

**ELAINE CRISTINA GAVIOLI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NOCICEPTINA / ORFANINA FQ -  
RECEPTOR NOP NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE E DA  
DEPRESSÃO EXPERIMENTAL**

**Florianópolis – SC**

**2003**

**ELAINE CRISTINA GAVIOLI**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NOCICEPTINA / ORFANINA FQ -  
RECEPTOR NOP NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE E DA  
DEPRESSÃO EXPERIMENTAL**

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

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

**Florianópolis – SC**

**2003**

GAVIOLI, Elaine Cristina. **Participação do sistema nociceptina / orfanina FQ – receptor NOP na modulação da ansiedade e da depressão experimental.** Florianópolis, 2003, 111 pp. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Defesa: 16/12/2003

O presente trabalho estudou o papel da nociceptina (N/OFQ) e da nocistatina (NST) na modulação da ansiedade e da depressão experimental. Nossos dados mostraram que camundongos tratados com N/OFQ apresentaram um perfil do tipo ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado (LCE), enquanto que a NST induziu um efeito do tipo ansiogênico. Além disso, dados mostrados neste trabalho sugerem haver uma interação entre o sistema GABAérgico e a N/OFQ, mas não entre a NST, na modulação da ansiedade experimental. Em relação à depressão experimental, observamos que a N/OFQ e a NST não alteraram o comportamento dos camundongos submetidos ao teste da natação forçada (TNF), porém o UFP-101, um antagonista NOP, induziu um perfil do tipo antidepressivo no TNF em camundongos e ratos e no teste da suspensão pela cauda (TSC) em camundongos e, em linha com estes dados, camundongos *knockout* para o receptor NOP apresentaram um perfil do tipo antidepressivo no TNF e no TSC. No presente trabalho mostrou-se também que o efeito do tipo antidepressivo induzido pelo bloqueio do receptor NOP parece ser mediado pelo sistema monaminérgico e, em especial, pelo serotoninérgico. Assim, os resultados apresentados nesta tese candidatam o sistema N/OFQ – receptor NOP como um alvo terapêutico promissor para o tratamento da ansiedade e da depressão.

*Da minha aldeia vejo o quanto da terra se pode ver do universo  
Por isso a minha aldeia é tão grande quanto outra terra qualquer  
Porque sou do tamanho que vejo  
E não do tamanho da minha altura*

**Fernado Pessoa**

**Dedico este trabalho, com muito orgulho, aos meus pais  
pela bela educação, pelo imenso amor e  
dedicação que me foi dado.**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à **Profa. Dra. Thereza C.M. de Lima** pela orientação na realização deste trabalho, pelo incentivo, mas especialmente, por ter me dado a oportunidade de iniciar na carreira científica e, acima disso, por ter confiado no meu trabalho, muitas vezes, mais do que eu mesma... Não poderia deixar também de agradecer-lá por ter sido a minha ‘mãe’ em todos estes anos de convivência, pois sempre pude contar com o seu apoio e sua amizade...

A todos os outros professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, em especial ao **Prof. Dr. Giles A. Rae** e ao **Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi** pela orientação, amizade e atenção em todas as horas.

Ao **Prof. Dr. Domenico Regoli** e ao grupo da Università di Ferrara, Itália, que me receberam de braços abertos, em especial, ao **Dr. Girolamo Calò**, que sempre me incentivou e com quem aprendi muito. Ao **Seu Giuliano**, pelo apoio técnico e pela grande amizade e, também, aos químicos que viabilizaram este estudo através da síntese das moléculas aqui testadas, em particular, ao **Prof. Dr. Severo Salvadori** e **Dr. Remo Guerrini**.

Aos funcionários da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, particularmente a **Rita, Diana** e **Maria Goretti**, que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À direção e aos funcionários do Biotério Central e aos funcionários do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, **Pedro** e **Ione**, que foram de importância fundamental e sem os quais esse trabalho não seria realizado.

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia, **Filipe, Ana Valquíria, Raquel, Denise, Luís Arthur, Marquinho, Selma** e **Marcelo** pela amizade, apoio e pelas informações que trocamos durante a nossa convivência... mas não poderia esquecer das estagiárias **Tulani** e **Clarissa** que fizeram do laboratório um lugar muito agradável.

A um amigo que já partiu, **Ricardo A. Vieira**, mas que nunca esqueço...O seu exemplo de força e vontade permanece na minha memória.

Às minhas amigas e companheiras de todas as horas... **Thereza, Anna Paula e Maria Lúcia**, com quem não tive somente o prazer de dividir o apartamento, mas também a minha vida...

Ao **Junior e Nara**, que sempre se fizeram presentes nesta caminhada e sempre estiveram dispostos para o que der e vier...

Ao **Carlos**, pelo nosso amor, e por ser uma pessoa especial que me encanta, me diverte, me apoia, me ensina...Enfim dá um outro sentido a minha vida.

E a **Deus** que é a minha fonte eterna de força e coragem.

## SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE ABREVIACÕES	20
<b>INTRODUÇÃO</b>	
<b>Os sistemas peptidérgicos</b>	<b>23</b>
<b>O sistema nociceptina/orfanina FQ-receptor NOP</b>	<b>24</b>
Prepronociceptina: um precursor peptídico	24
Nociceptina/orfanina FQ II	26
Nocistatina	27
Nociceptina/orfanina FQ	28
Receptor NOP	29
Ligantes do receptor NOP	31
Mecanismos de transdução de sinal	32
<b>Ações biológicas da nociceptina/orfanina FQ</b>	<b>33</b>
Nocicepção	33
Ações em sistemas periféricos	34
Ações no sistema nervoso central	36
<b>Estresse, ansiedade e depressão</b>	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>Animais</b>	<b>48</b>
<b>Drogas e soluções</b>	<b>49</b>



<b>Procedimentos</b>	<b>51</b>
Administração central de drogas em camundongos	51
Administração central de drogas em ratos	51
Equipamentos e avaliação comportamental	53
Protocolo experimental	58
<b>Análise estatística</b>	<b>67</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>68</b>
<b>Participação do sistema N/OFQ - receptor NOP na modulação da ansiedade experimental</b>	<b>69</b>
Avaliação do efeito da NST, NST-C6, N/OFQ e do UFP-101 no LCE	69
Efeito da co-injeção de NST, NST-C6 e UFP-101 na atividade ansiolítica da N/OFQ	81
Envolvimento do sistema GABAérgico no efeito da NST e da N/OFQ na modulação da ansiedade experimental	85
<b>Participação do sistema N/OFQ - receptor NOP na modulação da depressão experimental</b>	<b>93</b>
Avaliação do efeito da N/OFQ, NST-C6, [Nphe <sup>1</sup> ]N/OFQ(1-13)NH <sub>2</sub> e UFP-101 no TNF	93
Avaliação do efeito da N/OFQ e do UFP-101 no TSC	98
Avaliação do efeito antidepressivo do UFP-101 no TNF para ratos	101
Envolvimento do sistema monoaminérgico no efeito do tipo antidepressivo induzido pelo UFP-101 no TNF	103
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>118</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>121</b>

## RESUMO

A prepronociceptina (ppN/OFQ) é um precursor peptídico que pertence a família dos opióides e após a clivagem enzimática dá origem a, no mínimo, 3 peptídeos bioativos, sendo que o presente trabalho enfocou, em especial, o papel de dois deles, a nociceptina (N/OFQ) e a nocistatina (NST), em modelos experimentais de ansiedade e depressão.

A N/OFQ é o peptídeo mais estudado entre os derivados da ppN/OFQ, sua cadeia é formada por 17 resíduos de aminoácidos, além disso a N/OFQ possui um receptor exclusivo, o receptor NOP. A ppN/OFQ se encontra no cérebro especialmente no sistema límbico, enquanto que o receptor NOP está amplamente expresso no sistema nervoso central, destacando particularmente sua presença no córtex cerebral e em núcleos noradrenérgicos e serotoninérgicos, o que poderia explicar os vários efeitos centrais induzidos pela N/OFQ, como prejuízo de memória, redução da ansiedade, aumento da ingestão de alimentos e ação hiperalgésica decorrente da injeção central deste peptídeo.

Pouco se sabe sobre a NST, pois ainda não se conhece o receptor e/ou sítio no qual este peptídeo se liga, no entanto, a maioria dos estudos mostra que a NST bloqueia o efeito induzido pela N/OFQ.

O presente trabalho objetivou avaliar o envolvimento da N/OFQ e da NST na modulação da ansiedade em camundongos, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado (LCE), e da depressão experimental, submetendo os animais ao teste da natação forçada (TNF) e ao de suspensão pela cauda (TSC). Os procedimentos experimentais deste estudo foram divididos em 2 etapas, sendo que a primeira avaliou o efeito da injeção i.c.v. da N/OFQ, do UFP-101, antagonista NOP, da NST e do seu fragmento C-terminal (NST-C6) no teste do LCE em camundongos. A NST (0,01 – 100 pmol), assim como a NST-C6 (0,001 – 1000 pmol), reduziram a exploração dos braços abertos do LCE, sugerindo efeito do tipo ansiogênico, enquanto que a N/OFQ (0,1 – 1000 pmol) produziu efeito do tipo ansiolítico, que foi bloqueado pela co-injeção com NST, NST-C6 e UFP-101, o antagonista NOP, que *per se* não modificou o comportamento dos camundongos no LCE.

Além disso, avaliando a ação temporal dos peptídeos NST (1 pmol), NST-C6 (0,1 pmol) e N/OFQ (10 pmol) no LCE, vimos que, além da NST e da NST-C6 serem mais potentes que a N/OFQ, os efeitos destes peptídeos são mais duradouros, pois 15 min após a injeção i.c.v., o efeito do tipo ansiogênico da NST e da NST-C6 ainda estava presente,

enquanto que a N/OFQ induziu efeito do tipo ansiolítico no LCE apenas após 5 min da injeção central.

O mecanismo pelo qual a N/OFQ e a NST modulam a ansiedade ainda não é conhecido, porém parece haver um envolvimento do sistema GABAérgico neste efeito, em particular, para a N/OFQ, pois o pré-tratamento i.p. com flumazenil (FMZ; 1 mg/kg) preveniu o efeito do tipo ansiolítico induzido por este peptídeo. Além disso, o pré-tratamento com etil  $\beta$ -carbolina 3-carboxilato ( $\beta$ -CCE; 5 mg/kg) bloqueou completamente a ação do tipo ansiolítica induzida pela N/OFQ (10 pmol), embora o pré-tratamento com pentilenotetrazol (PTZ; 20 mg/kg) não alterou a resposta ansiolítica induzida pelo N/OFQ (10 pmol). Já para a NST, observou-se que o FMZ (1 mg/kg) não modificou a resposta do tipo ansiogênica induzida por este peptídeo e que o pré-tratamento i.p. com diazepam (0,25 mg/kg) bloqueou este efeito, enquanto que doses sub-máximas de PTZ (20 mg/kg) e NST (0,01 pmol) potencializaram o efeito ansiogênico da NST *per se*, o que pode ser decorrente de um sinergismo fisiológico. Conjuntamente, estes dados sugerem haver uma interação entre o sistema GABAérgico e a N/OFQ, mas não entre a NST, na modulação da ansiedade experimental.

Na segunda etapa deste estudo, vimos que o tratamento i.c.v. com NST (0,001 – 1 nmol) e N/OFQ (0,01 – 1 nmol) não modificou o desempenho comportamental dos camundongos submetidos ao teste da natação forçada (TNF), mas o antagonista do receptor NOP, UFP-101 (1 – 10 nmol), reduziu dose-dependentemente o tempo de imobilidade no TNF, sugerindo ação do tipo antidepressiva, sendo que este efeito foi bloqueado pela co-injeção com N/OFQ, indicando que o receptor NOP está mediando esta ação. Além disso, camundongos *knockout* para o receptor NOP apresentaram um fenótipo antidepressivo quando submetidos ao TNF e o tratamento com UFP-101 (10 nmol) não modificou esta resposta nos animais mutantes, mas reduziu o tempo de imobilidade nos controles *wild-type*.

Os resultados obtidos no teste da suspensão pela cauda (TSC) com o UFP-101 e com os animais *knockout* para o receptor NOP estão de acordo com os achados no TNF. Além disso, ratos tratados com UFP-101 (10 nmol) se comportam da mesma maneira que os tratados com a desipramina, um antidepressivo clássico. Deste modo, os resultados apresentados neste trabalho mostram que o efeito do tipo antidepressivo dos antagonistas NOP é um fenômeno consistente que se mantém em diferentes espécies (camundongos e ratos) e em diferentes testes experimentais utilizados para avaliar atividade antidepressiva (TNF e TSC).

Pouco se sabe sobre o mecanismo que medeia o efeito do tipo antidepressivo induzido pelos antagonistas do receptor NOP, porém no presente estudo foram obtidos resultados preliminares a respeito do envolvimento do sistema monoaminérgico na ação do UFP-101 no TNF, sendo que o pré-tratamento com PCPA (4 dias consecutivos; 100 mg/kg/dia, i.p.), um inibidor da síntese de serotonina, não modificou o tempo de imobilidade dos camundongos tratados com desipramina (30 mg/kg, i.p.), mas preveniu completamente a ação induzida pela fluoxetina (30 mg/kg, i.p.), um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e reduziu parcialmente o efeito do tipo antidepressivo do UFP-101 (10 nmol). Por outro lado, o pré-tratamento com DSP-4 (50 mg/kg, i.p., 7 dias antes do teste), uma neurotoxina noradrenérgica, preveniu completamente a ação antidepressiva da desipramina (30 mg/kg, i.p.), um inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina, sem, no entanto, modificar a resposta da fluoxetina (30 mg/kg, i.p.) e do UFP-101 (10 nmol), sugerindo que o sistema monoaminérgico está envolvido na mediação do efeito do tipo antidepressivo de antagonistas NOP, em particular a serotonina, porém não se pode descartar a participação noradrenérgica, especialmente em ratos, pois como mostrado, o UFP-101 induziu perfil de resposta comportamental no TNF semelhante às drogas noradrenérgicas.

Nossos resultados sugerem que a NST e a N/OFQ modulam em sentidos opostos a ansiedade experimental avaliada no LCE, enquanto que achados farmacológicos e genéticos mostram que o bloqueio do receptor NOP induz ação do tipo antidepressiva em diferentes testes experimentais. Assim, os resultados obtidos nesta tese candidatam o sistema N/OFQ – receptor NOP como um alvo terapêutico promissor para o tratamento da ansiedade e da depressão.

## ABSTRACT

### INVOLVEMENT OF NOCICEPTIN - NOP RECEPTOR SYSTEM IN THE MODULATION OF EXPERIMENTAL ANXIETY AND DEPRESSION

Prepronociceptin is the peptidic precursor of, at least, three bioactive peptides, nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ), nocistatin (NST) and nociceptin/orphanin FQII (N/OFQII). This work focused on the study of N/OFQ and NST in experimental anxiety and mood disorders, using the elevated plus-maze (EPM) and behavioral despair tests, respectively, for assessing the behavioral effects of these peptides.

N/OFQ is an heptadecapeptide recently identified as the endogenous ligand of the NOP receptor. This new system N/OFQ-NOP receptor belongs to the opioid family. The i.c.v. injection of N/OFQ produces several biological actions, such as increase of food intake, hyperalgesia, impairment of memory and reduction of anxiety levels. In most studies, NST was found to be inactive *per se*, but it has been reported to antagonize many actions of N/OFQ, although it acts on distinct receptors.

Regarding the methodological procedure of the EPM, five minutes after i.c.v. treatment, mice were placed on the apparatus for 5 min and entries into and time spent on open and closed arms were recorded alongside other parameters. NST (0,01 – 100 pmol) reduced percentages of entries into and time spent on open arms in the EPM. However, the C-terminal hexapeptide of NST (NST-C6; 0,001 – 1000 pmol) closely mimicked these actions of NST.

On the other hand, N/OFQ (0,1 – 1000 pmol) induced anxiolytic-like effects in mice and this action was blocked by the co-injection with NST, NST-C6 and a NOP receptor antagonist, UFP-101, which was inactive *per se*. Closed arm entries, an index of locomotor activity, were unchanged by all peptides. Effects of NST (1 pmol) or NST-C6 (0,1 pmol), but not N/OFQ (10 pmol), were still detectable 15 min after injection.

No objective information about the underlying mechanism of action by which N/OFQ and NST induce anxiolytic and anxiogenic-like effects has already been reported. In this work we studied the participation of GABAergic system in the effects induced by N/OFQ and NST in the EPM test. Pre-treatment with flumazenil (FMZ; 1 mg/kg, i.p.) partially blocked the anxiolytic-like effect induced by N/OFQ (10 pmol). However, the pre-treatment

with pentilenotetrazole (PTZ; 20 mg/kg, i.p.) did not modify the anxiolytic-like effect of N/OFQ, while  $\beta$ -CCE (5 mg/kg), i.p. injected 10 min before N/OFQ (10 pmol), completely blocked the anxiolytic-like effect induced by this peptide. Regarding NST, the pre-treatment with FMZ (1 mg/kg, i.p.) did not modify the effect of NST (0,1 pmol) in the EPM test while diazepam (0,25 mg/kg, i.p.) has blocked the anxiogenic-like effect of NST and PTZ (20 mg/kg, i.p.) has potentiated the reduction of open spaces of the EPM induced by NST (0,01 pmol).

Concerning the role of N/OFQ-NOP receptor system in the behavioral despair test, neither N/OFQ nor NST were able to change the immobility time of mice i.c.v. injected with these compounds. Nevertheless, animals i.c.v. injected with UFP-101 (1-10 nmol), a NOP receptor antagonist, 5 min prior the forced swimming test (FST), dose-dependently reduced the immobility time, suggesting an antidepressant-like effect. This reduction of immobility time induced by 3 or 10 nmol UFP-101 was fully or partially reversed, respectively, by the co-administration of 1 nmol N/OFQ, which was *per se* inactive. NOP receptor knockout mice (NOP<sup>-/-</sup>) showed a reduced immobility time compared to their wild-type (NOP<sup>+/+</sup>) littermates. Moreover, i.c.v. injected UFP-101 (10 nmol) significantly reduced immobility time in NOP<sup>+/+</sup>, but not in NOP<sup>-/-</sup> mice. Similar results were obtained in the tail suspension test (TST) in mice acutely treated with UFP-101. In TST, N/OFQ (1 nmol, i.c.v.) fully prevented the effect of UFP-101 (10 nmol, i.c.v.). Spontaneous immobility time of NOP<sup>-/-</sup> mice in the TST was much lower than those displayed by their wild-type NOP<sup>+/+</sup> littermates or Swiss mice.

In line with the antidepressant-like effects of NOP antagonists in mice, rats acutely i.c.v. treated with UFP-101 (10 nmol) decreased the immobility time and increased the climbing behaviour in the forced swimming test, similar to noradrenaline reuptake inhibitors.

Fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, desipramine (both 30 mg/kg, i.p.), a noradrenaline reuptake inhibitor, and UFP-101 (10 nmol, i.c.v.) reduced mouse immobility time in the mouse FST. The serotonin synthesis inhibitor PCPA (4 x 100 mg/kg/day, i.p.) prevented the antidepressant-like effects of fluoxetine and UFP-101 (but not desipramine), whereas DSP-4 (neurotoxic for noradrenergic neurons; 50 mg/kg, i.p., 7 days beforehand), suppressed only the effect of desipramine. Neither pretreatment affected immobility time *per se*. Thus, UFP-101 exhibits pronounced antidepressant-like effects in distinct species and models of depression, possibly by strengthening brain monoaminergic (in particular serotonergic) neurotransmission.

In conclusion, these results reveal potent anxiogenic-like actions of NST and its C-terminal fragment NST-C6, and confirm the anxiolytic-like properties of N/OFQ. As NST and

N/OFQ both derive from ppN/OFQ, anxiety may be modulated in opposing directions depending on how this precursor is processed. In addition, the results obtained using a combined pharmacological and genetic approach, indicate that blockade of the N/OFQ-NOP receptor signaling in the brain produces antidepressant-like effects in the mouse FST. These effects appear to be robust across species (mouse and rat) and tests (forced swimming and tail suspension) and, collectively with the EPM findings, the present data candidate the N/OFQ-NOP receptor system as a potential target for the development of innovative antidepressant and anxiolytic drugs.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Seqüência dos resíduos de aminoácidos da ppN/OFQ em diferentes espécies animais (bovino, humano, camundongo e rato). **25**
- Figura 2** – Seqüência da nociceptina/orfanina FQ comparada com a da dinorfina A, o peptídeo opióide mais semelhante à N/OFQ. **29**
- Figura 3** – Representação esquemática do padrão de expressão de RNAm para o receptor NOP no sistema límbico de rato. **30**
- Figura 4** – Representação esquemática do padrão de expressão de RNAm para o receptor NOP no sistema aminérgico de rato. **31**
- Figura 5** - Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ 200 nmol e DZP 7 nmol na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do LCE, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e número de entradas nos braços fechados no LCE. **70**
- Figura 6** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. **72**
- Figura 7** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST-C6 na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. **73**
- Figura 8** - Efeito do tratamento i.c.v. com N/OFQ na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. **74**



**Figura 9** – Efeito do tratamento com NST , NST-C6 e N/OFQ 5, 15 e 30 min após a injeção central na porcentagem de tempo de permanência e entradas nos braços abertos do LCE. 76

**Figura 10** - Efeito do tratamento i.c.v. com UFP-101, um antagonista do receptor NOP, na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 78

**Figura 11** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST, NST-C6 e/ou N/OFQ na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 82

**Figura 12** - Efeito do tratamento i.c.v. com UFP-101 e/ou N/OFQ na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 83

**Figura 13** - Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ 15 min após o tratamento com PTZ, um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 87

**Figura 14** - Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ 15 min após a administração de  $\beta$ -CCE, um agonista inverso do sítio benzodiazepínico, ou de flumazenil, antagonista do sítio benzodiazepínico na porcentagem de tempo de permanência e de entradas nos braços abertos do LCE, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 88

**Figura 15** - Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 15 min após o tratamento com PTZ, um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, na porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. 90

- Figura 16** - Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 15 min após a administração de diazepam, agonista do sítio benzodiazepínico, ou de flumazenil, antagonista do sítio benzodiazepínico, na porcentagem de tempo de permanência e de entradas nos braços abertos do LCE, número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no número de entradas nos braços fechados no LCE. **91**
- Figura 17** - Efeito da injeção i.c.v. de antidepressivos clássicos, como a imipramina, a desipramina e a fluoxetina, da N/OFQ, da NST-C6 e do [NPhe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada. **94**
- Figura 18** - Efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 e da co-injeção de N/OFQ e UFP-101, no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada. **96**
- Figura 19** - Registro do comportamento espontâneo de camundongos *knockout* (NOP<sup>-/-</sup>) e *wild-type* (NOP<sup>+/+</sup>) para o receptor NOP no teste da natação forçada e efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 no tempo de imobilidade de camundongos NOP<sup>-/-</sup> e NOP<sup>+/+</sup> submetidos ao teste da natação forçada. **97**
- Figura 20** - Efeito da injeção i.c.v. de antidepressivos clássicos, como a imipramina e a desipramina e da N/OFQ no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da suspensão pela cauda. **99**
- Figura 21** - Efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 e da co-injeção de N/OFQ e UFP-101 no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada. Registro do comportamento espontâneo de camundongos *wild-type* (NOP<sup>+/+</sup>) e *knockout* (NOP<sup>-/-</sup>) para o receptor NOP no teste da suspensão pela cauda. **100**
- Figura 22** - Efeito do tratamento i.p. com desipramina e da injeção i.c.v. de UFP-101 no tempo de imobilidade, de natação e de escalada das paredes do cilindro em ratos submetidos ao teste da natação forçada. **102**
- Figura 23** - Influência do pré-tratamento com salina, PCPA ou DSP-4 no efeito do tipo antidepressivo induzido pela fluoxetina, desipramina ou UFP-101 em camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada. **104**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Papel dos neuropeptídeos e de seus receptores na ansiedade e na depressão experimental.	<b>39</b>
<b>Tabela 2</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ, DZP, N/OFQ, NST, NST-C6 e UFP-101 em alguns dos parâmetros registrados no LCE.	<b>79</b>
<b>Tabela 3</b> - Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ, DZP, N/OFQ, NST, NST-C6 nos parâmetros comportamentais avaliados no teste do rota-rod e na temperatura corpórea de camundongos.	<b>80</b>
<b>Tabela 4</b> – Efeito do tratamento i.c.v. com NST, NST-C6, UFP-101 e/ou N/OFQ em alguns dos parâmetros registrados no LCE.	<b>84</b>
<b>Tabela 5</b> – Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ 15 min depois da administração de PTZ, $\beta$ -CCE ou FMZ em camundongos avaliados em alguns parâmetros do LCE.	<b>92</b>
<b>Tabela 6</b> – Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 15 min após a administração de DZP, FMZ ou PTZ em camundongos avaliados no LCE.	<b>92</b>

## LISTA DE ABREVIACOES

**$\beta$ -CCE** – Etil  $\beta$ -carbolina 3-carboxilato

**DMI** - desipramina

**DSP-4** - N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina

**DZP** – diazepam

**EA** – entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado

**EF** – entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado

**Eixo HPA** – eixo adreno-hipotálamo-pituitária

**E.P.M.** – erro padrão da mdia

**e.v.** – endovenosa

**FLX** - fluoxetina

**FMZ** – flumazenil

**GABA** – cido gama-aminobutírico

**i.c.v.** – intracerebroventricular

**IMI** - imipramina

**i.p.** – intraperitoneal

**i.pl.** - intraplantar

**i.t.**- intratecal

**KO** – camundongos *knockout*

**LCE** – labirinto em cruz elevado

**N/OFFQ** – nociceptina/orfanina FQ

**NOP<sup>-/-</sup>** - camundongo *knockout* para o receptor NOP

**NOP<sup>+/+</sup>** - camundongo *wild-type* para o receptor NOP

**NST** – nocistatina bovina

**NST-C6** – fragmento C-terminal hexapeptídico da nocistatina

**PBS** – ‘physiological buffer solution’

**PCPA** - p-clorofenilalanina metil éster

**ppN/OFQ** - prepronociceptina

**PTZ** – cloridrato de pentilenotetrazol

**TA** – tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado

**TF** – tempo de permanência nos braços fechados do labirinto em cruz elevado

**TNF** – Teste da natação forçada

**TSC** – Teste da suspensão pela cauda

**UFP-101** - [Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ-NH<sub>2</sub>

**WT** – camundongos *wild-type*

# ***INTRODUÇÃO***

## INTRODUÇÃO

### OS SISTEMAS PEPTIDÉRGICOS

Nas últimas três décadas, muitos estudos relataram a descoberta de sistemas peptidérgicos endógenos e as suas respectivas ações em processos fisiológicos e patológicos, fato que vem motivando o mundo acadêmico e as indústrias farmacêuticas a investirem no estudo e na produção de novas ferramentas farmacológicas para o tratamento de diversas doenças (HOKFELT *et al.*, 2000).

Os neuropeptídeos são moléculas constituídas por 3 a 100 resíduos de aminoácidos e possuem uma estrutura que pode ser até 50 vezes maior que os neurotransmissores clássicos. Além disso, devido ao tamanho, estas moléculas possuem mais sítios de reconhecimento nos seus receptores e mais informações químicas que os neurotransmissores clássicos. Outro fato relevante é a afinidade pelo receptor, pois os neuropeptídeos são cerca de 1000 vezes mais potentes que os outros neurotransmissores, ou seja, os neuropeptídeos se ligam aos seus receptores em uma faixa de concentração de nmol/l, enquanto que os neurotransmissores clássicos o fazem na faixa de  $\mu\text{mol/l}$  (HOKFELT *et al.*, 2003).

Outra característica do sistema peptidérgico é a alta seletividade quando comparado aos outros neurotransmissores, deste modo, poucas moléculas precisam ser liberadas para produzir um efeito farmacológico e, conseqüentemente, isto sugere que a intervenção farmacológica com ligantes destes sistemas produza menos efeitos adversos (HOKFELT *et al.*, 2003).

É importante também destacar que o sistema peptidérgico possui a capacidade de desensibilizar o seu receptor, devido a internalização do complexo neuropeptídeo-receptor, o que serve como um sistema de regulação da liberação e transmissão dos neuropeptídeos. Além disso, por serem moléculas grandes, os neuropeptídeos se difundem e também se ligam mais lentamente do que os neurotransmissores clássicos. Entretanto, os neuropeptídeos se encontram em concentrações menores do que os outros neurotransmissores no cérebro de mamíferos (HOKFELT *et al.*, 2003).

Outro fato relevante é que quase todos os neuropeptídeos são expressos em neurônios com mais um ou até dois neurotransmissores (HOKFELT *et al.*, 1980) e estas combinações propiciam comunicações sinápticas lentas (100-500 ms) e rápidas (2-5 ms).

Além disso, a liberação dos neuropeptídeos requer alta frequência de disparos ou situações patológicas específicas e, uma vez liberados, os neuropeptídeos podem atuar em receptores localizados na fenda sináptica ou distantes do sítio de liberação. Todas estas vantagens ultrapassam os conceitos convencionais de transmissão sináptica e enfatizam a capacidade dos neuropeptídeos de influenciar grandes áreas do sistema nervoso central (HOKFELT *et al.*, 2003).

Diante das vantagens acima estabelecidas para os neuropeptídeos em relação aos neurotransmissores clássicos, podemos dizer que os sistemas peptidérgicos não são usados comumente em circunstâncias normais, porém possuem um papel importante quando o sistema nervoso esta tentando se adaptar a situações variadas, como no estresse, em convulsões, no uso de drogas de abuso, em casos de dano nervoso e outros tipos de condições patofisiológicas (HOKFELT *et al.*, 2003) e, deste modo, os sistemas peptidérgicos são alvos terapêuticos atrativos para o tratamento de várias patologias do sistema nervoso central.

## **O SISTEMA NOCICEPTINA/ORFANINA FQ – RECEPTOR NOP**

### **Prepronociceptina: um precursor peptídico**

Devido à natureza proteica destas moléculas, os peptídeos são alvos fáceis de enzimas metabólicas e, para garantir que a ação farmacológica não seja prejudicada pela curta meia-vida destas moléculas, os peptídeos são sintetizados na forma de grandes cadeias de aminoácidos inativas farmacologicamente, denominadas de precursores, cadeias estas que sofrem a ação de enzimas de clivagem e, a partir deste processo, o peptídeo ativo é liberado (HOKFELT *et al.*, 2000).

A prepronociceptina (ppN/OFQ) é um exemplo de um precursor peptídico, cuja molécula foi seqüenciada, seu gene codificador foi localizado e a expressão da ppN/OFQ em diferentes tecidos foi determinada em 1996 por Mollereau e colaboradores. A ppN/OFQ é formada por uma seqüência de aminoácidos e possui uma estrutura dimensional muito semelhante à dos precursores dos peptídeos opióides, como a preproencefalina, a preprodinorfina e a preproopiomiocortina, o que sugere que a ppN/OFQ pertença a família



dos opióides e que estes polipeptídeos possam ter origens evolucionárias comuns (MOLLEREAU *et al.*, 1996).

O número de resíduos de aminoácidos da ppN/OFQ varia conforme a espécie, sendo que em humanos e bovinos há 176 resíduos, enquanto que em ratos e camundongos a ppN/OFQ é formada por 181 e 187 aminoácidos, respectivamente (OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998). O gene que codifica a ppN/OFQ é encontrado em humanos no cromossomo 8p e é predominantemente transcrito no cérebro e na medula espinhal (MOLLEREAU *et al.*, 1996). No cérebro, foram detectados níveis elevados de RNAm da ppN/OFQ no sistema límbico, em especial na área septo-hipocampal, no núcleo do leito da estria terminal, no hipotálamo, no núcleo central da amígdala e em alguns núcleos do tálamo (BOOM *et al.*, 1999). A ppN/OFQ, porém, possui um padrão de distribuição no sistema nervoso central que não se sobrepõe completamente aos precursores dos opióides, o que sugere uma ação farmacológica distinta dos peptídeos opióides clássicos (HOUTANI *et al.*, 1996).

	Signal peptide	
Bovine	MKILFCDLLLSLFSVSSSSCQKDCLVCREKLRPTLDSFSLEMCILECEEKAFTSPLWTP	60
Human	MKVLLCDLLLLSLFSSVFSSCQRDCLTCQEKLHPALDSFDLEVCILECEEKVFPSPLWTP	60
Mouse	MKILFCDVLLLSLLSSVFSSCPRDCLTCQEKLHPAPDSFNLKTCILQCEEKVFPRPLWTV	60
Rat	MKILFCDVLLLSLLSSVFSSCPEDCLTCQERLHPAPGSFNLKLCILQCEEKVFPRPLWTL	60
bPNP-2		
Bovine	CTKVMARGSWQLSPADPDHVAALDQPRASEMQHLEKMPRVRSLSLFRQ-----K	109
Human	CTKVMARSSWQLSPAPEHVAALYQPRASEMQHLEKMPRVRSLSLFRQEQ-----E	109
Mouse	CTKVMASGSGQLSPADPELVSAAALYQPKASEMQHLEKMPRVRSLSLQVRDAEPGADAEPGA	120
Rat	CTKAMASDSEQLSPADPELTSAAALYQSKASEMQHLEKMPRVRSVQVQARDAEPEA-----	114
bPNP-3 (Nocistatin)      Noc/OFQ      bPNP-4		
Bovine	RTTEPGLEEVGIEIQKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFSEFMRQYLVLVSMQSSQRRRT	169
Human	EPEPGMEEAGEMEIQKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFSEFMRQYLVLVSMQSSQRRRT	169
Mouse	DAEPGADDAEEVEIQKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFSEFMRQYLVLVSMQSSQRRRT	180
Rat	DAEPVADEADEVEIQKQLQKRFGGFTGARKSARKLANQKRFSEFMRQYLVLVSMQSSQRRRT	174
bPNP-5		
Bovine	LHQNGNA	176
Human	LHQNGNV	176
Mouse	LHQNGNV	187
Rat	LHQNGNV	181

**Figura 1** – Seqüência dos resíduos de aminoácidos da ppN/OFQ em diferentes espécies animais (bovino, humano, camundongo e rato). A seqüência sinalizadora (‘signal peptide’), os pontos de clivagem enzimática e os prováveis peptídeos formados a partir do processamento da ppN/OFQ estão indicados no esquema. (Adaptado de OKUDA-ASHITAKA e ITO, 2000).

