoluto, respectivamente nas concentrações estabelecidas na hora do uso. A solução controle de cada droga foi a mesma mistura que constituiu seu veículo, sendo estocada de forma semelhante.

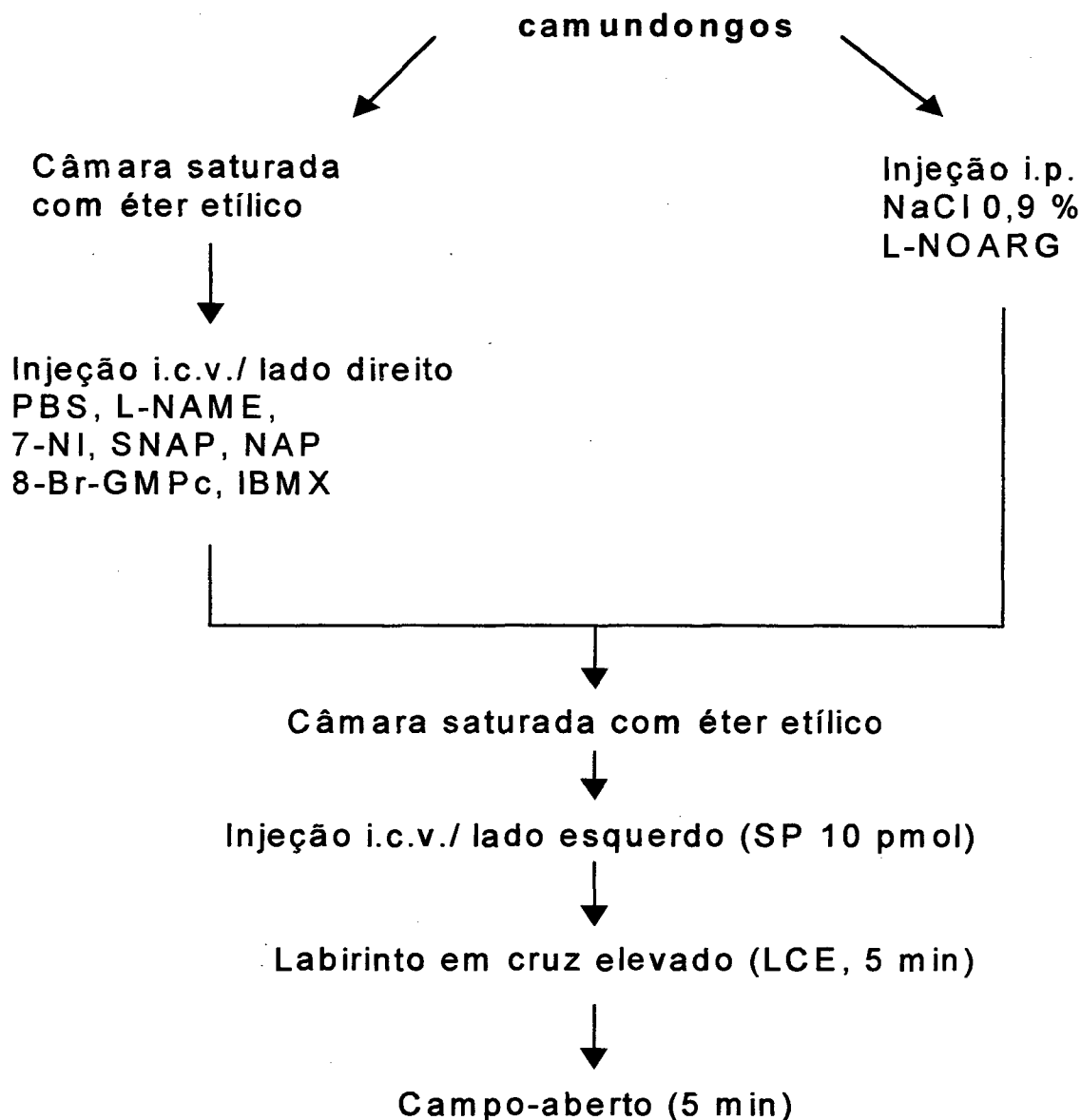
## PROCEDIMENTOS GERAIS

A administração intracerebroventricular (i.c.v.) das diversas drogas foi realizada empregando-se a técnica "free hand", desenvolvida por Haley e McCormick (1957) e modificada por Laursen e Belknap (1986). Cada animal foi

anestesiado superficialmente com éter e a seringa foi posicionada em plano inclinado (45°) ao crânio, com o bisel da agulha voltado para a cauda do animal. Uma linha imaginária foi traçada rostralmente às orelhas do animal e a agulha foi introduzida 3,5 mm no sentido dorso-ventral e aproximadamente 2 mm lateral à linha mediana. A injeção foi realizada com o auxílio de uma micro-seringa Hamilton 701 N (10 µl), conectada a um tubo de polietileno (PE 20 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA) de aproximadamente 12 cm de comprimento. Na extremidade final do polietileno foi conectada uma agulha de insulina (13 x 4; 80/100; Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Curitiba, Paraná). As seguintes drogas foram injetadas por via i.c.v. (2 µl), nas concentrações indicadas abaixo:

- 8-Br-GMP: 2,0 e 20 nmol;
- IBMX: 0,2 e 2,0 nmol;
- L-NAME: 0,3; 1,0; 3,0; 10; 30 e 100 nmol;
- NAP: 0,02; 0,2; 2,0 e 20 pmol;
- 7-NI: 0,025; 0,1; 0,25; 2,5 e 25 nmol;
- SNAP: 0,02; 0,2; 2,0 e 20 pmol;
- SP: 10 pmol

A administração de L-NOARG (2,0; 20 e 200 nmol) foi procedida pela via intraperitoneal (i.p. - 0,1 ml/10 g de peso), 30 min antes da administração central de SP. O L-NAME e o 7-NI, o SNAP e o NAP foram administrados 15 e 30 min antes da injeção i.c.v. de SP no ventrículo contralateral, respectivamente. O IBMX e o 8-Br-GMPc foram administrados i.c.v. 10 min antes da injeção i.c.v. de SP no ventrículo contralateral, respectivamente. A SP foi injetada na dose de 10 pmol, previamente determinada em nosso laboratório, como uma dose que promove um efeito ansiogênico no paradigma experimental utilizado em camundongos (Teixeira, 1995; Teixeira *et al.*, 1996). O grupo controle foi tratado com solução salina (i.p.) ou PBS (i.c.v.), nas mesmas condições e volume que os grupos experimentais. Os pré-tratamentos foram realizados como mostra o esquema abaixo:

**ESQUEMA 1 – Procedimento experimental**

Assim, após a injeção i.c.v. e a recuperação do reflexo postural, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), seguido pelo campo-aberto. Imediatamente após o término das observações comportamentais, no caso dos camundongos fêmeas, foi feita a coleta da secreção vaginal em solução salina (NaCl 0,9%) e a leitura do material foi realizada em microscopia óptica comum sendo a fase do ciclo estral determinada (Hoar, 1975). Os animais cuja fase do ciclo estral diferenciou do estágio de diestro (D1 e D2) foram desconsiderados na análise dos resultados finais comportamentais. A seguir, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, e a localização correta da injeção i.c.v. foi verificada

visualmente a *fresco* em cada animal. Os animais que apresentaram sinais de hemorragia e/ou localização duvidosa/incorrecta da injeção foram descartados das análises posteriores.

### **Labirinto em cruz elevado (“plus-maze”)**

Dentre os diversos modelos experimentais de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um dos modelos mais utilizados atualmente nas investigações dos substratos neuronais da ansiedade e nos estudos sobre os mecanismos de ação de drogas que atuam nesse distúrbio. Este modelo foi primeiramente empregado por Handley e Mithani (1984) que observaram que ratos colocados no centro do LCE demonstravam clara preferência pela exploração dos braços fechados, como já havia sido descrito por Montgomery (1955) usando um labirinto em forma de “Y”. Esta preferência foi atribuída ao conflito gerado nos animais entre seus impulsos exploratórios e aqueles de medo. Os impulsos exploratórios seriam evocados com a mesma intensidade nos braços fechados e abertos do labirinto, enquanto que os de medo seriam mais intensos nos braços abertos. Assim, a exposição dos animais a situações ameaçadoras, como altura e espaços abertos, que na natureza representam situações de potencial risco à predação, explicaria o maior medo pela exploração nos braços abertos, sendo que a ausência de proteção lateral (e não a altura dos braços abertos), impedindo a tigmotaxia, parece ser o fator mais importante para geração do medo (Treit *et al.*, 1993). O LCE é um modelo validado comportamentalmente, fisiológica e farmacologicamente, tendo sido observadas respostas comportamentais e fisiológicas indicativas de medo, como imobilidade, defecação e elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona pelo confinamento dos animais nos seus braços abertos. Além disso, está bem estabelecido que drogas ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que drogas ansiogênicas promovem o inverso (Pellow *et al.*, 1985). Face ao que foi discutido, aliado a reprodutibilidade desse paradigma e à facilidade de aquisição de dados para o estudo da ansiedade, escolhemos esse modelo experimental para atingir nossos objetivos de investigar a participação do NO no efeito ansiogênico da SP em camundongos.

O LCE foi baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow *et al.* (1985) e validado por Lister (1990) para camundongos e consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) opostos, em forma de cruz grega, elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos apresentam uma barra lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto.

O LCE encontrava-se numa sala iluminada com luz vermelha de 15 w, e a temperatura foi mantida em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Imediatamente após a recuperação do reflexo postural, cada animal foi colocado, individualmente, no LCE com sua face voltada para um dos braços fechados e seu comportamento avaliado durante 5 min.

Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do equipamento. Como medida de locomoção foi obtida a frequência total de entradas nos braços fechados. O número total de entradas foi obtido pela soma do número de entradas nos braços abertos e fechados. Segundo Rodgers *et al.* (1995), a entrada em um dos braços deve ser considerada quando o animal coloca as quatro patas dentro do respectivo braço. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos o percentual de entradas foi calculado dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas e este índice multiplicado por 100 ( $[A/A + F] \times 100$ ). O percentual de tempo foi calculado de maneira semelhante: o tempo gasto nos braços abertos foi dividido pela somatória do tempo de permanência em ambos os braços e o quociente obtido foi multiplicado por 100 ( $[TA/TA + TF] \times 100$ ) (Handiey e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Treit *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1994). Foram também registrados no labirinto em cruz medidas de avaliação etológica como o número de imersões de cabeça (“head-dippings”) e estiramentos (“stretch attend postures”), que são medidas do comportamento de avaliação de risco (“risk assessment”) (Rodgers e Cole, 1994) e o número de bolos fecais, como índice de emocionalidade (Hall, 1934; Archer, 1973), associado ou não à locomoção.



Os experimentos foram todos realizados entre às 08:00 e 13:00 h. Antecedendo aos experimentos, os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma ante-sala do laboratório por um período de, no mínimo, 1h antes do início dos experimentos.

### **Campo-aberto (“open-field”)**

Após a exposição ao LCE cada animal foi colocado, individualmente, no centro de um campo aberto confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto, 30 x 30 x 15 cm) para avaliar a atividade exploratória dos animais: movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza (“grooming”), de levantar (“rearing”) e a sua defecação, parâmetros estes registrados durante um período de 5 min.

### **Inibição da atividade da óxido nítrico sintase neuronal *in vitro* e *ex vivo***

A determinação da atividade da NOS (*in vitro* e *ex vivo*) baseia-se na conversão de [<sup>3</sup>H] L-arginina em [<sup>3</sup>H] L-citrulina pela NOS, descrito por Bredt e Snyder (1990) e Knowles *et al.* (1990), modificado por Wolff e Dato (1992).

A inibição da atividade da NOSn pelas soluções de 7-NI (0,025; 0,25; 2,5; 25 e 125 nmol), *in vitro*, foi determinada pelo método indireto da L-arginina. O meio de reação consiste de uma mistura de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,4 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM; L-valina 120 mM; L-citrulina 2,4 mM e água. Ao meio de reação foi acrescido: DTT (DL-ditioneitol) 2mM; FAD (adenina dinucleotídeo de flavina) 8 μM; FMN (adenina mononucleotídeo de flavina) 8 μM; TBH<sub>4</sub> (tetrahidrobiopterina) 20 μM; NADPH (dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina, forma reduzida) 240 μM e L-Arg 5 μM. Em seguida adicionou-se [<sup>3</sup>H]L-Arg. Uma vez preparado o meio de reação final, foi acrescida NOSn extraída de membranas do córtex cerebral de camundongos e concentrações crescentes da solução de 7-NI. Após uma hora a reação foi interrompida com a adição de uma resina de troca iônica AG-50X8 [10 g/100 ml em MES (ácido

morfoiino etano sulfônico) 20 mM, pH = 5,5 e EDTA (ácido etileno diamino tetra acético) 2 mM]. A mistura foi mantida sob agitação por 30 min, seguida de repouso para decantação da resina e foi centrifugada durante 5 min em alta rotação (Centrimicro / modelo 212 - Fanem). Alíquotas (200  $\mu$ l) do sobrenadante contendo [ $^3$ H]L-citrulina acrescidas de 1000  $\mu$ l de líquido de cintilação e submetidos à análise em cintilador líquido (1600 TR / Tri-Card / Packard).

Para os ensaios *ex vivo*, os cérebros de animais tratados i.c.v. com SP (10 pmol; 2  $\mu$ l) ou PBS (2  $\mu$ l) foram rapidamente retirados, após sua decapitação com guilhotina, divididos em hemisférios esquerdo e direito, pesados e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . No dia da determinação da atividade da NOSn as amostras foram homogeneizadas (homogenizador Branson, modelo 2210) em 5 volumes de tampão TRIS (pH=7,0 com HCl) a  $4^{\circ}\text{C}$ , acrescidos de EDTA 1 mM, DDT 1 mM, sacarose 30 mM e um inibidor de tripsina 10  $\mu\text{g/ml}$ . Em seguida foram centrifugadas a 10000 x g, durante 10 min e o sobrenadante, contendo as membranas cerebrais, foi utilizado no ensaio. As amostras foram acrescidas de tampão de reação contendo:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 mM);  $\text{MgCl}_2$  (1,2 mM);  $\text{CaCl}_2$  (0,25 mM); L-valina (60 mM); L-citrulina (1,2 mM); L-arginina (5  $\mu\text{M}$ ); DDT (1 mM); FAD (4  $\mu\text{M}$ ); FMN (4  $\mu\text{M}$ );  $\text{TBH}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ) e NADPH (120  $\mu\text{M}$ ), pH=7,2 com HCl. Em seguida foi adicionada 100  $\mu$ l [ $^3$ H]-L-arginina 1  $\mu\text{M}$ . Cada amostra foi dividida em três alíquotas: a primeira; a segunda foi acrescida de EGTA (1mM) e a terceira de EGTA + L-NAME (1mM). As alíquotas foram então incubadas durante 1 h em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de uma resina de troca iônica AG-50X8. A mistura foi mantida sob agitação por 30 min, seguida de repouso para decantação da resina. As alíquotas do sobrenadante foram acrescidas de fluido de cintilação Triton X-100 e tolueno (fluido de cintilação normal) e utilizadas para análise de cintilação líquida. O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Wiener no fotolorímetro Cobas Mira (modelo 26-4919) e a atividade da NOS foi expressa em pmoles de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteínas.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Graphpad INSTAT versão 2.05a (1990-1994). As comparações estatísticas foram realizadas pela análise de variância univariada (ANOVA) seguida dos testes de Dunnett (curvas dose-resposta), Newman-Keuls (comparações entre diferentes tratamentos), conforme indicado na legenda das figuras, tendo como variável independente o fator tratamento. Algumas comparações foram feitas pelo teste "t" de Student não pareado de acordo com as indicações no texto. O nível de significância estatística considerado foi  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 6 - 10 animais por grupo nos diversos testes realizados.

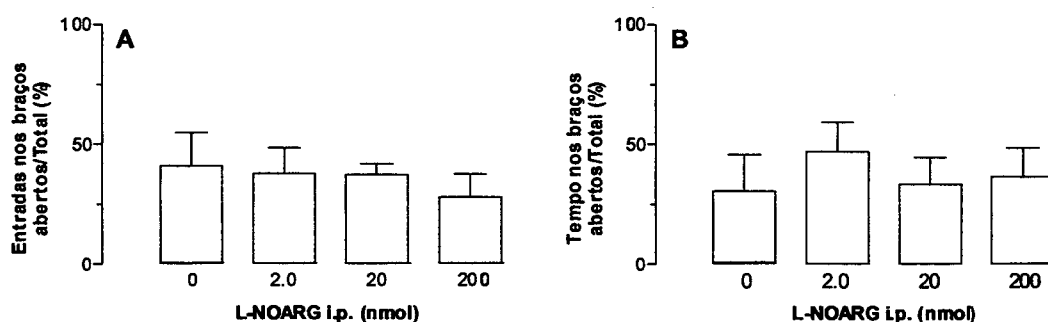
## 4 – RESULTADOS

### LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

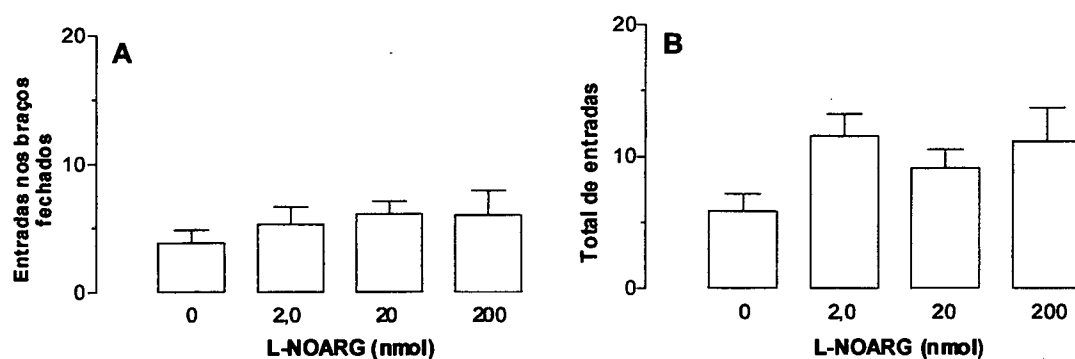
#### Influência do pré-tratamento sistêmico com a L-NOARG

A injeção i.p. de L-NOARG, um inibidor da NOS, não alterou a frequência de entradas nos braços abertos (Fig. 12 A;  $F_{(3, 31)} = 0,30$ ;  $p > 0,05$ ), nem o tempo de permanência nesses braços em relação ao tempo total despendido no LCE (Fig. 12 B;  $F_{(3, 31)} = 0,32$ ;  $p > 0,05$ ), em comparação ao grupo controle.

Em relação ao número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 13 A;  $F_{(3, 31)} = 0,56$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Fig. 13 B;  $F_{(3, 31)} = 2,04$ ;  $p > 0,05$ ), observamos que a injeção i.p. de L-NOARG, em doses crescentes, também não modifica de maneira estatisticamente significativa esses parâmetros.



**Figura 12 - Efeito da injeção i.p. de concentrações crescentes de L-NOARG sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**



**Figura 13 - Efeito da L-NOARG, injetada i.p. em concentrações crescentes, sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B; braços abertos + braços fechados) no LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**

Quanto aos demais parâmetros observados no LCE, a Tabela 4 mostra que a injeção i.p. de L-NOARG, em doses crescentes, promove uma tendência em aumentar o número de imersões de cabeça (HD) e o comportamento de levantar. Os outros parâmetros comportamentais (SAP, auto-limpeza e número de bolos fecais) não foram alterados pelo tratamento com L-NOARG.

**Tabela 4 - Efeito da L-NOARG, injetada i.p. em concentrações crescentes, nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Os dados representam a média dos resultados obtidos  $\pm$  EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8–10.**

PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	10,3 $\pm$ 2,2	9,0 $\pm$ 3,3	7,4 $\pm$ 1,9	1,4 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,9
L-NOARG 2 nmol	9,8 $\pm$ 1,9	20,8 $\pm$ 5,3	8,6 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
L-NOARG 20 nmol	9,8 $\pm$ 1,2	14,7 $\pm$ 3,9	9,8 $\pm$ 1,7	1,5 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,3
L-NOARG 200 nmol	8,1 $\pm$ 1,3	15,8 $\pm$ 4,7	11,7 $\pm$ 3,5	0,6 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,4

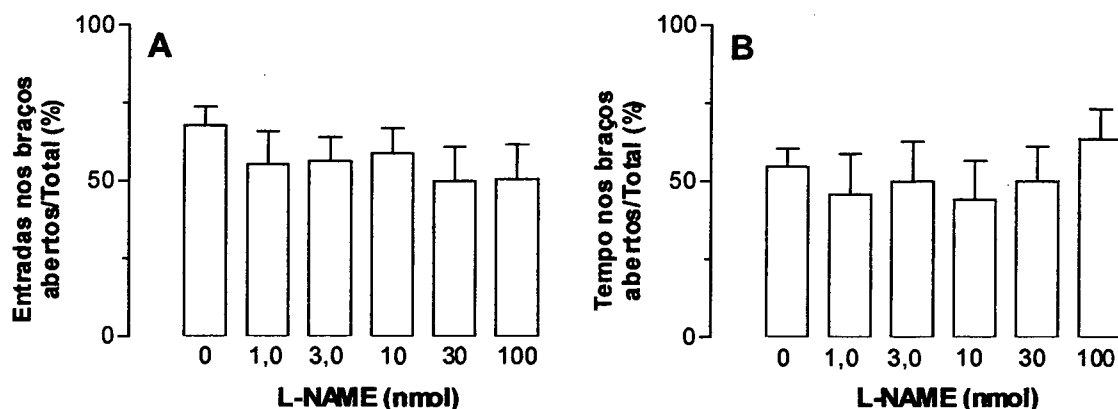
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

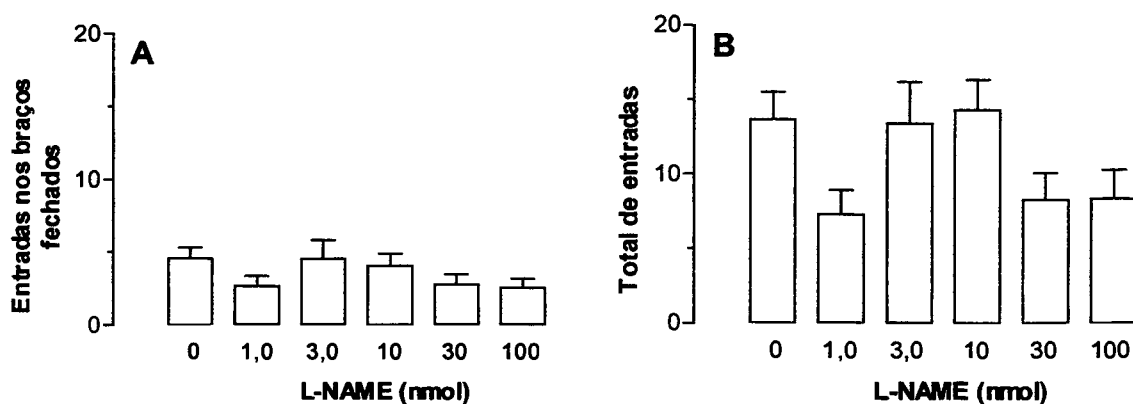
### **Influência do pré-tratamento central com L-NAME**

O L-NAME, um inibidor da NOS mais lipossolúvel do que a L-NOARG, quando injetado i.c.v. em doses crescentes, não promoveu quaisquer mudanças significativas nos parâmetros frequência de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 14 A;  $F_{(5, 61)} = 0,54$ ;  $p > 0,05$ ) ou no tempo de permanência nesses braços em relação ao tempo total (Fig. 14 B;  $F_{(5, 47)} = 0,39$ ;  $p > 0,05$ ), quando comparados aos resultados apresentados pelos animais controle.