De acordo com a figura 1, a clivagem da ppN/OFQ resulta na formação de cinco peptídeos para os bovinos e quatro para as demais espécies (rato, camundongo e humano), sendo que, no mínimo, três deles são bioativos: a nociceptina/orfanina FQ II (N/OFQ II); a nocistatina (NST), o mais recente a ser avaliado farmacologicamente, e a nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ; OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998).

## **Nociceptina/Orfanina FQ II**

A N/OFQ II é um peptídeo derivado da ppN/OFQ que foi primeiramente denominado de bPNP-4, hoje, porém é chamado de N/OFQII, devido às semelhanças estruturais com a N/OFQ, pois possui dezessete resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica, sendo que o primeiro e o último coincidem com a N/OFQ (FLORIN *et al.*, 1997). Nada se sabe sobre os sítios de ligação/receptores envolvidos nas ações da N/OFQII. Além disso, poucos estudos relatam as ações farmacológicas deste peptídeo, sendo que a maioria deles enfoca o envolvimento nos processos nociceptivos.

A N/OFQII possui uma potente ação antinociceptiva, quando administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.) e intratecal (i.t.) em camundongos. O efeito antinociceptivo da injeção i.c.v. é revertido pelo tratamento com naloxona, um antagonista não-seletivo dos receptores opióides, mostrando que este peptídeo atua no sistema opióide (ROSSI *et al.*, 1998). Em ratos, a N/OFQII também induz um efeito antinociceptivo após a injeção na amígdala, substância cinzenta periaquedutal, *locus coeruleus* e núcleo rostro-medial da medula, sendo que a naloxona reverte este efeito apenas após a injeção na amígdala e na substância cinzenta periaquedutal (ROSSI *et al.*, 2002). É importante, no entanto, salientar que a ação analgésica da N/OFQII é contraditória, pois Florin e colaboradores (1999) mostraram que a injeção i.c.v. de N/OFQII não produziu qualquer atividade em camundongos avaliados em diversos modelos de nocicepção, como o teste da placa quente, o teste das contrações abdominais induzidas por ácido acético e o *tail-flick test*.

Recentemente, Vaughan e colaboradores (2001) relataram que a N/OFQII não induziu modificação (inibição ou excitação) nas correntes da membrana dos neurônios do núcleo rostro-medial da medula de ratos. Além disso, nenhum outro trabalho abordou a ação deste peptídeo na liberação/transmissão de outros neurotransmissores, nem os efeitos

celulares induzidos pela N/OFQII, o que dificulta o entendimento de suas ações farmacológicas.

## **Nocistatina**

A NST é outro peptídeo formado a partir da clivagem da ppN/OFQ, esta possui um tamanho variável entre diferentes espécies (compreende 17, 30, 35 e 41 resíduos de aminoácidos em bovinos, humanos, ratos e camundongos, respectivamente), porém os últimos 6 resíduos da porção C-terminal são completamente conservados nas espécies acima citadas (OKUDA-ASHITAKA e ITO, 2000). A NST é particularmente abundante no núcleo da rafe, no núcleo ventromedial do hipotálamo e no trato trigeminal da espinha dorsal de camundongos, porém o receptor ao qual a NST se liga ainda não foi identificado (OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998).

Com relação as ações fisiológicas descritas para a NST, poucos estudos enfocam os efeitos *per se* deste peptídeo, mas a grande maioria enfatiza o antagonismo que ocorre entre as ações da N/OFQ e da NST. Entretanto, este efeito antagônico existente entre as ações destes peptídeos parece ser do tipo fisiológico, visto que a NST inibe os efeitos da N/OFQ, porém a NST não desloca a [<sup>3</sup>H]N/OFQ em estudos de *binding*, nem atenua a inibição do acúmulo de AMPc causada pela N/OFQ em células transfectadas pelo receptor NOP, descartando a ligação da NST ao receptor da N/OFQ (OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998).

Okuda-Ashitaka e colaboradores (1998) relataram o efeito anti-hiperalgésico da NST *i.t.*, em camundongos, induzido pela N/OFQ e pela prostaglandina E. Em ratos, a administração *i.c.v.* de NST também promoveu um efeito anti-hiperalgésico na hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina/caolina (NAKAGAWA *et al.*, 1999). Nakano e colaboradores (2000) mostraram que a NST induziu *per se* analgesia, quando injetada intratecalmente em camundongos avaliados no teste da formalina, sendo que este efeito não se modifica após a injeção de naloxona. Recentemente, INOUE e colaboradores (2003) mostraram que a injeção intraplantar (*i.pl.*) de NST induziu uma ação nociceptiva em doses que variaram de 0,01 – 10 pmol e este efeito foi abolido pelo tratamento com toxina *pertussis*, um inibidor da fosfolipase C, e também pelo CP-99994, um antagonista do receptor NK1, indicando que a NST pode induzir nocicepção através da liberação de substância P ou pela ativação da via da proteína Gi/o e fosfolipase C.

Devido a falta do receptor/sítio de ligação da NST, poucos estudos relataram os efeitos deste peptídeo na transmissão e liberação de neurotransmissores. Zeilhofer e colaboradores (2000) mostraram que a NST suprime a transmissão de neurotransmissores inibitórios rápidos, como a glicina e o GABA da camada superficial da medula espinhal de ratos, o que constitui um sítio primário de integração da informação nociceptiva. Além disso, Nicol e colaboradores (1998) estudaram o efeito da NST sobre a liberação de glutamato e mostraram que a NST *per se* não modifica a liberação deste neurotransmissor, porém reverte completamente a inibição da liberação de glutamato induzida pela N/OFQ em fatias de cérebro de rato.

É interessante salientar que a NST não está apenas envolvida com a nocicepção, pois modelos animais de aprendizagem e memória já foram utilizados para avaliar um possível envolvimento da NST nestes processos fisiológicos. Hiramatsu e Inoue (1999) mostraram que a NST não possui efeito *per se* na memória, porém a injeção de NST reverte o prejuízo de memória induzido pela N/OFQ e pela escopolamina (HIRAMATSU e INOUE, 1999).

### **Nociceptina/orfanina FQ**

O último dos três peptídeos bioativos derivados da ppN/OFQ que será abordado neste estudo é a N/OFQ, que foi identificada, simultaneamente, por dois grupos de pesquisadores em 1995, um francês (MEUNIER *et al.*, 1995) e o outro suíço (REINSCHEID *et al.*, 1995). Este peptídeo foi denominado de nociceptina por Meunier e colaboradores (1995), por reduzir o limiar da dor em modelos de nocicepção, enquanto que o nome orfanina FQ, atribuído pelo segundo grupo, refere-se ao peptídeo com afinidade por um receptor que era considerado 'órfão' e no qual o primeiro e o último aminoácido que compõe a cadeia peptídica são abreviados por F e Q (fenilalanina e glutamina, respectivamente) (REINSCHEID *et al.*, 1996). Na época da descoberta nenhum dos termos predominou, sendo por isso conhecido como nociceptina/orfanina FQ.

A N/OFQ é um peptídeo composto por 17 aminoácidos e que difere dos outros agonistas dos receptores opióides, porque não possui um resíduo de tirosina na porção N-terminal, que é requerido para a atividade agonística dos receptores opióides  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  (REINSCHEID, *et al.*, 1996; Fig. 2). Apesar da similaridade estrutural entre a N/OFQ e a

dinorfina A, a N/OFQ não se liga aos receptores opióides clássicos como o  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$ , porém liga-se com alta seletividade ao seu receptor, denominado de receptor NOP (MEUNIER *et al.*, 1995; REINSCHIED *et al.*, 1995).

**Nociceptina** H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH

**Dinorfina A** H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH

**Figura 2** – Seqüência da nociceptina/orfanina FQ comparada com a da dinorfina A, o peptídeo opióide mais semelhante à N/OFQ. Resíduos de aminoácidos comuns entre as duas cadeias estão sublinhados (Adaptado de GUERRINI *et al.*, 1997).

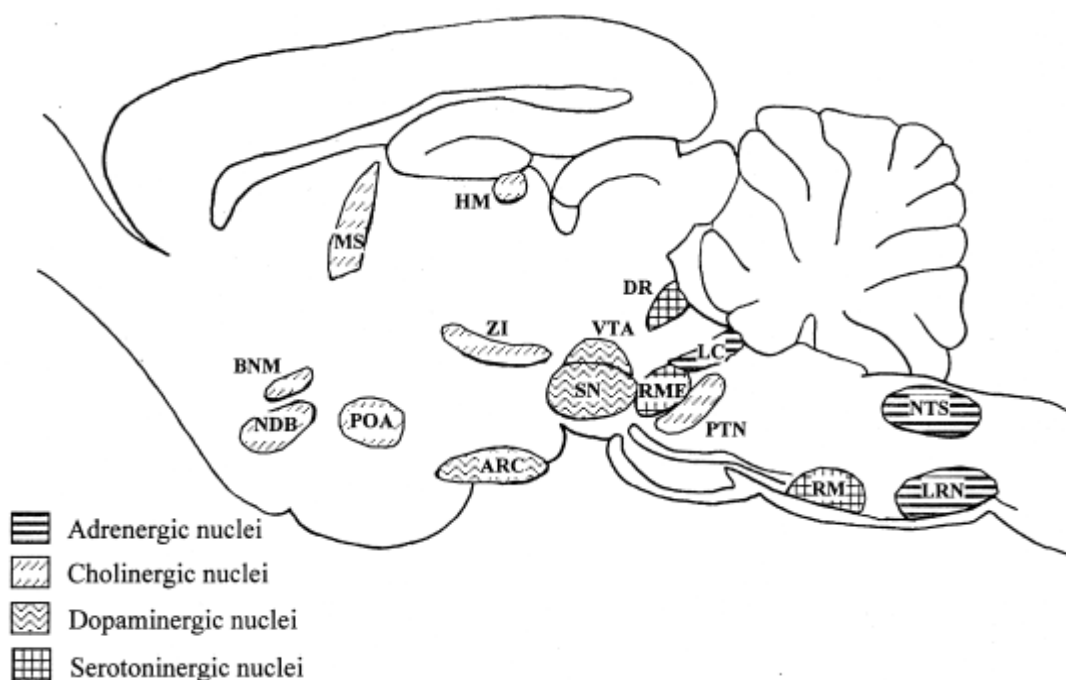
## Receptor NOP

O receptor NOP foi descoberto em 1994, após a realização de *screening* em bibliotecas de DNAc com sondas de seqüências de oligonucleotídeos homólogas aos receptores opióides. Inicialmente, o receptor foi chamado de ORL1 (*opioid receptor-like 1*), sendo seqüenciado por vários pesquisadores (BUNZOW *et al.*, 1994; FUKUDA *et al.*, 1994; MOLLEREAU *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994). Mais tarde, de acordo com as regras da IUPHAR (JENKINSON *et al.*, 1995), este receptor foi denominado de NOP. O receptor NOP tem 60 % de homologia com os receptores opióides, sendo que nas alças intracelulares e no 2°, 3° e 7° domínios transmembranais a homologia com os receptores opióides aumenta, mas na porção N-terminal e em alguns dos *loops* extracelulares a similaridade na seqüência de aminoácidos diminui (para uma revisão ver CALO *et al.*, 2000). Esta semelhança apresentada entre o receptor NOP e os receptores opióides, especialmente nas porções intracelulares, pode explicar porque o receptor NOP ativa os mesmos mecanismos intracelulares de transdução de sinal dos receptores opióides (CALO *et al.*, 2000).

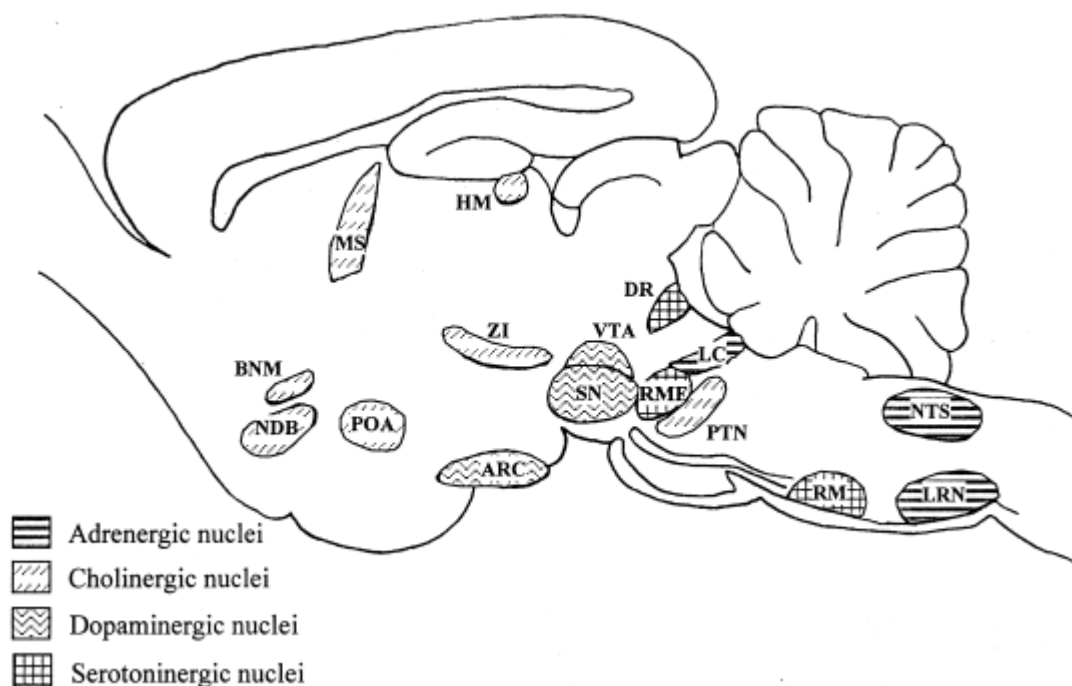
O receptor NOP foi encontrado e identificado em humanos, ratos, camundongos e porcos e a homologia das seqüências de aminoácidos que compõem o receptor é maior de 90% entre as diferentes espécies citadas acima (BUNZOW *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1994; LACHOWICZ *et al.*, 1995; MOLLEREAU *et al.*, 1994; NISHI *et al.*, 1994; OSINSKI *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1994). Além disso, logo após o seqüenciamento do receptor NOP, variantes (*splices*) deste receptor foram identificados em linfócitos (HALFORD *et al.*, 1995;

WICK *et al.*, 1995) e também no cérebro de camundongos, ratos e humanos (PAN *et al.*, 1998; PELUSO *et al.*, 1998; WICK *et al.*, 1994). Apesar do receptor NOP possuir variantes, não existe nenhuma evidência a respeito da heterogeneidade deste receptor (MOGIL e PASTERNAK, 2001).

Ao contrário da ppN/OFQ, o receptor NOP é amplamente expresso no sistema nervoso central, sendo que níveis elevados de expressão deste receptor são encontrados no córtex cerebral, hipocampo, núcleo olfatório, amígdala, giro denteado, septo medial e núcleos talâmicos (Fig.3), além dos núcleos noradrenérgicos e serotoninérgicos, como o *locus coeruleus* e o dorsal da rafe, respectivamente (Fig.4), e na medula espinhal (para uma revisão ver MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000). Um ponto a destacar é que há boa correlação entre a expressão do receptor NOP e do seu agonista endógeno, a N/OFQ, especialmente nas estruturas subcorticais do sistema límbico, o que sugere a participação do sistema N/OFQ–receptor NOP na modulação das emoções, no processo de aprendizagem e memória, na regulação do eixo HPA, entre outros (DARLAND *et al.*, 1998).



**Figura 3** – Representação esquemática do padrão de expressão de RNAm para o receptor NOP no sistema límbico de rato. Adaptado de MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000. Abreviações: ABL, núcleo basolateral da amígdala; AD, núcleo anterodorsal do tálamo; ACE, núcleo central da amígdala; ACO, núcleo cortical da amígdala; AME, núcleo medial da amígdala; ARC, núcleo arqueado; BST, núcleo do leito da estria terminal; C, corpo caloso; DG, giro denteado; HL, habênula lateral; HM, habênula medial; HPC, hipocampo; IP, núcleo interpeduncular; LHA, área hipotalâmica lateral; LS, septo lateral; MM, núcleo mamilar medial; MS, septo medial; NDB, núcleo diagonal de Broca; PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; SON, núcleo supra-óptico; VHM, núcleo ventromedial do hipotálamo.



**Figura 4** – Representação esquemática do padrão de expressão de RNAm para o receptor NOP no sistema aminérgico de rato. Os diferentes símbolos indicam os núcleos noradrenérgicos (‘adrenergic nuclei’; barras horizontais), núcleos colinérgicos (‘cholinergic nuclei’; traços em diagonal), núcleos dopaminérgicos (‘dopaminergic nuclei’; linhas onduladas) e núcleos serotoninérgicos (‘serotonergic nuclei’; linhas cruzadas). Adaptado de MOLLEREAU e MOULEDOUS, 2000. Abreviações: ARC, núcleo arqueado; BMN, núcleo basal de Meynert; DR, dorsal da rafe; HM, habênula medial; LC, locus coeruleus; LRN, núcleo lateral reticular; MS, septo medial; NDB, núcleo diagonal de Broca; NTS, núcleo do trato solitário; POA, área pré-óptica; PTN, núcleo tegmental pedunculopontino; RM, núcleo da rafe magno; RME, núcleo medial rafe; SN, substância negra; VTA, área tegmental ventral; ZI, zona incerta.

### Ligantes do receptor NOP

O receptor NOP possui como único ligante endógeno a N/OFQ(1-17) e os seus fragmentos, sendo que a mínima fração que contém a mesma eficácia do peptídeo íntegro é a N/OFQ(1-13). Porém, vários estudos de redução de aminoácidos foram realizados com o intuito de identificar a menor fração ativa, mas a conclusão mais importante foi que a redução de qualquer aminoácido da porção N-terminal leva à perda total de eficácia. A partir destes estudos, concluiu-se que os quatro primeiros aminoácidos da porção N-terminal (FGGF) são fundamentais para a ativação do receptor. A N/OFQ é um agonista seletivo para o receptor

NOP, mas isso não é muito comum entre os peptídeos opióides, visto que os peptídeos opióides possuem baixa seletividade pelos seus receptores. A seletividade de ação da N/OFQ é claramente devido à fenilalanina (F) na posição 1 da porção N-terminal, sendo que os opióides clássicos possuem um resíduo de tirosina (Y) nesta posição (para uma revisão ver ZAVERI, 2003).

A presença de resíduos catiônicos de arginina e lisina (AK) nas porções 8-9 e 12-13 possui um papel funcional na mediação da interação com o receptor NOP. Desta forma, em 2000, OKADA e colaboradores desenharam um agonista para este receptor, cuja molécula base era a N/OFQ, com uma substituição dos aminoácidos das posições 14-15 pela Arginina e Lisina, respectivamente, criando a [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ, um agonista peptídico com uma potência superior a da N/OFQ. Além disso, a amidação da porção C-terminal da N/OFQ conferiu à molécula um aumento na estabilidade metabólica, devido à diminuição da susceptibilidade à degradação enzimática, sem alterar a eficácia e a potência da N/OFQ-NH<sub>2</sub>, comparada a N/OFQ endógena. Juntos estes estudos serviram de base para o desenho de antagonistas peptídicos seletivos e altamente potentes para o receptor NOP, como o [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)-NH<sub>2</sub> e o [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ(1-13)-NH<sub>2</sub>, este último denominado de UFP-101 (*University of Ferrara Peptides-101*; CALO *et al.*, 2000; CALO *et al.*, 2002).

Apesar das semelhanças estruturais e funcionais do receptor NOP com os receptores opióides clássicos, o perfil farmacológico do receptor NOP é bastante peculiar, visto que ligantes peptídicos e não-peptídicos dos receptores opióides, incluindo a naloxona, não possuem afinidade por este receptor. Por outro lado, poucos ligantes do receptor NOP de natureza não-peptídica foram sintetizados, especialmente com biodisponibilidade por via oral. Através de sistemas otimizados de sínteses e *screening* foi descoberto o Ro64-6198, um agonista total para o receptor NOP (JENCK *et al.*, 2000), o J-113397 e o JTC-801, ambos antagonistas do receptor da N/OFQ (KAWAMOTO *et al.*, 1999; SHINKAI *et al.*, 2000).

## **Mecanismos de transdução de sinal**

Os mecanismos de transdução ativados após a estimulação do receptor NOP são os mesmos dos receptores opióides e envolvem a ativação de proteína Gi que inibe adenilato ciclase, Gk que estimula os canais de K<sup>+</sup> e G<sub>0</sub> que medeia a inibição dos canais de Ca<sup>+2</sup>



voltagem dependente. Devido à inibição da adenilato ciclase, a ativação do receptor NOP diminui a formação de AMPc, reduz a entrada de  $Ca^{+2}$  na célula e, além disso, promove uma hiperpolarização na membrana através da estimulação dos canais de  $K^{+}$  (para uma revisão ver HAWES *et al.*, 2000). Deste modo, a ativação do receptor NOP promove uma redução na excitabilidade neuronal e na liberação de neurotransmissores semelhante aos peptídeos opióides. Estudos têm mostrado que a N/OFQ inibe a liberação de muitos neurotransmissores, tais como o glutamato (NICOL *et al.*, 1996), dopamina (MURPHY *et al.*, 1996), noradrenalina (SCHLICKER *et al.*, 1998), taquicininas (GIULIANI e MAGGI, 1996; HELYES *et al.*, 1997) e acetilcolina (NEAL *et al.*, 1997; PATEL *et al.*, 1997). Além disso, a N/OFQ inibe a transmissão glutamatérgica (FABER *et al.*, 1996) e a GABAérgica (MEIS e PAPE, 2001).

## **ACÇÕES BIOLÓGICAS DA NOCICEPTINA/ORFANINA FO**

### **Nocicepção**

Muitas propriedades fisiológicas têm sido atribuídas a N/OFQ, sendo que a primeira a ser relatada foi o envolvimento nos processos de nocicepção (MEUNIER, *et al.*, 1995). Em modelos nociceptivos, a N/OFQ possui efeitos controversos dependendo da via de administração. A injeção i.c.v. de N/OFQ induz atividade pró-nociceptiva, descrito pela primeira vez juntamente com a identificação deste peptídeo, em 1995 (MEUNIER, *et al.*, 1995; REINSCHEID, *et al.*, 1995). Além disso, a injeção i.c.v. de N/OFQ reverte o efeito analgésico da morfina e de outros agonistas opióides (BERTORELLI *et al.*, 1999; CALO *et al.*, 1998; GRISEL *et al.*, 1996; MOGIL *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1999). O envolvimento do receptor NOP nos efeitos produzidos pela injeção central de N/OFQ pode ser evidenciado através da falta de atividade pró-nociceptiva induzida pela N/OFQ em camundongos *knockout* para o receptor NOP (NISHI *et al.*, 1997; NODA *et al.*, 1998) e reforçado pela técnica de *antisense*, pois peptídeos *antisense* contra o receptor NOP previnem o efeito da N/OFQ (TIAN *et al.*, 1997; ZHU *et al.*, 1997) e o efeito pró-nociceptivo da N/OFQ é revertido pela ação de antagonistas do receptor NOP (CALO *et al.*, 2000; CALO *et al.*, 2002).

Por outro lado, a injeção i.t. de N/OFQ produz uma ação controversa. A maioria dos estudos mostra que a injeção i.t. de N/OFQ induz um efeito antinociceptivo semelhante aos opióides clássicos (ERB *et al.*, 1997; HAO *et al.*, 1998; KING *et al.*, 1997; KAMEI *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1997). Outros estudos, porém mostraram que, em doses muito baixas (faixa de fmol), a N/OFQ induz um efeito hiperalgésico (SAKURADA *et al.*, 1999; INOUE *et al.*, 1999), que é mediado pelo receptor NOP, visto que animais *knockout* para o receptor NOP não respondem à N/OFQ (INOUE *et al.*, 1999).

A administração i.t. de antagonistas do receptor NOP não provocou alteração dos parâmetros nociceptivos, porém reverteu a atividade hiperalgésica induzida pela bradicinina e pela substância P (INOUE *et al.*, 2003). O mecanismo de ação do efeito nociceptivo da injeção i.t. de N/OFQ ainda não é conhecido, mas estudos apontam a participação da substância P, visto que o efeito da N/OFQ foi bloqueado em camundongos *knockout* para o precursor da substância P, após a administração de antagonistas dos receptores NK1 e, também, depois do pré-tratamento com capsaïcina (INOUE *et al.*, 1999).

Periféricamente, a N/OFQ parece induzir uma ação analgésica, como mostrada para camundongos (KOLESNIKOV e PASTERNAK, 1999) e macacos (KO *et al.*, 2002), sendo este efeito bloqueado por antagonistas NOP ou pelo uso de peptídeo *antisense* contra o receptor NOP (KO *et al.*, 2002; KOLESNIKOV e PASTERNAK, 1999). Mas, contrariamente, Inoue e colaboradores (1998) mostraram que a injeção intraplantar (i.pl.) de N/OFQ, em baixas doses, produz uma resposta pró-nociceptiva em camundongos. Além disso, camundongos *knockout* para o receptor NOP apresentaram uma potenciação das respostas nociceptivas após a injeção i.pl. de substância P quando comparados aos camundongos *wild-type* (INOUE *et al.*, 2003).

É importante salientar que camundongos *knockout* para o receptor NOP não apresentam diferença no limiar nociceptivo comparados com os camundongos *wild-type* (BERTORELLI *et al.*, 2002; NODA *et al.*, 1998) e isto sugere que o sistema N/OFQ–receptor NOP não possui papel crucial para o desenvolvimento de respostas nociceptivas.

### **Ações em sistemas periféricos**

A N/OFQ atua em diversos sistemas e órgãos periféricos, tais como o renal, o cardiovascular, o respiratório e também sobre o reflexo mictório (para uma revisão ver CALO

*et al.*, 2000). No sistema respiratório, a N/OFQ inibe a liberação de acetilcolina, de substância P e da calcitonina em preparações isoladas de traquéia e brônquio de cobaia e rato, este peptídeo também inibe a broncoconstrição induzida por estimulação elétrica em cobaia (FISCHER *et al.*, 1998), sendo que o efeito induzido pela N/OFQ foi insensível à naloxona, porém foi bloqueado por um antagonista NOP, o [F/G]NC(1-13)NH<sub>2</sub> (para uma revisão ver PEISER *et al.*, 2000). Esses dados corroboram a descoberta de novas drogas antitussígenas, sem os efeitos colaterais dos opióides, porém com a mesma eficácia da codeína (McLEOD *et al.*, 2002).

A injeção endovenosa de N/OFQ em ratos anestesiados induz bradicardia e hipotensão (CHAMPION e KADOWITZ, 1997; GIULIANI *et al.*, 1997) e resultados semelhantes foram obtidos com ratos conscientes (KAPUSTA *et al.*, 1997) e em camundongos (MADEDDU *et al.*, 1999), indicando que a anestesia não afeta o efeito cardiovascular da N/OFQ e que estes efeitos não são restritos aos ratos. O efeito da N/OFQ no sistema cardiovascular não foi modificado pela naloxona, mas, em ratos, este efeito foi antagonizado pela [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, antagonista do receptor NOP (BIGONI *et al.*, 1999), enquanto que em camundongos o [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, outro antagonista NOP, bloqueou o efeito da N/OFQ (MADEDDU *et al.*, 1999; SALIS *et al.*, 2000). Por outro lado, o antagonista da N/OFQ não induz efeito *per se*, o que sugere a inexistência de atividade tônica do sistema N/OFQ- receptor NOP sobre o sistema cardiovascular (para uma revisão ver MALINOWSKA *et al.*, 2002).

A administração intracerebroventricular de N/OFQ (2 - 10 nmol) produz os mesmos efeitos cardiovasculares da injeção periférica, ou seja, hipotensão e bradicardia em ratos (KAPUSTA e KENIGS, 1999; SHIRASAKA *et al.*, 1999). Chu e colaboradores (1999) mostraram que a injeção bilateral de N/OFQ (10 nmol) em neurônios de um núcleo pontino reduziu a pressão arterial e os batimentos cardíacos de ratos anestesiados. Além disso, o antagonista do receptor NOP quando injetado neste mesmo núcleo não produziu mudança nos parâmetros cardiovasculares basais, mas inibiu a ação da N/OFQ (CHU *et al.*, 1999). Por outro lado, Mao e Wang (2000) mostraram que a N/OFQ (0,2 nmol) elevou a pressão arterial e os batimentos cardíacos de ratos anestesiados e, também, de ratos conscientes quando injetados unilateralmente no núcleo do trato solitário, uma estrutura medular rica em fibras sensoriais aferentes como baroreceptores e quimiorreceptores.

No sistema renal, a injeção de N/OFQ via endovenosa (e.v.) ou i.c.v. induz aumento na excreção de água e diminuição na excreção de sódio urinário (KAPUSTA *et al.*, 1997), o que sugere que o efeito hipotensor da N/OFQ pode ser devido a modulação do

sistema cardiovascular e/ou ainda consequência do efeito diurético induzido por este peptídeo (para uma revisão ver KAPUSTA, 2000).

### **Ações no sistema nervoso central**

Em relação às ações centrais do sistema N/OFQ – receptor NOP, vários estudos vêm descrevendo a participação deste sistema na modulação da locomoção, memória, ansiedade, ingestão de alimentos, entre outros. Uma das primeiras observações comportamentais relatadas para a N/OFQ foi a diminuição da atividade locomotora, após a injeção de altas doses (10 nmol) deste peptídeo, que foi acompanhada por flacidez muscular e ataxia (REINSCHEID *et al.*, 1995). Em baixas doses (1-1000 ng), porém, a N/OFQ estimulou a locomoção espontânea avaliada no campo aberto em camundongos (FLORIN *et al.*, 1996). Por outro lado, animais *knockout* para o receptor NOP não apresentaram qualquer modificação da atividade locomotora após a administração de N/OFQ 10 nmol, enfatizando o papel do receptor NOP no desempenho da hipolocomoção induzida por este peptídeo. Além disso, estes animais *knockout* não apresentaram alteração na linha de base da atividade locomotora quando comparados com os *wild-type*, o que sugere que o sistema N/OFQ – receptor NOP não é um dos principais responsáveis pela regulação da locomoção (NISHI *et al.*, 1997; NODA *et al.*, 1998).

Estudos também têm mostrado que o sistema N/OFQ – receptor NOP reduz às propriedades de reforço e recompensa induzidas pelas drogas de abuso, pois a administração i.c.v. aguda de N/OFQ aumentou a ingestão de etanol, porém o tratamento crônico i.c.v. (7 dias) resultou em uma redução progressiva do consumo de etanol (CICCOCIOPPO *et al.*, 1999). A N/OFQ também prejudicou a aquisição de preferência por lugar (*place preference*) induzida pela morfina em ratos (MURPHY *et al.*, 1999) e em camundongos (SAKOORI e MURPHY, 2003) e precipitou uma síndrome de abstinência à morfina em ratos (MALIN *et al.*, 2000). Um mecanismo de ação provável para estes efeitos ‘anti-recompensa’ induzidos pela N/OFQ pode estar relacionado à inibição da atividade estimulatória induzida pelos opióides na área mesolímbica, pois a injeção de N/OFQ na área tegmental ventral reduziu a liberação de dopamina no núcleo *accumbens* (MURPHY e MAIDMENT, 1999). Corroborando esta hipótese, há um estudo de microdiálise *in vivo* mostrando que a N/OFQ

inibe a liberação de dopamina no núcleo *accumbens*, em ratos tratados sistemicamente com morfina (DI GIANNUARIO *et al.*, 1999).

Outros estudos têm mostrado que a N/OFQ não foi efetiva em alterar a taxa de auto-administração de heroína (WALKER *et al.*, 1998) ou o desenvolvimento de crise de abstinência à cocaína em ratos (NARAYANAN e MAIDMENT, 1999). No entanto, a administração i.c.v. de N/OFQ suprimiu completamente a aquisição de preferência por lugar induzida pela metanfetamina em ratos, sendo este efeito bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista NOP, [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (ZHAO *et al.*, 2003).

A N/OFQ parece ser um peptídeo com marcada propriedade anti-opiíide e, devido a este fato, a N/OFQ parece estar relacionada com os fenômenos de tolerância e dependência (MOGIL, *et al.*, 1996). Uma das teorias que procura explicar a tolerância baseia-se no fato de que a administração repetida de opiíides provoca a liberação de peptídeos anti-opiíides no sistema nervoso central, reduzindo a resposta analgésica (tolerância) e contribuindo para a produção de uma síndrome de abstinência (dependência), uma vez cessada a administração do opiíide (ROTHMAN, 1992).

A primeira evidência que contribuiu para determinar a relação entre o sistema N/OFQ – receptor NOP e os fenômenos de tolerância e dependência, veio de estudos com animais *knockout* para o receptor NOP, cujos camundongos apresentam uma redução parcial do desenvolvimento de tolerância à morfina, após 5 dias de tratamento repetido, enquanto que os camundongos *wild-type* apresentaram redução da resposta analgésica à morfina. Além disso, a injeção i.c.v. de SB-612111, um novo antagonista do receptor NOP, reverteu a tolerância à morfina no teste da placa quente, adquirida após a administração repetida de morfina (ZARATIN *et al.*, 2003), mas o bloqueio do receptor NOP feito pela administração sistêmica de J-113397, antagonista NOP, induziu redução parcial da tolerância à morfina (UEDA *et al.*, 2000).

Em 1997, Sandin e colaboradores descreveram que injeções de N/OFQ no hipocampo prejudicaram o aprendizado espacial avaliado no labirinto aquático de Morris. Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que a N/OFQ foi capaz de inibir a transmissão sináptica e a potenciação em longo prazo no hipocampo de rato (YU e XIE, 1998; YU *et al.*, 1997). Redrobe e colaboradores (2000) relataram que este prejuízo da memória induzido pela N/OFQ é devido à ativação do receptor NOP, visto que o antagonista do receptor NOP reverteu as ações da N/OFQ. Aliado a estes dados, camundongos *knockout* para o receptor NOP apresentam facilitação da potenciação em longo prazo na região CA1 do hipocampo e,

comportamentalmente, estes animais apresentam memória mais aguçada, além de aprenderem mais facilmente que os controles (MANABE *et al.*, 1998).

Higgins e colaboradores (2002) relataram que os camundongos *knockout* para a ppN/OFQ aprendem mais facilmente que os animais controles, porém quando injetados com Ro64-6198, um agonista do receptor NOP, apresentam prejuízo na aquisição de memória, quando avaliados no labirinto aquático de Morris. No entanto, recentemente, Sandin e colaboradores (2004) relataram que a N/OFQ quando injetada no CA3 do hipocampo, em doses menores que 1 nmol, melhora o desempenho de ratos no labirinto aquático de Morris, sendo este efeito bloqueado por um antagonista do receptor NOP.

Alguns estudos também relacionam o sistema N/OFQ–receptor NOP com a ingestão de alimentos. Em 1996, Pomonis e colaboradores publicaram que a N/OFQ estimulou a ingestão de alimentos em ratos saciados, e que esta ação ocorre por um curto período de tempo, além deste ser um efeito específico para a ingestão de alimentos, não afetando o consumo de água com sacarose (POLIDORI *et al.*, 2000 a, b). A N/OFQ também induziu este efeito sobre a ingestão de alimentos, após a administração no núcleo accumbens e no ventromedial do hipotálamo (STRATFORD *et al.*, 1997).

Este efeito hiperfágico da N/OFQ pode ser bloqueado pela co-injeção de antagonistas competitivos para o receptor NOP (POLIDORI *et al.*, 2000b) e através do antagonismo funcional induzido pela NST (OLSZEWSKI *et al.*, 2000). A naloxona também reverte o efeito da N/OFQ (LEVENTHAL *et al.*, 1998; POMONIS *et al.*, 1996), provavelmente porque os receptores opióides estão envolvidos no controle da ingestão alimentar e/ou afetam controles motivacionais ligados à ingestão de alimentos (GLASS *et al.*, 1999; POLIDORI *et al.*, 2000a). Assim como a administração de antagonistas dos receptores  $\mu$ -,  $\kappa$ - e  $\delta$ -opióides, o bloqueio do receptor NOP, induzido pelo uso de [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, inibiu a ingestão de alimentos em ratos em jejum (GLASS *et al.*, 1999; POLIDORI *et al.*, 2000b)

As evidências sugerem haver uma ligação entre a hiperfagia induzida pela N/OFQ e a corticosterona, pois se sabe que a N/OFQ aumenta os níveis plasmáticos deste hormônio (DEVINE *et al.*, 2001). Animais adrenalectomizados tratados com N/OFQ não apresentam o comportamento hiperfágico e o tratamento com corticosterona restaurou o efeito da N/OFQ nestes animais (NICHOLSON *et al.*, 2002). Além disso, o Ro64-6198, agonista do receptor NOP, aumentou a ingestão de alimentos em ratos submetidos ao estresse de contenção e reverteu o efeito anoréxico induzido pelo CRF, mas não modificou a redução na ingestão alimentar induzida pelo lipopolissacarídeo da *E. coli*, enfatizando um efeito seletivo na

inibição da ação anoréxica. O receptor NOP está também envolvido na mediação da hiperfagia induzida pela N/OFQ, pois este efeito é inibido pela administração de antagonistas do receptor NOP (CICCOCIO PPO *et al.*, 2002).

### **ESTRESSE, ANSIEDADE E DEPRESSÃO**

Após a exposição prolongada a uma situação de estresse, o cérebro desenvolve plasticidade adaptativa em seus neurotransmissores, bem como nos hormônios de ação sistêmica que agem produzindo mudanças estruturais e funcionais no organismo (McEWEN, 2000). Vários sistemas neuronais estão envolvidos na adaptação do organismo ao estresse, entre eles se destacam o sistema serotoninérgico, o GABAérgico, o glutamatérgico, além do noradrenérgico e alguns peptídeos, sendo o CRH o principal deles, porém é interessante destacar também a vasopressina, oxitocina, colecistocinina, neuropeptídeo Y e substância P (para revisão ver CARRASCO e VAN DE KAR, 2003).

Assim como no estresse, os neuropeptídeos também estão envolvidos na modulação da ansiedade e da depressão experimental, como mostrado na tabela 1, podemos ver o efeito de agonistas e antagonistas de vários sistemas peptidérgicos na ansiedade e na depressão, além do perfil comportamental de camundongos mutantes para um precursor peptídico ou para um receptor específico.

**Tabela 1.** O papel dos neuropeptídeos e de seus receptores na ansiedade e na depressão experimental.

<b>Peptídeo</b>	<b>Atividade do tipo ansiolítica</b>	<b>Atividade do tipo antidepressiva</b>	<b>Camundongos <i>knockout</i></b>
<b>Substância P</b>	Antagonistas NK1 e NK2 (TEIXEIRA <i>et al.</i> , 1996) e agonistas NK3 (RIBEIRO <i>et al.</i> , 1999)	Antagonistas NK1 (KRAMER <i>et al.</i> , 1998)	Camundongos KO para o receptor NK1 apresentam um perfil do tipo antidepressivo e não apresentam alteração comportamental em modelos de ansiedade (RUPNIAK <i>et al.</i> , 2001)
<b>Neuropeptídeo Y (NPY)</b>	NPY e agonista Y1 (BROQUA <i>et al.</i> , 1995)	NPY e agonista Y1 (REDROBE <i>et al.</i> , 2002;STO GNER e HOLMES, 2000)	Camundongos KO para o NPY apresentam um perfil do tipo ansiogênico (BANNON <i>et al.</i> , 2000)

<b>Colecistoquinina (CCK)</b>	Antagonista do receptor CCK2 (REVEL <i>et al.</i> , 1998)	Antagonista do receptor CCK2, mas não antagonista do receptor CCK1 (HERNANDO <i>et al.</i> , 1994)	Camundongos KO para o receptor CCK2 não apresentam alteração comportamental em modelos de ansiedade (DAUGE <i>et al.</i> , 2001)
<b>Hormônio de liberação de corticotrofina (CRH)</b>	Antagonistas dos receptores CRF(1) e CRF(2) (TAKAHASHI, 2001; TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2001)	Antagonista do receptor CRF(1) (MANSBACH <i>et al.</i> , 1997)	Camundongos KO para o receptor CRF(1) apresentam um perfil do tipo ansiolítico (CONTARINO <i>et al.</i> , 1999)
<b>Peptídeos opióides (receptores opióides)</b> - encefalinas ( $\delta$ ) - endorfinas ( $\mu$ ) - dinorfinas ( $\kappa$ )	Elevada expressão de preproencefalina em amígdala de ratos (KANG <i>et al.</i> , 1999)  Análogos da dinorfina (TSUDA <i>et al.</i> , 1996)	Inibidor da encefalinase (KITA <i>et al.</i> , 1997) Met-encefalina e Leu-encefalina (TEJEDOR-REAL <i>et al.</i> , 1995) Agonistas do receptor $\delta$ (BROOM <i>et al.</i> , 2002) Antagonistas do receptor $\kappa$ (MAGUE <i>et al.</i> , 2003)	Camundongos KO para a preproencefalina apresentam um perfil do tipo ansiogênico (KONIG <i>et al.</i> , 1996)  Camundongos KO para o receptor $\delta$ apresentam um perfil do tipo ansiogênico e depressivo e KO para o receptor $\mu$ apresentam um fenotipo oposto ao dos camundongos KO para o receptor $\delta$ (FILLIOL <i>et al.</i> , 2000)
<b>Ocitocina</b>	Ocitocina (MCCARTHY <i>et al.</i> , 1996)	Ocitocina (ARLETTI e BERTOLINI, 1987)	Camundongos KO para o receptor OT não apresentam alteração em modelos de ansiedade (DeVRIES <i>et al.</i> , 1997)
<b>Vasopressina</b>	Antagonistas do receptor V1b (GRIEBEL <i>et al.</i> , 2002)	Antagonistas do receptor V1b (GRIEBEL, <i>et al.</i> , 2002)	
<b>Angiotensina</b>	Antagonistas do receptor AT(I) (GARD <i>et al.</i> , 2001)		Camundongos KO para a angiotensina apresentam um perfil do tipo antidepressivo, mas nenhuma alteração comportamental foi observada em modelos de ansiedade (OKUYAMA <i>et al.</i> , 1999; WALTHER <i>et al.</i> , 1999)  Camundongos KO para o receptor AT (II) apresentam um perfil do tipo ansiogênico, porém não apresentam alteração em testes de depressão (OKUYAMA <i>et al.</i> , 1999)

Abreviações: KO - *knockout*



É interessante destacar, porém, que somente depois de 30 anos de muita pesquisa, a primeira droga derivada de peptídeos, um antagonista da substância P, foi clinicamente testada para o tratamento da depressão maior. Este lento progresso, porém, das pesquisas com peptídeos é parcialmente devido às dificuldades de síntese de agonistas e antagonistas destes sistemas que sejam potentes e seletivos, além de capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (HOKFELT *et al.*, 2003).

Em relação à N/OFQ, em 1997, Jenck e colaboradores mostraram que este peptídeo age como um ansiolítico, atenuando a inibição comportamental de animais agudamente expostos a condições estressantes/ansiosgênicas. A administração i.c.v. de N/OFQ, em doses baixas que variavam entre 0,1 e 3 nmol, induziu efeito do tipo ansiolítico em diversos paradigmas comportamentais em ratos, tais como caixa claro-escuro, LCE e comportamento exploratório de um ambiente não-familiar, sugerindo que a N/OFQ possa agir como um regulador endógeno da ansiedade aguda. Um perfil similar de ação foi observado com o Ro64-6198, um agonista do receptor NOP, de natureza não-peptídica (JENCK *et al.*, 2000), destacando que as doses que induzem perfil ansiolítico de N/OFQ e Ro-64-6198 não alteram as funções motora e cognitiva (HIGGINS *et al.*, 2002; JENCK *et al.*, 1997). Além disso, quando o Ro64-6198 foi cronicamente administrado em ratos, nenhum sinal de tolerância ao efeito ansiolítico foi detectado após 15 dias de tratamento diário (DAUTZENBERG *et al.*, 2001).

No teste de confronto com um predador, camundongos tratados centralmente com N/OFQ (0,3 - 3 nM / 5 µl) - o equivalente a 2 – 20 fmol – apresentaram claramente menos respostas de defesa perante um rato, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico também para baixíssimas doses de N/OFQ (GRIEBEL *et al.*, 1999). Além disso, o estudo do efeito ansiolítico induzido pela ativação do receptor NOP foi reforçado em animais *knockout*, mostrando que camundongos mutantes para o gene da ppN/OFQ apresentam ansiedade aumentada quando expostos a um ambiente novo – como o teste da caixa claro-escuro, o LCE e o campo aberto - quando comparado aos animais controles (KOSTER *et al.*, 1999). Por outro lado, camundongos *knockout* para o receptor NOP não apresentam modificação comportamental significativa quando avaliados no LCE (MAMIYA *et al.*, 1998).

Contrários, porém, ao efeito do tipo ansiolítico da N/OFQ, Fernandez e colaboradores (2003) descreveram que a injeção deste peptídeo (1 – 1000 pmol) em ratos aumentou o número de comportamentos relacionados à ansiedade em 3 modelos animais, o teste da caixa claro-escuro, o LCE e o campo aberto, sugerindo efeito do tipo ansiosgênico induzido pela N/OFQ.

Com relação a regulação do eixo HPA, o papel da N/OFQ também parece ser contraditório. Le Cudennec e colaboradores (2002) mostraram que camundongos injetados centralmente com N/OFQ e N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, agonistas do receptor NOP, apresentaram redução do nível plasmático de corticosterona, medida 30 min após o tratamento, quando comparados com os animais controles. Por outro lado, Devine e colaboradores (2001) descreveram aumento na concentração plasmática de corticosterona e de hormônio adrenocorticotrófico em ratos após a injeção i.c.v. de N/OFQ e análogos, incluindo a N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> e, também, após a exposição a um ambiente novo, sendo as medidas realizadas em um intervalo de 15 e 30 min após os tratamentos. No entanto, os camundongos mutantes para a ppN/OFQ apresentam nível plasmático basal e pós-estresse de corticosterona elevados quando comparados com os camundongos *wild-type*, o que sugere a participação da N/OFQ na regulação do eixo HPA e do estresse (KOSTER *et al.*, 1999).

Várias evidências corroboram ao efeito do tipo ‘anti-estresse’ induzido pela N/OFQ, sendo que camundongos mutantes para a ppN/OFQ exibiram prejuízo na adaptação ao estresse repetido, avaliado através de mudanças nas medidas da analgesia induzida pelo estresse, pois quando submetidos a natação forçada por 3 dias consecutivos, os *knockout* para a ppN/OFQ mostraram o mesmo perfil de resposta do primeiro dia, enquanto que os animais controle se habituaram ao estresse (KOSTER *et al.*, 1999). Além disso, camundongos com deficiência na expressão de N/OFQ apresentaram limiar basal de dor aumentado quando mantidos em grupos. Esta diferença na analgesia basal desapareceu quando os animais foram alojados individualmente por 2 semanas, provavelmente porque os camundongos *knockout* para a N/OFQ interpretam as interações sociais como eventos estressantes (KOSTER *et al.*, 1999; REINSCHEID e CIVELLI, 2002).

Com relação à depressão pouco se sabe sobre a participação do sistema N/OFQ-receptor NOP, em um estudo preliminar, Redrobe e colaboradores (2002) relataram os primeiros dados comportamentais que mostram o envolvimento deste sistema na depressão. Neste trabalho o tratamento com dois antagonistas seletivos do receptor NOP, o [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> e o J-113397, promovem ação do tipo antidepressiva. A injeção i.c.v. de N/OFQ e de naloxona, porém, não modificou o desempenho de camundongos avaliados no teste da natação forçada.

Como visto anteriormente, vários sistemas peptidérgicos participam da modulação da ansiedade e da depressão e, devido às vantagens apresentadas para os neuropeptídeos em relação aos neurotransmissores clássicos, é de grande interesse a descoberta de novos fármacos que atuem nestes sistemas. Assim, o presente trabalho enfocou o estudo dos efeitos

comportamentais de peptídeos derivados da ppN/OFQ, em particular a N/OFQ e a NST, em modelos animais de ansiedade e depressão.

## ***OBJETIVOS***

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito modulatório dos peptídeos derivados da ppN/OFQ, enfocando particularmente as ações da N/OFQ e a NST, em modelos experimentais de ansiedade e depressão. Além disso, este estudo também avaliou o mecanismo de ação destes peptídeos na modulação da ansiedade e da depressão experimental.

### **Específicos**

Para que o objetivo geral fosse alcançado, tornou-se necessário estabelecer alguns objetivos intermediários, que foram delineados dando enfoque às duas principais ações biológicas avaliadas no presente estudo:

#### 1) Ansiedade experimental:

→ Determinar o efeito comportamental da N/OFQ, do antagonista do receptor NOP (UFP-101), da NST e do seu fragmento C-terminal hexapeptídico (NST-C6) no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos;

→ Avaliar a influência da N/OFQ na ação induzida pela NST-C6 no teste do labirinto em cruz elevado, através da determinação do efeito da co-administração de N/OFQ e NST-C6 em camundongos;

→ Verificar a participação do receptor NOP na ação induzida pela N/OFQ em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado;

→ Estudar o envolvimento do sistema GABAérgico no efeito modulatório dos peptídeos N/OFQ e NST-C6 em um modelo animal de ansiedade, enfocando o antagonismo e o sinergismo de ações de ligantes de vários sítios do receptor GABA<sub>A</sub>.

## 2) Depressão experimental:

→ Avaliar a ação da NST-C6, N/OFQ e de antagonistas do receptor NOP, de natureza peptídica como o UFP-101 e o [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> e não-peptídica como o JTC-801 em camundongos submetidos ao teste da natação forçada;

→ Estudar o efeito do UFP-101 em outro modelo utilizado para avaliar ação antidepressiva em camundongos, o teste de suspensão da cauda, e em outra espécie animal, o rato, utilizando o teste da natação forçada;

→ Verificar a participação do receptor NOP na ação induzida pelo UFP-101 em camundongos submetidos ao teste da natação forçada e ao teste de suspensão da cauda;

→ Avaliar a performance comportamental de camundongos mutantes para o receptor NOP e dos seus respectivos controles em dois modelos animais de depressão, como no teste da natação forçada e no teste de suspensão da cauda;

→ Determinar o efeito da injeção de UFP-101 em animais *knockout* para o receptor NOP submetidos ao teste da natação forçada;

→ Estudar a participação do sistema monoaminérgico no mecanismo de ação do UFP-101 em camundongos submetido ao teste da natação forçada, avaliando a influência da depleção das monoaminas noradrenalina e serotonina no efeito induzido pelo UFP-101.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

## MATERIAL E MÉTODOS

### ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos Swiss machos e ratos Wistar machos provenientes de duas fontes. No estudo da ansiedade, utilizamos camundongos (25 – 30 g) criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo que após o desmame, os animais foram transferidos para o Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. No entanto, no mínimo, 48 h antes dos testes comportamentais, os animais foram transferidos para o Laboratório de Neurofarmacologia, onde os experimentos foram realizados. No estudo da depressão, utilizamos camundongos (22 – 25 g) e ratos (200 – 250 g) provenientes do fornecedor Morini (San Polo D’Enza, Emiglia Romagna, Itália). Com aproximadamente 2 meses e meio de idade, os animais foram comprados pela Università di Ferrara e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Medicina Clínica - Seção de Farmacologia da Università di Ferrara (Itália) por, pelo menos, uma semana, antes de serem submetidos aos testes comportamentais.

Neste trabalho também foram usados camundongos CD1-C57BL/6 J-129 machos *wild-type* e *knockout* para o receptor NOP, originários da colônia do Prof. Hiroshi Takeshima, Universidade de Tóquio (para detalhes ver NISHI *et al.*, 1997), que foram criados e mantidos em um biotério isolados dos demais camundongos no Departamento de Medicina Clínica (Università di Ferrara – Itália). Todos os camundongos mutantes para o receptor NOP foram genotipados utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Tanto no Brasil, quanto na Itália, os camundongos e os ratos foram criados sob condições ambientais controladas (12 h ciclo claro-escuro e a temperatura da sala era de  $22 \pm 2$  ° C), alojados em caixas plásticas forradas com serragem e tiveram livre acesso a ração e água, exceto durante os experimentos.

As condições dos animais utilizados neste estudo estão de acordo com os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA # 23080.001156/2001-50) da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo Comitê de Ética Italiano no uso de animais em pesquisa. Os experimentos foram realizados de acordo com um Guia de Princípios para o uso e cuidado dos animais recomendado pela Sociedade Brasileira



de Neurociência e Comportamento (1992) e por legislações requeridas pela Comunidade Européia, tais como as diretrizes do *Communities Council* (86/609/EEC) e as regulamentações italianas (D.L. 116/92). A manipulação dos animais *knockout* seguiu os acordos do *Genetically Modified Organisms*, proposto pela Comunidade Européia.

Para que o sofrimento dos animais utilizados fosse minimizado, procuramos utilizar o tamanho de amostra mínimo e adequado para a realização da análise estatística, além disso, após a utilização os animais foram rapidamente sacrificados em câmara de éter etílico. Cada animal foi utilizado apenas uma vez e os grupos experimentais consistiam de 8 a 12 camundongos e de 7 a 10 ratos.

## DROGAS E SOLUCÕES

As seguintes drogas e soluções foram administradas centralmente:

→ **PBS ('physiological buffer solution')**, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), usado como solução solvente das drogas e injetado i.c.v. nos grupos controle: NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM.

→ **Nocistatina-bovina (NST =Thr-Glu-Pro-Gly-Leu-Glu-Glu-Val-Gly-Glu-Ile-Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln)**, Tocris Cookson LTD. (Bristol, UK).

→ **Fragmento C-terminal hexapeptídico da nocistatina (NST-C6 = Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln)**, American Peptide Company (Sunnyvale, CA, EUA).

→ **Nociceptina/Orfanina FQ (N/OFQ = Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln)**, sintetizado por Dr. R. Guerrini, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Università di Ferrara (Ferrara, Itália).

→ **[Nphe<sup>1</sup>,Arg<sup>14</sup>,Lys<sup>15</sup>]N/OFQ-NH<sub>2</sub> (UFP-101)**, antagonista peptídico do receptor NOP, sintetizado por Dr. R. Guerrini, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Università di Ferrara (Ferrara, Itália; CALO *et al.*, 2002).

→ **[Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>**, antagonista peptídico do receptor NOP, sintetizado por Dr. R. Guerrini, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Università di Ferrara (Ferrara, Itália; CALO *et al.*, 2000).

Todas as drogas foram dissolvidas em tampão de fosfato (PBS), exceto a NST que foi solubilizada em PBS contendo 5 % de NaHCO<sub>3</sub> (50:1). As soluções-estoque foram

armazenadas em tubos Eppendorf siliconizados e estocadas em freezer a temperatura de -20°C, sendo que poucos minutos antes do uso estas soluções foram diluídas para a concentração desejada utilizando PBS.

As seguintes drogas e soluções foram injetadas intraperitonealmente:

- **Diazepam (DZP)**, agonista do sítio benzodiazepínico, Sanofi Withrop Farmacêutica Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- **Flumazenil (FMZ)**, antagonista do sítio benzodiazepínico, F- Hoffmann – La Roche Ltd. (Basiléia, Suíça).
- **Etil  $\beta$ -carbolina 3-carboxilato ( $\beta$ -CCE)**, agonista inverso do sítio benzodiazepínico, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Cloridrato de pentilenotetrazol (PTZ)**, antagonista GABA<sub>A</sub> do sítio da picrotoxina, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Imipramina (IMI)**, inibidor da recaptação de monoaminas, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Desipramina (DMI)**, inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Fluoxetina (FLX)**, inibidor seletivo da recaptação de serotonina, Tocris Cookson LTD. (Bristol, UK).
- **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4)**, neurotoxina noradrenérgica, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **p-clorofenilalanina metil éster (PCPA)**, inibidor da síntese de serotonina, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Cloridrato de xilazina**, agente anestésico, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).
- **Cloridrato de ketamina**, agente anestésico, Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

As drogas administradas intraperitonealmente foram diluídas em solução fisiológica de NaCl 0,9 %, este também foi utilizado como solução controle das injeções periféricas. Todas as drogas foram diluídas minutos antes do uso e foram descartadas após o término de cada sessão experimental.

## **PROCEDIMENTOS**

### **Administração central de drogas em camundongos**

Todas as injeções centrais em camundongos foram realizadas usando a técnica *free-hand* (LAURSEN e BELKNAP, 1986). Para a realização deste procedimento, os animais foram ligeiramente anestesiados com éter etílico (apenas o suficiente para a perda do reflexo postural) e uma agulha de 27 G foi ligada a uma seringa de Hamilton de 10 µl com o auxílio de um tubo de polietileno (PE-20 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA). Para a visualização do local da injeção, criou-se imaginariamente um ponto formado pela interseção de uma linha que passa pela base anterior das orelhas do animal com a linha que divide a calota craniana ao meio deslocando-se lateralmente cerca de 2 mm, sendo que neste ponto a agulha foi perpendicularmente inserida à calota craniana do camundongo a uma profundidade de 3 mm.

Cada animal recebeu apenas uma única injeção central, exceto o grupo de camundongos tratados com NST ou NST-C6 e N/OFQ, que recebeu duas injeções, uma em cada ventrículo lateral. Por outro lado, os camundongos tratados com a associação UFP-101 e N/OFQ, receberam também apenas uma injeção, sendo que a N/OFQ foi a primeira a ser aspirada para dentro da cânula de polietileno e, por último, estava o antagonista NOP (UFP-101) e para mantê-los separados, aspirou-se uma microbolha de ar, deste modo, foi possível fazer a administração do antagonista antes do agonista, em uma única injeção, sem haver contato entre eles.

Após a realização dos testes experimentais, cada animal foi decapitado e o seu cérebro examinado *a fresco* sob microscopia óptica. Os camundongos cujo sítio de injeção estivesse fora dos ventrículos laterais foram descartados da análise estatística (de 5 a 10 % do total de camundongos testados).

### **Administração central de drogas em ratos**

Os ratos foram anestesiados com xilazina (13 mg/kg, i.p.) e ketamina (87 mg/kg, i.p.) e, após verificada a perda total dos reflexos, procedeu-se à tricotomia da pelagem da parte superior da cabeça do animal. Os ratos foram imobilizados individualmente em um aparelho estereotáxico (Stöelting, mod. 300, EUA) e iniciou-se os procedimentos de assepsia da área a ser manipulada com álcool iodado. Com o auxílio de um bisturi, procedeu-se com a realização de um pequeno corte na parte superior da cabeça do animal, para a abertura do campo cirúrgico. Em seguida, raspou-se o periósteo, deixando a calota craniana exposta. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem situados num mesmo plano horizontal. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação da cânula e de dois parafusos de aço inoxidável. Para o implante da cânula no ventrículo lateral foram obedecidas as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1986): 0,8 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral e 2,5 mm abaixo da superfície do crânio.

Uma vez adaptados os parafusos e a cânula, a área aberta foi preenchida com uma camada de acrílico autopolimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil). Decorridos alguns minutos após a secagem total do acrílico, foi colocado um mandril dentro da cânula que só foi retirado no momento da infusão da droga. A área de pele aberta foi fechada com pontos cirúrgicos, para minimizar o efeito lesivo decorrente da implantação da cânula. Após a cirurgia, cada animal foi colocado numa caixa para a recuperação, aquecida por uma lâmpada de 40 W, a fim de minimizar a hipotermia, conseqüente à anestesia geral. Posteriormente, os animais foram colocados aos pares em gaiolas providas de água e comida, onde permaneceram por, em média, 5 dias até serem utilizados experimentalmente.

As cânulas utilizadas para possibilitar as microinjeções intracerebrais, implantadas no ventrículo lateral dos ratos, foram confeccionadas em nosso laboratório a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm (calibre 22 interno/28 externo). Com o auxílio de um paquímetro (General Hardware MFG Inc., Nova Iorque, EUA), as cânulas foram medidas, para serem cortadas no comprimento de 16,5 mm. Um mandril, feito de fio de aço (n° 26), foi adaptado ao interior da cânula para evitar a oclusão das mesmas.

Ao final dos procedimentos experimentais, todos os ratos foram anestesiados com éter e perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9 %), seguido por solução de formaldeído (10 %). Posteriormente, os animais foram decapitados e receberam uma microinjeção de Azul de Evans (2 µl). Os cérebros foram removidos e imediatamente fixados em solução de formalina 10 % - sacarose 20 %, sendo posteriormente cortados no plano frontal e os locais das injeções analisados com o uso de microscopia óptica. Todos os animais que não apresentaram a localização correta das cânulas foram descartados do estudo.

Para administração das drogas, os ratos foram imobilizados manualmente e, com um alicate, foi retirado o mandril adaptado à cânula durante o ato cirúrgico. As drogas foram infundidas através de uma agulha injetora conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA), a uma micro-seringa de Hamilton 701 N (10 µl). As agulhas injetoras utilizadas foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais odontológicas, sendo estas 1,0 mm maiores que a cânula. Em cada animal foi injetado um volume de 2 µl, num período de 30 s, permanecendo a agulha na cânula por mais 30 s.

## **Equipamentos e avaliação comportamental**

### Avaliação experimental do possível efeito ansiolítico/ansiogênico

#### *Labirinto em cruz elevado*

O LCE é um modelo de ansiedade baseado na aversão natural de roedores por espaços abertos (LISTER, 1987). O aparelho consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), todos opostos entre si, em forma de cruz, ligados por uma plataforma central (5 x 5 cm) e elevados a 45 cm do chão. Os braços abertos são circundados por um anteparo (0,25 cm de altura) para evitar a queda dos animais. O LCE é construído em acrílico, sendo que as paredes laterais foram confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. Os testes realizados no LCE foram feitos em uma sala com isolamento sonoro e pouco iluminada (luz vermelha de 15 W).

Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (EA e TA, respectivamente) e fechados (EF e TF, respectivamente) do equipamento, sendo que o número de entradas nos braços fechados foi utilizado como medida de avaliação da atividade locomotora (para uma revisão ver FILE, 2001). A entrada em um dos braços só foi considerada quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço. O número total de entradas e o tempo total gasto foi obtido pela soma do número de entradas e pelo tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto.

Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas dos braços abertos foi calculada dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas e este índice foi multiplicado por 100 ( $[(EA/EA + EF) \times 100]$ ). 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 ( $[(TA/TA + TF) \times 100]$ ). Os percentuais de tempo de permanência e do número de entradas nos braços abertos foram os parâmetros adotados para detectar modificações na ansiedade, que, acredita-se, refletir a inibição induzida pelo medo de entrar nos braços abertos e, deste modo, pode estar relacionado com o nível de ‘ansiedade’ experienciado pelo animal (RODGERS e DALVI, 1997). De maneira geral, substâncias ansiolíticas como os benzodiazepínicos, aumentam o tempo de permanência e/ou o número de entradas nos braços abertos e o contrário é verdadeiro para substâncias com efeito do tipo ansiogênico, como o pentilenotatrazol e as  $\beta$ -carbolinas (LISTER, 1987; RODGERS *et al.*, 1995).

Foram registradas, também, no LCE medidas etológicas de avaliação, como o número de comportamentos de auto-limpeza, o número de imersões de cabeça, número de estiramentos corporais, medidas estas relacionadas com o comportamento de avaliação de risco (RODGERS *et al.*, 1997). Rodgers e colaboradores (1999) mostraram haver uma correlação entre o número de estiramentos corporais e a elevação dos níveis de corticosterona plasmática no teste do labirinto em cruz elevado, fato este interessante pois relaciona um comportamento de avaliação de risco com a exposição a uma situação aversiva. Todos estes parâmetros foram registrados durante um período de 5 min após os diferentes tratamentos, como especificado adiante.

Os procedimentos realizados no LCE, ocorreram no período vespertino entre 13:00 e 17:00 h e, antecedendo os experimentos, os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma ante-sala do laboratório por um período de, no mínimo, 1 h. As sessões experimentais foram realizadas em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e foram gravadas por um VCR Philco PVC-4H10 conectado a uma câmara de vídeo localizada a 2 m do chão para serem, posteriormente, analisados. Após a avaliação comportamental de cada animal, o aparelho foi limpo com solução de etanol a 10 %. É importante ressaltar que o experimentador não permanecia na sala durante a realização dos testes experimentais.

#### *Teste do rota-rod*

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rota-rod, desenvolvido originalmente por Dunham e Miya (1957). O aparelho consiste de um cilindro horizontal de 2,5 cm de diâmetro, colocado a 40 cm de altura e girando, com o auxílio de um motor elétrico, a 12 r.p.m.. Após o teste do LCE, os camundongos foram colocados na barra giratória do aparelho por 1 min, onde foi registrado o número de quedas e o tempo de permanência (em s) na barra.

#### *Avaliação da temperatura retal*

A avaliação da temperatura retal ocorreu imediatamente antes do tratamento i.c.v. da droga (T0) e após a realização do teste do rota-rod (T1), com a utilização de um termômetro digital. Os camundongos foram imobilizados manualmente para a inserção anal do *probe* do termômetro, em cerca de 3 cm, seguindo a realização de 3 leituras da temperatura corpórea do animal, respeitando um intervalo de 1 min entre cada uma delas. A partir das 3 leituras obteve-se as médias de T0 e T1 que foram utilizadas para calcular a diferença de temperatura antes e após o tratamento ( $\Delta T = T1 - T0$ ) para cada animal. Para fins estatísticos e para a construção de tabelas foram utilizadas as médias dos valores de  $\Delta T$  expressos em ° C.

#### Avaliação experimental do possível efeito antidepressivo

##### *Natação forçada para camundongos*

O teste da natação forçada foi realizado em um cilindro de polietileno, medindo 18,5 cm de altura e 12,5 cm de diâmetro e contendo 13,5 cm de água à temperatura de  $25 \pm 1^\circ$  C. Os camundongos foram submetidos a uma sessão prévia de nado forçado por 15 min, 24 h antes do teste, sendo que o tratamento foi feito 5 min antes da re-submissão dos animais ao teste da natação forçada. O tempo que cada animal permaneceu imóvel (tempo de imobilidade), durante os 5 min de teste, foi registrado, sendo que os animais eram considerados imóveis quando cessavam de nadar e permaneciam flutuando, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da linha da água (PORSOLT *et al.*, 1977).

O tempo de imobilidade é considerado um comportamento que reflete a falta de persistência na fuga a uma situação aversiva e é também chamado de desespero comportamental (PORSOLT *et al.*, 1977). Fármacos antidepressivos, como a imipramina e a

desipramina, atuam seletivamente reduzindo o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TNF (PORSOLT *et al.*, 1977).

Após serem avaliados no TNF os camundongos foram secos com toalhas de papel e mantidos, por cerca de 30 min, em uma caixa aquecida com uma lâmpada de 40 W, sendo posteriormente recolocados nas suas gaiolas. Além disso, é interessante destacar que as sessões experimentais foram realizadas entre 9:00 e 12:00 h.