O número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 15 A;  $F_{(5, 61)} = 0,54$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Fig. 15 B;  $F_{(5, 59)} = 1,31$ ;  $p > 0,05$ ) também não sofreram modificações significantes pelo tratamento com L-NAME, em comparação ao grupo controle.



**Figura 14 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de L-NAME na frequência de entradas nos braços abertos do LCE (A) e no tempo despendido nesses braços (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**



**Figura 15 - Efeitos da injeção i.c.v. de L-NAME, em concentrações crescentes, sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do LCE (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 – 10.**

Doses crescentes de L-NAME, injetadas i.c.v., apresentaram uma tendência a reduzir os parâmetros etológicos SAP e HD em todas as doses utilizadas. Esse efeito, porém, não alcançou significância estatística. Quanto ao comportamento de levantar, a L-NAME promoveu uma redução desse parâmetro nas doses de 1 e 100 nmol, enquanto que nas demais doses produziu um aumento no mesmo. Esses resultados, contudo, não foram significativamente diferentes dos valores obtidos do grupo controle. Os parâmetros de auto-limpeza e o número de bolos fecais foram aumentados em todas as doses, mas esse achado também não foi estatisticamente significativo em nenhum caso (Tabela 5).

**Tabela 5 - Efeito de doses crescentes de L-NAME, injetada i.c.v., nos parâmetros etológicos avaliados no LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Os dados representam a média dos resultados obtidos  $\pm$  EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	10,8 $\pm$ 1,8	24,5 $\pm$ 3,1	9,7 $\pm$ 1,7	1,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
L-NAME 1 nmol	5,7 $\pm$ 0,9	20,5 $\pm$ 5,3	6,6 $\pm$ 1,7	1,2 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2
L-NAME 3 nmol	4,6 $\pm$ 0,6	19,5 $\pm$ 4,7	8,0 $\pm$ 2,0	1,7 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
L-NAME 10 nmol	6,4 $\pm$ 0,9	21,5 $\pm$ 5,9	10,7 $\pm$ 2,4	1,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2
L-NAME 30 nmol	4,1 $\pm$ 1,3	16,4 $\pm$ 3,8	8,2 $\pm$ 2,1	1,7 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,2
L-NAME 100 nmol	4,0 $\pm$ 1,5	21,9 $\pm$ 5,9	5,4 $\pm$ 1,5	1,4 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,5

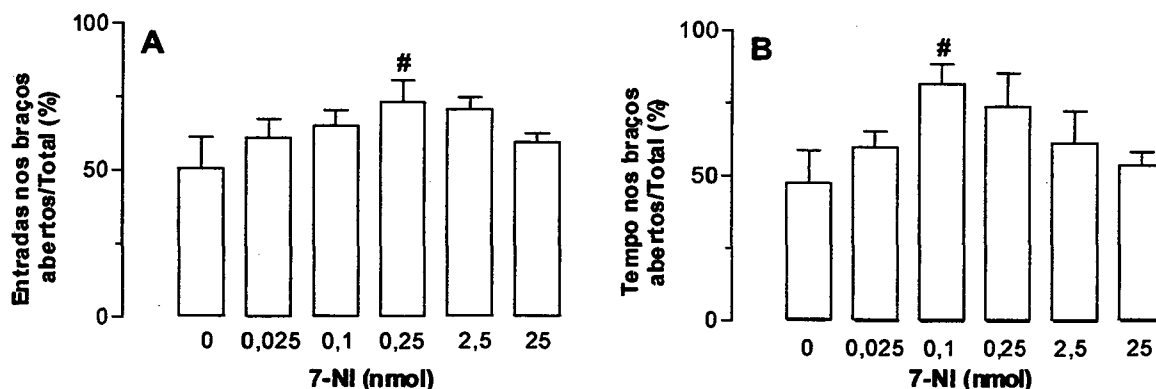
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

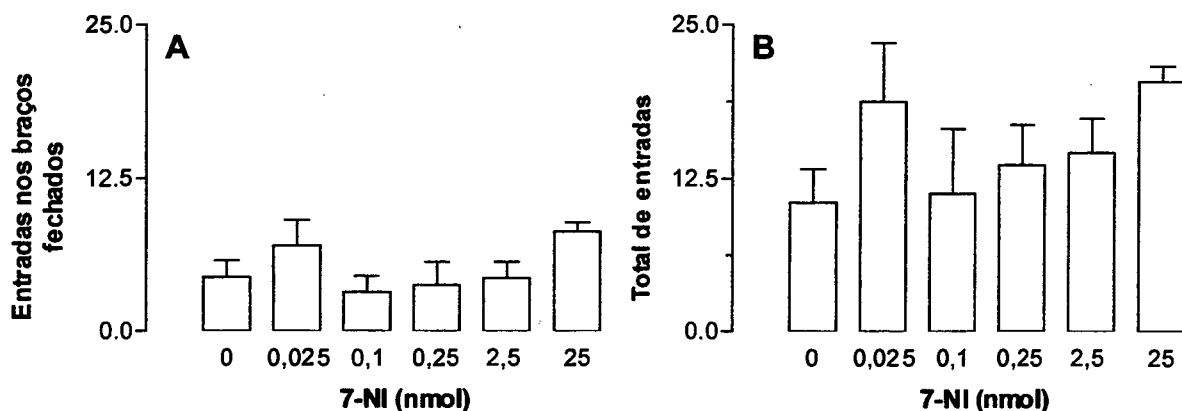


### Influência do pré-tratamento central com 7-NI

A administração i.c.v. de 7-NI, um inibidor seletivo da NOSn, não foi capaz de alterar de forma estatisticamente significativa quaisquer parâmetros observados no LCE. Na figura 16 estão representados a freqüência de entradas nos braços abertos (A;  $F_{(5, 29)} = 1,31$ ;  $p > 0,05$ ) e tempo de permanência nesses mesmos braços (B;  $F_{(5, 29)} = 1,67$ ;  $p > 0,05$ ). A figura 17 mostra o número de entradas nos braços fechados (A;  $F_{(5, 29)} = 1,59$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (B;  $F_{(5, 29)} = 1,45$ ;  $p > 0,05$ ), que também não foram alterados pelo tratamento i.c.v. com doses crescentes de 7-NI.



**Figura 16 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de 7-NI nas medidas de exploração (freqüência de entradas nos braços abertos = A; tempo de permanência nos braços abertos = B) do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. # estatisticamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ; teste  $t$  de Student não pareado). O número de animais empregados por tratamento foi de 8 -10.**



**Figura 17 - Efeito de concentrações crescentes de 7-Ni (i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B), em camundongos no LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

Doses crescentes de 7-Ni mostraram uma tendência a aumentar os parâmetros HD, levantar (nas doses de 0,025, 2,5 e 25 nmol) e número de bolos fecais, quando comparadas aos dados obtidos no grupo controle. Em relação aos demais parâmetros observados, o pré-tratamento com 7-Ni promoveu uma redução nos mesmos, porém todas as alterações não foram estatisticamente significantes (Tabela 6).

**Tabela 6 - Efeito do pré-tratamento i.c.v. com doses crescentes de 7-NI nos parâmetros etológicos avaliados, em camundongos, no LCE, por um período de 5 min. Os dados representam a média dos resultados obtidos  $\pm$  EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**

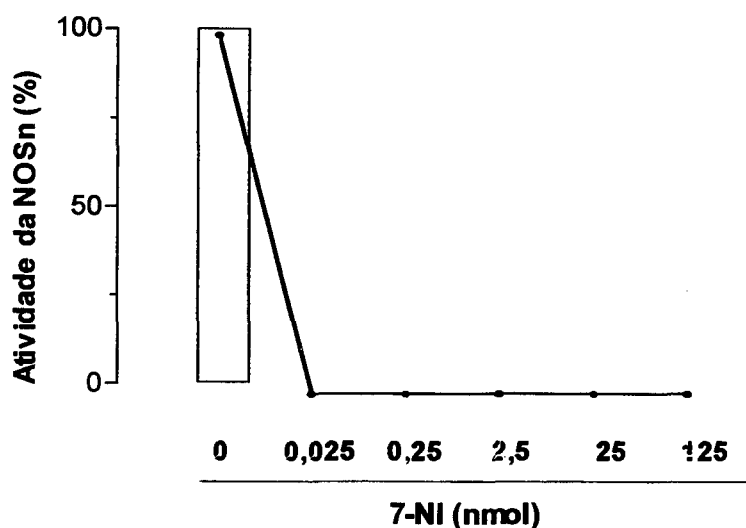
PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	15,6 $\pm$ 3,9	22,8 $\pm$ 5,8	8,4 $\pm$ 2,3	1,3 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
7-NI 0,025 nmol	10,5 $\pm$ 2,1	29,0 $\pm$ 6,6	12,5 $\pm$ 4,1	1,3 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,3
7-NI 0,1 nmol	10,0 $\pm$ 1,3	25,3 $\pm$ 5,8	4,0 $\pm$ 2,3	0,5 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,6
7-NI 0,25 nmol	12,0 $\pm$ 2,8	32,6 $\pm$ 7,1	5,8 $\pm$ 3,2	0,4 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,6
7-NI 2,5 nmol	14,2 $\pm$ 1,0	33,4 $\pm$ 4,9	10,2 $\pm$ 1,9	1,8 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,8
7-NI 25 nmol	13,4 $\pm$ 1,9	37,2 $\pm$ 5,4	9,6 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2

SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

### Determinação da atividade da NOSn *in vitro*

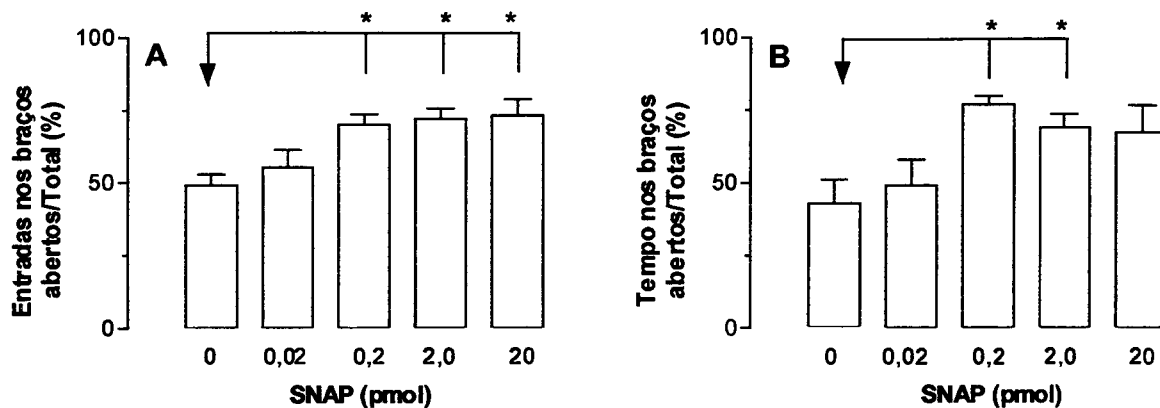
Este teste foi realizado para confirmar a atividade inibidora da NOS pelo 7-NI dissolvido na mistura contendo DMSO, NaOH 5M, Tween 80 e PBS, como descrito em Material e Métodos. A atividade da NOS foi avaliada pela habilidade dessa enzima em converter [ $^3$ H]L-arginina em [ $^3$ H]L-citrulina, *in vitro*. O 7-NI inibiu em 100% a atividade da NOS em todas as doses empregadas (0,025, 0,25, 2,5, 25 e 125 nmol; Figura 18).



**Figura 18- Efeito de doses crescentes de 7-NI sobre a conversão de [<sup>3</sup>H]L-arginina em [<sup>3</sup>H]L-citrulina *in vitro*.**

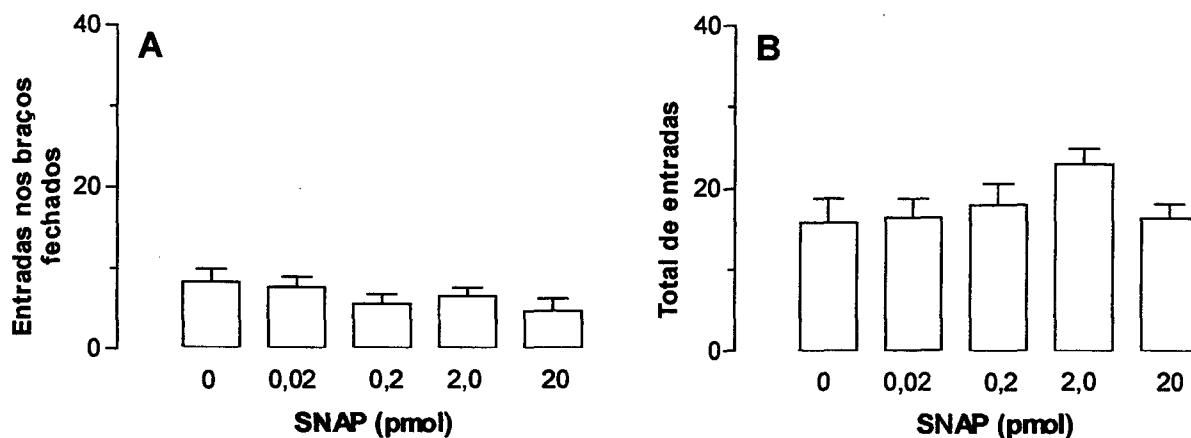
### **Influência do pré-tratamento central com SNAP**

Na Figura 19 é possível verificar que o pré-tratamento com SNAP, um doador de NO, aumentou de maneira significativa a freqüência de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas (A;  $F_{(4, 50)} = 5,89$ ;  $p < 0,01$ ), nas doses de 0,2, 2,0 e 20 pmol, quando comparou-se esses resultados aos do grupo controle. O tempo de permanência nesses mesmos braços, em relação ao tempo de permanência em ambos os braços comparado aos animais controle, foi também aumentado pelo pré-tratamento com SNAP nas doses de 0,2 e 2,0 pmol (B;  $F_{(4, 49)} = 3,91$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 19 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SNAP na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nesses braços (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ( $* p < 0,05$ ), em relação aos valores obtidos nos grupos controle (0), empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

Não se observou, no entanto, diferenças estatisticamente significantes no número de entradas nos braços fechados (Figura 20 A;  $F_{(4, 49)} = 1,21$ ;  $p > 0,05$ ) e no número total de entradas em ambos os braços (Figura 20 B;  $F_{(4, 49)} = 1,69$ ;  $p > 0,05$ ), quando os animais foram tratados previamente com o SNAP. O número de imersões de cabeça, por sua vez, foi significativamente aumentado em relação aos dados do grupo controle nas doses de 2,0 e 20 pmol (Tabela 7;  $F_{(4, 49)} = 6,40$ ;  $p < 0,05$ ). As demais medidas não foram modificadas por esse tratamento (Tabela 7).



**Figura 20 - Efeito de concentrações crescentes de SNAP, injetado i.c.v. em camundongos, sobre o número total de entradas nos braços fechados (A), o número total de entradas (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 –10.**

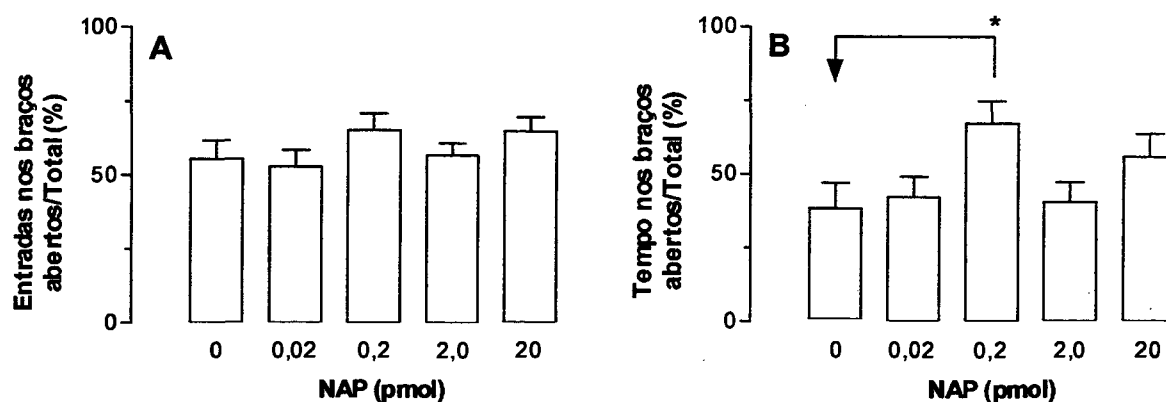
**Tabela 7 - Efeito do pré-tratamento i.c.v. com concentrações crescentes de SNAP nos parâmetros etológicos avaliados, em camundongos, no LCE, por um período de 5 min. Os dados representam a média dos resultados obtidos  $\pm$  EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**

PARÂMETRO	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>				
Controle	14,1 $\pm$ 2,9	13,1 $\pm$ 2,7	0,7 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3
SNAP 0,02 pmol	13,6 $\pm$ 2,7	13,4 $\pm$ 2,4	0,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2
SNAP 0,2 pmol	7,6 $\pm$ 2,0	10,0 $\pm$ 2,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
SNAP 2,0 pmol	14,1 $\pm$ 2,1	11,1 $\pm$ 1,5	0,8 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1
SNAP 20 pmol	16,2 $\pm$ 4,4	9,3 $\pm$ 1,9	1,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1

SAP = número de estiramentos

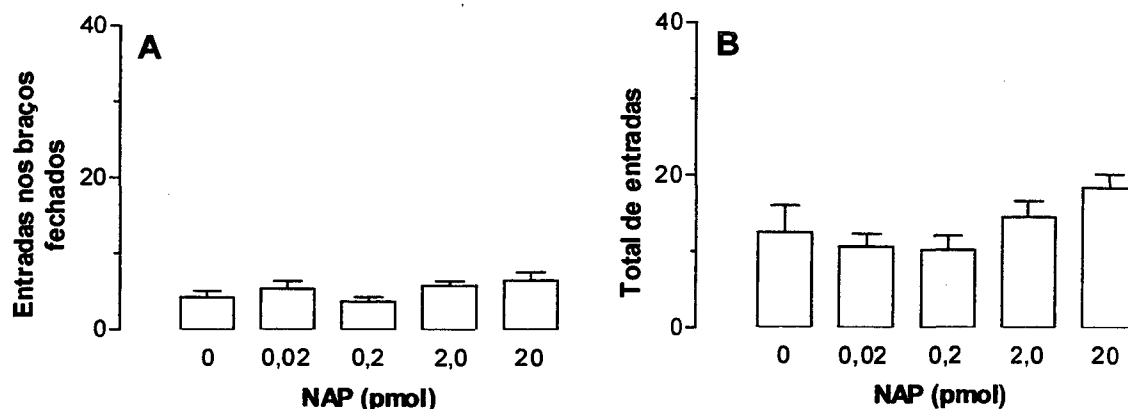
### Influência do pré-tratamento central com NAP

O pré-tratamento com NAP, molécula precursora do SNAP, não promoveu alterações significantes na frequência de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas (Figura 21 A;  $F_{(4, 49)} = 1,09$ ;  $p > 0,05$ ), quando comparou-se os resultados aos do grupo controle. O tempo de permanência nesses mesmos braços, em relação ao tempo de permanência em ambos os braços comparado aos animais controle, foi aumentado de maneira significativa pelo pré-tratamento com NAP na dose de 0,2 pmol (Figura 21 B;  $F_{(4, 49)} = 2,64$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 21 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de NAP na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nesses braços (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ( $* p < 0,05$ ), em relação aos valores obtidos nos grupos controle (0), empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

No entanto, não houve diferenças estatisticamente significantes no número de entradas nos braços fechados (Figura 22 A;  $F_{(4, 49)} = 1,78$ ;  $p > 0,05$ ) e no número total de entradas em ambos os braços (Figura 22 B;  $F_{(4, 49)} = 1,09$ ;  $p > 0,05$ ), quando os animais foram tratados previamente com o NAP. As demais medidas registradas no LCE foram modificadas por esse tratamento em algumas doses, sem apresentar uma relação dose-efeito (Tabela 8).