#### *Teste de suspensão pela cauda*

O teste da suspensão pela cauda (TSC) foi realizado de acordo com a descrição de Stéru e colaboradores (1985). Os camundongos foram presos com uma fita adesiva a 1 cm da ponta da cauda, a 50 cm do chão, distante, pelo menos, 30 cm de possíveis objetos que o circundavam. O teste foi realizado em uma sala acusticamente isolada e com baixa luminosidade e a quantidade de tempo que o animal permaneceu imóvel durante os 5 min em que ficou suspenso foi registrado (em s) como tempo de imobilidade. Algumas linhagens de camundongos, incluindo os Swiss, exibem tempo de imobilidade bastante baixo quando submetidos ao TSC (RIPOLL *et al.*, 2003) e, para aumentar o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TSC, estes foram previamente suspensos pela cauda (24 h antes) por 5 min seguindo os mesmos procedimentos descritos para o teste.

O tempo de imobilidade medido neste teste comportamental, assim como no teste da natação forçada, avalia o desespero comportamental, que reflete um estado de ‘depressão’, sensível ao tratamento com antidepressivos, como a imipramina e a desipramina (STERU *et al.*, 1985).

Os camundongos foram submetidos individualmente ao TSC 5 min após o tratamento i.c.v. e 30 min após as injeções intra-peritoneais, sendo que as sessões experimentais foram realizadas no período vespertino, entre 15:00 e 17:00 h.

#### *Caixa automática para avaliação da atividade locomotora de camundongos*

Em um grupo separado de experimentos, objetivando descartar drogas que poderiam estar alterando a locomoção dos animais avaliados no TNF e no TSC (BOURIN *et al.*, 2001), averiguou-se a atividade locomotora espontânea de camundongos tratados com as mesmas drogas testadas no TNF e no TSC. Cinco minutos após o tratamento i.c.v., os



camundongos foram colocados nas caixas de atividade automática (Ugo Basile, Itália) e foram avaliados por um período de 10 min.

As caixas medem 20 cm de largura, 30 cm de comprimento e 25 cm de altura, sendo que as paredes e o tampo são confeccionados em acrílico transparente, enquanto que o chão, é semelhante a uma grelha, feito por barras de aço inoxidável, que com a movimentação do animal, enviam informações elétricas para o aparelho leitor, que transforma estas informações em pulsos.

Os experimentos foram realizados entre 9:00 e 12:00 h em ambiente tranquilo e pouco iluminado. Após a medida da atividade locomotora de cada animal as caixas eram limpas com água e secas para a continuidade do experimento. A número de pulsos expresso pelo aparelho leitor em um período de 10 min foi utilizado para a confecção das médias e realização de testes estatísticos para cada grupo de animal.

#### *Natação forçada para ratos*

O teste da natação forçada consiste em colocar os ratos, individualmente, em um cilindro de acrílico de 46 cm de altura e 20 cm de diâmetro, com 30 cm de água à temperatura de 24-26° C, por 15 min (pré-teste), sendo que, 24 h mais tarde, estes ratos foram re-submetidos ao teste, mas desta vez, por apenas 5 min.

Porsolt e colaboradores (PORSOLT *et al.*, 1978) mostraram que quando os ratos são colocados no cilindro com água pela primeira vez (por um período de 15 min), permanecem mais tempo nadando e atingem um platô – média de 80 % de imobilidade por minuto – em cerca de 7 min. Além disso, foi relatado que uma única exposição de 15 min é suficiente para produzir um nível relativamente consistente de imobilidade no teste subsequente, sendo que a re-submissão do rato ao cilindro com água reproduz de maneira resumida o comportamento da primeira sessão (pré-teste), porém alcançando o platô de imobilidade já no terceiro minuto do teste (PORSOLT *et al.*, 1978).

Três parâmetros comportamentais, previamente mostrados serem replicáveis e validados para a detecção de drogas de efeito antidepressivo, foram utilizados no teste da natação forçada, apenas no segundo dia de teste (5 min) e os parâmetros foram registrados cumulativamente (DETKE *et al.*, 1995) e são eles: (1) tempo de imobilidade, ou seja, o tempo que o animal permaneceu flutuando, fazendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água; (2) tempo de natação, que é quando o animal se movimenta ativamente e gira ao redor do cilindro e (3) tempo de escalada, que é o registro do tempo que o rato tenta

escalar as paredes do cilindro utilizando-se das patas dianteiras. (PORSOLT *et al.*, 1978) e colaboradores mostraram que fármacos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade de ratos no TNF, mas um outro estudo propôs que um aumento na neurotransmissão noradrenérgica pode mediar o comportamento de escalada, pois inibidores da recaptação de noradrenalina (ex.: desipramina), elevam o tempo despendido em escalar as paredes do cilindro, enquanto que um aumento na neurotransmissão serotoninérgica estaria relacionado com o tempo de natação, sendo que no tratamento com fluoxetina, ocorre elevação do tempo de natação dos ratos submetidos ao TNF (DETKE *et al.*, 1995).

O teste da natação forçada ocorreu 5 min após o tratamento intracerebroventricular e 30 min após a injeção intraperitoneal, além disso, os procedimentos experimentais foram realizados sempre no período matutino, entre 9:00 e 12:00 h. No final de avaliação comportamental de cada animal (primeiro e segundo dia), a água do cilindro foi substituída completamente e os animais foram removidos do cilindro, foram secos em toalhas de papel e colocados em caixas aquecidas com uma lâmpada de 40 W para descansar por, pelo menos, 30 min, sendo posteriormente recolocados em suas caixas plásticas.

#### *Arena para avaliação da atividade locomotora de ratos*

Em outra série de experimentos, objetivando avaliar os possíveis efeitos na atividade locomotora espontânea dos ratos, utilizou-se a arena (60 x 60 x 35 cm). Este equipamento foi construído em acrílico, sendo o chão de cor preta e dividido em 9 quadrados (20 x 20 cm), enquanto que as paredes são transparentes. Cinco minutos após a injeção i.c.v. o rato foi colocado no centro da arena e a movimentação espontânea do animal foi avaliada através do número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo. O experimento foi realizado sob luz vermelha de 15 W, entre 9:00 e 12:00 h e o equipamento foi limpo com solução de etanol (10 %) após a avaliação de cada animal.

### **Protocolo experimental**

O presente trabalho consistiu de duas etapas distintas, na **etapa A** o enfoque foi dado para o estudo da participação dos peptídeos NST, N/OFQ e seus derivados na

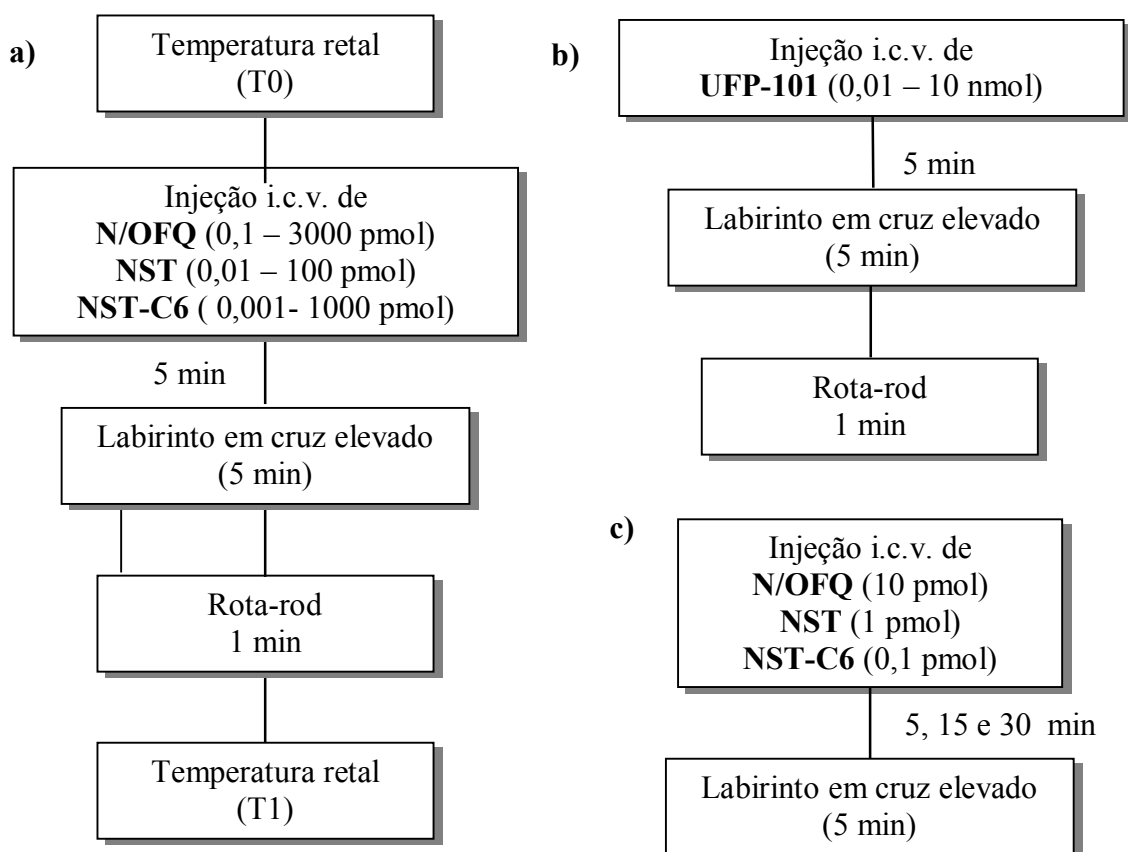
modulação da ansiedade experimental, enquanto que na **etapa B** objetivou-se determinar o envolvimento destes peptídeos na depressão experimental.

Para alcançar a meta proposta na **etapa A**, dividiu-se esta etapa em 3 fases. Primeiramente, na **fase 1** avaliou-se o efeito da injeção i.c.v. de N/OFQ (0,1 – 3000 pmol), NST (0,01 - 100 pmol), NST-C6 (0,001 – 1000 pmol) e UFP-101 (0,01 – 10 nmol) em camundongos submetidos ao LCE e ao teste do rota-rod (Esquema 1a e 1b), sendo que os animais que receberam o tratamento com N/OFQ, NST e NST-C6 foram também submetidos a avaliação da temperatura retal (Esquema 1a), imediatamente antes do tratamento central e após o teste do rota-rod. Outros animais receberam injeções centrais de DZP (7 nmol) ou PTZ (200 nmol), como substância de referência do efeito ansiolítico e ansiogênico, respectivamente, 15 min antes do LCE. Além disso, visando verificar a evolução temporal do efeito da N/OFQ, NST e NST-C6 no modelo de ansiedade, submeteu-se os animais 5, 15 e 30 min após a injeção i.c.v. no LCE (Esquema 1c).

### ESQUEMA 1

#### Procedimento experimental – Etapa A

##### Fase 1

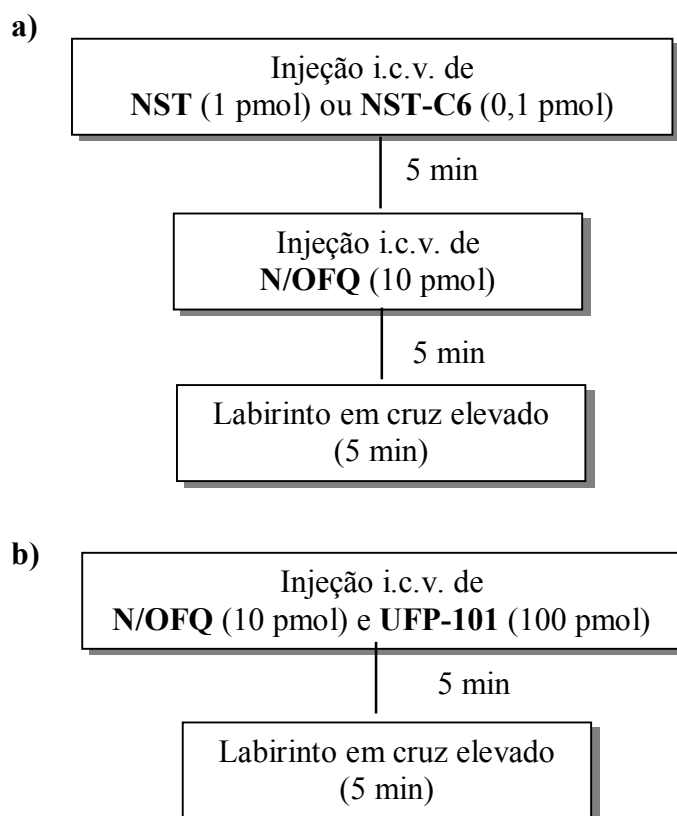


Por outro lado, na **fase 2** com o intuito de determinar a interação entre a atividade dos peptídeos NST e NST-C6 na resposta induzida pela N/OFQ, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com NST (1 pmol) e NST-C6 (0,1 pmol) 5 min antes do tratamento com N/OFQ (10 pmol) em camundongos submetidos ao LCE (Esquema 2a). Além disso, objetivando estudar a participação do receptor NOP na atividade da N/OFQ em um modelo de ansiedade, avaliou-se o efeito de um tratamento único com N/OFQ e UFP-101, nas doses de 10 pmol e 100 pmol, respectivamente, em camundongos submetidos 5 min após a injeção central ao LCE (Esquema 2b).

## ESQUEMA 2

### Procedimento experimental – Etapa A

#### Fase 2

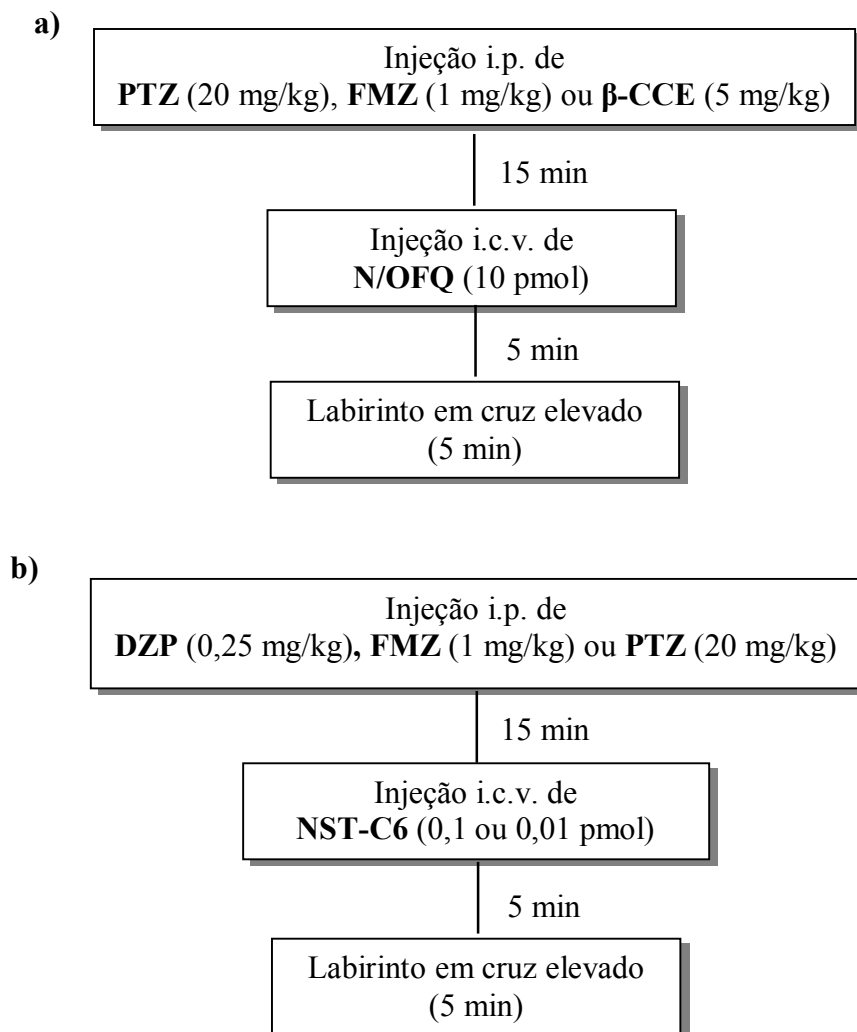


Na **fase 3**, porém, em prol de estudar o mecanismo de ação da N/OFQ e da NST na modulação da ansiedade experimental, avaliamos a participação do sistema GABAérgico na atividade destes peptídeos no LCE em camundongos. Iniciou-se com o estudo do efeito do pré-tratamento i.p. com PTZ (20 mg/kg),  $\beta$ -CCE (5 mg/kg) e FMZ (1 mg/kg) 15 min antes da administração central de N/OFQ (10 pmol) realizado a 5 min do teste do LCE (Esquema 3a). Com relação a NST, foram averiguados os efeitos comportamentais do pré-tratamento i.p. com PTZ (20 mg/kg), DZP (0,25 mg/kg) e FMZ (1 mg/kg) 15 min antes da injeção i.c.v. de NST-C6 (0,1 ou 0,01 pmol) em camundongos submetidos ao LCE (Esquema 3b).

### ESQUEMA 3

#### Procedimento experimental – Etapa A

##### Fase 3



Na **etapa B**, estudou-se o envolvimento dos peptídeos N/OFQ, NST e seus derivados na modulação da depressão experimental, dividindo-se esta etapa, também, em 3 fases. A **fase 1** caracterizou-se pela realização de *screenings* de peptídeos relacionados a N/OFQ e NST em um modelo utilizado para avaliação de atividade antidepressiva. Deste modo, estudou-se o efeito da injeção i.c.v. de N/OFQ (0,1 – 1000 pmol), NST-C6 (0,001 – 1000 pmol), [Nphe<sup>1</sup>] N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (3 – 30 nmol) e UFP-101 (1 – 10 nmol) em camundongos injetados 5 min antes da avaliação no TNF (Esquema 4a), enquanto que em uma outra série de experimentos, determinou-se o efeito do UFP-101 (1 – 10 nmol) na atividade locomotora de camundongos tratados 5 min antes de serem colocados na caixa de atividade automática (Esquema 4b).

Prosseguiu-se com o estudo, averiguando a participação dos receptores NOP na resposta do UFP-101, através da avaliação do efeito induzido pelo tratamento de UFP-101 (10 e 3 nmol) associado a N/OFQ (1 nmol) em camundongos submetidos ao TNF (Esquema 4c).

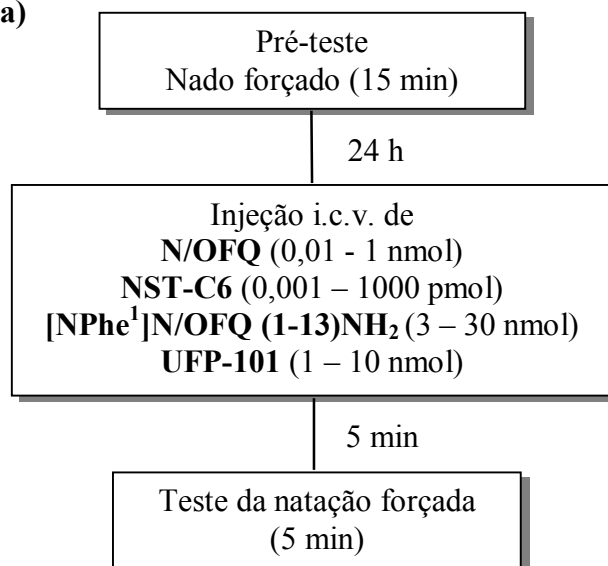
Ainda na **fase 1** da etapa B, estudamos o comportamento espontâneo de camundongos *knockout* para o receptor NOP e seus respectivos controles no TNF. Após uma semana, os mesmos camundongos foram submetidos a caixa de atividade automática, visando determinar a atividade locomotora espontânea dos camundongos *knockout* e *wild-type* para o receptor NOP. Ainda no TNF, avaliamos o efeito do tratamento com UFP-101 (10 nmol) em mutantes e não mutantes para o receptor NOP, 5 min após a injeção i.c.v. (Esquema 4d).

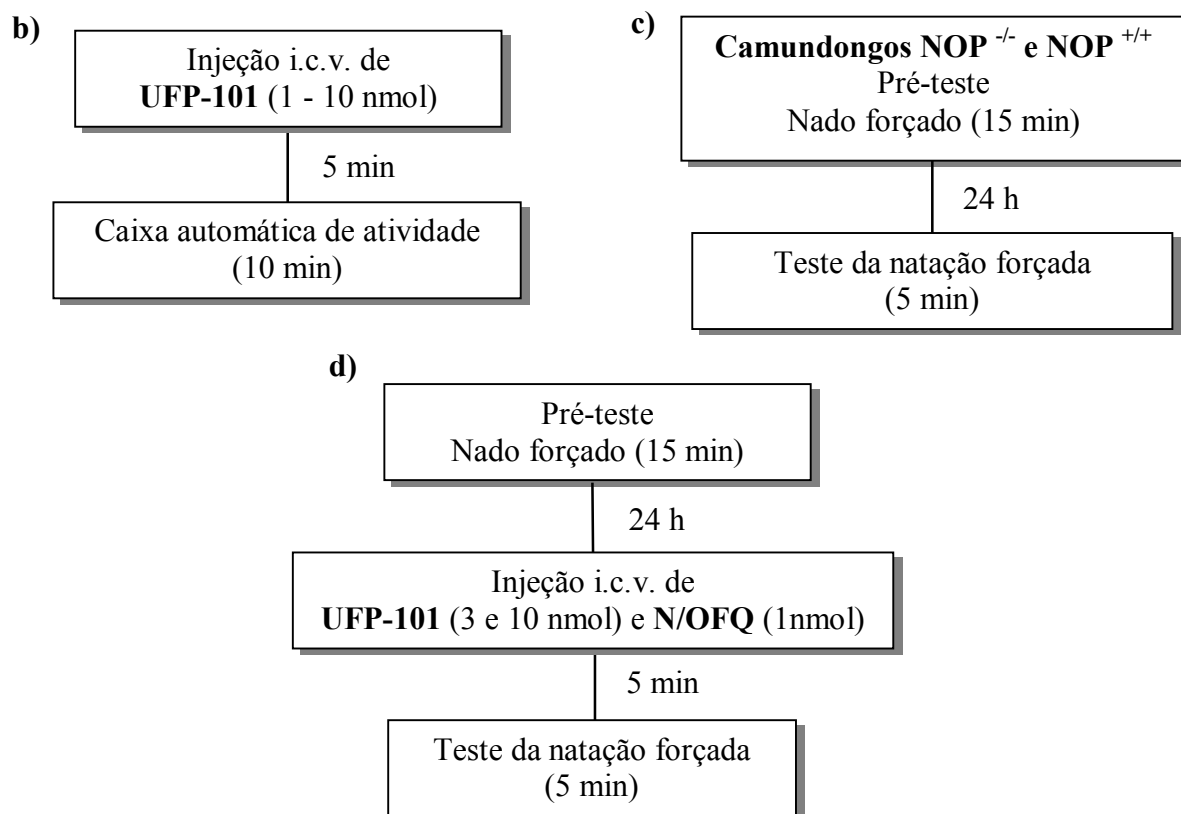
#### ESQUEMA 4

##### Procedimento experimental – Etapa B

##### Fase 1

a)





Na **fase 2**, objetivou-se estudar o efeito do UFP-101 em outro teste comportamental utilizado para avaliar a atividade de drogas antidepressivas, o teste de suspensão pela cauda em camundongos. Além disso, testou-se o efeito do UFP-101 em outra espécie de roedor, o rato, utilizando o modelo de natação forçada.

Primeiramente, padronizou-se o TSC com antidepressivos clássicos, como a imipramina (15 mg/kg), a fluoxetina (30 mg/kg) e a desipramina (30 mg/kg), injetados 30 min antes da avaliação experimental. Prosseguiu-se com o estudo do efeito da injeção i.c.v. de N/OFQ (0,01 - 1 nmol) e UFP-101 (1 - 10 nmol) 5 min antes do TSC em camundongos (Esquema 5a). Avaliou-se a participação do receptor NOP na resposta induzido por UFP-101 através do efeito da co-injeção de N/OFQ (1 nmol), agonista endógeno do receptor NOP, e UFP-101 (10 nmol) em camundongos no TSC (Esquema 5b). Além disso, estudou-se o comportamento espontâneo de camundongos mutantes para o receptor NOP e dos seus respectivos controles no TSC (Esquema 5c).

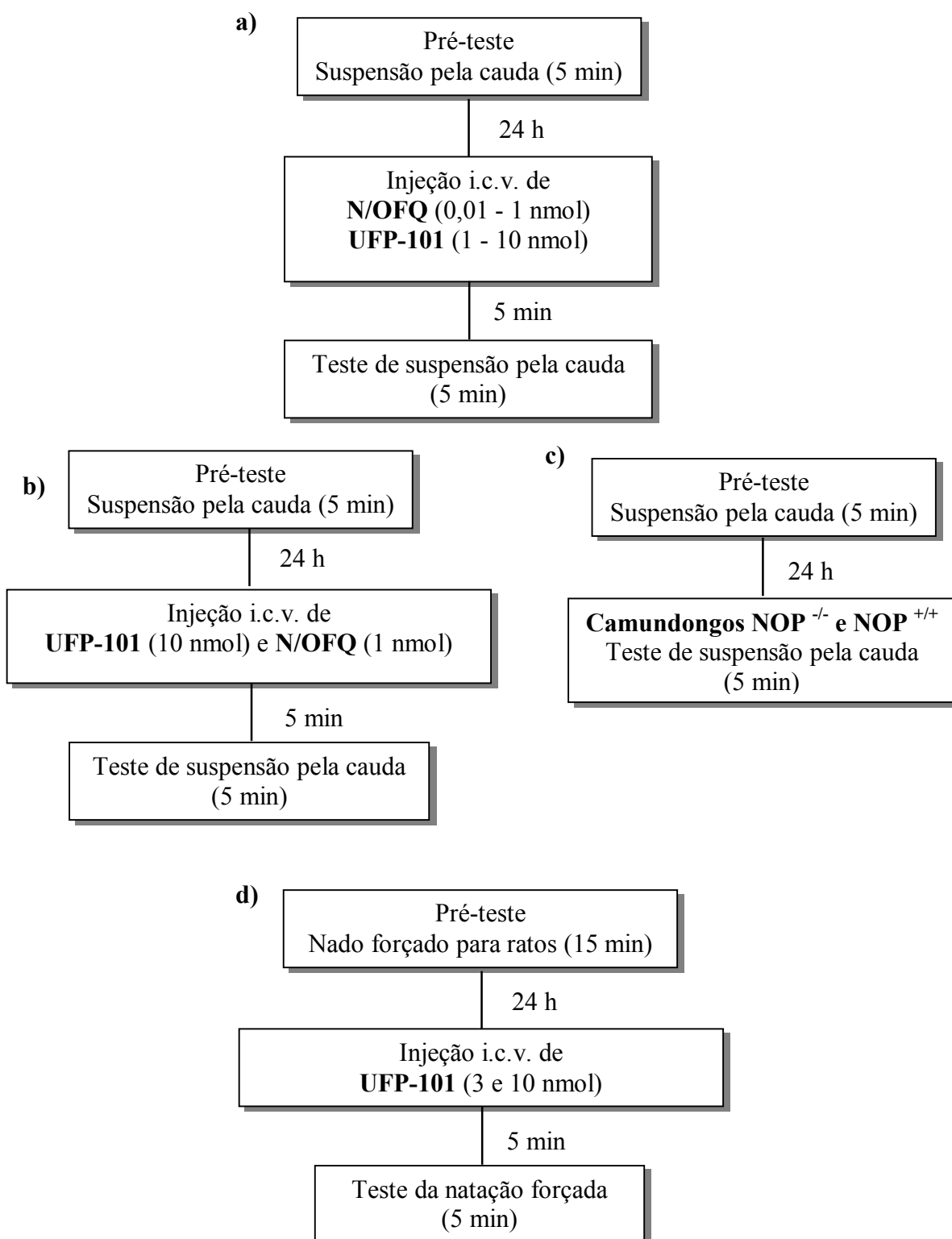
O teste da natação forçada para ratos foi padronizado com a desipramina (30 mg/kg) injetada i.p. 30 min antes da avaliação comportamental. Seguiu-se com o estudo do efeito do UFP-101 (3 e 10 nmol) injetado no ventrículo lateral de ratos 5 min antes do TNF. Em outra série de experimentos, averiguou-se o efeito do UFP-101 (10 nmol)

intracerebroventricularmente injetado na atividade locomotora espontânea de ratos submetidos à arena (Esquema 5d).

### ESQUEMA 5

#### Procedimento experimental – Etapa B

#### Fase 2





Por outro lado, na **fase 3**, realizou-se testes preliminares que visavam o estudo da participação de monoaminas na atividade antidepressiva induzida pelo UFP-101. Primeiramente, objetivando avaliar o envolvimento da noradrenalina, utilizou-se o DSP-4 (JAIM-ETCHEVERRY e ZIEHER, 1980), uma neurotoxina noradrenérgica, que foi administrada em uma única dose de 50 mg/kg, i.p., 7 dias antes do tratamento com UFP-101 (10 nmol) em camundongos submetidos ao TNF, e para evitar a lesão dos neurônios serotoninérgicos, 30 min antes da injeção de DSP-4 foi realizada o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg, i.p.; JONSSON *et al.*, 1981). Para determinar a seletividade de resposta do DSP-4, no dia do teste camundongos foram tratados com os antidepressivos desipramina (30 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (30 mg/kg, i.p.), que atuam inibindo a recaptação seletiva de noradrenalina e serotonina, respectivamente (Esquema 6a).

No entanto, para a avaliação da participação do sistema serotoninérgico na resposta do UFP-101, os camundongos foram tratados uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos com PCPA, um inibidor da síntese de serotonina (SANDERS-BUSH *et al.*, 1972), sendo que no dia do teste, os animais foram injetados com o PCPA 40 min antes do tratamento i.c.v. de UFP-101 e, após 5 min, foram submetidos ao TNF. Do mesmo modo que no tratamento com o DSP-4, objetivando determinar a seletividade da ação do PCPA, no dia do teste camundongos foram injetados com desipramina (30 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (30 mg/kg, i.p.), 30 min antes da avaliação comportamental no TNF (Esquema 6b).

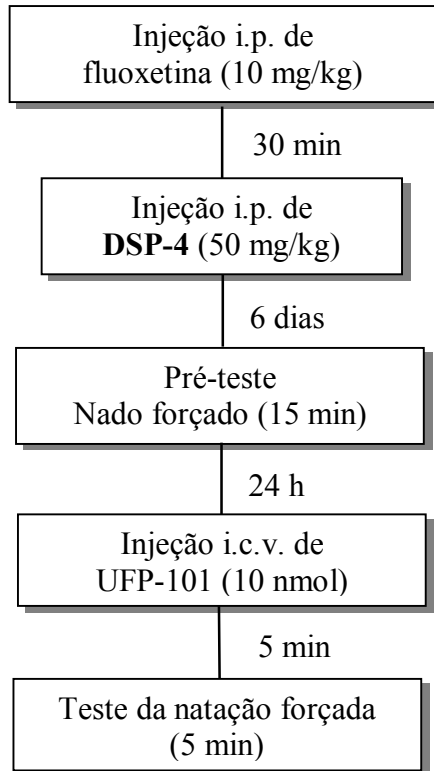
É importante destacar que os animais controle foram sempre tratados somente com o veículo PBS, para as injeções i.c.v., e solução fisiológica de NaCl 0,9 %, para os tratamentos i.p., e testados em paralelo com os animais tratados com drogas.

## ESQUEMA 6

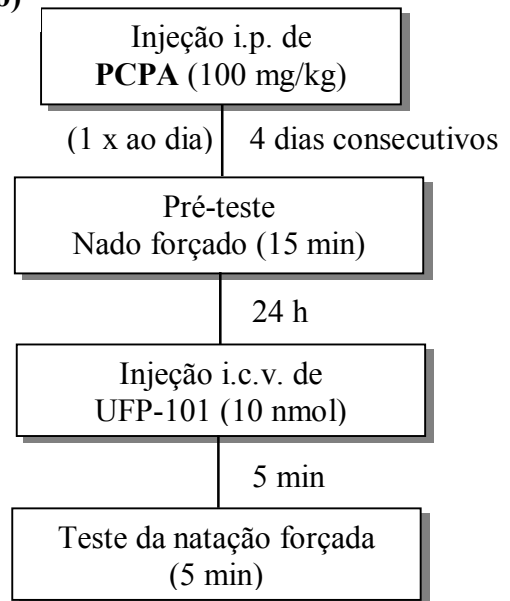
### Procedimento experimental – Etapa B

#### Fase 3

a)



b)



## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com a realização dos protocolos experimentais foram analisados pelo software Graphpad INSTAT (versão 2.05) e STATISTICA (versão 6,0). Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett para a verificação da homogeneidade das variâncias e na ocorrência de valores não homogêneos ( $p < 0,05$ ), estes foram transformados pelo logaritmo, com o objetivo de homogeneizar a amostra ou foi utilizado um teste não paramétrico. Todos os dados apresentados em tabelas ou na forma de gráficos foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.

No caso de 3 ou mais amostras, os dados foram submetidos ao teste de análise da variância (ANOVA) de uma via, quando havia apenas uma variável independente, e ANOVA de duas vias, para duas variáveis independentes. Caso as diferenças entre os grupos fossem consideradas significantes, aceitando  $p < 0,05$  como o nível de significância aceitável, aplicou-se o teste *post-hoc* de Dunnett (precedido da ANOVA de uma via) e Duncan (para os casos em que foi realizada a ANOVA de duas vias) para determinar a diferença estatística entre os grupos. Nos casos, porém, de apenas 2 amostras foi utilizado o teste *t* de Student não-pareado bicaudal, conforme indicado nas legendas das figuras.