**Figura 22 - Efeito de concentrações crescentes de NAP, injetado i.c.v. em camundongos, sobre o número total de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 –10.**

**Tabela 8 - Efeito do NAP, injetado i.c.v. em doses crescentes nos parâmetros etológicos avaliados em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Os dados representam a média dos resultados obtidos  $\pm$  EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 –10.**

PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	5,2 $\pm$ 1,0	25,1 $\pm$ 3,4	11,2 $\pm$ 2,0	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
NAP 0,02 pmol	13,9 $\pm$ 2,6*	33,5 $\pm$ 4,6	25,7 $\pm$ 5,4*	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
NAP 0,2 pmol	12,2 $\pm$ 1,6	27,7 $\pm$ 5,6	25,3 $\pm$ 2,5*	0,6 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1
NAP 2,0 pmol	12,8 $\pm$ 1,9*	36,0 $\pm$ 7,8	12,5 $\pm$ 10,5	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2
NAP 20 pmol	10,9 $\pm$ 2,4	44,4 $\pm$ 5,9	13,0 $\pm$ 2,8	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1

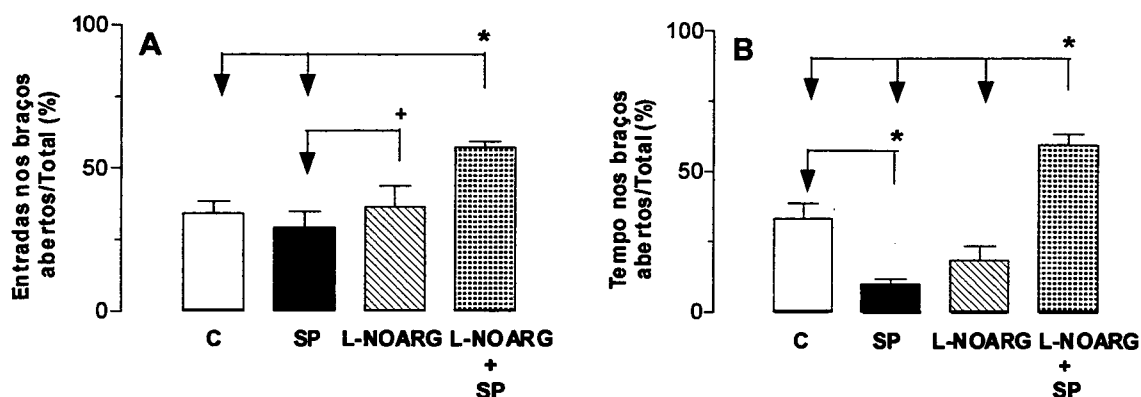
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça



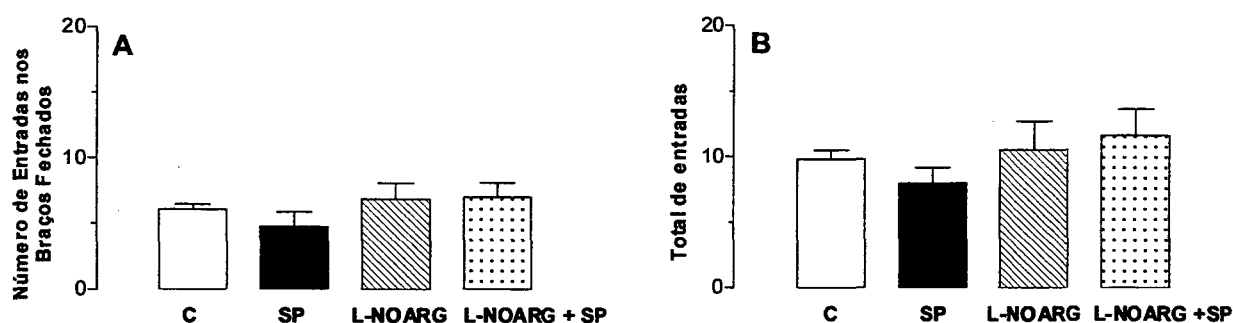
### Influência do pré-tratamento com inibidores de NOS sobre o efeito da SP

A injeção sistêmica (i.p.) de L-NOARG, um inibidor da NOS, antes da injeção i.c.v. de SP, o agonista natural preferencial dos receptores neurocinérgicos do tipo NK<sub>1</sub>, aumentou de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) a frequência de entradas nos braços abertos (Figura 23 A;  $F_{(3, 31)} = 5,65$ ) e o tempo de permanência nesses mesmos braços (Figura 23 B;  $F_{(3, 31)} = 26,52$ ;  $p < 0,05$ ), mostrando, nesse último parâmetro, uma clara reversão dos efeitos da SP.



**Figura 23 - Influência da injeção de L-NOARG (20 nmol, i.p.) no efeito promovido pela injeção de SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, na frequência de entradas nos braços abertos (A) e tempo despendido nestes braços (B), por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e cruces denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais utilizados em cada tratamento = 8 - 10.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 24 A;  $F_{(3, 31)} = 1,11$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Figura 24 B;  $F_{(3, 31)} = 0,86$ ), a injeção i.p. de L-NOARG seguida da injeção i.c.v. de SP, não promoveu alterações estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ) no efeito da SP em ambas medidas.



**Figura 24 - influência da Injeção de L-NOARG (20 nmol, i.p.) sobre o efeito da injeção de SP (10 pmol, i.c.v.) no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

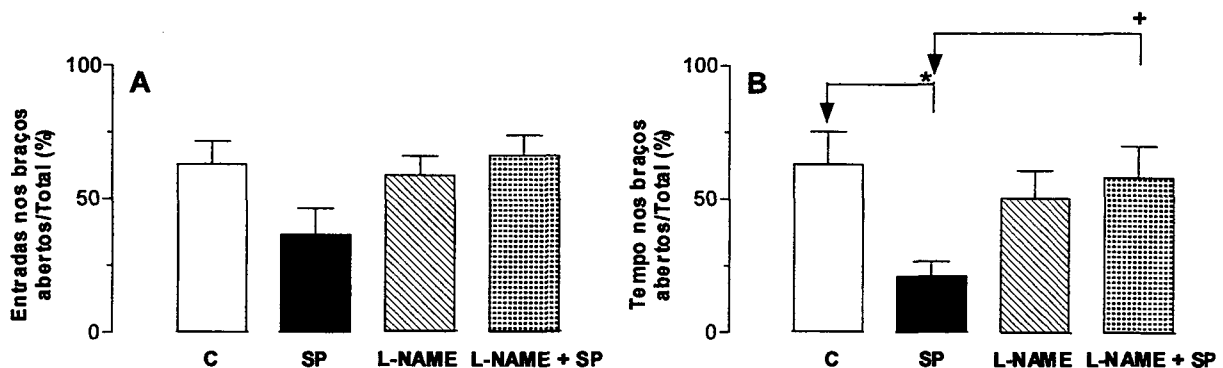
Os demais parâmetros, registrados no LCE que também não foram alterados significativamente pelos tratamentos, estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9 - Influência do pré-tratamento de L-NOARG (20 nmol, i.p.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) em camundongos no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
TRATAMENTO				
Controle	13,6 $\pm$ 3,0	9,1 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,3
SP 10 pmol	12,0 $\pm$ 2,0	15,4 $\pm$ 2,2	1,8 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,3
L-NOARG 20 nmol	16,0 $\pm$ 3,7	9,5 $\pm$ 1,9	1,3 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,6
L-NOARG + SP	13,3 $\pm$ 2,3	9,4 $\pm$ 1,9	0,9 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4

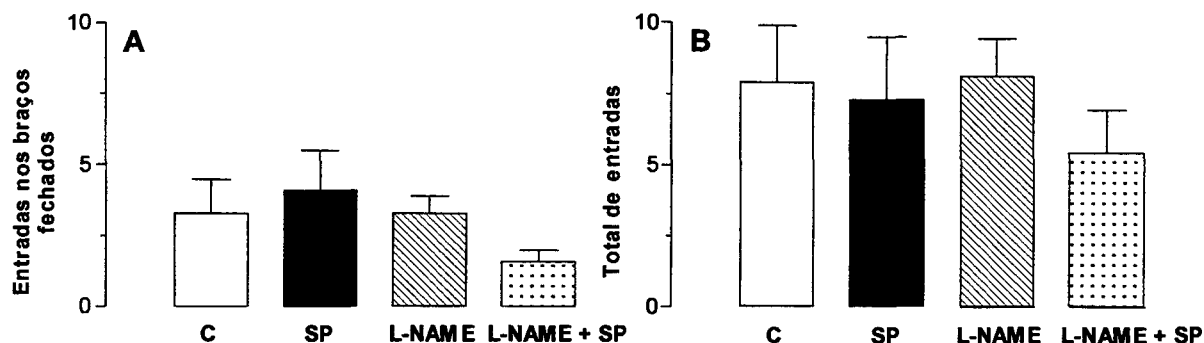
SAP = número de estiramentos

Por outro lado, o tratamento prévio i.c.v. com L-NAME, outro inibidor da NOS, que não modificou o efeito da SP sobre a freqüência de entradas nos braços abertos sobre o total de entradas (Figura 25 A;  $F_{(3, 31)} = 2,53$ ;  $p > 0,05$ ), reverteu de maneira significativa a redução promovida pela SP i.c.v., no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (Figura 25 B;  $F_{(3, 31)} = 3,26$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 25 - Influência da injeção de L-NAME (3 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) na freqüência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) avaliado em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e cruzes denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

O efeito da SP sobre o número de entradas nos braços fechados (A;  $F_{(3,31)} = 1,13$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (B;  $F_{(3, 31)} = 0,49$ ) não foram alterados pelo tratamento prévio i.c.v. com a L-NAME, conforme demonstra a figura 26.



**Figura 26 - Influência do pré-tratamento de L-NAME (3 nmol) no efeito da SP (10 pmol), ambas as drogas injetadas i.c.v., no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), avaliadas em camundongos no LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi = 8 -10.**

Os demais parâmetros observados no LCE estão descritos na Tabela 10 e o efeito da injeção i.c.v. de SP não foi modificado pelo tratamento prévio com L-NAME i.c.v. ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 10 - Influência do pré-tratamento de L-NAME (3 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>				
Controle	9,8 $\pm$ 1,4	6,6 $\pm$ 1,8	0,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	13,3 $\pm$ 3,1	7,4 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
L-NAME 3 nmol	8,3 $\pm$ 2,0*	7,4 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
L-NAME + SP	4,9 $\pm$ 1,2*	3,6 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,3

SAP = número de estiramentos

A L-NAME injetado i.c.v., como observado anteriormente, resultou em uma curva dose resposta em sino, o que levou, num primeiro momento a utilizar uma dose central da curva (3 nmol) para observar a influência do tratamento prévio sobre o efeito da SP. Posteriormente utilizamos uma dose menor (1,0 nmol) e outra maior (30 nmol) de L-NAME nesse tratamento prévio, onde observamos que o efeito da SP foi alterado de maneira semelhante à primeira dose utilizada (3 nmol). O tratamento prévio com 1,0 e 30 nmol não modificou o efeito da SP sobre a frequência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (L-NAME 1,0 nmol:  $F_{(3, 28)} = 2,1$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 30 nmol:  $F_{(3, 28)} = 1,8$ ;  $p > 0,05$ ), mas reverteu de maneira significativa a redução promovida pela SP no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (L-NAME 1,0 nmol:  $F_{(3, 28)} = 1,8$ ;  $p < 0,05$ ; L-NAME 30 nmol:  $F_{(3, 28)} = 2,6$ ;  $p < 0,05$ ). O efeito da SP sobre o número de entradas nos braços fechados (L-NAME 1,0 nmol:  $F_{(3, 28)} = 1,0$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 30 nmol:  $F_{(3, 28)} = 1,2$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas (L-NAME 1,0 nmol:  $F_{(3, 28)} = 0,58$ ;  $P < 0,05$ ; L-NAME 30 nmol:  $F_{(3, 28)} = 0,9$ ;  $P < 0,05$ ) não foi alterado pelo tratamento prévio i.c.v. com 1,0 ou 30 nmol de L-NAME (dados não apresentados).

O efeito da SP nos demais parâmetros avaliados no LCE, descritos na Tabela 11, não foram alterados significativamente pelos tratamentos prévios de L-NAME 1,0 e 30 nmol.

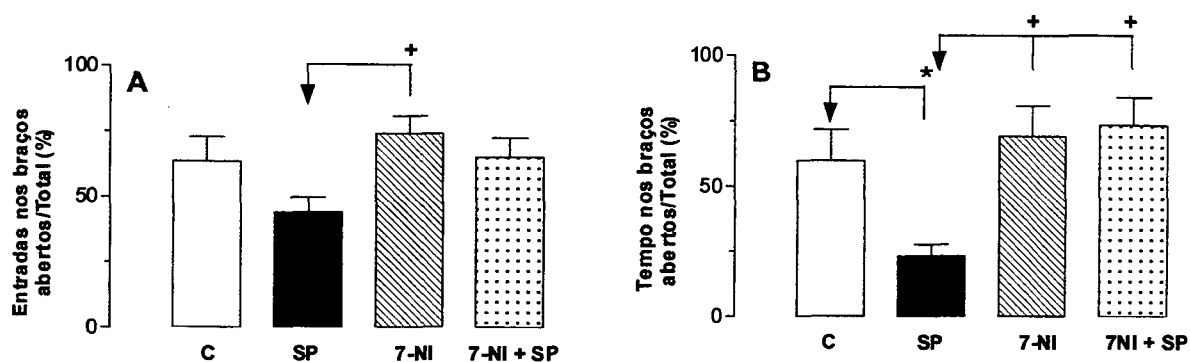
**Tabela 11 - Influência do pré-tratamento com L-NAME (1,0 e 30 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	12,3 $\pm$ 2,0	7,6 $\pm$ 2,8	1,3 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	16,3 $\pm$ 1,4	8,5 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3
L-NAME 1,0 nmol	9,8 $\pm$ 3,7	8,3 $\pm$ 1,2	0,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1
L-NAME 30 nmol	12,0 $\pm$ 1,5	7,6 $\pm$ 1,3	0,7 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,2
L-NAME 1,0 + SP	10,4 $\pm$ 2,1	5,8 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1
L-NAME 30 + SP	11,6 $\pm$ 1,2	4,5 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1

SAP = número de estiramentos

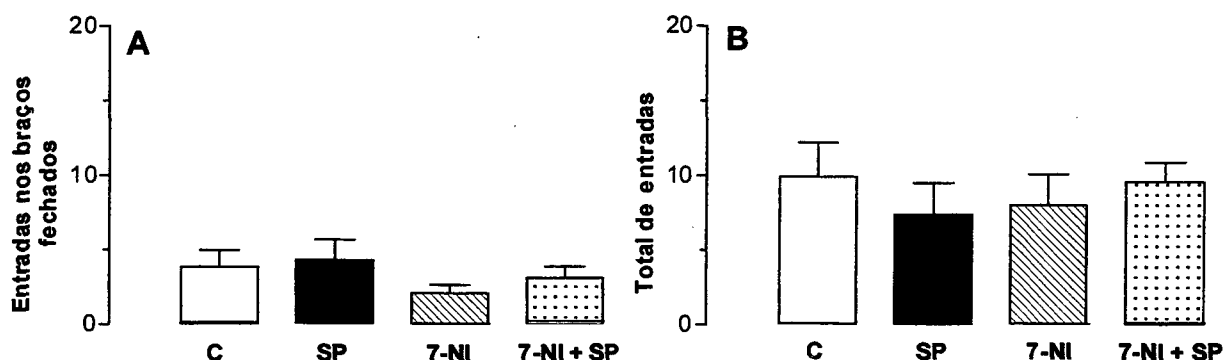
### **Influência do pré-tratamento de inibidor da NOSn sobre o efeito da SP**

A injeção i.c.v. de 7-NI, um inibidor seletivo da NOSn, aumentou de maneira significativa a frequência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (Figura 27A;  $F_{(3, 31)} = 2,89$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparamos os dados aos do grupo tratado apenas com SP. Esse mesmo pré-tratamento reverteu significativamente o efeito da SP sobre o tempo de permanência nos braços abertos, em relação ao tempo total (Figura 27 B;  $F_{(3, 31)} = 4,99$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 27 - Influência da injeção i.c.v. de 7-NI (0,25 nmol) sobre o efeito promovido pela injeção i.c.v. de SP (10 pmol) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e o tempo de permanência nesses braços (B) no LCE em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e as cruces denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi de 8 -10.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 28 A;  $F_{(3, 31)} = 0,82$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Figura 28 B;  $F_{(3, 30)} = 0,65$ ), o pré-tratamento central com 7-NI não mudou significativamente o efeito da injeção i.c.v. de SP.



**Figura 28 - Influência do pré-tratamento com 7-NI (0,25 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entrada em ambos os braços (B) do LCE em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados em cada tratamento = 8 - 10.**

O tratamento prévio com 7-NI na dose de 0,025 nmol, promoveu um aumento significativo no efeito da SP sobre a freqüência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas ( $F_{(3, 27)} = 3,01$ ;  $p < 0,05$ ), quando comparamos com o grupo tratado apenas com SP. Esse mesmo pré-tratamento reverteu significativamente o efeito da SP sobre o tempo de permanência nos braços abertos, em relação ao tempo total ( $F_{(3, 27)} = 4,68$ ;  $p < 0,05$ ; dados não apresentados). O efeito da SP sobre o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3, 27)} = 0,78$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas ( $F_{(3, 27)} = 0,91$ ;  $p < 0,05$ ) não foi alterado pelo tratamento prévio i.c.v. de 7-NI.

A injeção i.c.v. de 7-NI (0,025 e 0,25 nmol) não promoveu mudanças significantes no efeito da SP (10 pmol) injetada no ventrículo lateral sobre os outros parâmetros comportamentais analisados no LCE (Tabela 12).



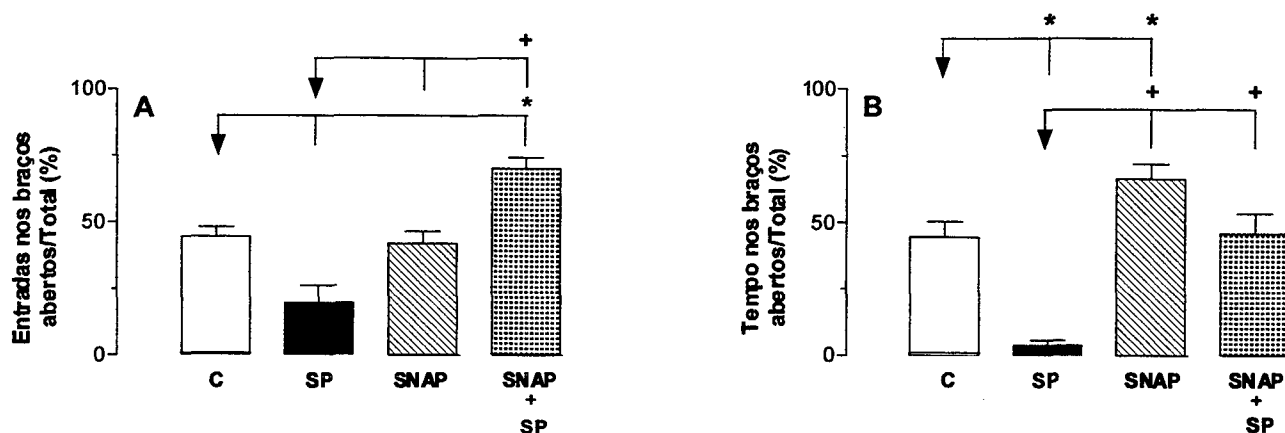
**Tabela 12 - Influência do pré-tratamento de 7-NI (0,025 e 0,25 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>				
Controle	12,0 $\pm$ 2,7	8,4 $\pm$ 1,7	1,0 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	12,6 $\pm$ 3,4	8,4 $\pm$ 2,1	0,9 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
7-NI 0,025 nmol	13,5 $\pm$ 2,3	5,1 $\pm$ 1,2	0,9 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
7-NI 0,25 nmol	14,2 $\pm$ 1,8	6,2 $\pm$ 1,7	0,8 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,2
7-NI 0,025 + SP	13,3 $\pm$ 2,2	6,9 $\pm$ 1,2	0,9 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3
7-NI 0,25 + SP	13,8 $\pm$ 1,2	6,8 $\pm$ 1,3	0,7 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1

SAP = número de estiramentos

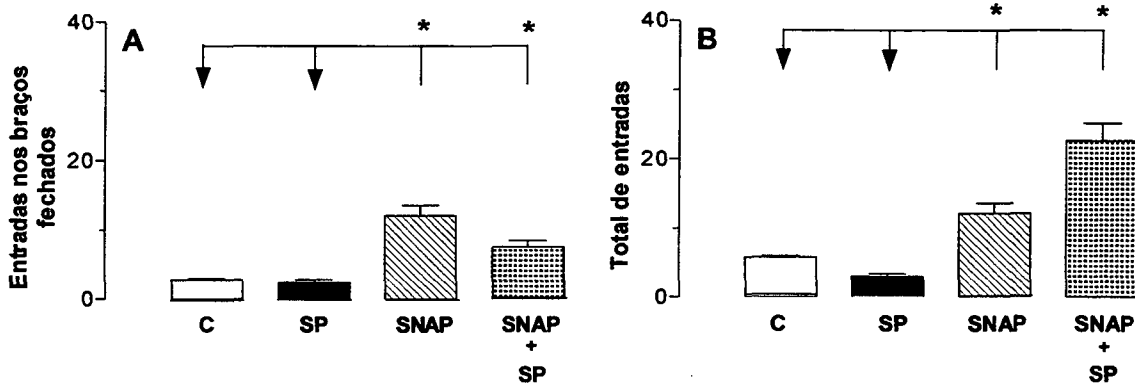
### **Influência do pré-tratamento com doador de NO sobre o efeito da SP**

O tratamento prévio i.c.v. com SNAP, substância doadora de NO, aumentou de maneira significativa ( $p < 0,01$ ) a freqüência de entradas nos braços abertos (Figura 29 A;  $F_{(3, 31)} = 18,4$ ) e o tempo de permanência nesses mesmos braços (Figura 29 B;  $F_{(3, 31)} = 21,8$ ;  $p < 0,05$ ), promovendo uma reversão dos efeitos da SP.



**Figura 29 - Influência da injeção i.c.v. de SNAP (2,0 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) avaliados em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e as cruzes denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi = 8-10.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 30 A;  $F_{(3,31)} = 24,6$ ;  $p < 0,01$ ) e ao número total de entradas em ambos os braços (Figura 30 B;  $F_{(3, 31)} = 39,4$ ;  $p < 0,01$ ), o tratamento prévio central com SNAP aumentou de maneira significativa o efeito da injeção i.c.v. com SP.