## ***RESULTADOS***

## RESULTADOS

### PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA N/OAQ - RECEPTOR NOP NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EXPERIMENTAL

#### **Avaliação do efeito da NST, NST-C6, N/OAQ e do UFP-101 no LCE**

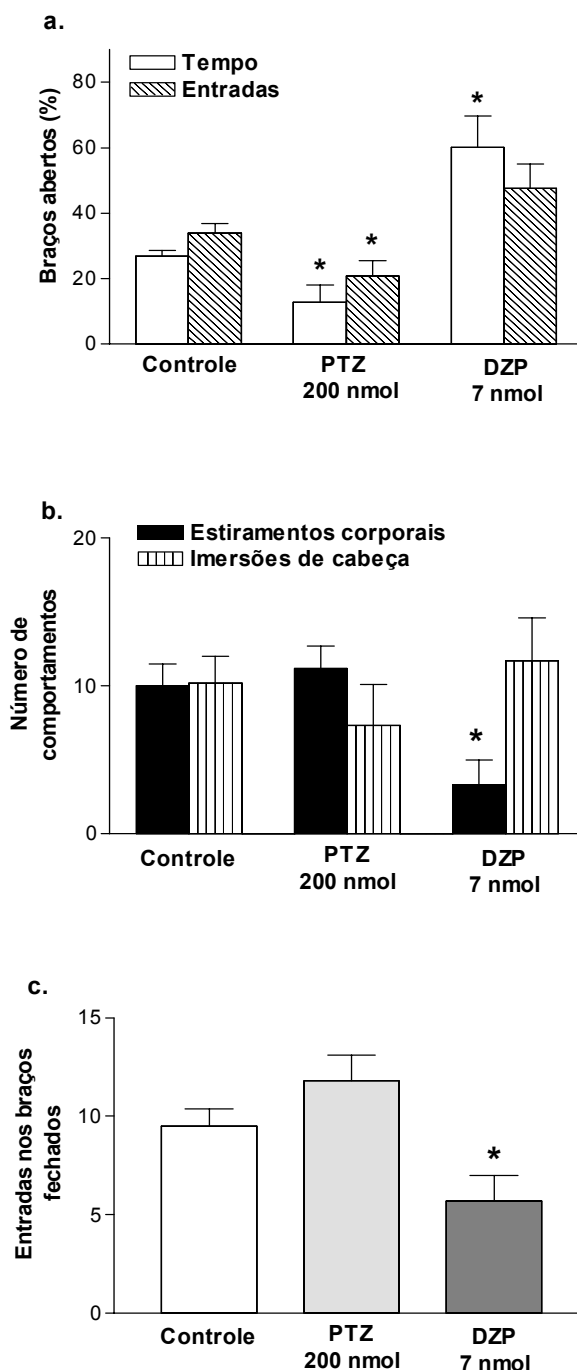
O efeito de substâncias de referência para a ação do tipo ansiogênica e ansiolítica estão representadas na figura 5 e na tabela 1. A replicação dos comportamentos ansiogênico e ansiolítico induzidos pela injeção i.c.v. de PTZ (200 nmol) e DZP (7 nmol), respectivamente, em camundongos submetidos ao LCE, é de grande importância, pois valida as condições experimentais utilizadas neste estudo.

Como mostrado na figura 5, a administração i.c.v. de PTZ (200 nmol), ansiogênico padrão, reduziu a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 4a;  $t = 3,07$  e  $t = 3,37$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos) e o tempo de permanência nos braços abertos, medido em segundos (Tabela 1;  $p < 0,05$ ), sem causar modificação da atividade locomotora e da coordenação motora destes animais, avaliado pelo número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 5c;  $p > 0,05$ ) e pelos parâmetros comportamentais do teste do rota-rod (Tabela 1).

A injeção i.c.v. de DZP (7 nmol), droga ansiolítica de referência, como esperado aumentou a porcentagem de tempo (Fig. 5a;  $t = 3,61$ ;  $p < 0,05$ ) e o tempo de permanência (em s; Tabela 2;  $P < 0,05$ ) nos braços abertos do LCE, além de reduzir o número de estiramentos corporais (Fig. 5b;  $t = 2,81$ ;  $p < 0,05$ ). É importante, porém, destacar que o tratamento com DZP (7 nmol) aumentou a exploração dos braços abertos, mesmo diminuindo a atividade geral dos animais, como visto pela redução do número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 5c;  $t = 2,46$ ;  $p < 0,05$ ), efeito já descrito na literatura (DALVI e RODGERS, 1999), porém sem causar prejuízo da coordenação motora, como mostrado na Tabela 1.

Objetivando estudar a participação dos peptídeos derivados da ppN/OAQ na modulação da ansiedade experimental, avaliou-se o efeito da injeção i.c.v. de N/OAQ (0,1 – 1000 pmol), agonista endógeno do receptor NOP, NST (0,01 - 100 pmol), peptídeo derivado da clivagem da ppN/OAQ, NST-C6 (0,001 – 1000 pmol), porção C-terminal da NST, e UFP-

101 (0,01 – 10 nmol), antagonista do receptor NOP, em camundongos submetidos ao LCE e ao teste do rota-rod.



**Figura 5** - Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ 200 nmol e DZP 7 nmol na (a) porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do LCE, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 9 animais (\* $p < 0,05$ ; teste  $t$  de Student para amostras não-pareadas bicaudal).

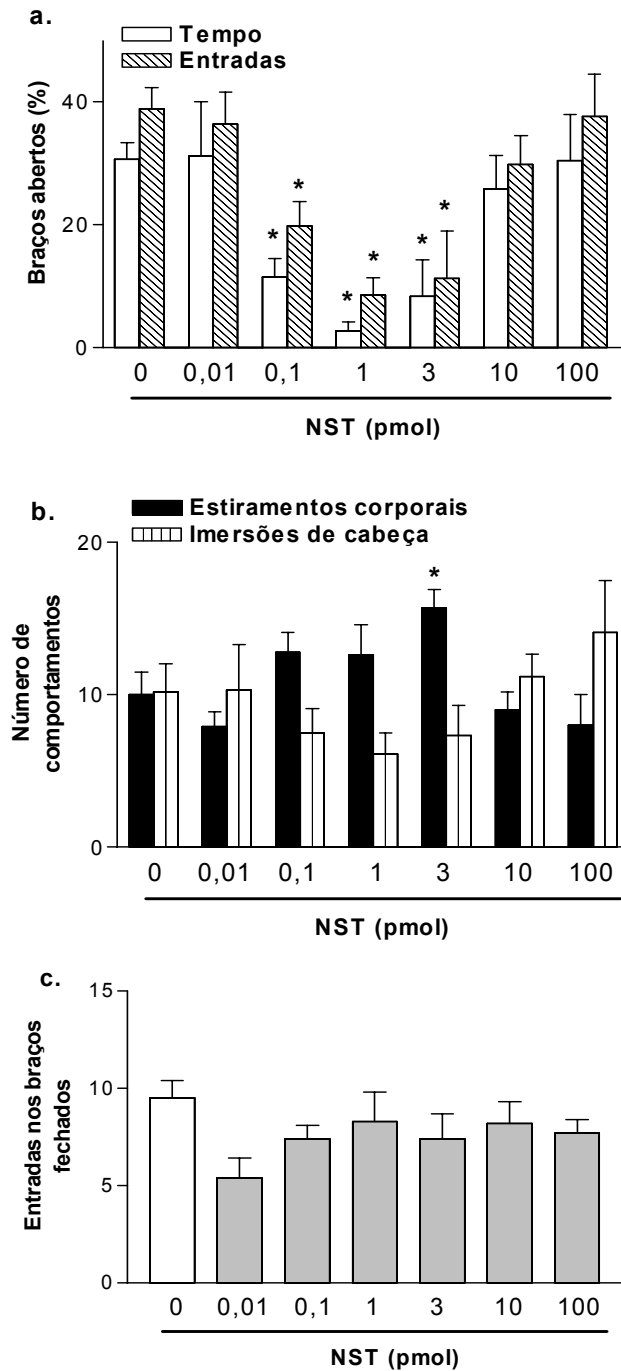
A administração i.c.v. de NST em doses que variaram entre 0,01 - 100 pmol, diminuiu a porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do LCE nas doses de 0,1 a 3 pmol em camundongos (Fig. 6a;  $F_{(6,58)} = 4,70$  e  $F_{(6,58)} = 5,92$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos) e, também, como descrito na tabela 1, na mesma faixa de doses a NST reduziu o tempo gasto e o número de entradas nos braços abertos do LCE ( $P < 0,05$  para ambos os parâmetros), sugerindo um efeito do tipo ansiogênico para a NST. Além disso, a administração de NST 3 pmol aumentou o número de estiramentos corporais (Fig. 6b;  $F_{(6,58)} = 3,40$ ;  $P < 0,05$ ), e nas doses testadas nenhuma alteração da atividade locomotora e da coordenação motora foram averiguadas, o que também corrobora com a ação do tipo ansiogênica descrita para a NST (Fig. 6c e Tabela 1).

Como mostrado na Figura 7, resultados qualitativamente similares foram obtidos com o fragmento C-terminal da NST (NST-C6), que também reduziu a porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, nas doses de 0,01 a 100 pmol (Fig. 7a;  $F_{(7,64)} = 20,35$ ;  $P < 0,05$  e  $F_{(7,64)} = 8,74$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos), bem como reduziu o número de imersões de cabeça em camundongos tratados com NST-C6, em doses que variaram entre 0,01 e 1 pmol (Fig. 7b;  $F_{(7,64)} = 3,90$ ,  $p < 0,05$ ). Além disso, como mostrado na tabela 1, a NST-C6 (0,01 – 10 pmol) reduziu o tempo de permanência e o número de entradas dos camundongos nos braços abertos do LCE, sem causar modificação no número de entradas nos braços fechados e nos parâmetros comportamentais avaliados no teste do rota-rod (Fig. 7c e Tabela 1).

Tanto a NST íntegra como o seu fragmento C-terminal exibem curvas dose-resposta em forma de U, com resposta máxima a 1 e 0,1 pmol respectivamente, sendo que a injeção de NST e NST-C6 em altas doses (maiores de 100 pmol) induziu progressiva perda da atividade farmacológica no LCE (Fig. 6a e 7a).

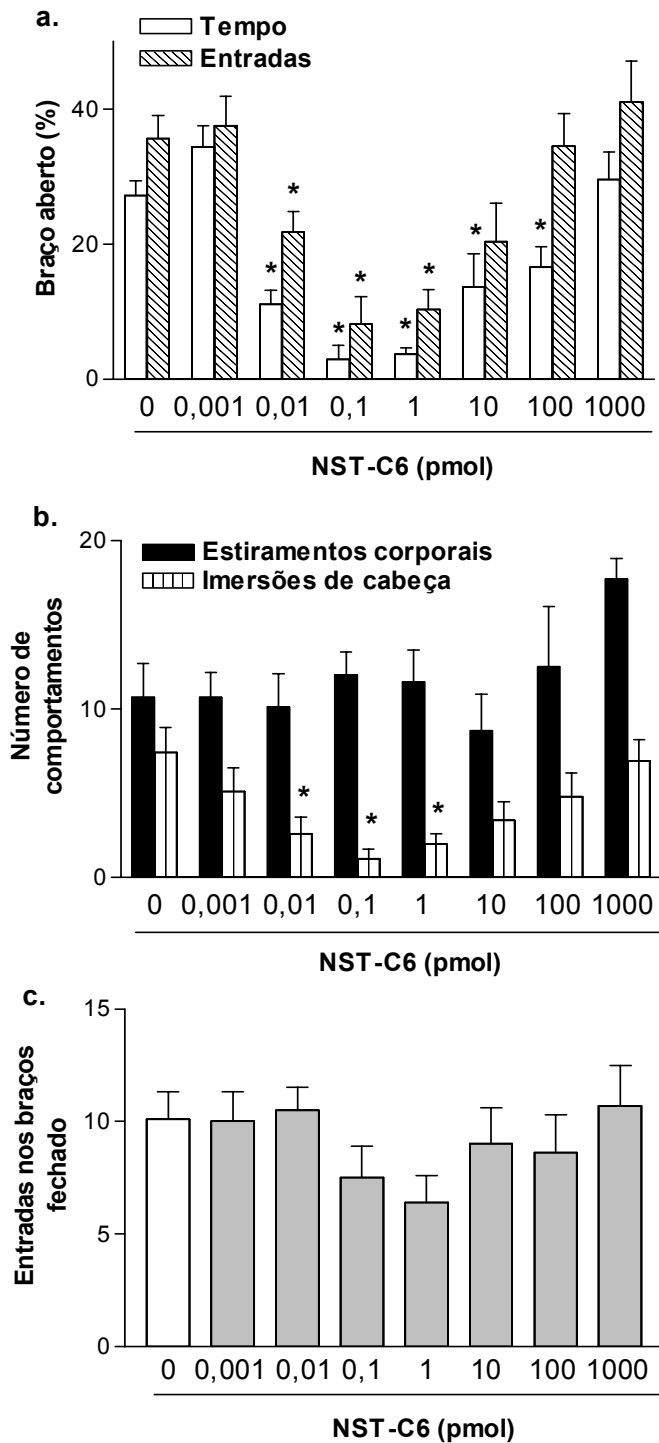
Os nossos dados também mostram que a N/OFQ, agonista do receptor NOP, quando injetada centralmente, induziu efeito do tipo ansiolítico em camundongos submetidos ao LCE. A injeção i.c.v. de N/OFQ, nas doses de 10 e 100 pmol, aumentou a porcentagem de tempo gasto e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, exibindo uma curva dose-resposta em forma de sino, com efeito máximo a 10 pmol (Fig. 8a;  $F_{(5, 49)} = 7,98$  e  $F_{(5, 49)} = 17,21$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos). Além disso, o tratamento i.c.v. com N/OFQ (10 pmol) elevou o número de estiramentos corporais (Fig. 8b;  $F_{(5, 49)} = 4,73$ ;  $p < 0,05$ ), o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos do LCE (Tabela 1;  $p < 0,05$  para ambos os casos), enquanto que, a injeção de N/OFQ (1 pmol) reduziu o número de

imersões de cabeça (Fig. 8b;  $F_{(5, 49)} = 4,24$ ;  $p < 0,05$ ), o que corrobora para a ação do tipo ansiolítica induzida pela N/OFQ.

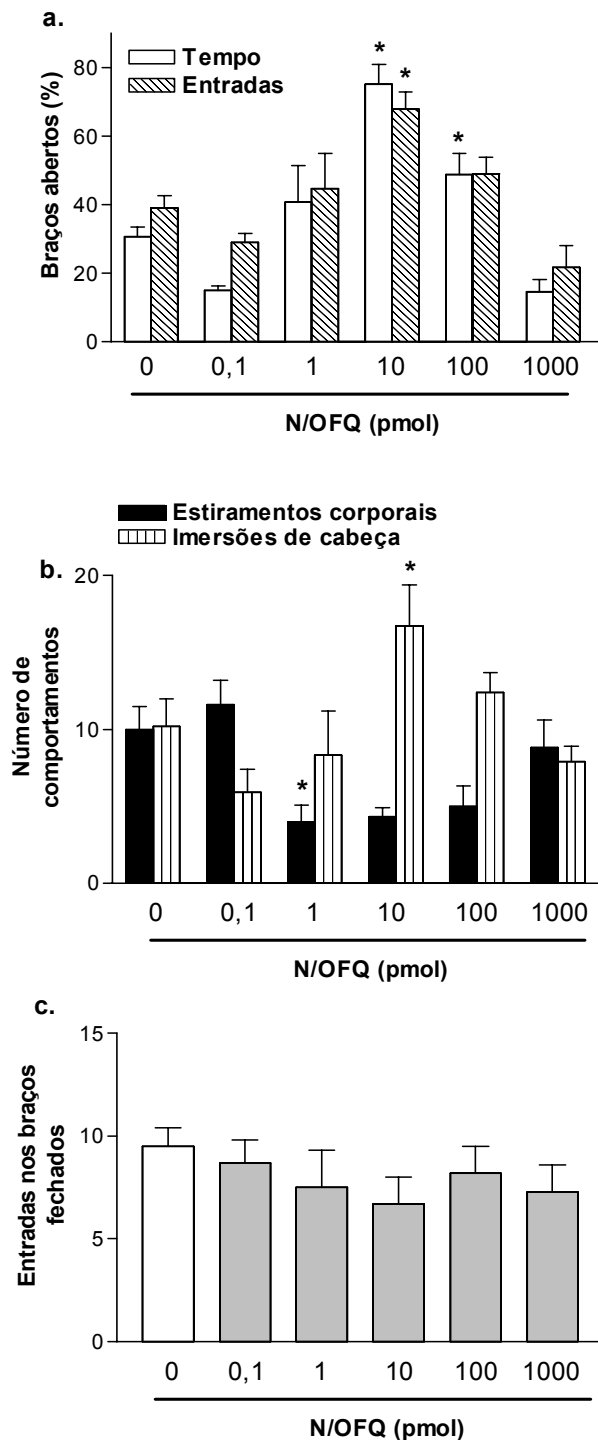


**Figura 6** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST na (a) porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 11 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).





**Figura 7** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST-C6 na (a) porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 11 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

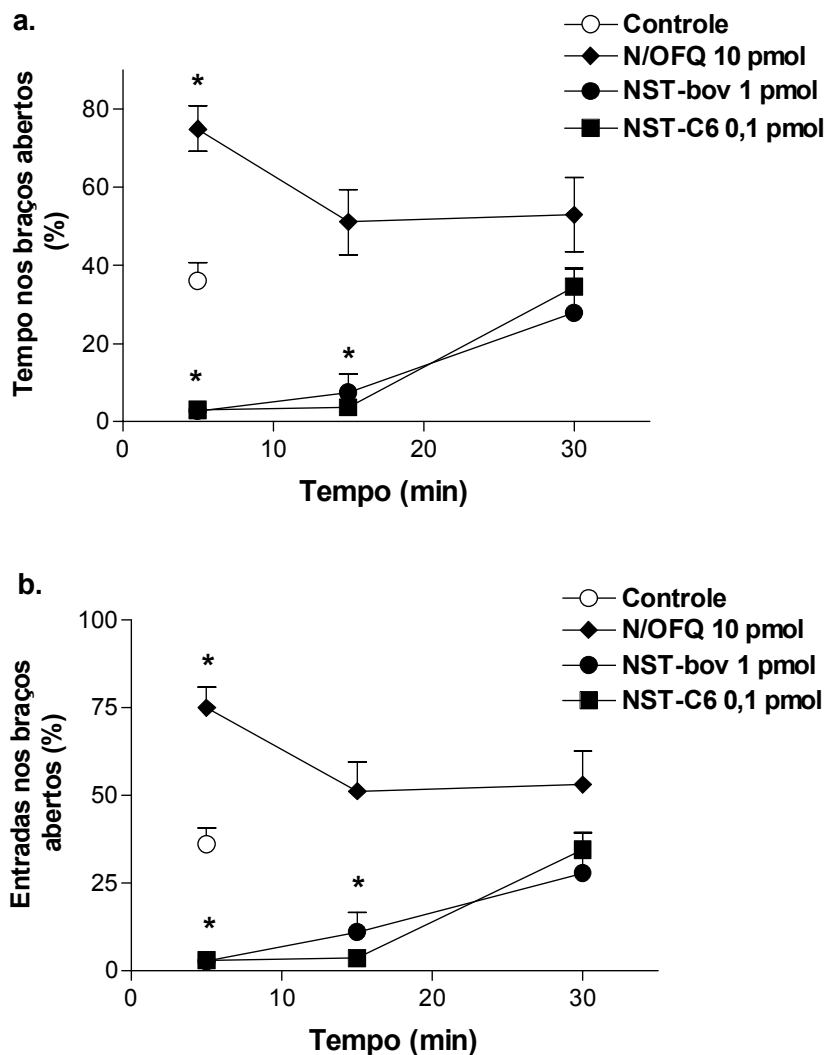


**Figura 8** - Efeito do tratamento i.c.v. com N/OFQ na (a) porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 7 e 12 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

É importante salientar que a N/OFQ não modificou a performance motora no teste rota-rod em camundongos tratados com a dose que causou efeito do tipo ansiolítico (10 pmol), mas nas doses de 100, 1000 e 3000 pmol, a N/OFQ aumentou significativamente o número de quedas e diminuiu o tempo de permanência na barra giratória do rota-rod (Tabela 2), como previamente descrito (REINSCHEID *et al.*, 1995). Além disso, em altas doses (1000 e 3000 pmol) a N/OFQ induziu esporadicamente tremores musculares e redução da temperatura corpórea dos camundongos (Tabela 2;  $F_{(4,32)}= 14,74$ ;  $p<0,05$ ), mas em doses mais baixas, incluindo as doses que induziram efeito ansiolítico, nenhuma alteração na temperatura corpórea foi observada (Tabela 2). Os animais tratados com NST e NST-C6 foram também submetidos a avaliação da temperatura retal, imediatamente antes do tratamento central e após o teste do rota-rod, porém, como descrito na tabela 2, nenhuma alteração foi observada na temperatura corpórea destes camundongos.

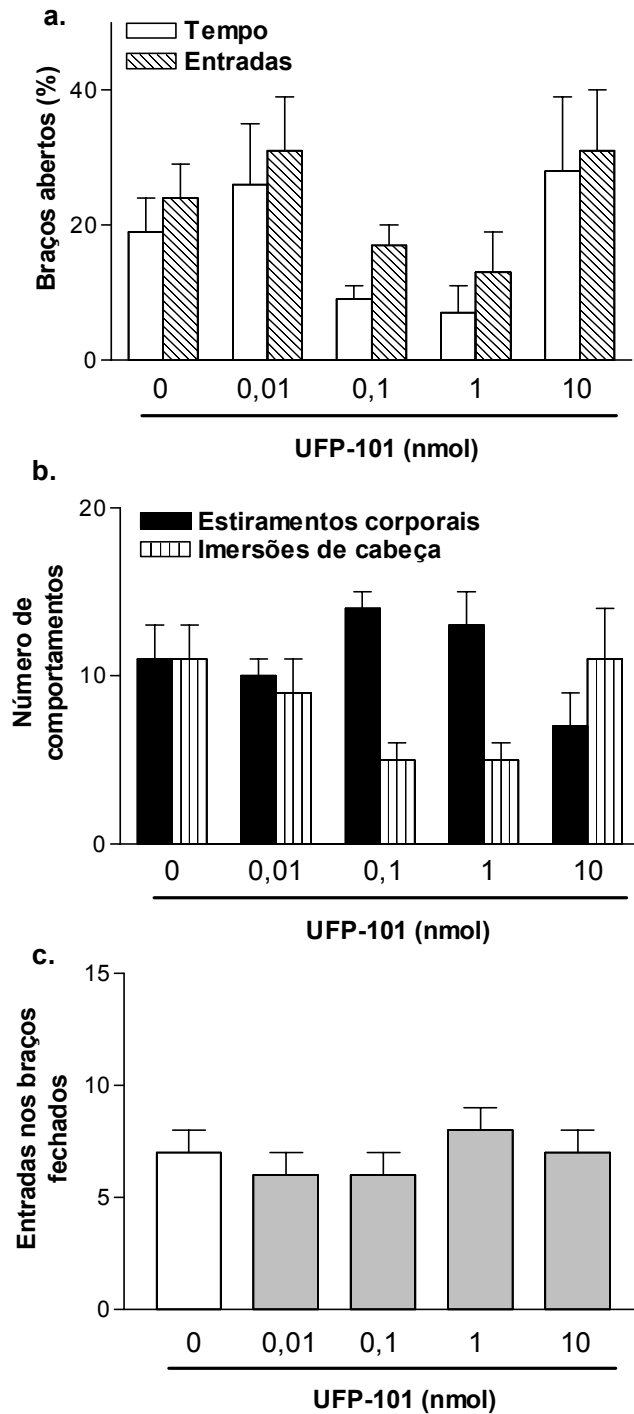
Visando verificar a evolução temporal do efeito da NST, NST-C6 e N/OFQ no LCE, avaliou-se comportamentalmente os camundongos após 5, 15 ou 30 min do tratamento i.c.v. com estes peptídeos no teste do LCE. As doses de NST, NST-C6 e N/OFQ que induziram o mais proeminente efeito comportamental (1, 0,1 e 10 pmol, respectivamente) foram selecionados para avaliar a performance em relação ao tempo. Como mostrado na figura 9, a NST e a NST-C6 ainda exercem efeito do tipo ansiogênico em animais testados no LCE 15 min após a injeção i.c.v., sendo que a intensidade da resposta do tipo ansiogênica a 15 min foi similar àquela vista a 5 min após o tratamento com a NST e a NST-C6. Nenhum efeito comportamental, porém, foi visto a 30 min após a injeção destes peptídeos (porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos  $F_{(3,28)}= 29,80$  e  $F_{(3,37)}= 18,64$ ; porcentagem de frequência de entradas nos braços abertos  $F_{(3,28)}= 24,30$  e  $F_{(3,37)}= 10,83$ , respectivamente;  $p<0,05$  em todos os casos).

A figura 9 mostra que animais testados a 15 e a 30 min após a administração de N/OFQ não apresentaram qualquer mudança comportamental quando comparados com os animais controles, sendo que o efeito da N/OFQ foi evidente, porém, apenas em animais testados no LCE 5 min após a injeção i.c.v. (porcentagem de tempo nos braços abertos  $F_{(3,26)}= 8,85$ ; porcentagem de entradas nos braços abertos  $F_{(3,26)}= 6,39$ ;  $p<0,05$  para ambos os casos).



**Figura 9** – Efeito do tratamento com NST (1 pmol), NST-C6 (0,1 pmol) e N/OFQ (10 pmol) 5, 15 e 30 min após a injeção central na porcentagem de (a) tempo de permanência e (b) entradas nos braços abertos do LCE em camundongos avaliados por um período de 5 min. O grupo controle foi avaliado no LCE apenas 5 min após a injeção. Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 8 animais. \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett).

Quando se administrou o UFP-101, um antagonista peptídico do receptor NOP, intracerebroventricularmente nas dose de 0,01 a 10 nmol, nenhuma alteração significativa da porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos foi observada em camundongos submetidos ao LCE (Fig. 10a;  $F_{(4,46)} = 2,18$  e  $F_{(4,46)} = 1,58$ ; respectivamente;  $p > 0,05$  para ambos os casos), além disso nenhum outro parâmetro etológico avaliado no LCE foi afetado após o tratamento i.c.v. com UFP-101 (Fig. 10 e Tabela 1).



**Figura 10** - Efeito do tratamento i.c.v. com UFP-101, um antagonista do receptor NOP, na (a) porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos, no (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 11 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

**Tabela 2** – Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ (200 nmol), DZP (7 nmol), N/OFQ, NST, NST-C6 e UFP-101 em alguns dos parâmetros registrados no LCE.

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo nos braços abertos (s)</b>	<b>Tempo nos braços fechados (s)</b>	<b>Entradas nos braços abertos</b>	<b>Comportamento de auto-limpeza</b>
<b>Controle</b>	83,0 ± 5,7	191,2 ± 10,8	6,0 ± 0,7	1,2 ± 0,3
<b>PTZ 200 nmol</b>	35,2 ± 14,7 *	240,2 ± 15,2	3,3 ± 1,0	1,0 ± 0,4
<b>DZP 7 nmol</b>	163,2 ± 29,0 *	104,8 ± 24,9	4,7 ± 0,6	1,3 ± 0,4
<b>NST</b>				
0,01 pmol	55,0 ± 12,1	146,4 ± 27,4	3,0 ± 0,7	1,0 ± 0,4
0,1 pmol	35,5 ± 9,5 *	170,3 ± 10,4	2,8 ± 0,8 *	1,0 ± 0,3
1 pmol	5,0 ± 2,6 *	216,4 ± 16,2	0,8 ± 0,3 *	0,9 ± 0,2
3 pmol	18,1 ± 12,3 *	179,7 ± 10,6	1,3 ± 0,8 *	1,1 ± 0,3
10 pmol	52,9 ± 11,1	148,9 ± 11,5	3,6 ± 0,8	1,2 ± 0,3
100 pmol	68,4 ± 21,4	144,0 ± 16,4	5,9 ± 2,0	0,9 ± 0,5
<b>NST-C6</b>				
0,001 pmol	94,4 ± 8,0	180,7 ± 9,7	6,0 ± 1,0	0,9 ± 0,3
0,01 pmol	27,6 ± 5,2 *	222,5 ± 11,1	2,9 ± 0,4 *	0,8 ± 0,2
0,1 pmol	8,4 ± 6,1 *	273,8 ± 7,7 *	0,8 ± 0,4 *	0,6 ± 0,2
1 pmol	8,9 ± 3,1 *	280,4 ± 3,3 *	1,0 ± 0,3 *	1,6 ± 0,4
10 pmol	33,9 ± 11,0 *	225,4 ± 18,0	2,4 ± 0,8 *	1,4 ± 0,4
100 pmol	44,5 ± 8,2	221,9 ± 10,8	3,9 ± 0,5	1,0 ± 0,3
1000 pmol	84,3 ± 11,8	200,3 ± 12,2	7,0 ± 1,0	1,6 ± 0,2
<b>N/OFQ</b>				
0,1 pmol	31,5 ± 3,8	179,1 ± 7,4	3,3 ± 0,4	0,6 ± 0,2
1 pmol	104,0 ± 30,8	144,5 ± 26,6	8,0 ± 2,7	1,3 ± 0,3
10 pmol	193,5 ± 21,7 *	61,3 ± 12,5 *	14,0 ± 2,3 *	1,2 ± 0,3
100 pmol	113,3 ± 19,4	126,1 ± 14,7	7,3 ± 1,4	1,0 ± 0,3
1000 pmol	35,1 ± 8,0	213,0 ± 13,2	1,8 ± 0,5	1,9 ± 0,7
<b>Controle (UFP-101)</b>				
<b>UFP-101</b>	39,2 ± 10,1	158,3 ± 14,4	2,2 ± 1,3	1,0 ± 0,3
0,01 nmol	51,0 ± 19,1	144,2 ± 19,3	3,1 ± 1,2	2,1 ± 0,3
0,1 nmol	19,0 ± 5,0	189,0 ± 7,0	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,4
1 nmol	11,0 ± 7,0	180,0 ± 16,0	1,0 ± 0,4	2,0 ± 0,5
10 nmol	62,0 ± 27,0	130,0 ± 22,0	4,0 ± 2,0	1,0 ± 0,3

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 6 a 12 animais, \*p<0,05 (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett ou teste *t* de Student para amostras não-pareadas bicaudal).

**Tabela 3** - Efeito do tratamento i.c.v. com PTZ (200 nmol), DZP (7 nmol), N/OAQ, NST, NST-C6 nos parâmetros comportamentais avaliados no teste do rota-rod e na temperatura corpórea de camundongos.

<b>Tratamento</b>	<b>Número de quedas</b>	<b>Tempo de permanência (s)</b>	<b>Temperatura retal (<math>\Delta T</math>)</b>
<i>Controle</i>	1,0 $\pm$ 0,4	56,2 $\pm$ 2,9	0,74 $\pm$ 0,27
<i>PTZ</i> 200 nmol	1,3 $\pm$ 0,7	54,2 $\pm$ 1,8	1,54 $\pm$ 1,07
<i>DZP</i> 7 nmol	1,0 $\pm$ 1,0	54,0 $\pm$ 3,0	1,42 $\pm$ 0,58
<i>NST</i> 1 pmol	1,2 $\pm$ 0,5	54,8 $\pm$ 2,4	0,85 $\pm$ 0,30
100 pmol	1,2 $\pm$ 0,5	55,3 $\pm$ 1,9	1,01 $\pm$ 0,56
<i>NST-C6</i> 0,1 pmol	0,8 $\pm$ 0,5	57,3 $\pm$ 1,6	0,91 $\pm$ 0,32
1000 pmol	0,4 $\pm$ 0,2	58,0 $\pm$ 1,0	1,32 $\pm$ 0,46
<i>N/OAQ</i> 10 pmol	1,5 $\pm$ 0,4	52,2 $\pm$ 2,6	1,28 $\pm$ 0,33
100 pmol	3,2 $\pm$ 0,9 *	39,8 $\pm$ 5,8 *	0,33 $\pm$ 0,38
1000 pmol	3,2 $\pm$ 0,9 *	40,1 $\pm$ 6,0 *	-0,58 $\pm$ 0,55
3000 pmol	3,3 $\pm$ 0,5 *	42,3 $\pm$ 3,1 *	-2,72 $\pm$ 0,69 *

Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 12 animais, \*p<0,05 (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett ou teste *t* de Student para amostras não-pareadas bicaudal).

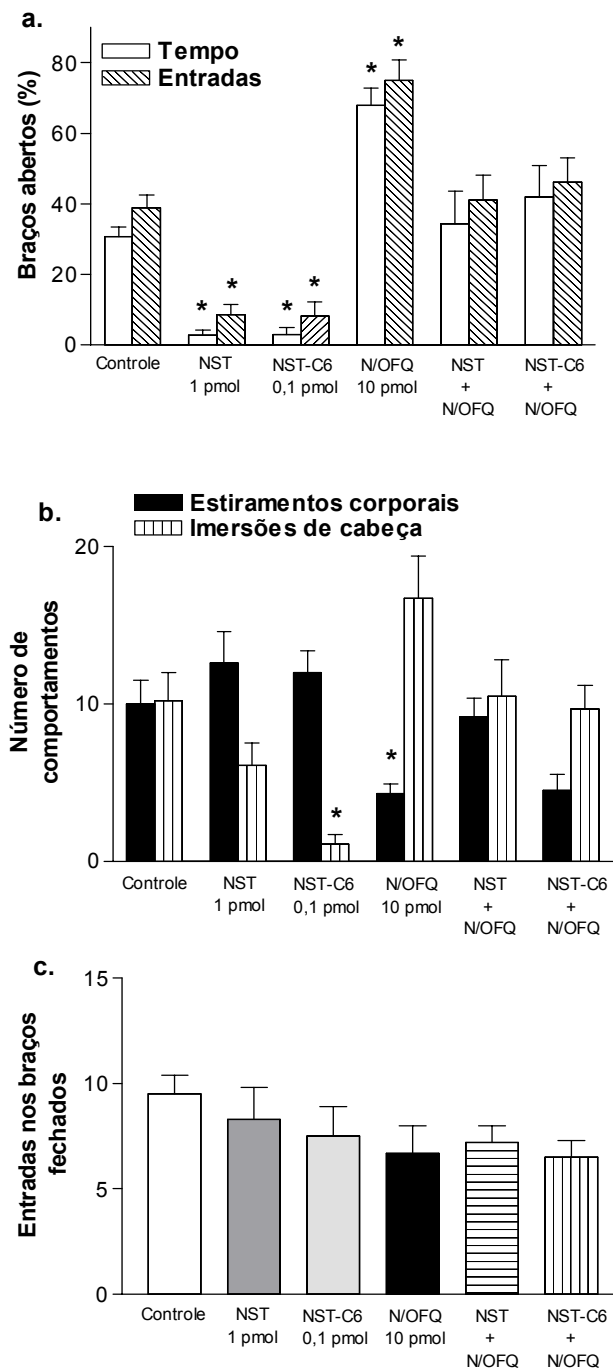


## Efeito da co-injeção de NST, NST-C6 e UFP-101 na atividade ansiolítica da N/OFQ

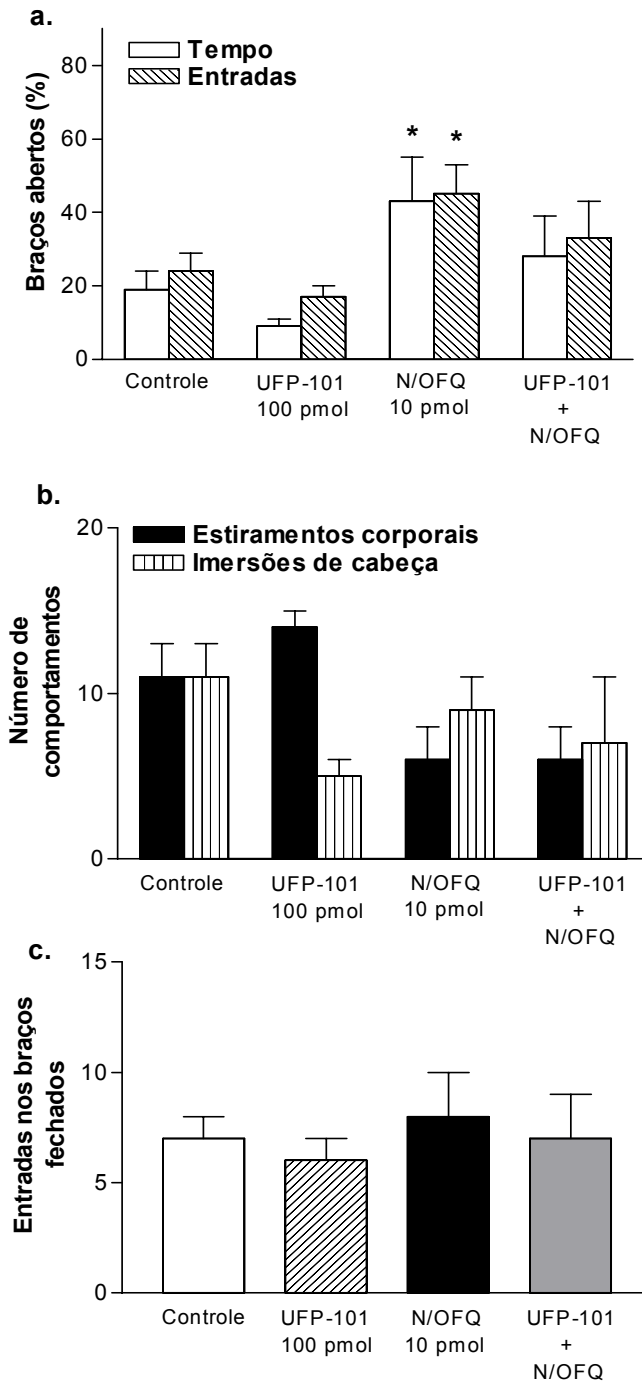
Muitos estudos têm demonstrado que a NST age como um antagonista das respostas produzidas pela N/OFQ (HIRAMATSU e INOUE, 1999; YAMAMOTO e SAKASHITA, 1999; ZHAO *et al.*, 1999), assim esta série de experimentos objetivou avaliar o efeito da NST na atividade do tipo ansiolítica induzida pela N/OFQ em camundongos no LCE.

Os camundongos pré-tratados (i.c.v.) com NST (1 pmol) ou NST-C6 (0,1 pmol) 5 min antes da injeção i.c.v. de N/OFQ (10 pmol) não apresentaram alterações comportamentais quando submetidos ao teste do LCE (Fig. 11 e Tabela 3), indicando que tanto a NST quanto o seu fragmento C-terminal preveniram a resposta induzida pela N/OFQ neste modelo animal. Na mesma série de experimentos, a administração única de NST (1 pmol) e a NST-C6 (0,1 pmol) levou a um efeito do tipo ansiogênico como previamente descrito neste estudo, enquanto que camundongos tratados com a N/OFQ, na dose de 10 pmol, exibiram perfil do tipo ansiolítico no LCE (Fig. 11 e Tabela 3).

Por outro lado, visando verificar se a ação do tipo ansiolítica induzida pela N/OFQ ocorre através da ativação do receptor NOP, avaliou-se o efeito da co-injeção de UFP-101 e N/OFQ, nas doses de 100 e 10 pmol, respectivamente. A figura 12 mostra que a N/OFQ 10 pmol, quando injetada isoladamente, aumentou a porcentagem de tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 12a;  $F_{(3,35)} = 3,70$  e  $F_{(3,35)} = 3,19$ , respectivamente,  $p < 0,05$  para ambos os casos). O UFP-101 (100 pmol) *per se* não modificou significativamente a resposta dos camundongos (Fig. 12), mas a co-injeção de UFP-101 e N/OFQ bloqueou parcialmente o efeito do tipo ansiolítico induzido pela N/OFQ em camundongos submetidos ao LCE. As injeções i.c.v. de N/OFQ e de UFP-101, assim como o tratamento associado de UFP-101 e N/OFQ não modificaram a atividade locomotora, nem os parâmetros etológicos avaliados no LCE (Fig. 12b e 12c).



**Figura 11** - Efeito do tratamento i.c.v. com NST (1 pmol), NST-C6 (0,1 pmol) e/ou N/OFQ (10 pmol) na porcentagem de (a) tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 8 e 12 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).



**Figura 12** - Efeito do tratamento i.c.v. com UFP-101 (100 pmol) e/ou N/OFQ (10 pmol) na porcentagem de (a) tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 7 e 10 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

**Tabela 4** – Efeito do tratamento i.c.v. com NST (1 pmol), NST-C6 (0,1 pmol), UFP-101 (0,1 nmol) e/ou N/OFQ (10 pmol) em alguns dos parâmetros registrados no LCE.

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo nos braços abertos (s)</b>	<b>Tempo nos braços fechados (s)</b>	<b>Entradas nos braços abertos</b>	<b>Comportamento de auto-limpeza</b>
<i>Controle</i>	86,0 ± 14,7	135,9 ± 11,3	8,6 ± 1,4	1,4 ± 0,5
<i>NST</i> 1 pmol	5,0 ± 2,6 *	216,4 ± 16,2	0,8 ± 0,3 *	0,9 ± 0,2
<i>NST-C6</i> 0,1 pmol	8,4 ± 6,1 *	273,8 ± 7,7 *	0,8 ± 0,4 *	0,6 ± 0,2
<i>N/OFQ</i> 10 pmol	193,5 ± 21,7 *	61,3 ± 12,5 *	14,0 ± 2,3 *	1,2 ± 0,3
<i>NST + N/OFQ</i>	80,6 ± 23,2	140,6 ± 17,8	7,0 ± 0,8	0,8 ± 0,3
<i>NST-C6 + N/OFQ</i>	102,6 ± 22,9	137,6 ± 21,1	7,8 ± 2,1	1,7 ± 0,5
<i>Controle</i>	39,2 ± 10,1	158,3 ± 14,4	2,2 ± 1,3	1,0 ± 0,3
<i>UFP-101</i> 0,1 nmol	19,0 ± 5,0	189,0 ± 7,0	1,0 ± 0,3	2,0 ± 0,4
<i>N/OFQ</i> 10 pmol	93,0 ± 37,1 *	103,4 ± 19,2	6,2 ± 1,5 *	1,1 ± 0,4
<i>UFP-101 + N/OFQ</i>	59,2 ± 30,4	143,1 ± 29,3	4,2 ± 3,1	1,3 ± 0,2

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 7 a 12 animais, \*p<0,05 (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

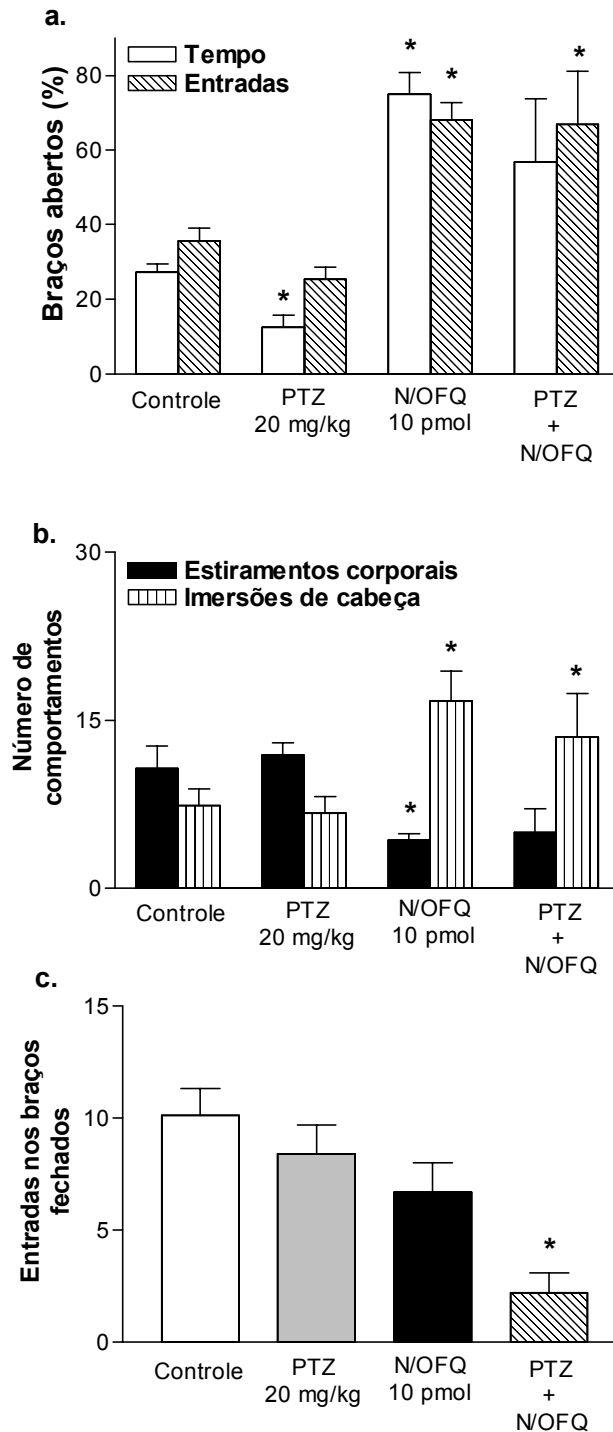
## **Envolvimento do sistema GABAérgico no efeito da NST e da N/OFQ na modulação da ansiedade experimental**

A injeção sistêmica de PTZ (20 mg/kg), um antagonista do receptor GABA que atua no sítio da picrotoxina (KORPI *et al.*, 2002), induziu efeito do tipo ansiogênico, demonstrado através da redução da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Fig. 13a). Por outro lado, a N/OFQ (10 pmol), o agonista endógeno do receptor NOP, produziu efeito do tipo ansiolítico, quando injetado centralmente, como já havia sido previamente descrito neste estudo, promovendo um aumento na porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 13a;  $F_{(3,25)}= 10,96$  e  $F_{(3,25)}= 8,50$ , respectivamente;  $p<0,05$  para ambos). Este aumento da porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos induzido pela N/OFQ não foi afetado pelo tratamento sistêmico com o PTZ, porém, sinais do antagonismo entre estas substâncias foram observados no tempo de permanência, medido em segundos, e no número de entradas nos braços abertos do LCE, pois o pré-tratamento com PTZ bloqueou o aumento induzido pela N/OFQ nestes dois parâmetros (Tabela 4;  $F_{(3,25)}= 7,62$  e  $F_{(3,25)}= 8,20$ , respectivamente;  $p<0,05$  para ambos).

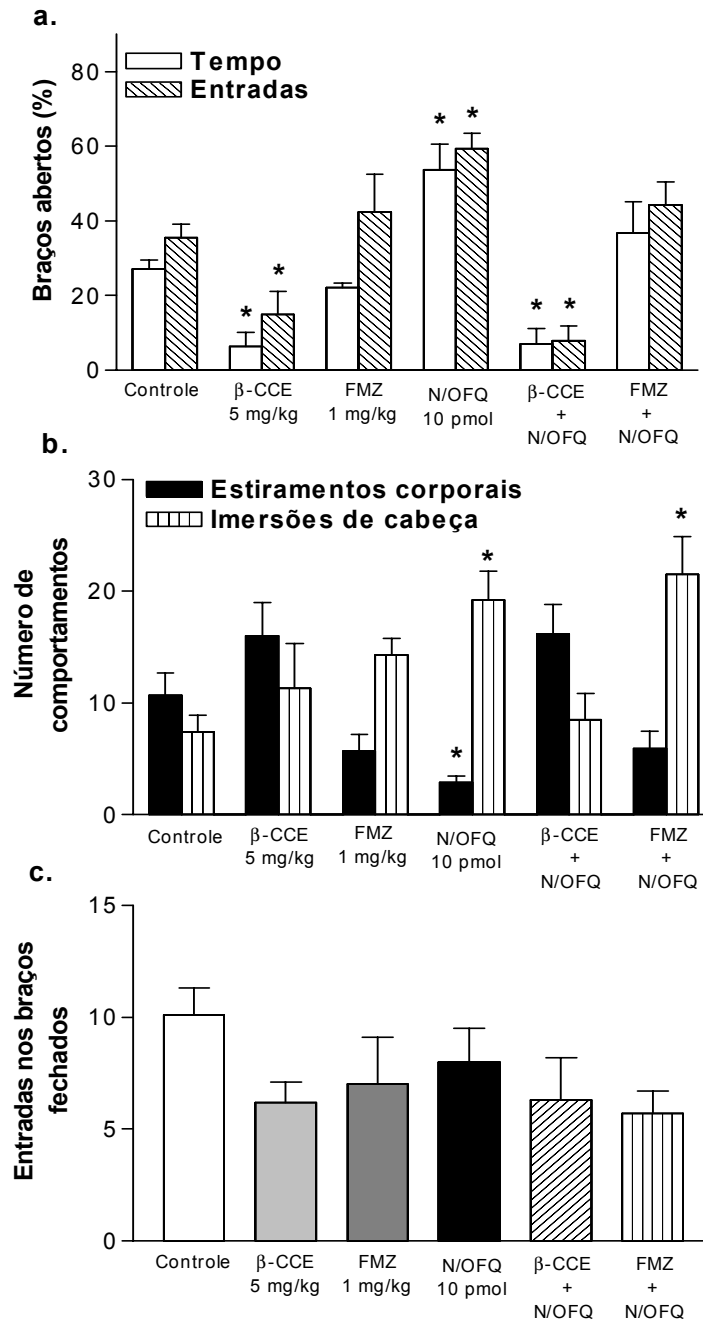
É também interessante destacar que os tratamentos não afetaram a atividade locomotora avaliado pelo número de entradas nos braços fechados do LCE, exceto para os animais que receberam a associação PTZ e N/OFQ onde foi observada redução do número de entradas nos braços fechados (Fig. 13c), porém sem comprometimento da frequência de entradas nos braços abertos (Tabela 4), como também descrito para o DZP (Fig. 5; Tabela 1)

Para avaliar o envolvimento do sítio benzodiazepínico na ação do tipo ansiolítica produzida pela N/OFQ, verificou-se o efeito da  $\beta$ -CCE, um agonista inverso do receptor benzodiazepínico, e do FMZ, um antagonista do sítio benzodiazepínico, na ação induzida pela N/OFQ. O pré-tratamento i.p. com  $\beta$ -CCE (5 mg/kg) reduziu *per se* a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE ( $F_{(3,23)}= 7,25$  e  $F_{(3,25)}= 20,28$ , respectivamente;  $p<0,05$  para ambos), perfil característico de drogas ansiogênicas. Além disso, a  $\beta$ -CCE (5 mg/kg, i.p.) bloqueou o efeito do tipo ansiolítico induzido pela administração de N/OFQ (10 pmol, i.c.v.), sendo que a resposta comportamental decorrente da associação entre  $\beta$ -CCE e N/OFQ não foi diferente do tratamento com  $\beta$ -CCE e salina (Fig. 14 e Tabela 4).

A administração i.p. de FMZ (1 mg/kg) *per se* não modificou os parâmetros comportamentais de camundongos avaliados no teste do LCE (Fig. 14). Além disso, o pré-tratamento com FMZ (1 mg/kg) foi capaz de bloquear o efeito do tipo ansiolítico induzido pela administração i.p. de 0,25 mg/kg de DZP (% de tempo nos braços abertos: Controle  $27,2 \pm 2,2$ ; FMZ  $22,0 \pm 1,4$ ; DZP  $80,2 \pm 4,9$ ; FMZ + DZP  $40,8 \pm 3,6$  e % de entradas nos braços abertos: Controle  $35,6 \pm 3,5$ ; FMZ  $42,4 \pm 10,1$ ; DZP  $71,6 \pm 8,6$ ; FMZ + DZP  $40,3 \pm 5,5$ ). Da mesma maneira, o efeito ansiolítico induzido pela N/OEQ (10 pmol) foi parcialmente antagonizado pelo pré-tratamento sistêmico com FMZ, ou seja, o FMZ bloqueou o aumento na porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 14a;  $F_{(3,33)} = 3,07$  e  $F_{(3,33)} = 3,74$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos), assim como o aumento na frequência de entradas nos braços abertos do labirinto (Tabela 4;  $F_{(3,33)} = 6,60$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 13** - Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ (10 pmol) 15 min após o tratamento com PTZ (20 mg/kg, i.p.), um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, na porcentagem de (a) tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 9 animais (\*p<0,05; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

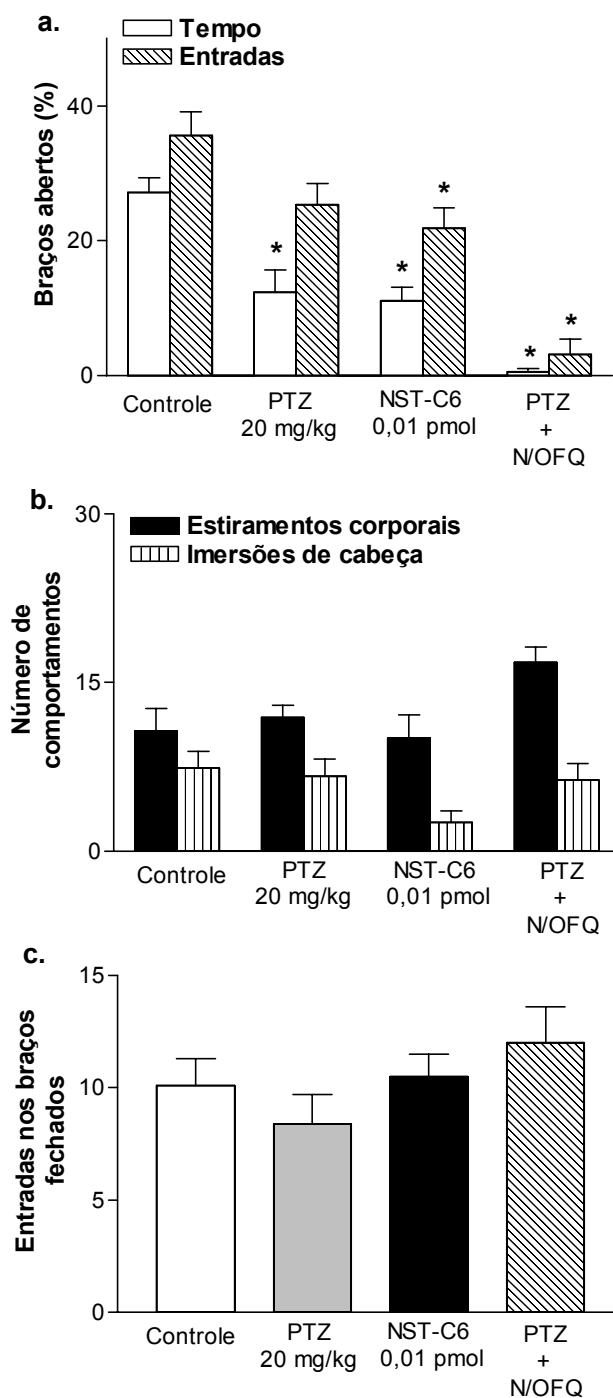


**Figura 14** - Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ (10 pmol) 15 min após a administração de  $\beta$ -CCE (5 mg/kg, i.p.), um agonista inverso do sítio benzodiazepínico, ou de flumazenil (FMZ 1 mg/kg, i.p.), antagonista do sítio benzodiazepínico na porcentagem de (a) tempo de permanência e de entradas nos braços abertos do LCE, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 7 e 10 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

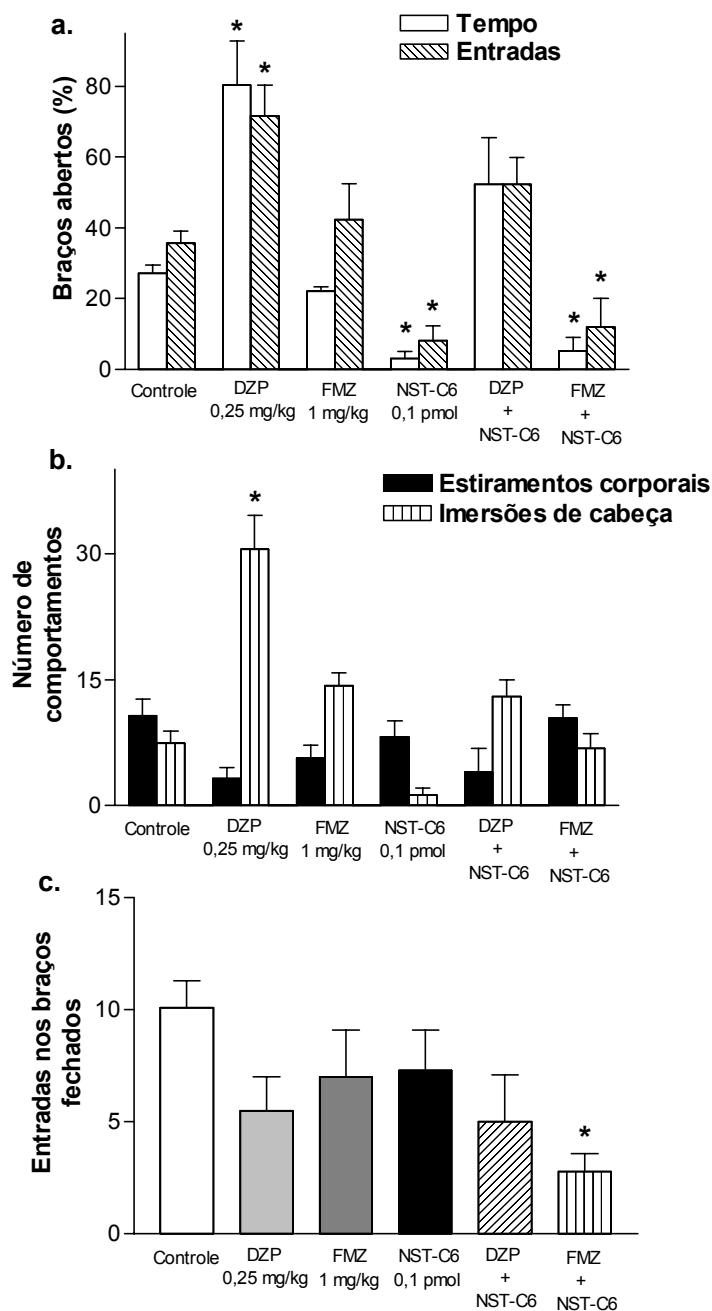


Visando averiguar a participação do receptor GABA<sub>A</sub> na ação do tipo ansiogênica induzida pela NST, avaliou-se o efeito do pré-tratamento com PTZ na resposta da NST-C6 em camundongos submetidos ao LCE. A injeção sistêmica de PTZ (20 mg/kg) induziu efeito do tipo ansiogênico, visto pela redução da porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos do LCE (Fig. 15a), porém pela amplitude da resposta, pode-se considerar que a dose de PTZ utilizada não é a que produz o máximo efeito aversivo no LCE. O mesmo podemos dizer para a NST-C6, visto que a dose escolhida para ser associada ao PTZ foi de 0,01 pmol e nesta dose a NST-C6 induziu *per se* efeito do tipo ansiogênico, pois reduziu tanto a porcentagem de tempo, quanto de entradas nos braços abertos do LCE. A injeção sistêmica de PTZ (20 mg/kg) 10 min antes do tratamento com NST-C6 (0,01 pmol), porém, potencializou o efeito do tipo ansiogênico induzido pela NST-C6 0,01 pmol, como descrito na Figura 15 e na Tabela 5.

No entanto, com o objetivo de verificar a participação do sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub> na atividade do tipo ansiogênica da NST, avaliou-se o efeito do tratamento sistêmico com DZP e FMZ na resposta induzida pela injeção de 0,1 pmol de NST-C6. A injeção i.p. de DZP (0,25 mg/kg) aumentou a porcentagem de tempo e de entradas nos braços abertos do LCE (Fig. 16a;  $F_{(3,26)} = 26,7$  e  $F_{(3,26)} = 21,5$ , respectivamente;  $p < 0,05$  para ambos os casos) e o número de imersões de cabeça (Fig. 16b;  $F_{(3,26)} = 32,8$ ;  $p < 0,05$ ), porém quando associado à NST-C6 (0,1 pmol), o DZP bloqueou o efeito do tipo ansiogênico induzido pela NST-C6 (Fig. 16 e Tabela 5). Por outro lado, o pré-tratamento com FMZ (1 mg/kg) não modificou a atividade do tipo ansiogênica induzida pela administração i.c.v. de NST-C6 (Fig. 16 e Tabela 5), mas reduziu o número de entradas nos braços fechados do LCE (Fig. 16c;  $F_{(3,20)} = 4,48$ ;  $p < 0,05$ ), sugerindo prejuízo da atividade locomotora, sendo que este efeito não foi observado após nenhum outro tratamento (Fig. 15c e 16c).



**Figura 15** - Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 (0,1 pmol) 15 min após o tratamento com PTZ (20 mg/kg, i.p.), um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>, na porcentagem de (a) tempo de permanência e de número de entradas nos braços abertos do labirinto, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 9 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).



**Figura 16** - Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 (0,1 pmol) 15 min após a administração de diazepam (DZP, 0,25 mg/kg, i.p.), agonista do sítio benzodiazepínico, ou de flumazenil (FMZ 1 mg/kg, i.p.), antagonista do sítio benzodiazepínico, na porcentagem de (a) tempo de permanência e de entradas nos braços abertos do LCE, (b) número de estiramentos corporais e de imersões de cabeça e no (c) número de entradas nos braços fechados em camundongos submetidos ao teste do LCE, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais usados em cada tratamento variou entre 6 e 10 animais (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

**Tabela 5** – Efeito da administração i.c.v. de N/OFQ (10 pmol) 15 min depois da administração de PTZ (20 mg/kg, i.p.),  $\beta$ -CCE (5 mg/kg, i.p.) ou FMZ (1 mg/kg, i.p.) em camundongos avaliados em alguns parâmetros do LCE.

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo nos braços abertos (s)</b>	<b>Tempo nos braços fechados (s)</b>	<b>Entradas nos braços abertos</b>	<b>Comportamento de auto-limpeza</b>
<i>Controle</i>	88,4 ± 24,5	205,4 ± 25,9	6,3 ± 1,7	1,4 ± 0,5
<i>N/OFQ 10 pmol</i>	139,1 ± 18,9	119,2 ± 18,5*	11,2 ± 1,4 *	1,2 ± 0,3
<i>PTZ 20 mg/kg</i>	30,4 ± 6,9 *	224,6 ± 15,2	3,0 ± 0,6 *	0,7 ± 0,2
<i><math>\beta</math>-CCE 5 mg/kg</i>	18,3 ± 11,1 *	274,2 ± 12,0 *	1,2 ± 0,5 *	1,0 ± 0,3
<i>FMZ 1 mg/kg</i>	55,3 ± 8,8	194,0 ± 16,6	5,3 ± 1,8	1,7 ± 0,3
<i>N/OFQ + PTZ</i>	125,0 ± 46,7	99,2 ± 42,5	7,2 ± 2,7	1,7 ± 0,5
<i>N/OFQ + <math>\beta</math>-CCE</i>	20,5 ± 12,9	276,2 ± 13,1	0,7 ± 0,3	1,3 ± 0,4
<i>N/OFQ + FMZ</i>	90,9 ± 24,7	137,3 ± 20,8	4,9 ± 1,0	1,3 ± 0,3

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 6 a 10 animais, \*p<0,05 (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

**Tabela 6** – Efeito da administração i.c.v. de NST-C6 (0,1 pmol ou 0,01 pmol) 15 min após a administração de DZP (0,25 mg/kg, i.p.), FMZ (1 mg/kg, i.p.) ou PTZ (20 mg/kg, i.p.) em camundongos avaliados no LCE.

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo nos braços abertos (s)</b>	<b>Tempo nos braços fechados (s)</b>	<b>Entradas nos braços abertos</b>	<b>Comportamento de auto-limpeza</b>
<i>Controle</i>	78,3 ± 6,6	208,9 ± 6,3	5,4 ± 0,6	1,4 ± 0,4
<i>NST-C6 0,1 pmol</i>	10,5 ± 8,0 *	273,8 ± 9,0 *	0,8 ± 0,5 *	0,7 ± 0,2
<i>NST-C6 0,01 pmol</i>	27,6 ± 5,2 *	222,5 ± 11,2	2,9 ± 0,4	0,8 ± 0,2
<i>PTZ 20 mg/kg</i>	30,4 ± 6,9 *	224,6 ± 15,2	3,0 ± 0,6	0,7 ± 0,2
<i>DZP 0,25 mg/kg</i>	215,2 ± 14,4*	52,8 ± 12,6 *	17,5 ± 4,8 *	1,2 ± 0,2
<i>FMZ 1 mg/kg</i>	55,3 ± 8,8	194,0 ± 16,6	5,3 ± 1,8	1,7 ± 0,3
<i>NST-C6 + FMZ</i>	13,4 ± 9,7 *	231,4 ± 10,9	0,6 ± 0,4 *	2,4 ± 0,2
<i>NST-C6 + DZP</i>	140,3 ± 39,5	114,2 ± 28,9	5,8 ± 2,4	1,3 ± 0,3
<i>NST-C6 0,01 pmol +PTZ</i>	1,7 ± 1,2 *	280,2 ± 4,9 *	0,5 ± 0,3 *	1,2 ± 0,2

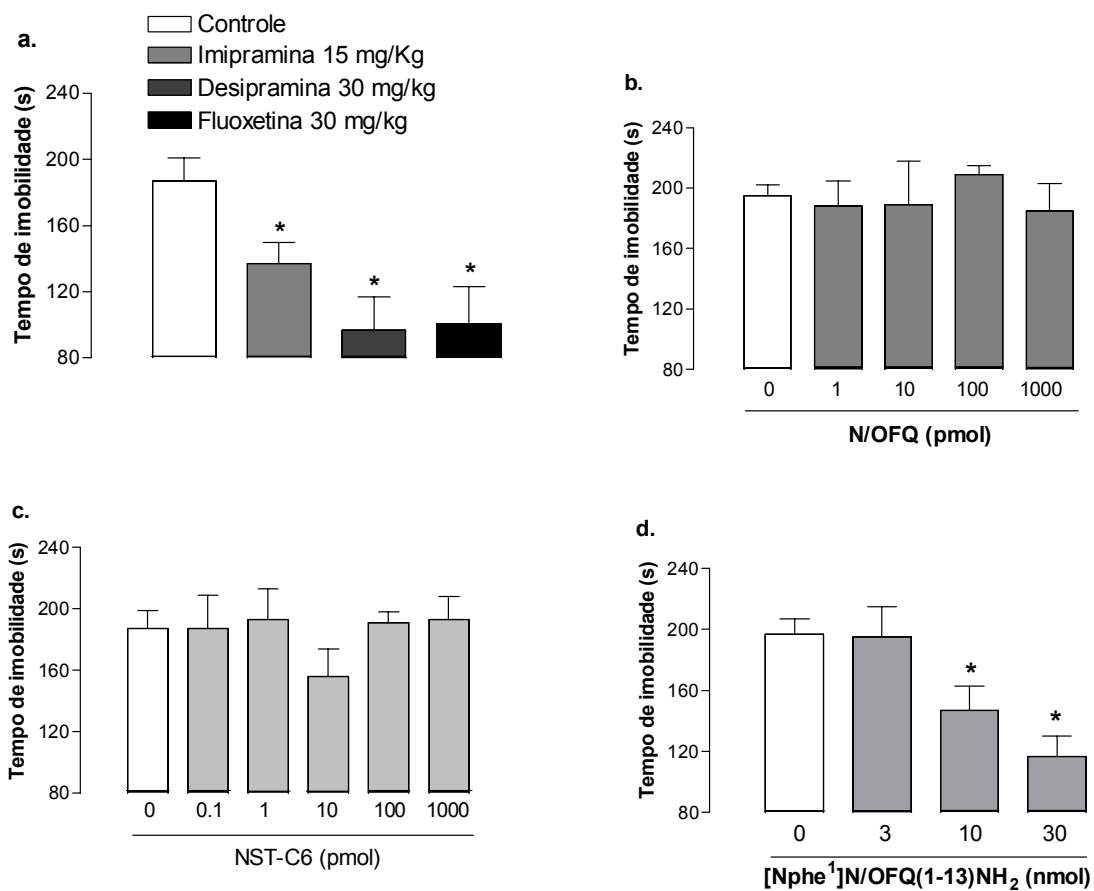
Os dados estão expressos como média ± E.P.M. de 6 a 10 animais, \*p<0,05 (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

## PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA N/OFQ - RECEPTOR NOP NA MODULAÇÃO DA DEPRESSÃO EXPERIMENTAL

### **Avaliação do efeito da N/OFQ, NST-C6, [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> e UFP-101 no TNF**

Devido ao fato de haver uma sobreposição entre a neuroquímica e a neuroanatomia da ansiedade e da depressão e, também, devido ao estudo preliminar realizado por Redrobe e colaboradores (2002) sobre o efeito de ligantes do receptor NOP no teste da natação forçada (TNF) em camundongos, decidiu-se avaliar o envolvimento do sistema N/OFQ – receptor NOP na modulação da depressão experimental. Inicialmente, padronizou-se o TNF com antidepressivos clássicos como a imipramina (15 mg/kg), desipramina (30 mg/kg) e fluoxetina (30 mg/kg), sendo que todos reduziram o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao teste, indicando um perfil de resposta do tipo antidepressivo (Fig. 17a;  $t = 2,85$ ,  $t = 3,63$  e  $t = 3,49$  respectivamente;  $p < 0,05$  para todos os casos).