**Figura 30 - Influência do tratamento prévio com SNAP (2,0 pmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B) do LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ( $p < 0,01$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10.**

O tratamento prévio de SNAP numa dose menor (0,02 pmol) aumentou de maneira significante o efeito da SP sobre a freqüência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas ( $F_{(3, 31)} = 5,8$ ;  $p < 0,01$ ), quando comparamos com os grupos controle (C) e tratado com SP. Esse mesmo pré-tratamento reverteu significantemente o efeito da SP sobre o tempo de permanência nos braços abertos, em relação ao tempo total ( $F_{(3, 31)} = 8,03$ ;  $p < 0,01$ ; dados não apresentados). O tratamento prévio com esta dose de SNAP produziu também um aumento significante no efeito da SP sobre o número de entradas nos braços fechados ( $F_{(3, 31)} = 4,9$ ;  $p < 0,05$ ) e o número total de entradas ( $F_{(3, 31)} = 8,04$ ;  $p < 0,01$ ).

A injeção i.c.v. de SNAP na dose de 2,0 pmol, quando utilizada isoladamente ou associada a SP (10 pmol), aumentou de maneira significativa o número de imersões de cabeça (HD). Em relação aos demais parâmetros analisados no LCE, o SNAP não promoveu mudanças significantes no efeito da SP injetada no ventrículo lateral (10 pmol; Tabela 13).

**Tabela 13 - Influência do pré-tratamento de SNAP (0,02 e 2,0 pmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
TRATAMENTO					
Controle	10,3 $\pm$ 1,2	8,5 $\pm$ 1,0	6,8 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	13,0 $\pm$ 3,8	8,8 $\pm$ 0,9	9,4 $\pm$ 1,8	0,5 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,4
SNAP 0,02 pmol	11,9 $\pm$ 7,5	17,4 $\pm$ 4,7	13,1 $\pm$ 1,8	0,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3
SNAP 2,0 pmol	11,3 $\pm$ 0,9	53,2 $\pm$ 5,7*	10,5 $\pm$ 1,3	0,8 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1
SNAP 0,02 + SP	10,8 $\pm$ 9,2	31,9 $\pm$ 17,5*	11,9 $\pm$ 3,5	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
SNAP 2,0 + SP	14,7 $\pm$ 3,6	31,4 $\pm$ 5,3*	13,0 $\pm$ 2,8	0,4 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2

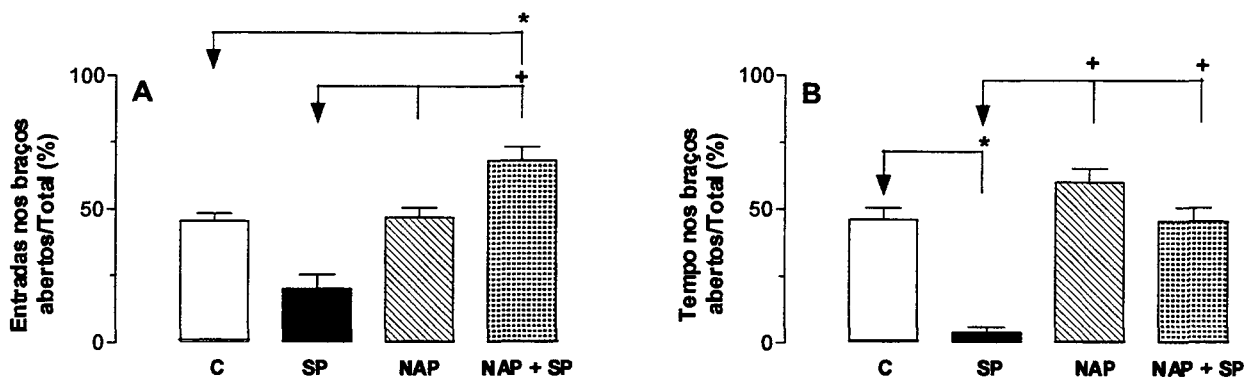
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

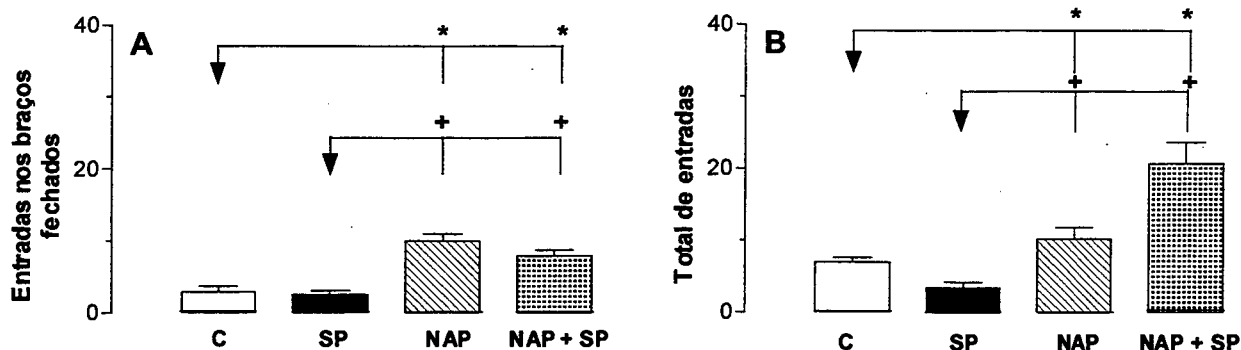
### Influência do pré-tratamento central com NAP sobre o efeito da SP

O tratamento prévio com NAP, molécula precursora do SNAP, aumentou de maneira significativa a freqüência de entradas nos braços abertos (Figura 31 A;  $F_{(3, 31)} = 15,3$ ;  $p < 0,05$ ) e o tempo de permanência nestes braços (Figura 31 B;  $F_{(3, 31)} = 19,4$ ;  $p < 0,05$ ), mostrando uma reversão dos efeitos da SP.



**Figura 31 - Influência da injeção de NAP (0,2 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) na frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos mesmos braços (B) avaliado em camundongos no LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e as cruzes denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi = 8-10.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 32 A;  $F_{(3,31)} = 20,3$ ;  $p < 0,01$ ) e ao número total de entradas em ambos os braços (Figura 32 B;  $F_{(3,31)}$ ;  $p < 0,01$ ), o tratamento prévio central com NAP aumentou de maneira significativa o efeito da injeção i.c.v. com SP.



**Figura 32 - Influência do pré-tratamento com NAP (0,2 pmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B) do LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e as cruces denotam diferenças significantes ( $p < 0,01$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10.**

A injeção i.c.v. de NAP (0,2 pmol) não promoveu mudanças significantes no efeito da SP (10 pmol) injetada no ventrículo lateral sobre outros parâmetros comportamentais analisados no LCE (Tabela 14).

**Tabela 14 - Influência do pré-tratamento de NAP (0,2 pmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 8-10 animais  $\pm$  EPM.**

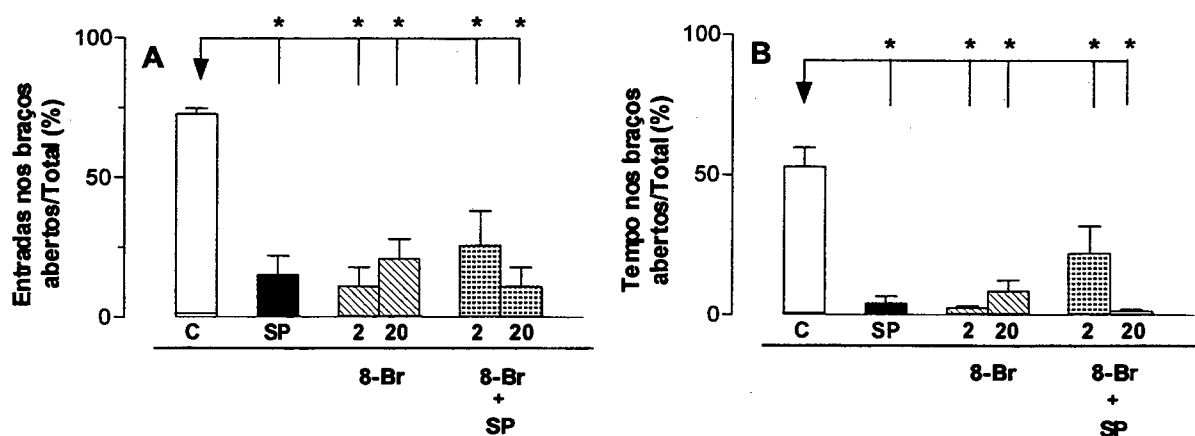
PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	12,0 $\pm$ 1,4	8,0 $\pm$ 1,2	6,4 $\pm$ 2,1	0,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1
SP 10 pmol	14,3 $\pm$ 3,2	9,0 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 2,0	0,7 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3
NAP 0,2 pmol	12,4 $\pm$ 4,5	12,1 $\pm$ 3,7	16,1 $\pm$ 1,5	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
NAP 0,2 + SP	10,8 $\pm$ 9,2	15,6 $\pm$ 7,3	12,9 $\pm$ 4,5	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2

SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

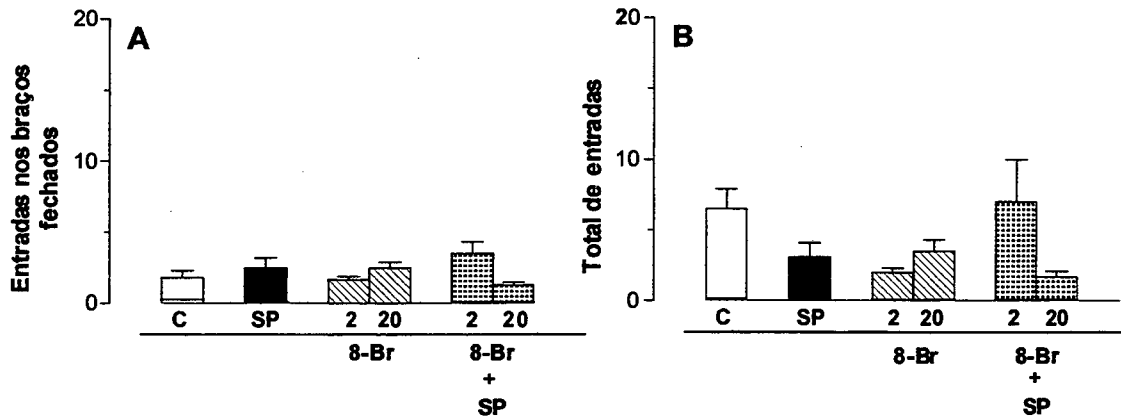
### Influência do pré-tratamento central com 8-Br-GMPc sobre o efeito da SP

A injeção i.c.v. de 8-Br-GMPc, um análogo do GMPc, quando utilizado isoladamente reduziu de maneira significativa a frequência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (Figura 33 A;  $F_{(5, 35)} = 9,4$ ;  $p < 0,001$ ) e o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (Figura 33 B;  $F_{(5, 35)} = 14,7$ ;  $p < 0,05$ ) quando comparamos os dados aos do grupo tratado com o controle. Na dose de 2 nmol observou-se os mesmos efeitos de maneira mais evidente sobre a frequência de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos mesmos braços. Esse tratamento parece ampliar o efeito da SP sobre a última medida, isto é, o pré-tratamento com 20 nmol de 8-Br-GMPc reduziu ainda mais o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, efeito este promovido pela SP *per se*.



**Figura 33 - Influência do tratamento com 8-Br-GMPc (2,0 e 20 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre a frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) do LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi de 6.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 34 A;  $F_{(5, 35)} = 2,1$ ;  $p > 0,05$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Figura 34 B;  $F_{(5, 35)} = 2,3$ ;  $p > 0,05$ ), o pré-tratamento central com 8-Br-GMPc não promoveu qualquer alteração significativa quando utilizado isolado ou associado a SP, quando os dados são comparados com os do grupo controle.



**Figura 34 - Influência do tratamento com 8-Br-GMPc (2,0 e 20 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B) do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 6.**

Os demais parâmetros observados no LCE estão descritos na Tabela 15 e tanto o 8-Br-GMPc isolado quanto o pré-tratamento com 8-Br-GMPc e posterior tratamento com SP levaram a uma diminuição significativa do número de imersões de cabeça e do comportamento de levantar, enquanto que os demais parâmetros analisados no LCE não foram alterados por quaisquer tratamentos (Tabela 15).



**Tabela 15 - Influência do tratamento com 8-Br-GMPc (2 e 20 nmol, i.c.v.) e sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 6 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	7,3 $\pm$ 1,6	16,8 $\pm$ 1,8	7,0 $\pm$ 2,1	0,7 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	4,8 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,6*	3,8 $\pm$ 1,2	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,3
8-Br-GMPc 2 nmol	4,7 $\pm$ 1,9	3,7 $\pm$ 2,0*	1,0 $\pm$ 0,5*	0,7 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2
8-Br-GMPc 20 nmol	4,0 $\pm$ 1,5	3,7 $\pm$ 1,1*	4,0 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2
8-Br 2 + SP	6,7 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 2,8	8,5 $\pm$ 2,0	0,7 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2
8-Br 20 + SP	1,7 $\pm$ 1,1	1,8 $\pm$ 0,6*	1,5 $\pm$ 0,5*	0,2 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2

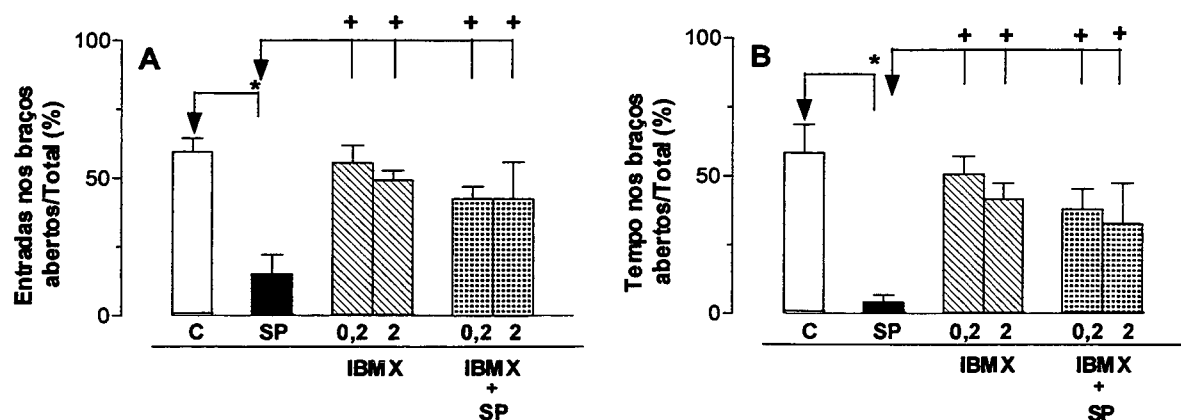
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

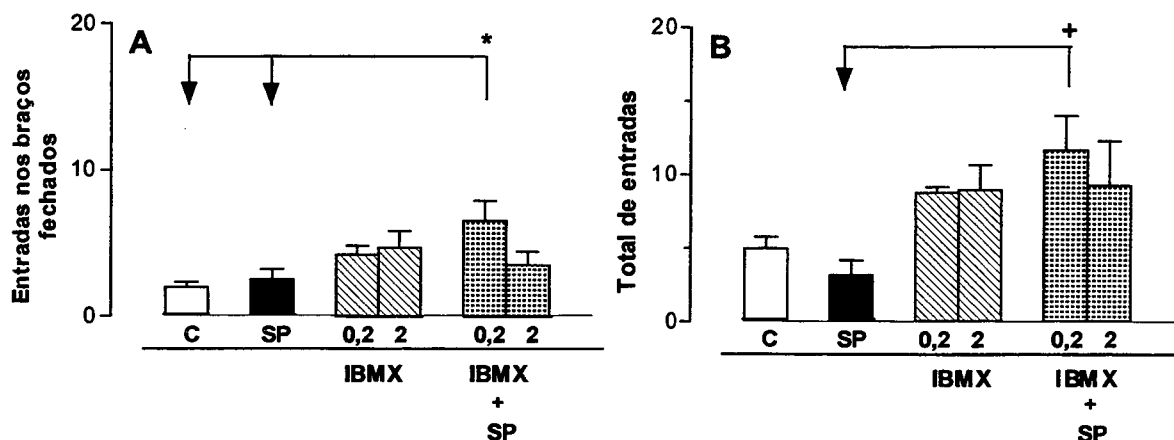
### **Influência do pré-tratamento central com IBMX sobre o efeito da SP**

O tratamento i.c.v. com IBMX, um inibidor inespecífico de fosfodiesterases, aumentou de maneira significativa a frequência de entradas nos braços abertos sobre o total de entradas (Figura 35 A;  $F_{(5,35)} = 4,5$ ;  $p < 0,05$ ) e o tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (Figura 35 B;  $F_{(5,35)} = 4,6$ ;  $p < 0,05$ ), revertendo de maneira significativa a redução promovida pela SP nos mesmos parâmetros.



**Figura 35 - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre a frequência de entradas nos braços abertos (A) e no tempo de permanência nos braços abertos (B) do LCE por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e cruces denotam diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais empregados por tratamento foi de 6.**

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 36 A;  $F_{(5,35)} = 3,2$ ;  $p < 0,05$ ) e o número total de entradas em ambos os braços (Figura 36 B;  $F_{(5,35)} = 3,0$ ;  $p < 0,05$ ), o tratamento central com IBMX aumentou significativamente essas medidas em relação ao grupo controle, revertendo de maneira significativa, na dose de 0,2 nmol, a redução promovida pela SP nesses parâmetros.



**Figura 36 - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2 nmol, i.c.v.) no efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e em ambos os braços (B) do LCE em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Os asteriscos e cruzes denotam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação aos valores obtidos nos grupos controle (C) e tratado com SP, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls. O número de animais utilizados em cada tratamento foi de 6.**

O tratamento com IBMX na dose de 0,2 nmol, quando utilizado isoladamente, aumentou o número de imersões de cabeça ( $p < 0,05$ ), enquanto que os demais parâmetros analisados no LCE não foram alterados. Esse pré-tratamento não promoveu alterações significativas no efeito da SP injetada no ventrículo lateral, sobre os diversos parâmetros etológicos registrados no LCE (Tabela 16).

**Tabela 16 - Influência do tratamento com IBMX (0,2 e 2 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.), em camundongos, no LCE (5 min). Os dados estão expressos como a média de 6 animais  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	SAP	HD	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
<b>TRATAMENTO</b>					
Controle	5,3 $\pm$ 0,4	22,0 $\pm$ 3,2	9,0 $\pm$ 2,1	1,6 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	4,8 $\pm$ 1,3	2,2 $\pm$ 0,6*	3,8 $\pm$ 1,2	0,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,3
IBMX 0,2 nmol	19,5 $\pm$ 4,1*	26,1 $\pm$ 3,3	26,1 $\pm$ 3,3	1,1 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3
IBMX 2 nmol	13,2 $\pm$ 3,2	15,1 $\pm$ 2,8	15,1 $\pm$ 2,8	1,1 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2
IBMX 0,2 + SP	9,0 $\pm$ 3,4	15,8 $\pm$ 4,2	15,8 $\pm$ 4,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
IBMX 2+ SP	5,3 $\pm$ 2,2	17,3 $\pm$ 8,9	17,3 $\pm$ 8,9	1,1 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3

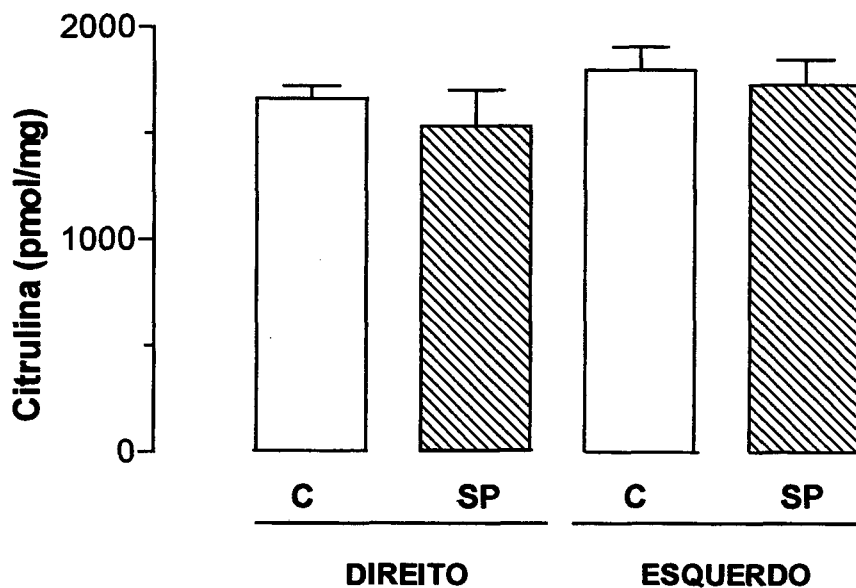
SAP = número de estiramentos

HD = número de imersões de cabeça

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

### Determinação da atividade da NOS "ex vivo"

A determinação da atividade da NOS em membranas sinápticas isoladas do córtex cerebral de camundongos tratados com SP 10 pmol, mostrou que esse tratamento não produz alterações significantes nessa atividade quando comparada com os animais controle (PBS). Também não foi observada quaisquer diferenças de atividade comparando-se as dosagens feitas nos hemisférios direito e esquerdo dos cérebros (Figura 37).



**Figura 37 - Atividade da NOS ex vivo em membranas sinápticas cerebrais isoladas de animais previamente tratados com SP 10 pmol i.c.v. (2  $\mu$ l) . Cada coluna representa a média  $\pm$  EPM . O número de animais empregados por tratamento foi de 6.**

**CAMPO ABERTO****Influência do pré-tratamento sistêmico com L-NOARG**

A injeção i.p. de L-NOARG, um inibidor da NOS, aumentou de maneira significativa a movimentação espontânea na dose de 2 nmol ( $F_{(3, 31)} = 3,46$ ;  $p < 0,05$ ), mas não alterou o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(3, 31)} = 0,45$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar ( $F_{(3, 31)} = 2,62$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(3, 31)} = 0,54$ ;  $p > 0,05$ ), em relação aos resultados obtidos no grupo controle, como pode ser observado na Tabela 17.

**Tabela 17 - Efeito do tratamento com doses crescentes de L-NOARG nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
TRATAMENTO				
Controle	26,9 $\pm$ 4,8	6,1 $\pm$ 1,6	2,1 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,2
L-NOARG 2 nmol	68,3 $\pm$ 16,2*	20,1 $\pm$ 4,0*	3,0 $\pm$ 0,8	0,1 $\pm$ 0,1
L-NOARG 20 nmol	36,0 $\pm$ 6,9	12,0 $\pm$ 2,8	2,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2
L-NOARG 200 nmol	54,8 $\pm$ 8,2	18,1 $\pm$ 5,9	3,2 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,2

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

**Influência do pré-tratamento central com L-NAME**

A injeção i.c.v. de L-NAME, um inibidor da NOS mais lipossolúvel que a L-NOARG, não alterou quaisquer parâmetros registrados no campo-aberto, como a movimentação espontânea ( $F_{(5, 61)} = 0,63$ ;  $p > 0,05$ ), o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(5, 61)} = 2,43$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar ( $F_{(5, 61)} = 2,43$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(5, 61)} = 2,47$ ;  $p > 0,05$ ), quando compara-se com os dados dos animais controle (Tabela 18).

**Tabela 18 - Efeito do tratamento com doses crescentes de L-NAME nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	69,7 $\pm$ 6,3	22,4 $\pm$ 2,7	2,3 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
L-NAME 1 nmol	57,2 $\pm$ 8,5	20,2 $\pm$ 6,6	3,5 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
L-NAME 3 nmol	69,3 $\pm$ 12,5	18,1 $\pm$ 4,8	2,4 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
L-NAME 10 nmol	64,1 $\pm$ 16,4	22,5 $\pm$ 5,9	1,8 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,3
L-NAME 30 nmol	48,8 $\pm$ 6,6	11,3 $\pm$ 2,6	3,0 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2
L-NAME 100 nmol	59,0 $\pm$ 7,9	16,1 $\pm$ 2,6	3,6 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,2

### Influência do pré-tratamento central com 7-NI

A injeção i.c.v. de 7-NI, um inibidor seletivo da NOSn, não modificou a movimentação espontânea ( $F_{(5, 29)} = 0,07$ ;  $p > 0,05$ ), o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(5, 29)} = 0,16$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar ( $F_{(5, 29)} = 0,79$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(5, 29)} = 1,40$ ;  $p > 0,05$ ), no teste do campo-aberto, em relação o as animais controle (Tabela 19).

**Tabela 19 - Efeito do tratamento com doses crescentes de 7-NI nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	63,4 $\pm$ 12,0	21,7 $\pm$ 6,3	3,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
7-NI 0,025 nmol	62,5 $\pm$ 7,8	22,0 $\pm$ 3,7	3,0 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,4
7-NI 0,1 nmol	49,8 $\pm$ 13,8	16,5 $\pm$ 5,5	3,0 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,5
7-NI 0,25 nmol	43,8 $\pm$ 11,6	13,2 $\pm$ 6,2	2,4 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,5
7-NI 2,5 nmol	94,6 $\pm$ 12,3	29,0 $\pm$ 6,3	2,8 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,8
7-NI 25 nmol	81,0 $\pm$ 11,9	20,6 $\pm$ 5,2	2,8 $\pm$ 0,9	0,2 $\pm$ 0,2

### Influência do pré-tratamento central com SNAP ou NAP

A injeção i.c.v. de SNAP, um doador de NO, não alterou quaisquer parâmetros registrados no campo-aberto, como a movimentação espontânea ( $F_{(4, 49)} = 2,20$ ;  $p > 0,05$ ); o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(4, 49)} = 0,89$ ;  $p > 0,05$ ); de levantar ( $F_{(4, 49)} = 0,96$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(4,49)} = 2,50$ ;  $p > 0,05$ ), quando comparados com os dados obtidos nos animais controle (Tabela 20).

**Tabela 20 - Efeito do tratamento com doses crescentes de SNAP nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
TRATAMENTO				
Controle	78,0 $\pm$ 7,1	19,2 $\pm$ 3,1	2,9 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,3
SNAP 0,02 pmol	57,0 $\pm$ 8,2	12,4 $\pm$ 2,9	2,3 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,5
SNAP 0,2 pmol	77,0 $\pm$ 10,9	20,3 $\pm$ 3,4	2,2 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
SNAP 2,0 pmol	92,6 $\pm$ 10,0	22,4 $\pm$ 5,2	2,5 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,1
SNAP 20 pmol	62,5 $\pm$ 34,0	19,8 $\pm$ 4,3	2,5 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,1

A injeção i.c.v. de NAP, molécula precursora do SNAP, não modificou a movimentação espontânea ( $F_{(4, 49)} = 1,23$ ;  $p > 0,05$ ), o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(4, 49)} = 0,35$ ;  $p > 0,05$ ), de levantar ( $F_{(4, 49)} = 2,69$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(4, 49)} = 1,25$ ;  $p > 0,05$ ) no teste do campo-aberto, em relação ao grupo controle (Tabela 21).



**Tabela 21 - Efeito do tratamento com doses crescentes de NAP nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	66,0 ± 8,3	16,0 ± 3,7	2,3 ± 0,4	0,5 ± 0,1
NAP 0,02 pmol	48,4 ± 6,9	10,5 ± 1,1	2,2 ± 0,4	0,4 ± 0,2
NAP 0,2 pmol	54,2 ± 6,3	12,3 ± 1,8	1,7 ± 0,3	0,3 ± 0,1
NAP 2,0 pmol	65,5 ± 5,6	17,5 ± 2,7	2,0 ± 0,3	0,1 ± 0,1
NAP 20 pmol	58,6 ± 6,3	23,5 ± 4,6	2,2 ± 0,5	0,7 ± 0,3

### **Influência do pré-tratamento de inibidores de NOS sobre o efeito da SP**

A injeção i.p. de L-NOARG não alterou o efeito da SP (i.c.v.) sobre quaisquer parâmetros observados no campo aberto. A Tabela 22 mostra os dados relativos à movimentação espontânea ( $F_{(3, 31)} = 2,10$ ;  $p > 0,05$ ), o número de comportamentos de auto-limpeza ( $F_{(3, 31)} = 0,47$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar ( $F_{(3, 31)} = 1,26$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais ( $F_{(3, 31)} = 1,35$ ;  $p > 0,05$ ), em relação aos resultados obtidos no grupo controle.

**Tabela 22 - Influência do tratamento com L-NOARG (20 nmol, i.p.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento ± EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	139,9 ± 29,3	35,4 ± 4,6	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,3
SP 10 pmol	84,0 ± 1,8	27,3 ± 7,3	1,3 ± 0,4	0,4 ± 0,2
L-NOARG 20 nmol	100,4 ± 15,0	20,3 ± 6,5	1,8 ± 0,6	0,1 ± 0,1
L-NOARG + SP	143,3 ± 20,4	23,2 ± 12,4	1,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1

A injeção i.c.v. de L-NAME, um inibidor de NOS mais lipossolúvel, também não alterou o efeito da SP i.c.v. sobre quaisquer parâmetros observados no campo aberto, como mostrado na Tabela 23 em relação à movimentação espontânea (L-NAME 1,0:  $F_{(3, 31)} = 1,02$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 3,0:  $F_{(3, 31)} = 1,65$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 30:  $F_{(3, 31)} = 1,70$ ;  $p > 0,05$ ), o número de comportamentos de auto-limpeza (L-NAME 1,0:  $F_{(3, 31)} = 1,40$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 3,0:  $F_{(3, 31)} = 0,69$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 30:  $F_{(3, 31)} = 1,75$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar (L-NAME 3,0:  $F_{(3, 31)} = 0,39$ ;  $p > 0,05$ ) e o número de bolos fecais (L-NAME 1,0:  $F_{(3, 31)} = 0,9$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 3,0:  $F_{(3, 31)} = 1,03$ ;  $p > 0,05$ ; L-NAME 30:  $F_{(3, 31)} = 1,1$ ;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 23 - Influência do tratamento com L-NAME (1, 3 e 30 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	65,8 $\pm$ 10,4	7,8 $\pm$ 1,4	2,1 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,3
SP 10 pmol	42,9 $\pm$ 7,6	10,8 $\pm$ 3,5	2,6 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,2
L-NAME 1 nmol	59,9 $\pm$ 6,9	11,5 $\pm$ 2,8	1,5 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
L-NAME 3 nmol	63,9 $\pm$ 7,1	12,0 $\pm$ 3,0	1,8 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,1
L-NAME 30 nmol	62,8 $\pm$ 7,4	12,4 $\pm$ 4,2	2,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
L-NAME 1 + SP	55,0 $\pm$ 5,0	10,3 $\pm$ 1,7	2,0 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2
L-NAME 3 + SP	56,4 $\pm$ 6,7	11,4 $\pm$ 3,6	2,6 $\pm$ 0,6	0,1 $\pm$ 0,1
L-NAME 30 + SP	57,2 $\pm$ 7,1	12,0 $\pm$ 3,8	3,4 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1

O inibidor seletivo de NOSn, 7-NI, aumentou significativamente a movimentação espontânea quando utilizado isoladamente (7-NI 0,025:  $F_{(3, 31)} = 4,0$ ;  $P > 0,05$ ; 7-NI 0,25:  $F_{(3, 31)} = 3,87$ ;  $P > 0,05$ ) e comparado com o grupo tratado com SP, porém não promoveu alteração significativa neste parâmetro, quando associado a SP. Em relação aos outros parâmetros registrados no campo-aberto, o pré-tratamento i.c.v. com 7-NI, utilizado isoladamente, não os alterou nem influenciou os efeitos da SP, como pode ser verificado na Tabela 24 para as medidas comportamentos de auto-limpeza (7-NI 0,025:  $F_{(3, 31)} = 1,1$ ;  $p > 0,05$ ; 7-NI 0,25:  $F_{(3, 31)} = 1,04$ ;  $p > 0,05$ ) e de levantar (7-NI 0,025:  $F_{(3, 31)} = 1,38$ ;  $p > 0,05$ ; 7-NI 0,25:  $F_{(3, 31)} = 1,42$ ;  $p > 0,05$ ) e número de bolos fecais (7-NI 0,025:  $F_{(3, 31)} = 0,9$ ;  $p > 0,05$ ; 7-NI 0,25:  $F_{(3, 31)} = 0,86$ ;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 24 - Influência do tratamento com 7-NI (0,025 e 0,25 nmol, i.c.v.) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	68,4 $\pm$ 10,4	10,9 $\pm$ 3,4	2,1 $\pm$ 0,4	0,1 $\pm$ 0,1
SP 10 pmol	36,4 $\pm$ 8,7	7,8 $\pm$ 3,8	2,0 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2
7-NI 0,025 nmol	79,2 $\pm$ 11,3 <sup>+</sup>	14,7 $\pm$ 5,0	3,2 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,2
7-NI 0,25 nmol	80,9 $\pm$ 13,5 <sup>+</sup>	16,9 $\pm$ 4,8	3,4 $\pm$ 0,7	0,1 $\pm$ 0,1
7-NI 0,025 + SP	66,2 $\pm$ 9,9	19,8 $\pm$ 8,2	2,1 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,1
7-NI 0,25 + SP	67,6 $\pm$ 11,4	21,5 $\pm$ 7,3	2,3 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,2

<sup>+</sup>  $p < 0,05$ , em relação a SP.

### Influência do pré-tratamento com doador de NO sobre o efeito da SP

A injeção i.c.v. de SNAP, substância doadora de NO, aumentou significativamente a movimentação espontânea (SNAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 28,3$ ;  $p < 0,001$ ; SNAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 22,3$   $p < 0,001$ ) e o comportamento de levantar (SNAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 9,3$ ;  $p < 0,001$ ; SNAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 19,7$   $p < 0,001$ ), quando os resultados obtidos foram comparados com os resultados da SP. Em relação aos parâmetros auto-limpeza (SNAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 1,9$ ;  $p > 0,05$ ; SNAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 1,5$ ;  $p > 0,05$ ) e número de bolos fecais (SNAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 1,4$ ;  $p > 0,05$ ; SNAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 0,2$ ;  $p > 0,05$ ), os mesmos não foram alterados quando comparados ao grupo controle, como pode ser visto na Tabela 25.

**Tabela 25 - Influência do tratamento i.c.v. com SNAP 0,02 e 2 pmol sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	89,7 $\pm$ 6,2	15,4 $\pm$ 1,7	2,4 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	31,2 $\pm$ 4,8	1,0 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2
SNAP 0,02 pmol	67,6 $\pm$ 8,3*	13,0 $\pm$ 3,5	2,6 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,4
SNAP 2,0 pmol	81,5 $\pm$ 8,6*	20,1 $\pm$ 3,2	2,8 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,2
SNAP 0,02 + SP	50,1 $\pm$ 2,7*	10,1 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2
SNAP 2,0 + SP	62,0 $\pm$ 6,2*	7,3 $\pm$ 1,1*	1,8 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2

\*  $p < 0,05$ , \*  $p < 0,05$  (em relação a SP), ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

### Influência do pré-tratamento central com NAP sobre o efeito da SP

A injeção i.c.v. de NAP, molécula precursora do SNAP, aumentou de maneira significativa a movimentação espontânea (NAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 22,4$ ;  $p < 0,001$ ; NAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 19,8$   $p < 0,001$ ) e o comportamento de levantar (NAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 7,9$ ;  $p < 0,001$ ; NAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 18,0$   $p < 0,001$ ) nos animais controles e tratados i.c.v. com SP 10 nmol, mas não alterou o comportamento de auto-limpeza (NAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 0,9$ ;  $p > 0,05$ ; NAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 1,1$ ;  $p > 0,05$ ) e número de bolos fecais (NAP 0,02:  $F_{(3,31)} = 0,9$ ;  $p > 0,05$ ; NAP 2,0:  $F_{(3,31)} = 0,2$ ;  $p > 0,05$ ), em relação aos resultados obtidos no grupo controle, como pode ser observado na Tabela 26.

**Tabela 26 - Influência do tratamento i.c.v. com NAP (0,02 e 2 pmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
TRATAMENTO				
Controle	89,7 $\pm$ 5,3	13,4 $\pm$ 1,4	2,6 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	33,0 $\pm$ 3,4	1,7 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
NAP 0,02 pmol	60,6 $\pm$ 8,3 <sup>*</sup>	16,0 $\pm$ 3,5	2,2 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,3
NAP 2,0 pmol	72,5 $\pm$ 8,6 <sup>*</sup>	21,2 $\pm$ 2,2	3,0 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,2
NAP 0,02 + SP	49,2 $\pm$ 2,7 <sup>*</sup>	13,2 $\pm$ 2,5	1,2 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1
NAP 2,0 + SP	59,3 $\pm$ 6,2 <sup>*</sup>	8,2 $\pm$ 1,4 <sup>*</sup>	1,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1

\*  $p < 0,05$ , <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  (em relação a SP), ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

### Influência do pré-tratamento central com 8-Br-GMPc sobre o efeito da SP

A injeção i.c.v. de 8-Br-GMPc, um análogo do GMPc, quando utilizado isoladamente ou associado a SP, reduziu de maneira significativa a movimentação espontânea ( $F_{(5,35)} = 10,8$ ;  $p < 0,01$ ), o número de comportamentos de levantar ( $F_{(5,35)} = 6,6$ ;  $p < 0,01$ ), e de auto-limpeza ( $F_{(5,35)} = 11,6$ ;  $p < 0,01$ ), sem alterar o número de bolos fecais ( $F_{(5,35)} = 0,4$ ;  $p > 0,05$ ), no teste do campo-aberto, em relação aos animais controle (Tabela 27).

**Tabela 27 - Influência do tratamento i.c.v. com 8-Br-GMPc (2,0 e 20 nmol) sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	95,3 $\pm$ 10,2	15,0 $\pm$ 1,8	3,0 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	26,8 $\pm$ 4,9*	2,3 $\pm$ 0,8 *	0,7 $\pm$ 0,3*	0,3 $\pm$ 0,2
8-Br-GMPc 2 nmol	33,2 $\pm$ 6,0*	4,0 $\pm$ 1,3*	0,3 $\pm$ 0,2*	0,3 $\pm$ 0,2
8-Br-GMPc 20 nmol	48,5 $\pm$ 9,3*	2,0 $\pm$ 1,4*	0,8 $\pm$ 0,3*	0,2 $\pm$ 0,2
8-Br-GMPc 2 + SP	61,3 $\pm$ 5,1*	10,0 $\pm$ 2,7	1,1 $\pm$ 0,3*	0,5 $\pm$ 0,2
8-Br-GMPc 20 + SP	35,2 $\pm$ 8,9*	6,3 $\pm$ 2,8*	0,3 $\pm$ 0,2*	0,2 $\pm$ 0,2

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

### Influência do pré-tratamento central com IBMX sobre o efeito da SP

A injeção i.c.v. de IBMX, um inibidor inespecífico de fosfodiesterases, utilizado isoladamente não alterou os parâmetros avaliados, com exceção do comportamento de levantar que foi aumentado significativamente na dose de 2,0 nmol. Quando o IBMX foi associado a SP (10 pmol) i.c.v. reverteu o efeito da SP sobre a movimentação espontânea ( $F_{(5,35)} = 2,5$ ;  $p < 0,05$ ), o número de comportamentos de levantar ( $F_{(5,35)} = 3,2$ ;  $p < 0,05$ ) e de auto-limpeza ( $F_{(5,35)} = 5,7$ ;  $p < 0,01$ ), sem alterar o número de bolos fecais ( $F_{(5,35)} = 0,3$ ;  $p > 0,05$ ), no teste do campo-aberto, como mostra a Tabela 28.

**Tabela 28 - influência do tratamento i.c.v. com IBMX (0,2 e 2,0) nmol sobre o efeito da SP (10 pmol, i.c.v.) nos parâmetros registrados no teste do campo-aberto (5 min). Os dados estão representados como a média de 8-10 animais por tratamento  $\pm$  EPM.**

PARÂMETRO TRATAMENTO	MOVIMENTAÇÃO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLO FECAL
Controle	78,5 $\pm$ 17,0	9,8 $\pm$ 1,9	1,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
SP 10 pmol	26,8 $\pm$ 4,9*	2,3 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
IBMX 0,2 nmol	59,5 $\pm$ 4,0	9,3 $\pm$ 1,7	2,2 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
IBMX 2,0 nmol	67,7 $\pm$ 10,8	17,0 $\pm$ 3,2*	2,8 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,2
IBMX 0,2 + SP	74,0 $\pm$ 14,9	5,1 $\pm$ 1,3	1,5 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2
IBMX 2,0 + SP	53,3 $\pm$ 11,9	13,7 $\pm$ 5,8	3,2 $\pm$ 0,4*	0,2 $\pm$ 0,2

\*  $p < 0,05$ , ANOVA univariada seguida do teste de Newman-Keuls.

## 5 - DISCUSSÃO

De acordo com Brandão (1995), existem tantas definições de ansiedade quanto as causas de sua manifestação. De modo geral, a ansiedade pode ser definida como um estado subjetivo de apreensão ou tensão, difuso ou vago, freqüentemente acompanhado por alterações fisiológicas como aumento da pressão arterial, da freqüência cardíaca, da respiração, urgência de micção ou defecação. A ansiedade é também um impulso motivacional fundamental em muitas formas de comportamento e, como o medo, tem importante significado adaptativo e, provavelmente, evolutivo. O medo difere da ansiedade na medida em que é uma resposta a uma ameaça conhecida, externa, definida. A ocorrência repetida do medo pode provocar uma reatividade neuroendócrina ou autônoma intensa e duradoura que, aliada ao conflito, pode resultar em ansiedade. Dentro de uma perspectiva evolucionária, a ansiedade e o medo têm suas raízes nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência. Estes podem ser estímulos ambientais, alterações no ambiente natural, estímulos nociceptivos ou o confronto com predadores. Frente a eles, os animais procuram responder segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilização, ataque defensivo ou submissão (Blanchard *et al.*,1993). As abordagens experimentais para avaliar a ansiedade levam em conta essas estratégias dos animais e tanto a ansiedade quanto o medo são freqüentemente tratados de forma unitária, ou seja, como uma emoção única, mesmo quando os estímulos e situações que supostamente desencadeiam estas emoções podem ser diferenciados em ameaças potenciais e reais. Na maioria das vezes, a ansiedade é inferida a partir de análise das respostas comportamentais de diferentes espécies, geralmente roedores, frente a estímulos aversivos, correlacionando-se os comportamentos observados com diferentes indicadores fisiológicos e neuroquímicos. Existem várias abordagens experimentais em uso, todas com aspectos positivos e negativos, levando-se em conta três critérios básicos de análise: previsibilidade da resposta farmacológica, semelhança fenomenológica e validade teórica, isto é, envolvimento de mecanismos básicos similares (Wiliner, 1991). File (1992), fazendo uma análise fatorial das medidas comportamentais registradas em três diferentes modelos



experimentais, observou que os parâmetros em cada paradigma relacionavam-se a diferentes tipos de ansiedade, reforçando a hipótese da heterogeneidade da ansiedade avaliada experimentalmente à semelhança do que ocorre em humanos.