Prosseguimos este estudo, avaliando o papel da N/OFQ, NST e de antagonistas do receptor NOP no teste da natação forçada. A injeção de N/OFQ i.c.v. na faixa de dose testada (0,01 – 1 nmol) não modificou o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TNF (Fig. 17b;  $F_{(4, 30)} = 0,32$ ;  $p > 0,05$ ). Do mesmo modo, a NST-C6, que é o fragmento da NST comum em várias espécies de mamíferos, e que apresentou o mesmo perfil de resposta do peptídeo íntegro no LCE mostrado neste estudo, nas doses de 1 a 1000 pmol, também não modificou o tempo de imobilidade dos camundongos (Fig. 17c;  $F_{(5,43)} = 0,96$ ;  $p > 0,05$ ). Ao contrário, o [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, um antagonista peptídico do receptor NOP, reduziu o tempo de imobilidade nas doses de 10 e 30 nmol, de maneira dose-dependente (Fig. 17d;  $F_{(3,36)} = 7,70$ ;  $p < 0,05$ ), sugerindo efeito do tipo antidepressivo como já havia sido anteriormente relatado por Redrobe e colaboradores (2002).



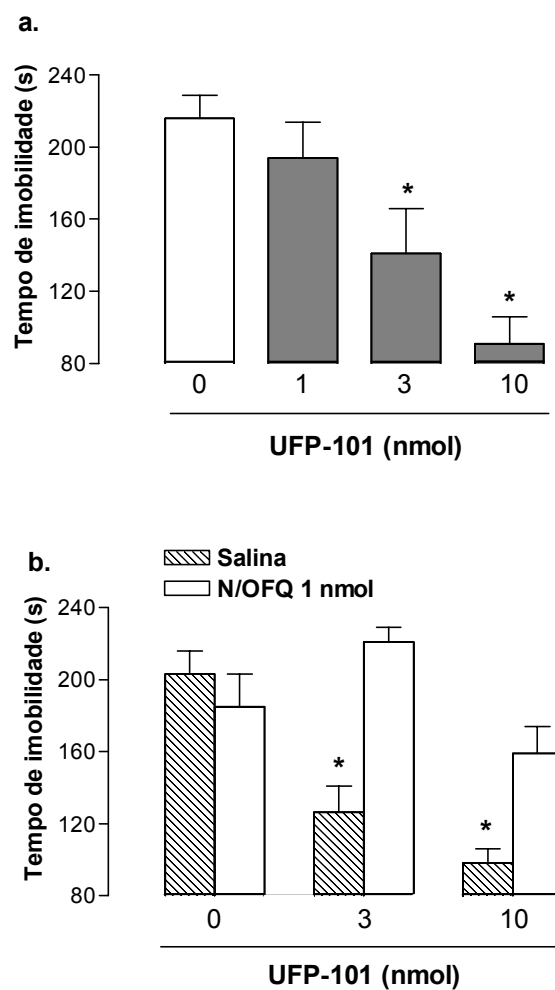
**Figura 17** - Efeito da injeção i.c.v. de antidepressivos clássicos, como a imipramina, a desipramina e a fluoxetina (a), da N/OFQ (b), da NST-C6 (c) e do [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> (d) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada, por um período de 5 min. As colunas dos gráficos representam a média ± E.P.M. de 9 a 14 animais. \*p<0.05 quando comparado com o grupo controle (\*p<0,05; em (a) teste *t* de Student para amostras não-pareadas e nos demais foi realizada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

Quando se avaliou, porém, o efeito do tratamento i.c.v. com um outro antagonista peptídico para o receptor NOP, o UFP-101, observou-se uma redução do tempo de imobilidade, nas doses de 3 e 10 nmol, com perfil de resposta semelhante ao [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, sendo o UFP-101 3 a 10 vezes mais potente que este antagonista neste teste (Fig. 18a;  $F_{(3,35)} = 10,97$ ;  $p < 0,05$ ).

Objetivando determinar a participação do receptor NOP na ação do tipo antidepressiva induzida pelo UFP-101, avaliou-se o efeito da co-injeção de N/OFQ (1 nmol), agonista do receptor NOP, e do UFP-101 (3 e 10 nmol) em camundongos submetidos ao TNF. A N/OFQ 1 nmol preveniu completamente o efeito do tipo antidepressivo induzido pelo UFP-101 3 nmol e bloqueou parcialmente a ação produzida pela injeção de UFP-101 10 nmol no teste da natação forçada (Fig. 18b;  $F_{(5,51)} = 8,74$ ;  $p < 0,05$ ), indicando que o receptor NOP medeia o efeito do UFP-101 nestas condições experimentais.

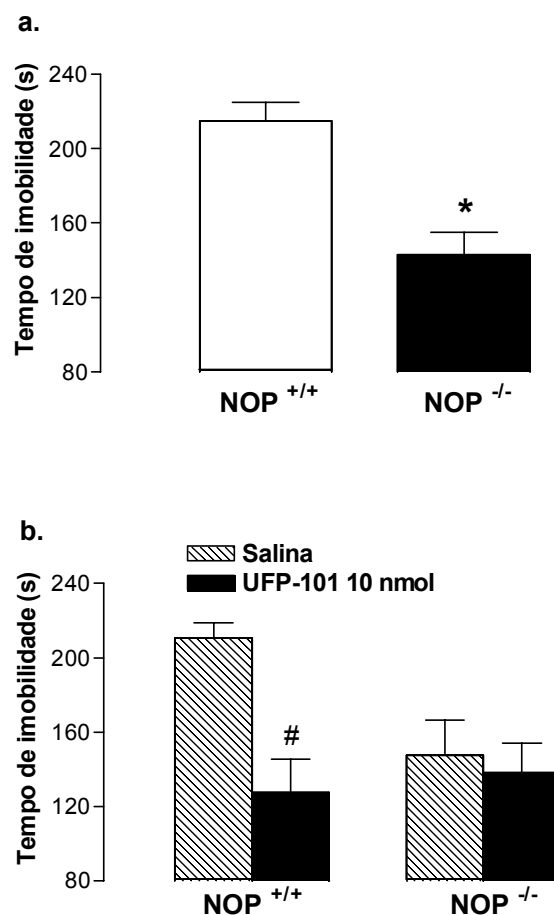
Visando reforçar a participação do sistema N/OFQ - receptor NOP na modulação da depressão experimental, avaliou-se o comportamento espontâneo de camundongos *knockout* para o receptor NOP no TNF. Os animais mutantes para o receptor NOP exibiram redução do tempo de imobilidade quando comparados com os seus respectivos controles *wild-type* (Fig. 19a;  $t = 4,27$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, os camundongos *wild-type* intracerebroventricularmente tratados com UFP-101 (10 nmol) exibiram redução do tempo de imobilidade quando avaliados no TNF, mas o mesmo tratamento não modificou o perfil de resposta dos camundongos *knockout* para o receptor NOP (Fig. 19b;  $F_{(4,27)} = 4,55$ ;  $p < 0,05$ ).

Outro dado relevante é que a atividade locomotora espontânea dos camundongos Swiss tratados com salina foi de  $516 \pm 45$  pulsos para um período de 10 min, enquanto que para a imipramina foi de  $570 \pm 79$ . As diferentes doses de UFP-101 também não produziram nenhuma mudança significativa na atividade locomotora quando comparados com o grupo controle (UFP-101 10 nmol:  $380 \pm 60$ ; UFP-101 3 nmol:  $410 \pm 78$ ). Entretanto, a N/OFQ 1 nmol reduziu este parâmetro comportamental para  $67 \pm 24$  pulsos por 10 min, embora doses menores de N/OFQ não tenham afetado a atividade locomotora espontânea. Nenhuma diferença na atividade locomotora foi detectada entre camundongos *wild-type* e *knockout* para o receptor NOP ( $679 \pm 74$  e  $750 \pm 71$  pulsos por 10 min, respectivamente).



**Figura 18** - Efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 (a) e da co-injeção de N/OFQ (1 nmol) e UFP-101, nas doses de 3 e 10 nmol, (b) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada, por um período de 5 min. As colunas dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 a 12 animais. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (\* $p < 0,05$ ; ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).





**Figura 19** - Registro do comportamento espontâneo de camundongos *knockout* (NOP<sup>-/-</sup>) e *wild-type* (NOP<sup>+/+</sup>) para o receptor NOP no teste da natação forçada (a) e efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 (10 nmol) no tempo de imobilidade de camundongos NOP<sup>-/-</sup> e NOP<sup>+/+</sup> (b) submetidos ao teste da natação forçada por 5 min. As colunas dos gráficos representam a média ± E.P.M. de 5 a 7 animais. \*p<0,05 quando comparado com o grupo *wild-type* e #p<0,05 quando comparado com o grupo *wild-type* salina (teste *t* de Student para amostras não-pareados).

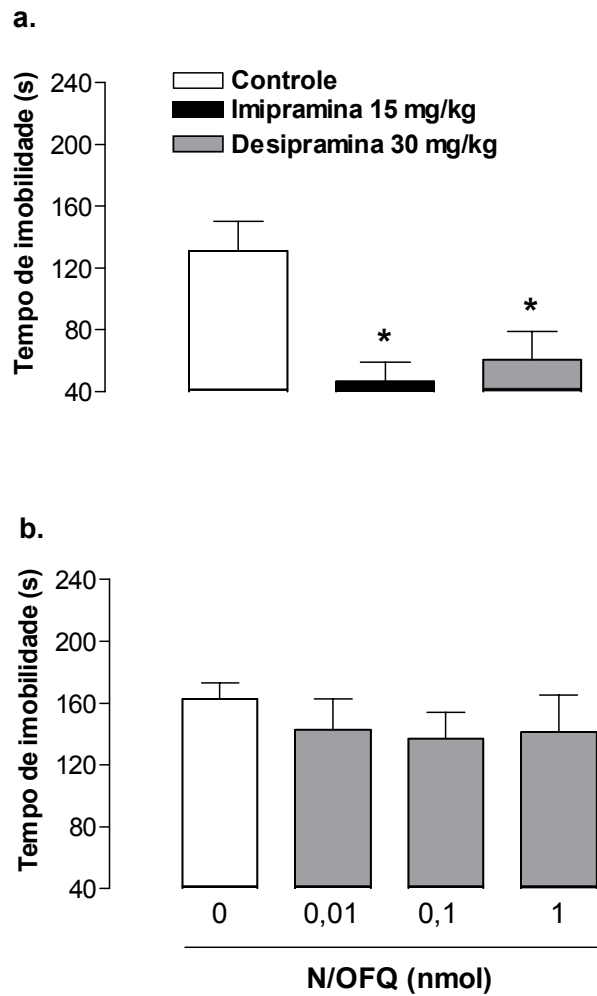
## Avaliação do efeito da N/OFQ e do UFP-101 no TSC

Objetivando estudar o efeito do UFP-101 em outro teste comportamental utilizado para avaliar a atividade antidepressiva, verificou-se a ação deste antagonista do receptor NOP em camundongos submetidos ao teste da suspensão pela cauda (TSC).

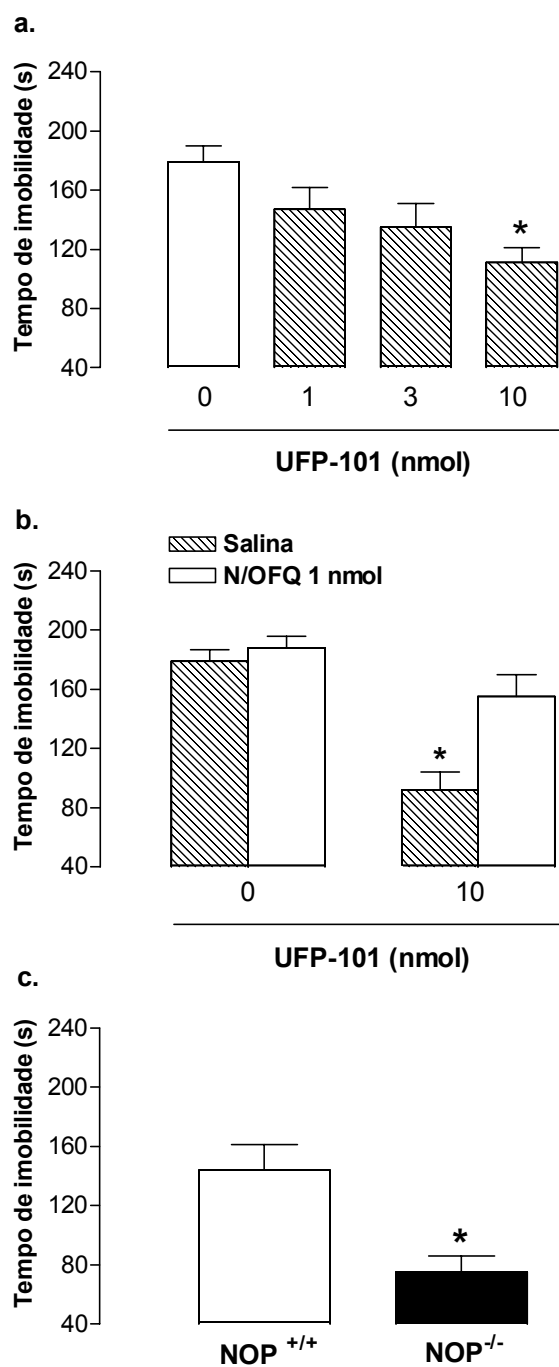
Primeiramente, padronizou-se as condições experimentais do TSC testando antidepressivos clássicos, como a imipramina (15 mg/kg, i.p.) e a desipramina (30 mg/kg, i.p.), sendo que ambos reduziram o tempo de imobilidade de camundongos, resposta esperada para drogas antidepressivas (Fig. 20a;  $t = 3,66$  e  $t = 2,54$ ;  $p < 0,05$  para ambos os casos).

A administração i.c.v. de N/OFQ (0,01 – 1 nmol) em camundongos não modificou o desempenho comportamental destes animais comparados com o grupo controle (Fig. 20b;  $F_{(3,42)} = 0,41$ ;  $p > 0,05$ ), semelhante ao efeito obtido com a injeção de N/OFQ em camundongos submetidos ao TNF. No entanto, o UFP-101 (1, 3 e 10 nmol) reduziu dose-dependentemente o tempo de imobilidade, mas somente a 10 nmol esta redução foi estatisticamente diferente do grupo controle (Fig. 21a;  $F_{(3,44)} = 4,35$ ;  $p < 0,05$ ).

A co-injeção de N/OFQ 1 nmol preveniu completamente a ação do UFP-101 10 nmol induzida em camundongos submetidos ao TSC, sugerindo que o receptor NOP também está mediando a ação do UFP-101 no teste de suspensão pela cauda (Fig. 21b;  $F_{(3,39)} = 8,82$ ;  $p < 0,05$ ). Avaliou-se também o comportamento espontâneo de camundongos *knockout* para o receptor NOP no TSC e os animais mutantes para o receptor NOP exibiram redução do tempo de imobilidade quando comparados com os seus controles *wild-type* (Fig. 21c;  $t = 3,56$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 20** - Efeito da injeção i.c.v. de antidepressivos clássicos, como a imipramina e a desipramina (a) e da N/OFQ (b) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste da suspensão pela cauda, por um período de 5 min. As colunas dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 8 animais. \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo controle (em (a) teste  $t$  de Student para amostras não-pareadas e em (b) ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

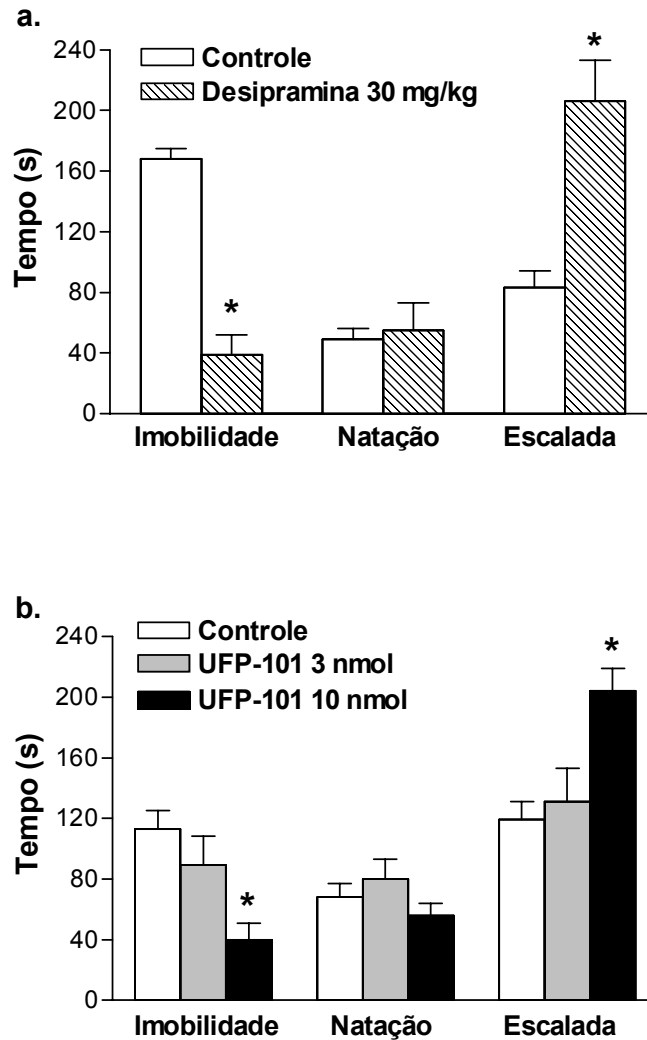


**Figura 21** - Efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 (a) e da co-injeção de N/OFQ (1 nmol) e UFP-101 (10 nmol) (b) no tempo de imobilidade de camundongos Swiss submetidos ao teste de suspensão pela cauda, por um período de 5 min. Registro do comportamento espontâneo de camundongos *wild-type* (NOP<sup>+/+</sup>) e *knockout* (NOP<sup>-/-</sup>) para o receptor NOP no teste da suspensão pela cauda (c). As colunas dos gráficos representam a média ± E.P.M. de 6 a 10 animais. \*p<0.05 quando comparado com o grupo controle ou com os camundongos *wild-type* (em (a e b) ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett e em (c) teste *t* de Student para amostras não-pareadas).

## **Avaliação do efeito antidepressivo do UFP-101 no TNF para ratos**

Objetivando estudar o efeito do UFP-101 em outra espécie de roedor, avaliou-se a atividade do antagonista do receptor NOP, UFP-10, em ratos submetidos ao teste da natação forçada (TNF). Inicialmente, padronizou-se as condições experimentais testando o efeito da desipramina (30 mg/kg), uma droga antidepressiva clássica, administrada intraperitonealmente em ratos e, como mostrado na figura 22a, a DMI reduziu o tempo de imobilidade e aumentou o tempo de escalada das paredes do cilindro, sem modificar o tempo de natação ( $t= 9,28$ ,  $t= 4,59$  e  $t= 0,34$ , respectivamente, sendo  $p<0,05$  para tempo de imobilidade e escalada e  $p>0,05$  para o tempo de natação).

Posteriormente, avaliou-se o efeito da injeção i.c.v. de UFP-101 nas doses de 3 e 10 nmol em ratos e, como descrito na figura 22b, a injeção de UFP-101 3 nmol não modificou o comportamento de ratos submetidos ao TNF, porém na dose de 10 nmol, o UFP-101 induziu o mesmo perfil de resposta da desipramina, ou seja, reduziu o tempo de imobilidade e elevou o tempo de escalada, sugerindo ação do tipo antidepressiva também para ratos submetidos no TNF ( $F_{(2,26)}= 7,50$ ;  $F_{(2,26)}= 8,04$  e  $F_{(2,26)}= 1,41$ , respectivamente, sendo  $p<0,05$  para o tempo de imobilidade e escalada e  $p>0,05$  para o tempo de natação). A mesma dose do UFP-101 que induziu modificações comportamentais no TNF, não alterou a atividade locomotora espontânea de ratos submetidos à arena, medida através do número de cruzamentos por um período de 5 min (salina:  $53 \pm 2$ ; UFP-101 10 nmol:  $54 \pm 9$ ).



**Figura 22** - Efeito do tratamento i.p. com desipramina (DMI; 30 mg/kg) (a) e da injeção i.c.v. de UFP-101 nas doses de 3 e 10 nmol (b) no tempo de imobilidade, de natação e de escalada das paredes do cilindro em ratos submetidos ao teste da natação forçada. As colunas dos gráficos representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 9 animais. \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo controle (em (a) teste  $t$  de Student para amostras não-pareadas e em (b) ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

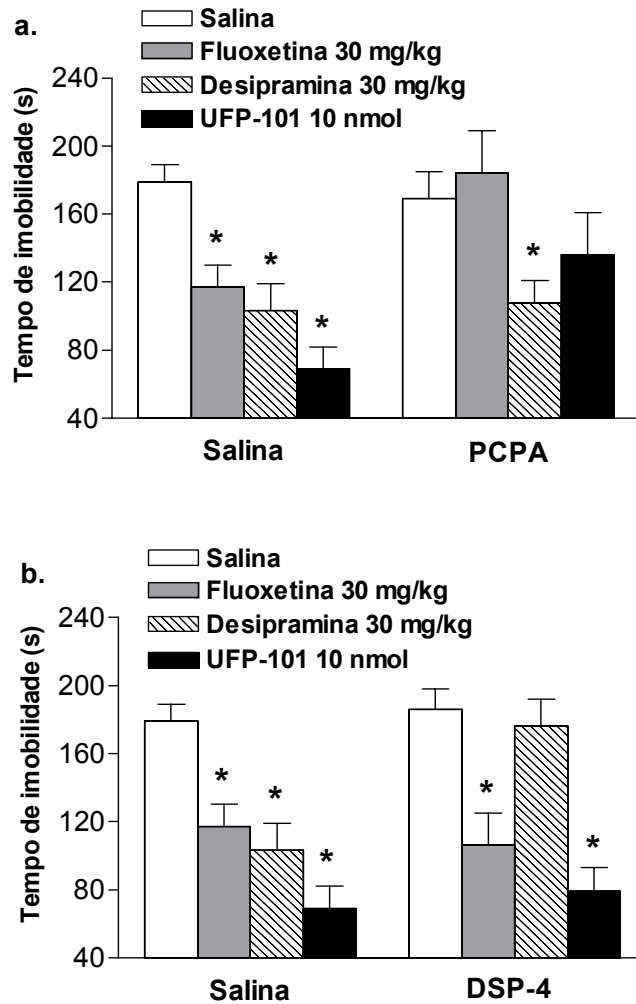
## **Envolvimento do sistema monoaminérgico no efeito do tipo antidepressivo induzido pelo UFP-101 no TNF**

Objetivando estudar a participação das monoaminas na atividade do tipo antidepressiva induzida pelo UFP-101, avaliou-se o efeito da redução dos conteúdos neuronais de noradrenalina causada pelo tratamento com a neurotoxina noradrenérgica - DSP-4 - e da inibição da síntese de serotonina, produzida pela administração de PCPA, na ação do UFP-101 (10 nmol) em camundongos submetidos ao TNF.

Inicialmente, é interessante destacar que os camundongos pré-tratados com PCPA e com DSP-4 não apresentaram diferença no tempo de imobilidade quando comparados com os grupos controles (Fig. 23), além disso, nenhuma alteração grosseira do comportamento destes animais foi observada após o tratamento com DSP-4 e com PCPA, tais como emagrecimento ou mortes. A figura 23a mostra o efeito do tratamento com desipramina, fluoxetina e UFP-101 em camundongos pré-tratados com salina ou DSP-4, enquanto que a figura 23b mostra o efeito da desipramina, fluoxetina e do UFP-101 em animais pré-tratados com o PCPA.

No grupo controle, as injeções de desipramina, fluoxetina e UFP-101 reduziram o tempo de imobilidade dos camundongos (Fig. 23a e 23b), porém, no grupo pré-tratado com a neurotoxina noradrenérgica, DSP-4, observou-se que *per se* este composto não modificou o comportamento dos animais, no entanto, preveniu completamente a resposta do tipo antidepressiva induzida pela desipramina, um inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina. A redução do tempo de imobilidade induzida pela fluoxetina e pelo UFP-101, porém, não foram alterados nos camundongos pré-tratados com o DSP-4 (Fig.23a;  $p < 0,05$ ).

Por outro lado, o pré-tratamento com PCPA não alterou *per se* o comportamento dos animais, nem a atividade do tipo antidepressiva induzida pela desipramina, mas bloqueou o efeito da fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, e preveniu parcialmente a redução do tempo de imobilidade induzida pelo UFP-101 em camundongos no TNF (Fig.23b;  $p < 0,05$ ).



**Figura 23** - Influência do pré-tratamento com salina, PCPA (a) ou DSP-4 (b) no efeito do tipo antidepressivo induzido pela fluoxetina, desipramina (ambos a 30 mg/kg, i.p.) ou UFP-101 (10 nmol, i.c.v.) em camundongos Swiss submetidos ao teste da natação forçada. Os dados mostrados são relativos ao tempo de imobilidade registrados em uma sessão de 5 min e representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 – 12 animais. \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo salina correspondente (ANOVA de duas vias seguido do teste de Duncan).



## ***DISCUSSÃO***

## DISCUSSÃO

O presente trabalho estudou os efeitos comportamentais de dois peptídeos, nociceptina/orfanina FQ (N/OFQ) e nocistatina (NST), originados do mesmo precursor, a ppN/OFQ, em modelos experimentais de ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, e de depressão, tais como o teste da natação forçada e o da suspensão pela cauda. É importante lembrar que estes modelos animais são validados e amplamente utilizados para predizer o efeito de novas moléculas em relação à ação na ansiedade e na depressão experimental (LISTER, 1987; PORSOLT *et al.*, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978; STERU *et al.*, 1985).

Na primeira parte deste trabalho, denotou-se a participação dos peptídeos N/OFQ e NST na modulação da ansiedade experimental. A administração i.c.v. de NST e do seu fragmento C-terminal (NST-C6) induziu ação do tipo ansiogênica em camundongos, mostrado através da redução dos parâmetros de exploração dos espaços abertos do LCE. Ao contrário, a N/OFQ quando injetada em camundongos induziu ação do tipo ansiolítica, pois aumentou a exploração dos braços abertos. Além disso, a co-administração de NST, NST-C6 ou UFP-101, antagonista do receptor NOP, bloqueou o efeito do tipo ansiolítico induzido pela injeção central de N/OFQ, agonista do receptor NOP, em camundongos submetidos ao LCE.

Devido à grande semelhança estrutural, a N/OFQ e o receptor NOP são considerados novos membros da família dos peptídeos opióides, sendo que a ativação deste novo sistema peptidérgico estimula mecanisticamente as mesmas vias intracelulares dos opióides, o que poderia sugerir uma similaridade de respostas farmacológicas. Em relação à ansiedade, alguns estudos relatam o envolvimento dos peptídeos opióides com esta patologia do sistema nervoso central. KANG e colaboradores (1999) mostraram que um aumento na expressão de pré-proencefalina, o precursor dos agonistas endógenos para o receptor  $\delta$ , na amígdala de ratos produz um comportamento do tipo ansiolítico. Em concordância com estes dados, camundongos *knockout* para a pré-proencefalina e animais mutantes para o receptor  $\delta$  apresentam o fenotipo ansiogênico (FILLIOL *et al.*, 2000; KONIG *et al.*, 1996). Além disso, a ativação dos receptores  $\kappa$ -opióide, induzida por análogos da dinorfina, também reduzem a ansiedade experimental (TSUDA *et al.*, 1996).

Como as encefalinas e os agonistas do receptor  $\kappa$ -opióide, a N/OFQ, agindo no receptor NOP, também reduz a ansiedade experimental. Dois anos após a descoberta deste peptídeo, Jenck e colaboradores (1997) relataram um efeito do tipo ansiolítico induzido pela

N/OFQ em ratos avaliados em diversos modelos de ansiedade, como o teste da caixa claro-escuro e o labirinto em cruz elevado e, posteriormente, estes dados foram confirmados pelo mesmo grupo (JENCK *et al.*, 2000) para um agonista sintético do receptor NOP, o Ro64-6198. Em acordo com a literatura, os dados apresentados neste trabalho, também corroboram o efeito do tipo ansiolítico produzido pela N/OFQ, sendo que, pela primeira vez, este efeito foi caracterizado em camundongos.

Por outro lado, os primeiros relatos de atividade farmacológica da NST surgiram em 1998 e, até hoje, poucos estudos enfocam os efeitos deste peptídeo, devido ao fato do seu receptor ainda não ter sido identificado. Atualmente, a maioria dos efeitos descrita para NST é devido a um provável antagonismo da resposta à N/OFQ, pois a NST, apesar de não se ligar ao receptor NOP, age como um antagonista funcional da N/OFQ (OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998). Diversos estudos, incluindo o presente trabalho, têm mostrado que as respostas farmacológicas da N/OFQ são revertidas pela NST, tais como a nocicepção em diversas condições experimentais (NAKANO *et al.*, 2000; OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998; YAMAMOTO e SAKASHITA, 1999), a inibição da resposta analgésica induzida pela morfina (ZHAO *et al.*, 1999), o prejuízo de memória (HIRAMATSU e INOUE, 1999), o aumento da ingestão alimentar (OLSZEWSKI *et al.*, 2000) e a liberação de glutamato (NICOL *et al.*, 1998), sendo que este bloqueio decorrente da associação entre NST e N/OFQ se deve provavelmente a um antagonismo fisiológico, visto que OKUDA-ASHITAKA e colaboradores (1998) mostraram que a NST não se liga no mesmo receptor da N/OFQ. Poucos estudos, porém, relatam os efeitos da NST *per se*, sendo que a maioria enfoca processos nociceptivos (NAKAGAWA *et al.*, 1999; NAKANO *et al.*, 2000; INOUE *et al.*, 2003).

Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, que a NST é um peptídeo com potente efeito ansiogênico em camundongos. Além disso, a NST-C6, um fragmento da NST, composto por uma seqüência de aminoácidos que é completamente conservada nas diversas isoformas de NST de todas as espécies estudadas (OKUDA-ASHITAKA e ITO, 2000), compartilha das mesmas propriedades do peptídeo bovino íntegro no LCE.

No entanto, é importante mencionar que o presente estudo foi obtido usando a NST de origem bovina, composta por 17 resíduos de aminoácidos, e que difere do peptídeo murino que possui 41 aminoácidos na sua cadeia. Deste modo, não pode ser descartada a possibilidade de a NST murina apresentar uma propriedade biológica distinta em camundongos e que a isoforma bovina não compartilhe desta ação. Entretanto, Okuda-

Ashitaka e colaboradores (1998) mostraram haver uma equipotência da resposta entre a NST murina e a bovina na inibição da alodinia induzida pela N/OFQ e prostaglandina E<sub>2</sub>. Aliado aos resultados do presente trabalho, onde o efeito ansiogênico da NST foi mimetizado pelo efeito da NST-C6, cuja seqüência é completamente conservada nas diferentes isoformas de NST, estes estudos argumentam contra uma possível diferença na bioatividade entre a NST murina e a bovina. Além disso, os resultados apresentados neste estudo mostram que a fração C-terminal da NST foi um pouco mais potente que o peptídeo íntegro, quando avaliada em camundongos no LCE, o que pode ser devido a maior acessibilidade que o fragmento C-terminal possui em relação à NST em se ligar ao seu sítio de ação.

Esses efeitos moduladores da ansiedade experimental produzidos pela administração central de NST, NST-C6 e N/OFQ parecem ser específicos, pois estes peptídeos não modificaram a atividade locomotora dos animais nas doses que causaram seu efeito máximo comparado aos animais do grupo controle. Apenas as doses maiores que 1 nmol de N/OFQ reduziram significativamente a coordenação motora, estando este dado de acordo com a literatura (REINSCHEID *et al.*, 1995; RIZZI *et al.*, 2001). Além disso, a injeção central de altas doses de N/OFQ (maiores que 1 nmol) induziu hipotermia nos animais, fato este também foi relatado por CHEN e colaboradores (2001) e poderia estar levando ao prejuízo da coordenação motora apresentado pelos animais tratados com N/OFQ em doses superiores a 1 nmol.