A respeito do substrato neuroquímico da ansiedade, muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos na sua gênese, sendo que o grau e a forma como ocorre esse envolvimento parece depender do tipo de ansiedade estudada nos diferentes modelos experimentais (Pratt, 1992). Entre os principais neurotransmissores envolvidos na modulação da ansiedade podemos citar os aminoácidos excitatórios, a serotonina, a noradrenalina, a dopamina, o hormônio liberador de corticotrofina, a corticosterona, a colecistocinina (Graeff *et al.*, 1993). Recentemente vêm sendo sugerido experimentalmente que outros neurotransmissores participam desse substrato. Dentre esses, o NO tem sido proposto como um modulador da ansiedade experimental em diferentes modelos experimentais e espécies animais (Quock e Nugyen, 1992; Caton *et al.*, 1994; Guimarães *et al.*, 1994; Volke *et al.*, 1995, 1997; Faria *et al.*, 1997, Oliveira *et al.*, 1997; Faria, 1998), participando também no substrato neuroquímico dos comportamentos aversivos e de defesa (Lovick e Key, 1996; Chiavegatto *et al.*, 1998). Nossos resultados mostram que o pré-tratamento sistêmico (i.p.) ou central (i.c.v.) com inibidores de NOS (L-NOARG, L-NAME e 7-NI, respectivamente) não promovem *per se* alterações significativas nas medidas registradas no LCE, quando analisamos as curvas dose-resposta desses compostos no paradigma experimental usado. No entanto, em algumas doses estes inibidores mostram uma tendência a aumentar os parâmetros de exploração dos braços abertos. Isso é o que ocorre para os seguintes tratamentos: 20 nmol de L-NOARG i.p.; 1, 3 e 30 nmol de L-NAME i.c.v.; 0,1 e 0,25 nmol de 7-NI i.c.v. Quando essas doses são analisadas individualmente, fazendo-se comparações com os respectivos grupos controle, esse aumento é estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ; teste *t* de Student não pareado) na frequência de entradas (0,25 nmol) e no tempo despendido (0,1 nmol) nos braços abertos do LCE para o 7-NI, o que é indicativo de uma ação do tipo ansiolítica, como já descrita para os inibidores da NOS por vários autores, em estudos empregando doses muito maiores que as usadas no presente estudo. Na literatura, os estudos com a administração de inibidores da

NOS i.p. (Oliveira *et al.*, 1997) ou diretamente na PAG (Guimarães *et al.*, 1994), no modelo experimental (LCE) em outra espécie animal (ratos), mostraram efeitos do tipo ansiolíticos para esses compostos, com um aumento seletivo nos parâmetros de exploração dos braços abertos. A mesma atividade foi observada em outros estudos submetendo ratos ou camundongos ao LCE ou ao teste de interação social após tratamento com diferentes inibidores da NOS (Volke *et al.*, 1995, 1997; Faria *et al.*, 1997; Faria, 1998), indicando que o NO produz um efeito do tipo ansiogênico. Um achado bioquímico que indiretamente reforça essa hipótese é a demonstração de que o NO é capaz de diminuir a liberação de GABA no SNC em diversas regiões (Semba *et al.*, 1995). Todos esses estudos, entretanto empregam sempre doses e esquemas de tratamento de inibidores da NOS, L-NOARG e L-NAME que podem alterar a pressão arterial dos animais, fato que por si só pode levar a modificações no comportamento observado no LCE (Paré, 1992; Frussa-Filho *et al.*, 1993; Nakamura-Palacios, 1993; Courvoisier *et al.*, 1996; Kulikov *et al.*, 1997) e esta probabilidade não é aventada na discussão dos resultados obtidos, como se fosse de menor importância. Apenas Faria (1998) procedeu ao controle da pressão arterial dos animais, mostrando que as doses de inibidores empregadas em seu estudo, que promoviam uma ação do tipo ansiolítica, não promoviam alterações cardiovasculares significantes. A esse respeito, recentemente foi demonstrado que o 7-NI, que inibe preferencialmente a NOSn *in vivo* (Moore *et al.*, 1993), ao contrário do L-NAME, não altera a pressão arterial dos animais tratados (Wang *et al.*, 1995). Em nosso estudo, nenhum inibidor da NOS, assim como a SP isolada, produziu alteração significativa da pressão arterial registrada pelo método invasivo em ratos anestesiados (dados não apresentados).

Quanto ao envolvimento do NO na modulação dos estados aversivos, há na literatura resultados contraditórios aos acima descritos, como aqueles obtidos por Quock e Nugyen (1992) e Caton *et al.* (1994) demonstrando que o tratamento sistêmico com L-NOARG, um inibidor da NOS, bloqueia o efeito ansiolítico do clordiazepóxido em camundongos submetidos ao teste do LCE. A administração i.c.v. de L-Arg, um precursor de NO, reverteu esse bloqueio, indicando indiretamente que o NO parece exercer um efeito ansiolítico e não ansiogênico, como proposto pelos estudos citados anteriormente. Essa

suposição está de acordo com os achados de Lovick e Key (1996) mostrando que o NO inibe a atividade neuronal na PAG, estrutura que indubitavelmente faz parte do substrato neural dos comportamentos aversivos e de defesa (Olds e Olds, 1963; Graeff, 1984; LeDoux, 1986; Davis, 1990; Canteras *et al.*, 1997). Relacionado a esses dados, Chiavegatto *et al.* (1998) observaram um aumento na atividade da NOS e conseqüente acúmulo de GMPc na PAG de ratos após exposição a um predador, sugerindo o envolvimento da via NO-GMPc nas respostas de medo inato. Além disso, camundongos com supressão de genes que determinam a síntese de NOSe (“eNOS knockout”) apresentam uma redução no tempo despendido nos braços abertos do LCE e concomitante aumento no tempo de permanência nos braços fechados, efeitos esses indicativos de uma ação ansiogênica nos animais “eNOS knockout”, isto é, teoricamente sem produção de NO (Huston *et al.*, 1997). Essa observação, no entanto, deve ser levada em consideração com cautela, pois embora não haja síntese de NOSe nesses animais, a síntese de NOSn provavelmente está inalterada, o que poderia promover, no nosso entender, uma ação ansiogênica pela produção de NO no SNC, como proposto no presente estudo.

Essas aparentes contradições indicam que o papel do NO na modulação da ansiedade experimental precisa ser melhor investigado. Assim, no presente estudo, empregamos um doador de NO (SNAP) tentando conseguir mais subsídios para esclarecer essa questão. O SNAP *per se* aumentou os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, isto é, observou-se um incremento nas entradas e no tempo de permanência nos braços abertos. Pode parecer discrepante o fato de um doador de NO (SNAP), em pequenas doses (pmol), promover respostas semelhantes aos inibidores de NOS. Contudo, deve-se notar que os inibidores de NOS atuam de maneira específica sobre a GCS, enquanto que o SNAP pode estar ativando as demais guanilato ciclases, devido ao aumento não só de NO como também de monóxido de carbono (CO), entre outros radicais livres (Schmidt, 1992; Inge *et al.*, 1996; Snyder *et al.*, 1998; Stone e Marletta, 1998). Devido o NO ser um gás difusível, pode ainda atuar em outras estruturas que não só aquelas envolvidas na modulação da ansiedade. Portanto, os resultados observados seriam uma somatória dos seus efeitos próprios e, provavelmente, da liberação e/ou modulação de outras substâncias. Assim, à primeira vista parece que o envolvimento do NO no

fenômeno estudado não é de fácil entendimento, porém é preciso levar em consideração a probabilidade deste resultado ser um resultado falso-positivo pois, até agora, analisamos apenas os parâmetros relativos à exploração dos braços abertos. Ao se fazer uma análise das outras medidas registradas no LCE, verificamos que o SNAP produz um aumento nos parâmetros que avaliam a atividade motora no LCE (número de entradas nos braços fechados e, secundariamente, número total de entradas, além do número de imersões de cabeça), observações estas confirmadas pela tendência a apresentar uma atividade motora exacerbada no teste do campo-aberto, o que certamente distorce o registro dos outros parâmetros analisados. Esses achados nos levam a sugerir que os efeitos observados no LCE após o tratamento central com SNAP são tão somente reflexo de um aumento inespecífico na atividade motora basal dos animais. Confirmando nossa hipótese de que o NO apresenta um efeito do tipo ansiogênico, o SIN-1 (cloridrato de 3-morfolino-sidnonimina; 150 nmol), outro doador de NO e do anion superóxido(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), administrado diretamente na PAG de ratos avaliados no campo-aberto, promove uma resposta ansiogênica, sem alterar a atividade motora dos animais, como esperado para compostos com essa atividade, em concordância com o que estamos propondo no presente estudo para o NO (Del Bel *et al.*, 1997).

Com o emprego do NAP, precursor do SNAP sem capacidade de liberar NO *in vitro* (Mitrovic *et al.*, 1994), não esperaríamos observar quaisquer efeitos desse composto isolado. No entanto, esse tratamento produziu, em algumas doses extremas da curva dose-resposta (0,02 e 20 pmol), um efeito semelhante ao SNAP, isto é, promoveu um aumento no tempo de permanência nos braços abertos, além de aumentar o número total de entradas em ambos os braços e o número de imersões de cabeça, parâmetros esses relacionados à atividade motora (Rodgers, 1997). Uma primeira hipótese para explicar esse efeito seria uma interação do NAP com compostos presentes no organismo favorecendo a formação do SNAP, levando então à obtenção de resultados similares a esse último composto. Na verdade, cremos que o aumento no tempo despendido nos braços abertos promovido pelo NAP é também consequência de uma ativação motora, sendo reflexo do aumento observado no número de entradas em ambos os braços do LCE.

Por outro lado, os neuropeptídeos liberados em diversas áreas do cérebro

podem agir como neurotransmissores e moduladores, sendo considerados moduladores ideais, pois transportam mais informações que, por exemplo, os aminoácidos ou tanto quanto as monoaminas, transmissores clássicos, permitindo aos animais uma adaptação rápida às mudanças ambientais (Landgraf, 1995), fatos que reforçam a hipótese de que os neuropeptídeos e as neurocininas, em particular, podem agir como neuromoduladores da ansiedade. A influência das neurocininas na ansiedade experimental foi anteriormente descrita por diversos autores, como colocado na introdução do presente trabalho. A SP, agonista natural preferencial dos receptores NK<sub>1</sub>, promoveu *per se*, no presente estudo, um efeito do tipo ansiogênico, reduzindo a frequência de entradas e o tempo despendido nos braços abertos do LCE. Essas observações confirmam os dados obtidos anteriormente em nossos laboratórios, mostrando que a injeção i.c.v. de agonista seletivos (naturais ou sintéticos) de receptores NK<sub>1</sub>, como a SP e a SP-metil-éster, leva a redução na frequência de entradas e no tempo despendido nos braços abertos do LCE, enquanto que o bloqueio seletivo deste receptor pelo FK-888 promove efeito contrário (Teixeira, 1995, Teixeira *et al.* 1995, 1996), sugerindo o envolvimento das neurocininas na modulação da ansiedade experimental. Em concordância a esses dados, Unger *et al.* (1988) mostrou que a SP induz reações cardiovasculares de defesa em ratos, enquanto Aguiar e Brandão (1996) observaram que a SP apresenta efeitos pró-aversivos quando micro-injetada na dPAG. Estes achados experimentais concordam com os dados clínicos obtidos por Fehder *et al.* (1997) que verificaram um aumento dos níveis sanguíneos periféricos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos. Esses autores propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas por estresse. Ainda a esse respeito, Ikeda *et al.* (1995) sugeriram que a SP estaria envolvida na defecação induzida pelo estresse em ratos. Outros estudos mostram que a SP está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa, em ratos (Brodin *et al.*, 1994) e gatos (Shaikh *et al.*, 1993), no sistema límbico. Estudos clínicos, entretanto, mostraram um relação inversa entre os níveis de SP no líquido céfalo-raquidiano e a intensidade de “tensão interna” e “ansiedade psíquica” expressa por pacientes (Almay *et al.*, 1988). A maioria desses pacientes, todavia, apresentava um quadro de dor crônica, e é bem conhecido que os

estímulos dolorosos aumentam a liberação de met-enkefalina (Le Bars *et al.*, 1987). Vários estudos reforçam essa sugestão de que os níveis de ansiedade experimental podem ser modulados pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem especificamente os receptores neurocinérgicos NK<sub>1</sub>. A administração i.p. de CP 96345, um agonista do receptor NK<sub>1</sub>, em camundongos, aumenta tanto a latência para entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro, como o tempo despendido no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1993). No entanto, o fato deste composto reduzir a atividade motora e o comportamento de levantar dos animais nas mesmas doses, torna difícil separar a influência do efeito depressor motor da possível ação ansiolítica do antagonista NK<sub>1</sub> em questão. Recentemente, outro antagonista NK<sub>1</sub>, CGP 49823, mostrou efeitos ansiolíticos no teste de interação social em ratos (File, 1997), reforçando a hipótese de que a SP desempenha papel modulatório nos estados de ansiedade.

Em síntese, nossos resultados sobre a participação das neurocininas e, em particular dos receptores NK<sub>1</sub> na ansiedade experimental, avaliada no LCE em camundongos, confirmaram a ação do tipo ansiogênica da SP administrada centralmente em camundongos avaliados no LCE, efeito esse já observado em estudos anteriores em nossos e outros laboratórios.

Os sítios anatômicos em que estão presentes os receptores de SP estão co-localizados com células imunorreativas à NOS em estruturas neurais relacionadas à expressão dos comportamentos de defesa e ansiedade, como no córtex pré-frontal que faz conexão com os núcleos septal lateral, medial da amígdala, intersticial da estria terminal, alimentando o circuito de defesa ao nível hipotalâmico e que, por sua vez, projeta para a PAG, colículo superior e núcleo cuneiforme. O fato de existir esta co-localização e de tanto o NO como a SP promoverem efeitos ansiogênicos, como já discutido anteriormente, não garante a participação do NO no efeito da SP, objetivo de investigação no presente estudo.

Para tal fim, procedemos o pré-tratamento sistêmico ou central dos animais com inibidores de NOS e posterior injeção i.c.v. de SP, observando uma reversão completa dos efeitos do tipo ansiogênico da SP em camundongos avaliado no LCE. Essa reversão é verificada pela análise dos parâmetros de

exploração dos braços abertos nos animais tratados com SP (pré-tratados com inibidores da NOS), que passam a apresentar valores semelhantes aos dos animais controle, sugerindo que o NO participa da ação do tipo ansiogênica produzida da SP. Realmente, vários estudos mostram que alguns efeitos periféricos e centrais da SP parecem ser mediados pelo NO (Ziche *et al.*, 1994; Goetti e Larson, 1996; Sakurada *et al.*, 1996; Holzer, 1997).

Mancuso *et al.* (1994) registraram uma redução nos efeitos da SP sobre a atividade locomotora e ingesta alimentar de ratos, após o uso de L-NAME, confirmando que o NO parece modular os efeitos da SP, como sugerido por nossos resultados com o pré-tratamento com inibidores da NOS e posterior administração central de SP. Adicionalmente, nossos dados mostram que o pré-tratamento central com o SNAP, doador de NO, exacerba os efeitos motores da SP, como demonstrado pelo aumento das entradas nos braços fechados do LCE e confirmado no campo-aberto. O NAP, precursor do SNAP, promoveu o mesmo tipo de efeito, isto é, exacerbou os efeitos da SP sobre a atividade locomotora. Esses achados reforçam a hipótese de que existe uma relação causal entre o NO e a SP, ou vice-versa.

Ainda assim, fica difícil garantir essa relação causa-efeito entre a SP e o NO, isto é, afirmar que o efeito ansiogênico da SP se deve à liberação de NO. Assim nossos experimentos empregando o 8-Br-GMPc, análogo permeável do GMPc, mensageiro intracelular formado por ativação da GCS pelo NO, tenta confirmar a possível relação causa-efeito entre a SP e o NO. De fato, o 8-Br-GMPc, administrado centralmente, produziu efeitos similares aos da SP, isto é, diminuiu significativamente a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, além de reduzir os comportamentos de avaliação risco e o comportamento de levantar, efeitos esses mais evidentes na maior dose empregada (20 nmol). O 8-Br-GMPc também potencializou o efeito do tipo ansiogênico promovido pela SP, resultados esperados se nossa hipótese de uma relação causal entre a SP e o NO existe, isto é, se a administração central de SP promove a liberação de NO, que por sua vez, produz o efeito do tipo ansiogênico em camundongos avaliados no LCE. Analisando os dados obtidos no LCE da maneira usual não é possível observar um decréscimo estatisticamente significativo nos valores registrados, pois esses já se encontram num patamar mínimo. A potencialização dos efeitos

da SP foi notada pela observação do comportamento dos animais, pré-tratados com 8-Br-GMPc e injetados com SP, que apresentavam uma alternância de comportamentos de “congelamento” (“freezing”), isto é, parada total, com corridas bruscas e explosivas (“darting behavior”), comportamento esse que não é adequadamente avaliado pelas medidas do LCE propostas na literatura até o momento. Essa alternância de comportamentos foi também observada em ratos submetidos ao LCE pela administração do SIN-1, que levaria a uma maior formação de NO e, conseqüentemente, a um aumento nos níveis de GMPc (Del Bel *et al.*, 1997). Em nossos laboratórios temos também observado esses comportamentos em ratos submetidos ao LCE após a administração de SP no septo lateral, na mesma dose (10 pmol) empregada no presente estudo (Gavioli *et al.*, 1998). Esses comportamentos são descritos na literatura como respostas à estimulação do receptor NMDA em áreas neuroanatômicas envolvidas nos comportamentos aversivos e de defesa, como a PAG (Hilton e Redfern, 1986), o colículo superior (Mitchell *et al.*, 1988), e o córtex pré-frontal (Crawley *et al.*, 1992; Savelli *et al.*, 1995). Acreditamos que é necessário modificar o registro comportamental no LCE para que esse paradigma experimental se torne mais sensível na análise da ação de drogas ansiogênicas e, talvez, ansiolíticas. Uma possibilidade seria a de empregar parâmetros como tempo de imobilidade e reações de fuga, entre outros.

Nossos estudos com o IBMX tinham o intuito de confirmar, numa abordagem indireta, os dados obtidos com o pré-tratamento com o 8-Br-GMPc, uma vez que este inibidor de fosfodiesterase promoveria um acúmulo de GMPc (Vallebuona e Raiteri, 1993, 1994). No entanto, o pré-tratamento com IBMX, que não apresentou efeito quando utilizado isoladamente, reverteu a ação do tipo ansiogênica da SP, ao contrário do que esperávamos. Essa aparente contradição tem, pelo menos, duas explicações: a primeira deve-se simplesmente ao fato do IBMX não ser um inibidor específico da fosfodiesterase do tipo V, inibindo inespecificamente outras fosfodiesterases, o que poderia levar, por exemplo, a um aumento de AMPc, que levaria ao efeito aqui observado. Mais provável, entretanto, é que a aparente reversão do efeito da SP seja simplesmente devido à estimulação motora promovida pelo IBMX, observada pelo aumento no número de entradas nos braços fechados e no total de entradas em ambos os braços. Esta estimulação motora foi confirmada



na observação feita no campo-aberto. De qualquer maneira, seria interessante empregar um inibidor específico da fosfodiesterase do tipo V, como o dipiridamol ou o zaprimast, para confirmar essa relação causa-efeito entre a SP e o NO.

Na tentativa de observar de uma forma mais direta a liberação de NO pela SP procedemos os estudos de atividade da NOS *ex vivo*, isto é, em cérebros de animais tratados centralmente com 10 pmol de SP. Não observamos diferenças significantes entre a atividade da NOS em animais tratados com SP comparados aos do grupo controle, apesar de em ambos os grupos notarmos uma tendência a lateralização, isto é, o hemisfério esquerdo sempre apresentava níveis mais altos de atividade da NOS em comparação com o direito, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. O tratamento com SP não alterou significativamente a atividade da NOS, provavelmente, porque promove liberação de NO em quantidades que não diferem dos valores basais, responsáveis pelos efeitos comportamentais observados.

## 6 - CONCLUSÕES

Nossos resultados acerca da participação do NO na ansiedade experimental avaliada no LCE em camundongos sugerem que o NO exerce uma ação do tipo ansiogênica, pois os inibidores de suas enzimas de síntese apresentam, em algumas doses, efeitos ansiolíticos neste paradigma experimental.

Nossos dados indicam que parece existir uma interação do sistema neurocinérgico com o sistema nitrérgico na modulação da ansiedade experimental avaliada no LCE em camundongos. Essa interação é provavelmente do tipo causa-efeito, uma vez que a SP parece promover um aumento da produção de NO, o que resultaria no efeito do tipo ansiogênico observado no LCE. No entanto, cremos que outros estudos complementares são importantes para melhor entendermos essa inter-relação entre o sistema neurocinérgico e o nitrérgico, como o emprego de outros agonistas e antagonistas NK<sub>1</sub>, além de verificar o envolvimento dos outros receptores neurocinérgicos NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub>, com o NO, na modulação da ansiedade experimental. Além disso, estudos imunohistoquímicos que mostrem uma correlação anatomo-funcional entre a presença de SP e as atividades bioquímicas da NOS, e estudos eletrofisiológicos com microeletrodos que detectam a liberação de NO após a administração central de SP, nas diferentes áreas do substrato neural da ansiedade experimental, ou ainda estudos *in vitro* com culturas de células primárias (PC12) que possibilitem demonstrar diretamente se a SP ativa a NOS, são de grande interesse e valia na determinação do papel do NO nos efeitos modulatórios das neurocininas na ansiedade experimental, como sugerido pelos resultados do presente trabalho.

Não é possível descartar também que a relação causa-efeito se dê no sentido contrário ao aqui proposto, isto é, que o NO estimule a liberação de SP no septo lateral produzindo o efeito do tipo ansiogênico por ativação, via receptores NK<sub>1</sub>, do hipotálamo que se projetam para a PAG. Além disso, uma ação direta do NO ativando o núcleo medial da amígdala que se projeta ao hipotálamo e este a PAG, poderia levar à promoção do efeito do tipo ansiogênico observado no presente estudo tanto para o NO quanto para SP,

assim como a potencialização observada no efeito da SP pelo pré-tratamento com 8-Br-GMPc. Essa probabilidade é reforçada pelas observações de Kamisaki *et al.* (1955) e Inoue *et al.* (1997) que demonstraram que o NO regula a liberação de SP em sinaptossomas cerebrais e em fatias da medula espinhal de ratos.

Desta maneira, o presente estudo mostra de forma inequívoca que o NO participa no efeito do tipo ansiogênico da SP avaliado no LCE, em camundongos, embora a direção em que essa interação entre o sistema nitrérgico eo neurocinérgico ocorra permanece a ser esclarecida.

## RESUMO

O óxido nítrico (NO) parece regular inúmeras funções biológicas no sistema nervoso central tais como a neurotoxicidade e a plasticidade neuronal, além de alguns processos fisiopatológicos como a ansiedade. A ansiedade é modulada por diversos sistemas de neurotransmissores. A este respeito, estudos anteriores mostraram que as neurocininas modulam a ansiedade experimental, avaliada no labirinto em cruz elevado (LCE), em camundongos. Por outro lado, têm sido descritos efeitos do tipo ansiolítico quando se trata ratos e camundongos com alguns inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), enzima passo limitante na síntese de NO. Adicionalmente, observou-se que a N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), um inibidor da NOS, altera alguns efeitos comportamentais da substância P (SP), neurocinina endógena, em ratos. Assim, o presente estudo teve como objetivo final investigar o possível envolvimento do NO na modulação do efeito ansiogênico da SP em camundongos, no paradigma experimental do LCE. Camundongos Suíços adultos foram injetados i. p. com L-NOARG (2, 20 e 200 nmol / kg) ou i. c. v. com N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME; 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 nmol / sítio), 7-nitroindazol (7-NI; 0,025, 0,1, 0,25, 2,5 e 25 nmol / sítio) ou veículo (NaCl 0,9% ou PBS, respectivamente). Após 10 e 5 min, respectivamente, os animais foram observados no LCE (5 min) e, posteriormente, no campo aberto (5 min). Outros grupos de animais foram injetados i. p. com L-NOARG (0,02 µmol / kg), i. c. v. com L-NAME (1, 3 e 30 nmol / sítio), 7-nitroindazol (7-NI 0,025 e 0,25 nmol / sítio), inibidores da NOS, ou veículo. Após 5 min, foi administrado, via i. c. v., SP 10 pmol ou PBS (2 µl). Imediatamente após a recuperação do reflexo postural esses animais foram observados no LCE (5 min) e, posteriormente, no campo aberto (5 min). O tratamento com inibidores da NOS não alterou os parâmetros observados no LCE. A SP *per se* reduziu o tempo despendido nos braços abertos em comparação aos outros tratamentos ( $p < 0,05$ ), indicando um efeito do tipo ansiogênico para essa neurocinina. O efeito ansiogênico da SP foi revertido pelo pré-tratamento com os diferentes inibidores de NOS ( $p < 0,05$ ). Em outro grupo de animais foi administrado S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP), um doador de NO, ou N-acetil-DL-penicilamina (NAP), sua molécula precursora, nas doses de 0,02, 0,2, 2 e 20

pmol / sítio i. c. v. No labirinto em cruz elevado, estas substâncias não alteraram quaisquer parâmetros registrados, exceto aqueles referentes à atividade motora. Nos grupos pré-tratados i. c. v. com SNAP (0,02 e 2 pmol) ou NAP (2 pmol) e após 30 min, injetados pela mesma via com a SP (10 pmol), ou seu veículo, observou-se também uma reversão dos efeitos do tipo ansiogênico da SP. O 8-bromo-GMP cíclico (8-Br-GMPc; 2 e 20 nmol), um análogo da GMPc, promoveu uma ação do tipo ansiogênica *per se* e, na maior dose, tendeu a ampliar a resposta do tipo ansiogênica da SP. O pré-tratamento i. c. v. de animais com 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0,2 e 2 nmol), um inibidor das enzimas fosfodiesterases, não alterou quaisquer parâmetros observados no LCE, mas reverteu os efeitos da SP nesse modelo experimental. O conjunto dos resultados obtidos em nosso estudo sugerem que o NO participa na ação do tipo ansiogênica da SP observada em camundongos no teste do LCE.

## ABSTRACT

### Nitric oxide involvement in the anxiogenic effect of substance P

Nitric oxide (NO) mediates several biological functions, including some central nervous system processes such as neurotoxicity, plasticity and anxiety. Anxiety is a pathophysiological condition regulated by various neurotransmitter systems. Neurokinins, such as substance P (SP), functionally modulates experimental anxiety as evaluated in the elevated plus-maze test (EPM) in mice and NO synthase inhibitors (NOS) usually promote anxiolytic-like effects in rodents in the same experimental paradigm. Moreover, N-nitro-L-arginine (L-NOARG), a NOS inhibitor, modifies some behavioral effects of SP in rats. Thus, this study investigates whether NO is involved in the anxiogenic profile of action of SP in mice in the EPM. Adult Swiss mice were injected i. p. with L-NOARG (2, 20 and 200 nmol/kg) and i.c.v. with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 nmol/site), 7-nitroindazole (7-NI; 0.025, 0.1, 0.25, 2.5 and 25 nmol/site) or vehicle (NaCl 0.9% or PBS, respectively). Animals were evaluated in the EPM for 5 min, followed by observation in the open-field (5 min). Another group of animals were injected with L-NOARG (0.02  $\mu$ mol/kg) i. p., L-NAME (1, 3 and 30 nmol/site) or 7-NI (0.025 and 0.25 nmol/site) i. c. v. or vehicle. Five min later, the animals received i.c.v injections of SP (10 pmol) or PBS (2  $\mu$ l). Immediately after the animals recovered their postural reflex they were observed in the plus-maze (5 min) and, afterwards, in the open-field (5 min). Treatment with NOS inhibitors did not change any parameters measured in the EPM. SP *per se* reduced the time spent on open arms in comparison to the other treatments indicating an anxiogenic-like effect ( $p < 0.05$ ). This anxiogenic effect of SP was reverted by pretreatment with different NOS inhibitors ( $p < 0.05$ ). Another group of animals received i. c. v. injections of a NO-releasing compound, S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP), or N-acetyl-DL-penicillamine (NAP), the non-nitrosylated thiol. These compounds did not modify the EPM parameters, except the locomotor activity of the animals, but reverted the anxiogenic effect of SP. 8-bromo- cyclic GMP (8-Br-cGMP, 2 and 20 nmol), a permeant cGMP analog, promoted an anxiogenic-like effect *per se* and, at the highest dose tested, enhanced the anxiogenic

action of SP. Central pretreatment with 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, 0.2 and 2 nmol), a phosphodiesterase inhibitor, alter the EPM locomotor measurements and reverted the SP responses on this experimental paradigm. Taken together, the results of the present study suggest a putative NO role in the anxiogenic-like effect of SP in mice evaluated in the EPM test.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, M. S.; BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of the rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.**, **60**: 1183-1186, 1996.
- ALMAY, B. G.; JOHANSSON, F.; VON KNORING, L.; LE GREVES, P. TERENIUS, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. **Pain**, **33**: 3-9, 1988.
- ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, **21**: 205-235, 1973.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **British J. Pharmacol.**, **108**: 833-837, 1993.
- BABBEDGE, R. C.; BLAND-WARD, P. A.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. **British J. Pharmacol.**, **110**: 225-228, 1993.
- BAUER, R. M.; IWAMOTO, G. A.; WALDROP T. G. Discharge patterns of ventrolateral medullary neurons during muscular contraction. **Am J. Physiol**, **259**: R606-611, 1991.
- BELVISIS, Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. **European J. Pharmacol.**, **198**: 219, 1991.
- BERNATZKY, G. e SARIÁ, A. Behavior effect of the NK<sub>2</sub> antagonist SR 48968 but not of the NK<sub>1</sub> antagonist SR 140333 in the mouse black and white box model. **Proceedings of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, San Diego, 1995.
- 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. Brain Res.**, **58**: 155-166, 1993.
- BOIX, F.; PFISTER, M.; HUSTON, J. P.; SCHWARTING, K. W. Substance P decreases extracellular concentrations of acetylcholine in neostriatum and nucleus accumbens *in vivo*: possible relevance for the central processing of reward and aversing. **Behav. Brain Res.**, **63**: 213-219, 1994.
- BONNER, T.; AFFOLTER, M. U.; YOUNG, A. C.; YONG, W. S. A cDNA encoding the precursors of the rat neuropeptide neurokinin B. **Mol. Brain. Res.**, **2**: 243-249, 1987.
- BRADY, D. R.; CAREY, R. G.; MUFSON, E. J. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPHd) profiles in the amygdala of



- human and new world monkey (*Saimiri sciureus*). **Brain Res.**, **577**: 236-248, 1992.
- BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional. In: BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**. Ed. Atheneu, S. P., 1995, pp. 105-126.
- BRENT, P.; CHAHL, J.; LORIS, A and CANTARELLA, P. A. Effect of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. **Biogenic. Amines**, **10**: 319-327, 1994.
- BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **87**: 682-685, 1990.
- BRETT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, **351**: 714-718, 1991.
- BRISTOW, L.; YOUNG, L. Chromodacryorrhea and repetitive hind paw tapping: models of peripheral and central tachykinin NK<sub>1</sub> receptor activation in gerbils. **European J. Pharmacol.**, **253**: 245-252, 1994.
- BRODIN, E.; ROSÉN, A.; SCHÖTT, E.; BRODIN, K. Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. **Neuropeptides**, **26**: 253-260, 1994.
- BUCHAN, Modulation of agonist-induced calcium mobilisation in bovine aortic endothelial cells by phorbol myristate acetate and cyclic AMP but not cyclic GMP, **British. J. Pharmacol.**, **104**: 361-366, 1991.
- BUGA, G. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; INGNARRO, L. J. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. **Circ. Res.**, **73**: 808-812, 1993.
- CANTERAS, N. S.; CHIAVEGATTO, S.; RIBEIRO DO VALLE, L. E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Res. Bull.**, **44**: 297-305, 1997.
- CATON, P. W.; TOUSMAN, S. A.; QUOCK, R. M. Involvement of nitric oxide in nitrous oxide anxiolysis in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Bioch. and Behav.**, **48**: 689-692, 1994.
- CHANG, M.; LEEMAN, S. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. **J. Biol. Chem.**, **245**: 4787-4790, 1970.

- CHANG, M. T. Substance P-dopamine relationship in the rat substantia nigra: a light and electron microscopy study of double immunocytochemically labelled materials. **Brain Res.**, **448**: 3911-396, 1988.
- CHANG, M.; LEEMAN, S.; NIALL, M. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, **232**: 86-87, 1971.
- CHERRY, P. D.; FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, T. V.; JOTHIANANDAN, D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 2105-2110, 1982.
- CHIAVEGATTO, S.; SCAVONE, C.; CANTERAS, N. S. Nitric oxide synthase activity in the dorsal periaqueductal gray of rats expressing innate fear responses. **Neuroreport**, **4**: 571-576, 1998.
- COURVOISIER, H.; MOISAN, M-P; SARRIEAU, A.; HENDLEY, E. D.; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA / WKY Inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Res.**, **743**: 77-85, 1996.
- CRAWLEY, J. N.; EVERS, J. R.; PAUL, S. M. Polyamine inhibit N-methyl-D-aspartate antagonist-induced darting behavior in the rat prefrontal cortex. **Brain Res.**, **586**: 6-11, 1992.
- CROSSIN, Nitric oxide: a versatile second messenger in brain, **TBS.**, **16**: 81, 1991.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **49**: 171-176, 1994.
- CUELLO, A. C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **178**:129-155, 1978.
- CULMAN, J.; UNGER, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. **J. Physiol. Pharmacology**, **73**: 885-891, 1995.
- DAVIS, M.; SCHLESINGER, L. S.; SORENSON, C. A. Temporal specificity of fear-conditioning: effects of different conditioned stimulus-unconditioned stimulus intervals on the fear-potentiated startle effect. **J. Exp. Psychol.: Animal Behav. Process.**, **15**:295-310, 1989.
- DAVIS, M.; RAINNIE, D.; CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **TINS**, **7**: 208-214, 1992.
- DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide: actions pathological roles. **Neuroscientist**, **1**: 7-18, 1995.

- DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, **14**: 147-159, 1994.
- DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 7797-7801, 1991.
- DE CARO, G.; PERFUMI, M.; MASSI, M. Tachykinins and body fluid regulation. In: EPSTEIN, A. N; MORRISON, A. R. (Eds.) **Prog. in Psychobiol. Physiol. Psychol.** New York: Academic Press, 31-66, 1988.
- DEL BEL, E. A.; de OLIVEIRA, R. W.; SILVEIRA, M. C. L.; GUIMARÃES, F. S. Modulation of defense reaction by nitric oxide in the dorsal central grey. **Proc. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, New Orleans, 1997.
- DOMINICZACK, A. F.; BOHR, D. F. Nitric oxide and its putative role in hypertension. **Hypertension**, **25**: 1202-1211, 1995.
- D'ORLEANS-JUSTE, P.; DION, S.; MIZRAHI, J.; REGOLI, D. Effects of peptides and non peptides on isolated arterial smooth muscles: role of endothelium. **European J. Pharmacol.**, **114**: 9-21, 1985.
- DORNAN, W. A.; WINK, K. L.; MOLEN, P.; SHORT, K.; STRUTHERS, W.; BARRET, C. Site-specific effects in intracerebral infections of three neurokinins (neurokinin A, neurokinin B and neurokinin) on the expression of male rat sexual behavior. **Physiol. Behav.**, **54**: 249-258, 1993.
- DWYER, Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-NG-Nitroarginine in brain in vitro and in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **176**: 1136, 1991.
- ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **TINS**, **4**: 267-269, 1981.
- EUTAMENE, H.; THEODOROU, V.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Implication of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> by interleukin 1 $\beta$ : role of nitric oxide. **Gastroenterology**, **109**: 483-489, 199.
- FARIA, M. S. **Papel do óxido nítrico em um modelo animal de ansiedade.** Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Campinas, SP, 1998.
- FARIA, M. S.; MUSCARÁ, M. N.; Jr. MORENO, H.; TEIXEIRA, S. A.; DIAS, H. B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F. G.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **European J. Pharmacology**, **323**: 37-43, 1997.
- FEHDER, W. P.; SACHS, J.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Substance P as immune modulator of anxiety. **Neuroimmunomodulation**, **4**: 42-48, 1997.

- FERNANDES, P. D. **Óxido nítrico: ação giardicida e interação com citoesqueleto**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Química Biológica, Rio de Janeiro, RJ, 1996.
- FIELD, L.; DILTS, R. V.; RAVICHANDRAN, R.; LENHERT, P. G.; CARNAHAN, G. E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillanime; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 249-250, 1978.
- FILE, S. E. Behavior detection of anxiolytic action. In: J. M. ELLIOTT, D. J. HEAL, C. A. MARSDEN (Eds.) **Experimental approaches to anxiety and depression**, Elsevier, Amsterdam, 1992, pp. 25-44.
- FILE, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **58**: 747-752, 1997.
- FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, molecular cloning and functions. **Hypertension**, **23**: 1121-1131, 1994.
- FRUSSA-FILHO, R.; GOTO, S. H.; CONCEIÇÃO, I. M.; RIBEIRO, R. A. Comparison of anxiety plus-maze, open-field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **26**: 965-969, 1993.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZK, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contraction factors. **FASEB J.**, **3**: 2007-2018, 1986.
- GALLY, J. A.; MONTAGUE, P. R., REEKE, G. N. Jr.; EDELMAN, G. M. The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 3547-3551, 1990.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; BENNETT, T.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N<sup>w</sup>-monomethyl-L-arginine or N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. **British J. Pharmacol.**, **101**: 10-12, 1990.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **TINS**, **14**: 60-67, 1991.
- GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Ann. Rev. Physiol.**, **57**: 683-706, 1995.

- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests a role as intracellular messenger in the brain. **Nature**, **336**: 385-388, 1988.
- GAVIOLI, E.; CRUZES, M. N.; BARETTA, I. P.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M. Envolvimento do receptor NK<sub>1</sub> na modulação da ansiedade experimental em ratos. Reunião anual da FESBE, Caxambu, 1998.
- GOETTI, V. M.; LARSON, A. A. Nitric oxide mediates long-term hyperalgesic and antinociceptive effects of the N-terminus of substance P in the formalin assay in mice. **Pain**, **67**: 435-441, 1996.
- GRAEFF, F. G. The anti-aversive action of minor tranquilizers. **TIPS**, **5**: 230-233, 1984.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. (Eds.) **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo: Lemos, 109-144, 1993.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 811-829, 1994.
- GRAY, The effects of inhibitors of the L-arginine nitric oxide pathway on endotoxin-induced loss of vascular responsiveness in anesthetized rats. **British J. Pharmacol.**, **103**: 1218, 1991.
- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat. **Science**, **212**: 56-58, 1981.
- GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, **320**: 454-456, 1986.
- GROSS, P. M.; WEAVER, D. F.; BOWERS, R. J.; NAG, S.; HO, L. T., PANG, J. J.; ESPINOSA, F. J. Neurotoxicity in conscious rats following intraventricular SNAP, a nitric oxide donor. **Neuropharmacology**, **33**: 915-927, 1994.
- GUARD, S.; WATSON, S. P. Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. **Neurochem. Int.**, **18**: 149-165, 1991.
- GUIMARÃES, F. S.; DE AGUIAR, J. C.; DEL-BEL, E. A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of NOS inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **Neuroreport**, **5**: 1929-1932, 1994.
- HALEY, T. J.; McCORMICK, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. **British J. Pharmacol.**, **12**: 12-15, 1957.

- HALL, M. E.; STEWART, J. M. Modulation of isolation-induced fighting by N- and C-terminal analogs of substance P: evidence for multiple recognition sites. **Peptides**, **5**: 85-89, 1984.
- HANDLEY, S.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **327**: 1-5, 1984.
- HASENÖHRL, R. U.; FRISCH, C.; NIKOLAUS, S.; HUSTON, J. P. Chronic administration of neurokinin SP improves maze performance in aged *Rattus norvegicus*. **Behav. Neural Biol.**, **62**: 110-120, 1994.
- HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase assays. **Meth. Enzymol.**, **233**: 256-258, 1994.
- HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, **235**: 473-476, 1987.
- HILTON, S. M.; REDFEM, W. S. A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. **J. Physiol.**, **378**: 231-228, 1986.
- HOAR, W. S.; HICKMAN, C. P. **General and comparative physiology 2<sup>o</sup> ed.**, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 1975, pp. 260-265.
- HÖKFELT, T.; MILLHORM, D.; SEROOGY, K.; TSURUO, Y.; CECCATELLI, S.; LINDH, B.; MEISTER, T.; MALANDER, T.; SCHALLING, M.; BARTFAI, T.; TERENIUS, L. Co-existence of peptides with classical neurotransmitters. **Experientia**, **43**: 768-780, 1987.
- HÖLZER, P. Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. **Neuroreport**, **8**: 2857-2860, 1997.
- HOOPER, A. B. Ammonia oxidation and energy transduction in the nitrifying bacteria. In: STROGL, W. R., TOUVINEN, O. H. (Eds.) **Microbial Chemoautotrophy**, Columbus: Ohio State University Press, 1984, 133-167.
- HOWALUK, Spontaneous liberation of nitric oxide cannot account for in vitro vascular relaxation by S-nitrosothiols. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, **255**: 1256-1264, 1990.
- HUSTON, J. P.; STÄUBLI, S. Substance P and its effects on learning and memory. In: MARTINEZ, J. L.; JENSEN, R. A.; MESSING, R. N.; RIGTER, M.; McGAUGH, J. L. (Eds.) **Endogenous peptides and learning and memory processes**. New York: Academic Press, 521-540, 1981.
- HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R. V.; BOIX, F.; GEHARD, P.; SCHWARTING, R. K. W. Sequence-specific effects of neurokinin, substance P on memory, reinforcement and brain dopamine activity. **Psychopharmacology**, **112**: 147-162, 1993.

- HUSTON, J. P.; GOEDECKE, A.; SCHRADER, J.; FRISCH, C.; HASENÖHRI, R. U. Behavioral analysis of the endothelial NO-synthase knockout mouse. **Proceedings of 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, New Orleans. vol. 3, 1997, p. 2216.
- IGNARRO, L. P. Stimulation of phagocytic release of neutral protease from human neutrophils by cholinergic amines and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate, **J. Immunol.**, **112**:210-214, 1974.
- IGNARRO, L. P.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, **61**: 866-879, 1987.
- IKEDA, K.; MIYATA, K.; ORITA, A.; KUBOTA, H. YAMADA, T.; TOMIOKA, K. RP 67580, a neurokinin<sub>1</sub> receptor antagonist, decreased restraint stress-induced defecation in rat. **Neurosci. Lett.**, **189**: 103-106, 1995.
- INGI, T.; CHENG, J.; RONNETT, G. V. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. **Neuron**, **16** (4): 835-842, 1996.
- INOUE, A.; HASHIMOTO, T.; HIDE, I.; NISHIO, H.; NAKATA, Y. 5-Hydroxytryptamine-facilitated release of substance P from rat spinal cord slices is mediated by nitric oxide and cyclic GMP. **J. Neurochemistry**, **68**: 128-133, 1997.
- ISHII, N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. **European J. Pharmacol.**, **176**: 219, 1990.
- ITOI, K., BADOER, E.; FATIMUNISSA, Q., UNGER, T. Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain. **Brain Res.**, **668**: 100-106, 1988.
- ITOI, K.; TSCHOPE, C.; JOST, N.; CULMAN, J.; LEBRUN, C.; STAUSS, B.; UNGER, T. Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. **European J. Pharmacol.**, **219**: 435-444, 1992.
- IVERSEN, L. L. Chemical signaling in the nervous system. **Prog. Brain Res.**, **68**: 15-21, 1986.
- JESSEL, T. M. Substance P in the nervous system. In: IVERSEN, L. L.; IVERSEN, S. D.; SNYDER, S. H. (Eds.) **Handbook of Psychopharmacology: Neuropeptides**, Plenum Press, vol. 16, 1983, pp. 1-1105.
- KAGE, R.; MCGREGOR, G. P.; THIM, L.; CONLON, J. M. Neuropeptide  $\gamma$ , a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from preprotachykinin mRNA in the female rat brain. **J. Neurochem.**, **50**: 1412-1427, 1988.

- KHAN, S.; WELPTON, R.; MICHAEL-TITUS, A. T. Endogenous dopamine outflow from rat striatal slices in state and dynamic conditions. **Neurosci. Res. Commun.**, **16**:145, 1995.
- KAMISAKI, Y.; OHKUMA, S. Role of nitric oxide in central synaptic transmission: effects on neurotransmitter release. **Jpn. J. Pharmacol.**, **69**: 1-8, 1995.
- KANAWAGA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATUSO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. **J. Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **114**: 533-540, 1983.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin  $\alpha$  and  $\beta$ , isolated from porcine spinal cord. **Proc. Jpn. Acad. Series B**, **59**: 101-104, 1983.
- KINJO, N.; SKINNER, R. D.; POWELL, E. W. A study of NADPH-diaphorase positive septo hippocampal neurons in rat. **Neurosci. Res.**, **7**: 154-158, 1989.
- KLATT, P.; HEINZEL, B.; MAYER, B.; AMBACH, E.; WERNER-FELMAYER, G.; WACHTER, H.; WENER, E. R. Stimulation of human nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and selective binding of the cofactor. **FEBS Lett.**, **305** (2): 160-162, 1992.
- KLAVDIEVA, M. M. The history of neuropeptides I. **Front. Neuroendocrinol.**, **16**: 293-321, 1995.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, **298**: 249-258, 1994.
- KNOWLES, R. G.; SALTER, M.; BROOKS, S. L.; MONCADA, S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **172**: 1042-1048, 1989.
- KOTANI, M.; MOSHIMARU, M.; NAWA, M.; NAKANISHI, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **83**: 7074-7078, 1986.
- KOVÁCS, G. L.; DE WIED, D. Peptidergic modulation of learning and memory process. **Pharmacological Reviews**, **46**: 269-290, 1994.
- KRAUSE, J. E.; CHIRGWIN, J. M.; CARTER, M. S.; XU, Z. S.; HERSHEY, A. D. Three rat preprotochykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **84**: 881-885, 1987.
- KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; SCHMIDT, T.; ZENKE, F. T.; DASTING, I.; WESENER, J. R.; BETTERMANN, H.; BREUNING, K. D.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc



- release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. **Biochem. Res. Commun.**, **200**: 1105-1110,1994.
- KULIKOV, A.; AGUERRE, S.; BERTON, O.; RAMOS, A.; MORMEDE, P.; CHAOULOFF, F. Central serotonergic systems in the spontaneously hypertensive and Lewis rat strains that differ in the elevated plus-maze test of anxiety. **J. Pharmacol. exp. Therap.**, **281**:775-784, 1997.
- LANDGRAF, R. Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioural consequences. **J. Neuroendocrinol.**, **7**: 243-253, 1995.
- LANEUVILLE, O.; DORAIS, J.; COUTURE, R. Characterization of the effects produced by neurokinin and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. **Life Sci.** **42**: 1295-1305,1988.
- LAURSEN, S. E., BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice some methodological refinements. **J. Pharmacol. Met.**, **16**: 155-157, 1986.
- LE BARS, D., BOURGOIN, S., CLOT, A. M., HAMON, M.; CESSÉLIN, F. Noxious mechanical stimuli increase the release of Met-enkephalin-like material heterosegmentally in the rat spinal cord. **Brain Res.**, **402**: 188-192, 1987.
- LE DOUX, J. E. Sensory systems and emotion: A model of affective processing. **Integr. Psychiat.**, **4**: 237-248, 1986.
- LEE, C. M.; SANDBERG, B. E.; HANLEY, M. R.; IVERSEN, L. L. Purification and characterisation of a membrane-bound substance P-degrading enzyme from human brain. **European J. Biochem.** **114**: 315,1981.
- LEE, C. M.; IVERSEN, L. L.; HANLEY, M. R.; SANDBERG, B. E. B. The possible existence of multiple receptors for substance P. **Naunyn-Schmied. Arch Pharmacol.**, **318**: 281-287, 1982.
- LEI, S. Z.; PAN, Z. H.; AGGARWAL, S. K.; CHEN, H. S. V.; HARTMAN, J.; SUCHER, N. J.; LIPTON, S. A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron**, **6**: 1087-1099, 1992.
- LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.**, **46**: 321-340, 1990.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, **92**: 180-185, 1987.

- LIZASOAIN, I.; KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Inhibition by lamotrigine of the generation of nitric oxide in rat forebrain slices. **J. Neurochemistry**, **64**: 636-642, 1995.
- LONGMORE, J.; SWAIN, C. J.; HILL, R. G. Neurokinin receptors. **DN&P**, **8**: 5-23, 1995.
- LORNAT, G.; WANG, J.; JOHNSON, K. M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **European J. Pharmacol.**, **220**: 271-272, 1992.
- LOVIC, T. A. ; KEY, B. J. Inhibitory effect of nitric oxide on neuronal activity in the periaqueductal grey matter of the rat. **Exp. Brain Res.**, **108**: 382-388, 1996.
- LYONS, C. R. The role of nitric oxide in inflammation. **Adv. Immunol.**, **60**: 323-371, 1995.
- MAGEE, T.; FUENTES, A. M.; GARBAN, H.; RAJAVASHISTH, T.; MARQUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. A.; RAJFER, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. F. Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. **Biochem. Biophys. Res Commun**, **226 (1)**: 145-151, 1996.
- MAGGI, C. A.; BORSINI, F.; SANTICIOLI, P.; GEPPETTI, P.; ABELLI, L.; EVANGELISTA, S.; MANZINI, S.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; SOMMA, V.; AMENTA, F.; BACCIARELLI, C.; MELI, A. Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats - a trophic role of capsaicin - sensitive afferents? **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **336**: 538-545, 1987.
- MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. **J. Auton. Pharmacol.**, **13**: 23-93, 1993.
- MAGGIO, J. E. Tachykinins. **Ann. Rev. Neurosci.**, **11**: 13-28, 1988.
- MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B. E. B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L. L.; SANTIKAN, S. Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: SKRABANEK, P. (Ed.) **Substance P**. Dublin, Boole, 1983, pp. 20-21.
- MANCUSO, F.; CALIGNANO, A.; SORRENTINO, L. Endogenous nitric oxide modulates behavioral effects elicited by substance P in rat. **European J. Pharmacol.**, **271**: 329-333, 1994.
- MARCHAND, J. E.; MERSHMAN, K.; KUMLER, M. S. A.; THOMPSON, M. L.; KREAM, R. M. Dissulfiram administration affects substance P-like immunoreactive and monoaminergic neural systems in rodent brain. **J. Biol. Biochem.**, **265**: 264-273, 1990.
- MARLETTA, H. A.; MAXEY, K. M. Nitric oxide: function, formation and therapeutic potential. **Currents (Cayman Co.)**, **1**:1-5,1995.

- MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. **Brain Res. Rev.**, **21**: 185-194, 1995.
- MITCHELL, H. H.; SCHONLE, H. A.; GRINDLY, H. S. The origin of the nitrates in the urine. **J. Biol. Chem.**, **24**: 461-490, 1916.
- MITCHELL, I. J. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. **Exp. Brain Res.** **72**: 626-639, 1988.
- MITROVIC, B.; IGNARRO, L. J., MONTESTRUQUE, S.; SMOLL, A.; MERRIL, J. E. Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells *in vitro*. **Neuroscience**, **61(3)**: 575-585, 1994.
- MIZUKAWA, K.; McGEER, P. L.; VINCENT, S. R.; McGEER, E. G. Distribution of reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate-diaphorase-positive cells and fibers in the cat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **279**: 281-311, 1989.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England J. Med.**, **329**: 2002-2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem. Pharmacol.**, **37**: 2495-2501, 1988.
- MONTAGUE, W.; COOK, J. R. **Biochem. J.**, **122**: 115, 1971.
- MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, **48**: 254-260, 1955.
- MOORE, P. K.; AL-SWAYEH, O. A.; EVANS, R. Rabbit brain contains an endogenous inhibitor of endothelium-dependent relaxation. **British J. Pharmacol.** **101**: 865-868, 1990.
- MOORE, P. K. 7-NI, and inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **British J. Pharmacol.**, **108**: 296, 1993.
- MÜLSCH, A.; BUSSE, R. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino) methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **341**: 143-147, 1990.

- MUNEKATA, E.; KUBO, K.; TANAKA, M.; OSAKADA, F. Structure-activity studies on heptapeptide derivatives related to substance P, neurokinin A, B and other tachykinins on smooth muscle. **Peptides**, **15**: 169-173, 1987.
- MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P.; BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J. Neurochem.**, **60**: 1987-2009, 1993.
- MYERS, R. D. Neuroactive peptides: unique phases in research on mammalian brain over three decades. **Peptides**, **15**: 367-381, 1994.
- NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. **Ann. Rev. Neurosci.**, **14**: 123-136, 1991.
- NAKAMURA-PALACIOS, E. M.; ROSA, W. C. M.; OLIVEIRA, G. M. Effects of the antihypertensive drugs  $\alpha$ -methyl dopa and hydralazine on the performance of spontaneously hypertensive rats in the elevated plus-maze. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 55-59, 1994.
- NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion Immunol.**, **33**: 65-70, 1991.
- NAWA, M.; MIROSE, T.; TAKASHIMA, M.; INOYAMA, S.; NAKANISHI, S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine substance P precursor. **Nature**, **306**: 32-36, 1983.
- O'DONOHUE, T. L.; HELKE, C. J.; SHULTS, C. W.; BUCK, S. H.; BURCHER, E. Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 9: Neuropeptides in the CNS, Part II. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T.; KUHAR, M. J. (Ed.), **Tachykinin receptors**. Elsevier Science Publishers B. V., 395-442, 1990.
- OEHME, P.; HECTH, K.; PRIESCHE, L.; MILSEM, M. E.; POPPEI, M. Substance P as a modulator of physiological processes. In: MORSAN, C. A.; TRACZYK, W. Z. (Eds.) **Neuropeptides and neuronal transmission**. New York: Raven Press, 73-84, 1980.
- OLIVEIRA, C. L.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **56**: 55-59, 1997.
- OLDS, M. E.; OLDS, J. Approach-escape interactions in rat brain. **Am. J. Physiol.**, **203**: 803-810, 1963.
- OHESSEN, S. P.; CLAPHAM, D. E.; DAVIES, P. Haemodynamic shear stress activates a  $K^+$  current in vascular endothelial cells. **Nature**, **331**: 168-170, 1988.
- OSBORNE, N. N.; GHAZI, H. The effects of substance P and other tachykinins on inositol phospholipids hydrolysis in rabbit retino-superior culliculi and retinal cultures. **Vision Res.**, **29**: 757-764, 1989.

- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.**, **73**: 229-308, 1993.
- PALMER, R. M. J. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. **Arch. Surg.**, **128**: 396-401, 1993.
- PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, **333**: 664-666, 1988.
- PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, **327**: 524-526, 1987.
- PARÉ, W. P. The performance of WKY rats on three tests of emotional behavior. **Physiol. Behav.**, **51**: 1051-1056, 1992.
- PATACCHINI, R.; MAGGI, C. A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **329**: 161-184, 1995.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. **J. Neurosci. Meth.**, **14**: 149-167, 1985.
- PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol. Rev.**, **35**: 85-141, 1983.
- PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Card. Res.**, **28**: 34-39, 1994.
- PIOT, O.; BETSCHART, J.; GRALL, I.; RAVARD, S.; GARRET, C.; BLANCHARD, J-C. Comparative behavioural profile of centrally administered tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub>, NK<sub>3</sub> receptor agonists in the guinea-pig. **British J. Pharmacol.**, **116**: 2496-2502, 1995.
- PRATT, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmac. Ther.**, **55**: 149-181, 1992.
- QUARTARA, L.; PATACCHINI, R.; GOSO, C.; ROVERO, P.; MAGGI, C. A. Importance of the C-terminal amide for biological activity of neurokinin A derivative. **Neuropeptides**, **22**: 54, 1992.
- QUOCK, R. M.; NUGYEN, E. Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. **Life Sci.**, **51**: PL255-260, 1992.
- RADOMSKI, M. W. Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector. **Ann. Med.**, **27**: 321-329, 1995.
- RAVARD, S.; BETSCHART, J.; FARDIN, V.; FLAMAND, O.; BLANCHARD, J. C. Differential ability of tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> agonists to produce

- scratching and grooming behaviours in mice. **Brain Res.**, **651**: 199-208, 1994.
- REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences**, **86**: 3375-3378, 1989.
- REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Rev.**, **46**: 551-589, 1994.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; COUTURE, R. New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. **TIPS**, **9**: 290-295, 1988.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related tachykinins. **Pharmacology**, **38**: 1-15, 1989.
- RIBEIRO, S. J. **Envolvimento do receptor neurocinérgico NK<sub>3</sub> na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado.** Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC, 1998.
- RIBEIRO, S. J.; TEIXEIRA, R. M.; CALIXTO, J. B.; DE LIMA, T. C. M. Tachykinin NK<sub>3</sub> receptor involvement in the modulation of experimental anxiety in mice. **Neuropeptides** (submetido à publicação), 1998.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: **Ethology and psychopharmacology**. John & Sons, 1994, 9-44.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; ABOUALFA, K.; STEPHENSON, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative "anxiogenic" agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmac. Biochem. Behav.**, **52**: 805-813, 1995.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **30**: 289-304, 1997.
- ROGERS, N. E.; IGNARRO, L. J. Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **189**: 242-2249, 1992.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin-and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, **29(3)**: 271-278, 1996.

- SAKURADA, T.; YAMADA, T.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; OHBA, M. Substance P analogues containing D-histidine antagonize the behavioural effects of intrathecally co-administered SP in mice. **European J. Pharmacol.**, **174**: 153-160, 1989.
- SAKURADA, T.; YAMADA, T.; TAN-NO, K.; MANOME, Y.; SAKURADA, S.; KISSA, K.; OHBA, M. Differential effects of substance P analogs in NK1 receptor agonists in the mouse spinal cord. **J. Pharmacol. exper. Ther.**, **259**: 205-210, 1991.
- SAPHIER, D.; WELCH, J. E.; FARRAR, G. E.; NGUYEN, N. Q.; AGUADO, F.; THALLER, T. R.; KNIGHT, D. S. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance P in the CNS regulation of adrenocortical secretion. **Psychoneuroendocrinology**, **19**: 779-797, 1994.
- SAVELLI, J. E.; CHUGH, A.; CHENG, C.; MISHRA, R. K.; JOHNSON, R. L. Modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist-induced darting behavior by the peptidomimetic PAMTA. **Brain Res.**, **682 (1-2)**: 41-49, 1995.
- SCHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y.; TOHYAMA, M. Co-existence of substance P-and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**, **425**: 256-262, 1983.
- SCHMIDT, H. H. NO, CO and OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. **FEBS Lett.**, **307(1)**: 102-107, 1992.
- SCHUMAN, E. M.; MADISON, D. V. Nitric oxide and synaptic function. **Ann. Rev. Neurosci.**, **17**: 153-183, 1994.
- SCULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **TIPS.**, **15**: 255-259, 1994.
- SELJELID, R.; ESKELAND, T. The biology of macrophages: I general principles and properties. **European J. Haematol.**, **51**: 267-275, 1993.
- SEMBA, J.; SAKAI, M.; MIYOSHI, R.; KITO, S. N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, increases extracellular GABA in the striatum of the freely moving rat. **Neuroreport**, **6**: 1298-1300, 1995.
- SHAIKH, M. B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. **Brain Res.**, **625**: 283-294, 1993.
- SMITH, G. T. S.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; COSTA, J. J. L.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J. V.; RATTRAY, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **350**: 23-40, 1994.

- SNIDER, S. H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science**, **209**: 976-983, 1980.
- SNYDER, S. H.; BREDT, D. S., Nitric oxide as a neuronal messenger. **TIPS**, **12**: 125-128, 1991.
- SOUTHAM, E. Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. **Neurosci. Lett.**, **130**: 107-111, 1991.
- SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. **Neuropharmacology**, **32**: 1267-1277, 1993.
- SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **British J. Pharmacol.**, **114**: 510-516, 1995.
- SPAGNUOLO, C.; RINELLI, P.; COLETTA, M.; CHIANCONE, E.; ASCOLI, F. Oxidation reaction of human oxyhemoglobin with nitrite: a re-examination. **Biochem. Biophys. Acta**, **911**: 59-65, 1987.
- STABLES, J. M.; BERESFORD, I. J. M.; ARKINSTALL, S.; IRELAND, S. J.; WALSH, D. M.; SEALE, P. W.; WARD, P.; HAGAN, R. M. GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK<sub>3</sub> receptors. **Neuropeptides**, **27**: 333-341, 1994.
- STÖESSL, A. JON; BRACKSTONE, M.; RAJAKUMAR, N.; GIBSON, C. J. Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK-1 tachykinin receptor agonist. **Brain Res.**, **700**: 115-120, 1995.
- STRATTON, S. C.; BERESFORD, I. J. M.; HARVEY, F. J.; TURPIN, M. P.; HAGAN, R. M.; TYERS, M. B. Anxiolytic activity of tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonists in the mouse light-dark box. **European J. Pharmacol.**, **250**: 11-12, 1993.
- STRATTON, S. C.; BERESFORD, I. J. M.; HAGAN, R. M. GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK<sub>2</sub> receptor antagonist, release suppressed behaviours in a novel aversive environment. **British J. Pharmacol.**, **112**: 49P, 1994.
- STONE, T. W. **Neuropharmacology**. New York; W. H. Freeman/Spektrum, 1995.
- STÜEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gama. **J. Immunol.**, **139**: 518-525, 1987.
- TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J. M.; JORNVALL, M.; 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. **Influência da injeção intracerebral de agonistas e antagonistas de receptores de neurocininas no comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado.** Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC, 1995.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. M. Differential roles of neurokinin receptors on an experimental model of anxiety in mice. **Tachykinins'95: from basic science to clinical applications**, Florence, 35, 1995.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **European J. Pharmacol.**, **311**: 7-14, 1996.
- THOMAS, E.; PEARSE, A. G. E. The solitary active cells. Histochemical demonstration of damage-resistant nerve cells with a TPN-diaphorase reaction. **Acta Neuropathol.**, **3**: 238-249, 1964.
- THOMAS, E.; PEARSE, A. G. E. The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. **Histochemie**, **2**: 266-282, 1961.
- TREGGAR, G.; NIOLL, M. D.; POTTS, J. T.; LEEMAN, S. E.; CHANG, M. Synthesis of substance P. **Nature**, **232**: 87-89, 1971.
- TREIT, D.; PESOLD, C.; ROTZINGER, S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. **Behav. Neurosci.**, **107**: 770-785, 1993.
- TSCHÖPE, C.; PICARD, P.; CULMAN, N. J.; PRAT, A.; ITOI, K.; REGOLI, D.; UNGER, T.; COUTURE, R. Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinins on NK-1 and NK-2 receptors in the rat. **British J. Pharmacol.**, **107**: 750-755, 1992.
- UNGER, T. H.; CAROLUS, S.; DEMMERT, G.; GATEN, D.; LANG, R. E.; MASER-GLUTH, C.; STEINBERG, H.; VEELKEN, R. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. **Circ. Res.**, **63**: 812-820, 1988.
- VALLEBUONA, F.; RAITERI, M. Monitoring of cyclic GMP during cerebellar microdialysis in freely-moving rats as a index of nitric oxide synthase activity. **Neuroscience**, **57**: 577-585, 1993.
- VALLEBUONA, F.; RAITERI, M. Extracellular cGMP in the hippocampus of freely moving rats as an Index of nitric oxide (NO) synthase activity. **J. Neurosci.**, **14**: 134-139, 1994.
- VANE, J., ÄNGGARD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **New England J. Med.**, **323**: 27-36, 1990.

- VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, **46**: 755-784, 1992.
- VOLKE, V.; KÖKS, S.; VASAR, E.; BOURIN, M.; BRADWEJN, J.; MÄNNISTÖ, P. T. Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behavior in an elevated plus-maze. **Neuroreport**, **6**: 1413-1416, 1995.
- VOLKE, V.; SOOSAAR, A.; KÖKS, S.; BOURIN, M.; MÄNNISTÖ, P. T.; VASAR, E. 7-nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. **Psychopharmacology**, **131**: 399-405, 1997.
- VON EULER, V.; GADDUM, J. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J. Physiol.**, **72**: 74-87, 1931.
- WANG, X.; LIU, J. -P.; ROBINSON, P. J. Phosphorylation of protein kinase C by cGMP-dependent protein kinase. **Aust. Soc. Biochem. Mol. Biol.**, **26**: POS 3-19, 1995.
- WANG, X; ROBINSON, P. J. Cyclic GMP-dependent protein kinase substrates in rat brain. **J. Neurochem.**, **65**: 595-604, 1997.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A.; DE NUCCI, G.; VANE, J. R. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13**: 585-588, 1989.
- WATSON, S. P. , DOWNES, C. P. Substance P-induced hydrolysis of inositol phospholipids in the guinea pig ileum and rat hypothalamus. **Eur. J. Pharmacol.** **93**: 245-253, 1983.
- WIED, D.; van REE, J. M. Neuropeptides: animal behaviour and human psychopathology. **European Arch. Psychiatr. Neurol. Sci.**, **238**: 323-331, 1989.
- WOLOSKER, H.; REIS, M.; ASSREUY, J.; MEIS, L. de. Inhibition of glutamate uptake and proton pumping in synaptic vesicles by S-nitrosylation. **J. Neurochemistry**, **66**: 1943-1948, 1996.
- WÖRMSE, V.; LAUFER, R.; MART, Y.; CHOREV, M.; GILON, C.; SELINGER, Z. Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. **EMBO J.**, **5**: 2805-2808, 1986.
- ZANG, J.; SNYDER, S. H. Nitric oxide in the nervous system. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **35**: 213-233, 1995.
- ZAWADZKI, J. V.; FURCHGOTT, R. F.; CHERRY, P. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by substance P. **Fed. Proc.** **40**: 689, 1981.

- ZERNIG, G.; DIETRICH, M.; MAGGI, C. A.; SARIA, A. The substance P (NK<sub>1</sub>) receptor antagonists (±)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. **Neurosci. Lett.**, **143**: 169-172, 1992.
- ZERNIG, G.; TROGER, J.; SARIA, A. Different behavioral profile of the non-peptide substance P (NK<sub>1</sub>) antagonists CP-96,345 and RP 67580 in Swiss albino mice in the black-and-white box. **Neurosci Lett.**, **151**: 64-66, 993.
- ZHOU, X. F.; LIVETT, B. G. Substance P increases catecholamines secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. **J. Physiol.**, **425**: 321-324, 1990.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E.; AMERINI, S.; GRANGER, H. J.; MAGGI, C. A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. **J. Clin. Invest.**, **94**: 2036-2044, 1994.