É interessante salientar que as curvas dose-resposta do efeito ansiogênico e ansiolítico da NST (NST-C6) e da N/OFQ são em forma de U e de sino, respectivamente. Diversos estudos descreveram curvas dose-resposta nestes formatos anteriormente citados para a NST (OKUDA-ASHITAKA *et al.*, 1998; ZHAO, *et al.*, 1999) e para a N/OFQ (JENCK *et al.*, 1997), sendo que curvas em forma de sino também foram relatadas para o efeito ansiolítico da N/OFQ em ratos submetidos ao LCE e ao teste da caixa claro-escuro (JENCK *et al.*, 1997).

Esta forma de curva dose-resposta é comum para peptídeos e em doses baixas a curva tem uma característica de dose-resposta comum a todas as substâncias com ação farmacológica, enquanto que em doses altas, a curva não se apresenta na forma de um platô, pois ocorre redução decrescente da resposta farmacológica, sendo que a explicação para este fenômeno pode ser devido aos peptídeos estarem co-localizados a outros neurotransmissores e, deste modo, dependendo da dose de N/OFQ injetada ocorre a liberação de outros neurotransmissores que também estão envolvidos na ansiedade (HOKFELT *et al.*, 2003). Além disso, outros fatores poderiam explicar as curvas em forma de U e de sino para os

peptídeos, tais como a perda de seletividade da resposta ao peptídeo, à ativação de outros receptores (HOKFELT *et al.*, 2000), ou até mesmo, devido à dessensibilização do receptor alvo, fenômeno este já relatado para o receptor da N/OFQ (CHENG *et al.*, 1997).

O presente estudo também mostrou que a NST e NST-C6 induzem efeito ansiogênico que foi mantido até 15 min após a administração destes peptídeos e somente depois de 30 min da injeção que ocorre a perda do efeito farmacológico. No entanto, para a N/OFQ apenas nos primeiros 5 min após a injeção i.c.v. que o efeito ansiolítico foi visto, sendo que a 15 ou 30 min do tratamento central este efeito já foi abolido.

As doses efetivas máximas de NST (1 pmol) e NST-C6 (0,1 pmol) que induzem efeito ansiogênico foram 10 a 100 vezes menores do que a dose de N/OFQ (10 pmol) que produziu efeito ansiolítico máximo. Além disso, convém reforçar que os efeitos comportamentais da NST e NST-C6 são mais duradouros quando comparados aos da N/OFQ e, deste modo, é interessante notar que como ambos são derivados do mesmo precursor, a ppN/OFQ, a modulação da ansiedade pode ser dependente da biodisponibilidade, o que inclui a formação e a degradação de cada um destes peptídeos em áreas cerebrais específicas.

Um outro ponto importante a ser mencionado é sobre o processamento da ppN/OFQ, que pouco se sabe deste processo, além do fato do pró-hormônio convertase 2 ter uma função importante na formação da N/OFQ. Extratos hipotalâmicos e amigdalóides de camundongos *knockout* desta proteína apresentam um déficit nos níveis de N/OFQ de, aproximadamente, 10 a 30 % comparado com o grupo controle (ALLEN *et al.*, 2001). Além disso, enquanto a ppN/OFQ não é detectável em extratos de hipotálamo de animais controle, os camundongos deficientes do pró-hormônio convertase 2 apresentam acúmulo de ppN/OFQ (ALLEN *et al.*, 2001).

Por outro lado, as evidências genéticas do papel fisiológico dos derivados da ppN/OFQ na ansiedade são controversas, pois camundongos *knockout* para a ppN/OFQ apresentam níveis de ansiedade aumentados quando expostos a novos ambientes e prejuízo na adaptação ao estresse repetido (KOSTER *et al.*, 1999). No entanto, animais *knockout* para o receptor NOP não apresentam qualquer diferença comportamental no LCE, quando comparados ao grupo *wild-type* (MAMIYA *et al.*, 1998). Diversas razões poderiam explicar esta discrepância dos dados, incluindo uma possível contribuição de outros derivados da ppN/OFQ (como a N/OFQII) que poderiam estar modulando a ansiedade. Uma outra hipótese seria da mediação do efeito ansiolítico da N/OFQ ser feita via um receptor ainda não caracterizado farmacologicamente, além disso, diferenças genéticas entre as linhagens de animais *knockout* poderiam estar influenciando estas respostas contrastantes.

Um achado importante do nosso trabalho, além da verificação do efeito do tipo ansiogênico da NST e do seu fragmento C-terminal foi, que nenhum estudo anterior mostrou, que a ação do tipo ansiolítica da N/OFQ decorre da ativação do receptor NOP, pelo fato de o UFP-101, um antagonista NOP seletivo (CALO *et al.*, 2002), bloquear o efeito da N/OFQ no LCE, sugerindo que o receptor NOP está mediando a ação do tipo ansiolítica da N/OFQ. O UFP-101, no entanto, não modificou significativamente *per se* a resposta comportamental de camundongos submetidos no LCE, o que está de acordo com os dados obtidos de estudos com animais *knockout* para o receptor NOP, visto que estes não apresentam alteração espontânea do comportamento quando comparados aos controles *wild-type* no LCE (MAMIYA *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação do efeito ansiolítico e ansiogênico induzido pela N/OFQ e NST (NST-C6), respectivamente, ainda não é conhecido. A capacidade dos dois peptídeos em modular a ansiedade correlaciona-se bem com estudos histoquímicos e autoradiográficos, que mostram níveis elevados da expressão dos peptídeos ppN/OFQ, NST, N/OFQ e receptor NOP em diversas áreas do cérebro relacionadas com o controle da emocionalidade (DARLAND *et al.*, 1998). A este respeito, estudos utilizando a técnica de hibridização *in situ* para o RNAm da ppN/OFQ no cérebro de camundongos revelou particularmente intensa marcação de neurônios do septo lateral, septohipocampal, núcleo central da amígdala e hipocampo (BOOM *et al.*, 1999; KOSTER, *et al.*, 1999).

Em particular, quanto ao efeito ansiolítico da N/OFQ, além de haver uma importante expressão deste peptídeo e do seu receptor em áreas do sistema límbico envolvidas com a modulação da ansiedade (DARLAND *et al.*, 1998), outros estudos têm relatado o envolvimento da N/OFQ na modulação da liberação e transmissão da serotonina e do GABA no sistema nervoso central, cujos neurotransmissores desempenham um papel fundamental na patologia da ansiedade (SINISCALCHI *et al.*, 1999; MEIS e PAPE, 2001; MARTI *et al.*, 2003).

Estudos relatam que a N/OFQ inibe a liberação de neurotransmissores em várias preparações, devido a redução da excitabilidade neuronal pré-sináptica (CALO *et al.*, 2000). Entretanto, Sbrenna e colaboradores (1999) mostraram que o efluxo de GABA não foi afetado pela N/OFQ avaliado em preparações de sinaptossomas de ratos. Pouco se sabe, porém, sobre a influência da N/OFQ nas correntes pós-sinápticas, mas estudos relataram que a N/OFQ reduziu as correntes inibitórias pós-sinápticas GABAérgicas em 49 % e em 48 % nos neurônios da substância cinzenta periaquedutal e da amígdala lateral de ratos, respectivamente (VAUGHAN *et al.*, 1997; MEIS e PAPE, 2001). Vários estudos têm mostrado o

envolvimento do complexo amigdalóide e da substância cinzenta periaquedutal na mediação das emoções, especialmente da ansiedade (FENDT e FANSELOW, 1999; MILLAN, 2003). Além disso, níveis relativamente altos de N/OFQ, seu precursor e do receptor NOP são encontrados nestes áreas cerebrais (SHIMOHIRA *et al.*, 1997; SIM e CHILDERS, 1997; NEAL *et al.*, 1999a e b).

Visando estudar a participação do sistema GABAérgico na ação da N/OFQ e NST na modulação da ansiedade experimental, avaliou-se a resposta decorrente da interação entre estes peptídeos e ligantes de diferentes sítios do receptor GABA<sub>A</sub>. Em relação a N/OFQ, o pré-tratamento com flumazenil (1 mg/kg, i.p.), um antagonista do sítio benzodiazepínico, preveniu a resposta ansiolítica induzida por este peptídeo, sugerindo que o mecanismo de ação para esta resposta possa envolver diretamente a participação do sistema GABAérgico e, em especial, do sítio benzodiazepínico. No entanto, o pré-tratamento i.p. com  $\beta$ -CCE (5 mg/kg), um agonista inverso do sítio benzodiazepínico, impediu o efeito ansiolítico da administração central de N/OFQ (10 pmol). Por outro lado, o pré-tratamento com pentilenotetrazol (PTZ; 20 mg/kg, i.p.), um antagonista GABA<sub>A</sub> do sítio da picrotoxina, modificou apenas alguns parâmetros da resposta ansiolítica induzida pela injeção de N/OFQ, além de reduziu a atividade locomotora do camundongo no LCE, sendo este efeito semelhante ao do diazepam. O bloqueio da resposta ansiolítica da N/OFQ através da co-injeção com o flumazenil reforçam a hipótese de que a N/OFQ possa estar modulando o sistema GABAérgico, no entanto, os dados da co-injeção de PTZ ou  $\beta$ -CCE e N/OFQ podem sugerir que a N/OFQ esteja agindo diretamente em um dos vários sítios do complexo GABA<sub>A</sub>, ou que as doses de  $\beta$ -CCE e PTZ utilizadas não eram apropriadas para contrabalançar o efeito da N/OFQ.

Quanto à NST, na espinha dorsal de ratos este peptídeo suprime a transmissão sináptica inibitória mediada pelos receptores GABAérgicos e glicinérgicos (ZEILHOFER *et al.*, 2000). Por outro lado, esta ação da NST não parece ser refletida no sistema nervoso central, onde este peptídeo não produziu efeito na corrente sináptica e nas propriedades de membrana dos neurônios GABAérgicos do núcleo lateral da amígdala (MEIS e PAPE, 2001). Semelhante a estes fatos, a NST também não afetou as propriedades de membrana dos neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (CONNOR *et al.*, 1999).

Em relação a NST-C6, o pré-tratamento com flumazenil (1 mg/kg, i.p.) não modificou o efeito do tipo ansiogênico deste peptídeo no LCE. Por outro lado, o diazepam (0,25 mg/kg, i.p.) bloqueou a resposta induzida pela NST-C6 (0,1 pmol) e o pré-tratamento com PTZ (20 mg/kg, i.p.) potencializou a ação do tipo ansiogênica produzida por uma dose

sub-máxima de NST-C6 (0,01 pmol), sugerindo que a resposta decorrente da interação do PTZ e do DZP com a NST é fruto de um sinergismo fisiológico, porém devido a falta de informação sobre o receptor pelo qual a NST se liga, não se pode descartar a interação farmacológica destes sistemas.

Na verdade, diversas drogas podem interagir nos diversos sítios do receptor GABA<sub>A</sub> e produzir modificação alostérica do influxo de Cl<sup>-</sup> ativado pelo GABA, tais como os benzodiazepínicos, o PTZ e a β-CCE (SIEGHART, 1992; KORPI *et al.*, 2002). Entretanto existe uma heterogeneidade de receptores GABA<sub>A</sub> e, no mínimo, 15 subunidades diferentes já foram identificadas, sendo que estas podem se combinar de várias maneiras para formar os diferentes subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> (WHITING, 2003). Deste modo, os peptídeos N/OFQ e NST podem estar interagindo e/ou modulando algumas destas subunidades que formam o complexo GABA<sub>A</sub>, como a subunidade α<sub>2</sub> que se encontra envolvida com as respostas de ansiedade de camundongos (WHITING, 2003).

Como esperado neste estudo, o flumazenil (FMZ) reverteu o efeito ansiolítico do diazepam (DALVI e RODGERS, 1999), mas não apresenta efeito *per se* como descrito na literatura (PRZEGALINSKI *et al.*, 2000; DALVI e RODGERS, 1999), pois o FMZ age no sítio benzodiazepínico como um antagonista com pouca ou nenhuma eficácia intrínseca (HAEFELY, 1990), o que sugere que o bloqueio da resposta ansiolítica da N/OFQ produzido pela co-injeção com FMZ, ou a falta dele em relação ao efeito ansiogênico da NST-C6 não foi devido ao sinergismo de ação entre o FMZ e a N/OFQ ou a NST-C6. Além disso, não há nenhuma indicação que mostre a afinidade do FMZ pelo receptor NOP, mas é interessante destacar que o FMZ previne o efeito ansiolítico de drogas que não agem diretamente no receptor GABA<sub>A</sub>, como agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, antagonistas 5-HT<sub>2</sub> e também antagonistas CCK (NAGATANI *et al.*, 1991; CHOPIN e BRILEY, 1993), o que poderia indicar que a modulação do sistema GABAérgico pode ser feita não só diretamente através da atuação no sistema de receptores, mas também indiretamente através de uma via descendente comum que module a ansiedade e que inclua o sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub>.

Resumindo, este estudo confirmou um efeito do tipo ansiolítico para a N/OFQ e demonstrou um potente efeito ansiogênico para a NST e para o seu fragmento em camundongos no LCE. Como a NST e a N/OFQ são derivadas da ppN/OFQ, estes dados sugerem fortemente que os níveis de ansiedade em camundongos podem ser modulados, em direções opostas, dependendo de como o precursor é processado ou de qual dos dois sistemas é o mais relevante. O efeito do tipo ansiolítico da N/OFQ se deve à interação com o receptor



NOP e parece haver uma possível interação entre a N/OFQ, mas não entre a NST e o sistema GABAérgico.

Assim como na ansiedade, poucos estudos relatam o envolvimento dos peptídeos opióides na depressão, sendo que inibidores do metabolismo das encefalinas (KITA *et al.*, 1997), agonistas endógenos do receptor  $\delta$ -opióide como a Met-encefalina e a Leu-encefalina (TEJEDOR-REAL *et al.*, 1995) e antagonistas do receptor  $\kappa$ -opióide induziram uma ação do tipo antidepressiva (MAGUE *et al.*, 2003). De maneira complementar, camundongos *knockout* para o receptor  $\delta$ -opióide apresentam um perfil depressivo, enquanto que a falta do receptor  $\kappa$ -opióide não modificou o perfil comportamental de camundongos comparados com os controles (FILLIOL *et al.*, 2000). A este respeito, o presente estudo também mostra claramente o envolvimento do sistema N/OFQ – receptor NOP na depressão, reforçado através de evidências farmacológicas e genéticas. Como descrito, a administração i.c.v. de UFP-101, um antagonista seletivo do receptor NOP, e a avaliação do perfil comportamental de camundongos *knockout* para o receptor NOP, formam um conjunto de dados complementares que corroboram um efeito do tipo antidepressivo pelo bloqueio da ativação do receptor NOP.

Recentemente, Calo e colaboradores (2002) publicaram um estudo sobre as ações do UFP-101 mostrando que esta molécula de natureza peptídica age como um antagonista puro, competitivo e altamente seletivo para o receptor NOP. O efeito do tipo antidepressivo produzido pela administração i.c.v. de UFP-101 no teste da natação forçada está, portanto, de acordo com um estudo publicado recentemente, onde dois antagonistas seletivos para o receptor NOP, um peptídico ( $[Nphe^1]N/OFQ(1-13)NH_2$ ) e outro não-peptídico (J-113397), induziram um efeito do tipo antidepressivo em camundongos avaliados no mesmo paradigma experimental (REDROBE *et al.*, 2002).

Por outro lado, a N/OFQ e a NST não modificaram o tempo de imobilidade na natação forçada, porém, a N/OFQ reverteu a ação do tipo antidepressiva induzida pelo UFP-101, denotando o envolvimento do receptor NOP na mediação da atividade do tipo antidepressiva do UFP-101. É importante salientar que a razão agonista/antagonista necessária para reverter parcialmente (1/10) ou prevenir completamente (1/3) o efeito do UFP-101 feito pela N/OFQ, foi a mesma requerida pelo UFP-101 para prevenir completamente ou parcialmente a ação da N/OFQ 1 nmol na atividade locomotora (CALO *et al.*, 2002).

Sabemos, entretanto que alguns resultados falso-positivos com certas substâncias que não possuem uma ação antidepressiva foram descritos para o teste da natação forçada

(LUCKI, 1997; CRYAN *et al.*, 2002). Os dados obtidos, porém, com os animais *knockout* para o receptor NOP descartam essa possibilidade, visto que os camundongos *wild-type* que possuem uma herança genética diferente dos Swiss, utilizados para os estudos iniciais de avaliação das curvas dose-resposta, foram igualmente responsivos a redução do tempo de imobilidade após o tratamento com UFP-101. Além disso, camundongos *knockout* para o receptor NOP apresentam redução no tempo de imobilidade quando comparados com os *wild-type*, sendo que o tempo de imobilidade para os camundongos *wild-type* tratados com UFP-101 foi muito próximo ao dos *knockout* tratados com salina. Por último, o UFP-101 foi inativo em animais *knockout* para o receptor NOP. Existe, porém, um viés nestes dados devido à diferença na linha de base do tempo de imobilidade entre os camundongos *knockout* e os *wild-type*, o que poderia estar prejudicando a visualização de um provável efeito induzido pelo UFP-101 nos camundongos *knockout* para o receptor NOP, visto que a linha de base para o tempo de imobilidade dos animais mutantes é bastante baixa.

A atividade do tipo antidepressiva do UFP-101 foi avaliada em outro teste comportamental utilizado para prever ação de drogas antidepressivas, o teste de suspensão pela cauda. Neste teste, os resultados obtidos foram similares àqueles obtidos do TNF, isto é, os camundongos tratados com UFP-101 apresentaram perfil do tipo antidepressivo, sendo que a N/OFQ *per se* não modificou a resposta dos animais quando comparados com os controles, porém reverteu a ação do tipo antidepressiva induzida pelo UFP-101, sugerindo que o receptor NOP também está mediando a resposta induzida pelo antagonista NOP no TSC. Além disso, do mesmo modo que no TNF, os camundongos mutantes para o receptor NOP, apresentaram um fenotipo antidepressivo quando submetidos ao TSC.

De modo a fortalecer a hipótese de que o bloqueio do receptor NOP induz ação do tipo antidepressiva, avaliou-se a resposta do UFP-101 em outra espécie, utilizando o teste da natação forçada para ratos. Neste paradigma, o UFP-101 na dose de 10 pmol produziu o mesmo perfil de resposta da desipramina, indicando que este antagonista NOP também induz ação do tipo antidepressiva em ratos. Além disso, como proposto por Detke e colaboradores (1995), o padrão de resposta exibido pelo UFP-101 no TNF para ratos foi semelhante ao de fármacos antidepressivos noradrenérgicos, isto porque o UFP-101 reduziu o tempo de imobilidade e elevou o de escalada, sem modificar o tempo de natação, como ocorre para a desipramina. Por outro lado, fármacos antidepressivos serotoninérgicos, como a fluoxetina, apresentam redução do tempo de imobilidade e aumento do tempo de natação, sem, no entanto, alterar o tempo de escalada das paredes do cilindro.

Os dados obtidos em camundongos, com o TNF e o TSC, e em ratos submetidos ao TNF indicam claramente que o efeito do tipo antidepressivo induzido por antagonistas do receptor NOP é um fenômeno consistente que se mantém em diferentes espécies (ratos e camundongos) e em diferentes testes experimentais utilizados para avaliar atividade antidepressiva (TNF e TSC).

Atualmente, nenhuma informação objetiva está disponível a respeito do provável mecanismo de ação pelo qual antagonistas do receptor NOP produzem este efeito do tipo antidepressivo. No entanto, a N/OFQ modula a liberação de diversos neurotransmissores (SCHLICKER e MORARI, 2000), em particular, a N/OFQ ao agir sobre os receptores NOP do córtex cerebral, inibe a liberação de noradrenalina e serotonina em preparações de sinaptossomas e de fatias de cérebro (ROMINGER *et al.*, 2002; SBRENNNA *et al.*, 2000; SCHLICKER *et al.*, 1998; SINISCALCHI *et al.*, 1999; SINISCALCHI *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos têm mostrado que antagonistas dos receptores NOP, incluindo o UFP-101, revertem a inibição da liberação de noradrenalina e de serotonina em preparações de sinaptossomas (CALO *et al.*, 2002; MARTI *et al.*, 2003). Além disso, a N/OFQ agindo em receptores NOP localizados na pré-sinapse inibe a atividade de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (CONNOR *et al.*, 1996) e serotonérgicos do núcleo dorsal da rafe de ratos (VAUGHAN e CHRISTIE, 1996), devido a um aumento nas correntes de K<sup>+</sup>, conduzindo à hiperpolarização da célula. Estes efeitos são revertidos pelo UFP-101, tanto em neurônios noradrenérgicos quanto em serotonérgicos, do *locus coeruleus* e do núcleo dorsal da rafe, respectivamente (GAVIOLI *et al.*, 2003).

No presente estudo foram obtidos resultados preliminares a respeito do envolvimento do sistema monoaminérgico na ação do UFP-101 no teste da natação forçada. Em acordo com a literatura, o pré-tratamento com PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, não modificou *per se* o tempo de imobilidade dos animais comparado ao grupo controle (PAGE *et al.*, 1999), nem daqueles tratados com desipramina, mas preveniu completamente a ação induzida pela fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Além disso, o efeito do tipo antidepressivo do UFP-101 foi também parcialmente reduzido em animais tratados com PCPA.

Por outro lado, o pré-tratamento com DSP-4, uma neurotoxina noradrenérgica, não alterou *per se* o perfil de resposta dos animais co-tratados com salina, mas preveniu completamente a ação antidepressiva da desipramina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (confirmando outros estudos, DANYSZ *et al.*, 1986), sem, no entanto, modificar a resposta da fluoxetina e do UFP-101.

Conjuntamente, estas séries de experimentos sugerem que o sistema serotoninérgico esta fortemente envolvido no efeito do tipo antidepressivo induzido pelos antagonistas do receptor NOP, em particular pelo UFP-101. Isso também pode ser visto pela habilidade em prevenir as ações inibitórias da N/OFQ na atividade do núcleo dorsal da rafe e/ou nas projeções terminais destes neurônios no córtex cerebral (MARTI *et al.*, 2003; GAVIOLI *et al.*, 2003). Entretanto, não se pode descartar o envolvimento das vias noradrenérgicas na ação do tipo antidepressiva induzida por antagonistas do receptor NOP, ao menos em ratos, visto que o padrão de resposta do UFP-101 nesta espécie foi muito similar aos de drogas que atuam inibindo a recaptção de noradrenalina (DETKE *et al.*, 1995). Além disso, Danysz e colaboradores (1986) relataram que o DSP-4 previne os efeitos da desipramina, mas não aqueles produzidos pela reboxetina, um inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina (CRYAN *et al.*, 2002), o que poderia também estar ocorrendo em camundongos tratados com DSP-4 e UFP-101. Assim, pode ser proposto que os antagonistas do receptor NOP produzem seus efeitos antidepressivos por prevenirem seletivamente as ações inibitórias da N/OFQ nos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos, aumentando a transmissão destes dois sistemas.

Os resultados apresentados neste tese mostram a participação do sistema N/OFQ – receptor NOP na regulação da ansiedade e da depressão experimental, enfocando particularmente que a ativação do receptor NOP estaria envolvida na redução da ansiedade, enquanto que o bloqueio deste receptor produz uma ação do tipo antidepressiva. Estudos bioquímicos têm mostrado que a N/OFQ interage com as monoaminas, especialmente inibindo a liberação destes neurotransmissores e ativando os neurônios pós-sinápticos monoaminérgicos, enquanto antagonistas do receptor NOP bloqueiam estas ações da N/OFQ. Através de estudos comportamentais mostramos que o sistema GABAérgico parece estar mediando o efeito ansiolítico induzido pela N/OFQ, enquanto que para a depressão experimental, o sistema serotoninérgico parece estar mediando este efeito antidepressivo induzido pelos antagonistas do receptor NOP.

Atualmente, no tratamento farmacológico da ansiedade e da depressão há uma predominância de drogas que atuam diretamente nos sistemas de neurotransmissão monoaminérgico e GABAérgico e, tanto a redução da transmissão monoaminérgica, especialmente da serotonina, produzida por fármacos utilizados para o tratamento da ansiedade, tais como os antagonistas 5-HT e agonistas de receptores pré-sinápticos 5-HT, quanto o aumento da resposta monoaminérgica, amplamente utilizado na clínica para o tratamento da depressão, como os inibidores da recaptção de monoaminas, podem ser modulados pelo sistema N/OFQ-receptor NOP, o que garante uma resposta farmacológica

qualitativamente similar, mas mecanisticamente distintas dos clássicos ansiolíticos e antidepressivos disponíveis na clínica.

Novas estratégias para o tratamento das psicopatologias são requeridas, devido aos efeitos colaterais oriundos do uso dos fármacos disponíveis, e os neuropeptídeos são alvos terapêuticos bastante atrativos para o desenvolvimento de novas drogas, o que candidata o sistema N/OFQ-receptor NOP como um novo alvo terapêutico para o tratamento da ansiedade e da depressão.

## ***CONCLUSÃO***

## CONCLUSÃO

Os nossos resultados mostram que a NST, derivada da ppN/OFQ, induz efeito do tipo ansiogênico em camundongos submetidos ao LCE e um perfil de resposta semelhante foi obtido com o seu fragmento C-terminal. Por outro lado, a N/OFQ que é também derivada da ppN/OFQ, induz efeito oposto, ou seja, a N/OFQ leva a um efeito do tipo ansiolítico, que foi bloqueado pelo UFP-101, um antagonista do receptor NOP, sendo que sozinho o UFP-101 não alterou o desempenho comportamental dos animais, indicando que este receptor está mediando a redução da ansiedade induzida pela N/OFQ no LCE. Além disso, como amplamente descrito na literatura, a NST e a NST-C6 antagonizaram o efeito do tipo ansiolítico da N/OFQ, porém devido ao fato de a NST não atuar no mesmo receptor da N/OFQ, acredita-se que este antagonismo seja fisiológico.

Outro fato que merece destaque é que o efeito ansiogênico da NST e da NST-C6, além de ser mais potente que o da N/OFQ, é mais duradouro, porém como ambas são oriundas do mesmo precursor, sugere-se que os peptídeos derivados da ppN/OFQ possam modular a ansiedade em direções opostas, o que vai depender de como o precursor é processado ou de qual dos dois sistemas é o mais relevante num determinado momento.

Neste estudo mostramos que o mecanismo pelo qual a N/OFQ induz efeito ansiolítico no LCE envolve, provavelmente, uma interação entre este peptídeo e o sistema GABAérgico, em especial, o sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub>, mas o mesmo não parece acontecer para a NST, o que merece ser melhor investigado.

Na depressão experimental, vimos que o bloqueio do receptor NOP, tanto farmacológico (feito pelo tratamento com um antagonista do receptor NOP, o UFP-101) quanto genético (verificado em animais mutantes para o receptor NOP), induziu efeito do tipo antidepressivo avaliado em vários testes comportamentais validados e amplamente utilizados para estudar atividade antidepressiva, como o teste da natação forçada e o teste de suspensão pela cauda. Por outro lado, a N/OFQ *per se* não modificou os parâmetros comportamentais no TNF e TSC, mas bloqueou o efeito do UFP-101 em ambos os testes. O efeito do tipo antidepressivo induzido por antagonistas NOP em camundongos, também foi observado em ratos, o que reforça a importância do sistema N/OFQ-receptor NOP na modulação da depressão experimental.

Objetivando estudar o mecanismo pelo qual os antagonistas NOP induzem efeito antidepressivo, avaliamos a participação das monoaminas na mediação do efeito induzido

pelo UFP-101. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que a serotonina exerce papel importante na mediação deste efeito, pois o tratamento com o inibidor da síntese de serotonina PCPA bloqueou parcialmente o efeito do UFP-101 no teste da natação forçada, enquanto que a neurotoxina noradrenérgica DSP-4 não modificou o efeito do tipo antidepressivo do UFP-101. Não se pode, porém, descartar o envolvimento da noradrenalina na atividade dos antagonistas NOP, especialmente em ratos, pois a injeção i.c.v. de UFP-101 nestes animais induziu padrão de resposta comportamental semelhante a drogas bloqueadoras da recaptação de noradrenalina, além disso, evidências bioquímicas da literatura mostram que a inibição da liberação de noradrenalina e da transmissão noradrenérgica induzida pela N/OFQ foi revertida por antagonistas NOP, incluindo o UFP-101.

Estes dados somados apontam para a importância dos peptídeos derivados da ppN/OFQ na modulação da ansiedade e, em particular, para o sistema N/OFQ–receptor NOP na modulação da depressão experimental e candidatam este novo sistema como um promissor alvo terapêutico para o tratamento das psicopatologias da ansiedade e da depressão.



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R. G., PENG, B., PELLEGRINO, M. J., MILLER, E. D., GRANDY, D. K., LUNDBLAD, J. R., WASHBURN, C. L. e PINTAR, J. E. Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. **J. Neurosci.**, 21 (16): 5864-70, 2001.
- ARLETTI, R. e BERTOLINI, A. Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. **Life Sci.**, 41(14): 1725-30, 1987.
- BANNON, A. W., SEDA, J., CARMOUCHE, M., FRANCIS, J. M., NORMAN, M. H., KARBON, B. e MCCALEB, M. L. Behavioral characterization of neuropeptide Y knockout mice. **Brain Res.**, 868(1): 79-87, 2000.
- BERTORELLI, R., CORRADINI, L., RAFIQ, K., TUPPER, J., CALO, G. e ONGINI, E. Nociceptin and the ORL-1 ligand [Phe<sup>1</sup>psi (CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub> exert anti-opioid effects in the Freund's adjuvant-induced arthritic rat model of chronic pain. **Br. J. Pharmacol.**, 128 (6): 1252-8, 1999.
- BERTORELLI, R., BASTIA, E., CITTERIO, F., CORRADINI, L., FORLANI, A. e ONGINI, E. Lack of the nociceptin receptor does not affect acute or chronic nociception in mice. **Peptides**, 23 (9): 1589-96, 2002.
- BIGONI, R., GIULIANI, S., CALO, G., RIZZI, A., GUERRINI, R., SALVADORI, S., REGOLI, D. e MAGGI, C. A. Characterization of nociceptin receptors in the periphery: in vitro and in vivo studies. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 359 (3): 160-7, 1999.
- BOOM, A., MOLLEREAU, C., MEUNIER, J. C., VASSART, G., PARMENTIER, M., VANDERHAEGHEN, J. J. e SCHIFFMANN, S. N. Distribution of the nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. **Neuroscience**, 91 (3): 991-1007, 1999.
- BOURIN, M., FIOCCO, A. J. e CLENET, F. How valuable are animal models in defining antidepressant activity? **Hum. Psychopharmacol.**, 16 (1): 9-21, 2001.
- BROOM, D. C., JUTKIEWICZ, E. M., FOLK, J. E., TRAYNOR, J. R., RICE, K. C. e WOODS, J. H. Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. **Neuropsychopharmacology**, 26(6): 744-55, 2002.
- BROQUA, P., WETTSTEIN, J. G., ROCHER, M. N., GAUTHIER-MARTIN, B. e JUNIEN, J. L. Behavioral effects of neuropeptide Y receptor agonists in the elevated plus-maze and fear-potentiated startle procedures. **Behav. Pharmacol.**, 6(3): 215-222, 1995.
- BUNZOW, J. R., SAEZ, C., MORTRUD, M., BOUVIER, C., WILLIAMS, J. T., LOW, M. e GRANDY, D. K. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. **FEBS Lett.**, 347 (2-3): 284-8, 1994.

- CALO, G., GUERRINI, R., RIZZI, A., SALVADORI, S. e REGOLI, D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. **Br. J. Pharmacol.**, **129** (7): 1261-83, 2000.
- CALO, G., RIZZI, A., MARZOLA, G., GUERRINI, R., SALVADORI, S., BEANI, L., REGOLI, D. e BIANCHI, C. Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay. **Br. J. Pharmacol.**, **125** (2): 373-8, 1998,
- CALO, G., GUERRINI, R., BIGONI, R., RIZZI, A., MARZOLA, G., OKAWA, H., BIANCHI, C., LAMBERT, D. G., SALVADORI, S. e REGOLI, D. Characterization of [Nphe(1)]nociceptin(1-13)NH(2), a new selective nociceptin receptor antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, **129** (6): 1183-93, 2000.
- CALO, G., RIZZI, A., RIZZI, D., BIGONI, R., GUERRINI, R., MARZOLA, G., MARTI, M., MCDONALD, J., MORARI, M., LAMBERT, D. G., SALVADORI, S. e REGOLI, D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH2, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. **Br. J. Pharmacol.**, **136** (2): 303-11, 2002.
- CARRASCO, G. A. e VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur. J. Pharmacol.**, **463** (1-3): 235-72, 2003.
- CHAMPION, H. C. e KADOWITZ, P. J. [Tyr1]-nociceptin, a novel nociceptin analog, decreases systemic arterial pressure by a naloxone-insensitive mechanism in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **234** (2): 309-12, 1997.
- CHEN, X., MCCLATCHY, D. B., GELLER, E. B., LIU-CHEN, L., TALLARIDA, R. J. e ADLER, M. W. Possible mechanism of hypothermia induced by intracerebroventricular injection of orphanin FQ/nociceptin. **Brain Res.**, **904** (2): 252-8, 2001.
- CHEN, Y., FAN, Y., LIU, J., MESTEK, A., TIAN, M., KOZAK, C. A. e YU, L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. **FEBS Lett.**, **347** (2-3): 279-83, 1994.
- CHENG, Z. J., FAN, G. H., ZHAO, J., ZHANG, Z., WU, Y. L., JIANG, L. Z., ZHU, Y., PEI, G. e MA, L. Endogenous opioid receptor-like receptor in human neuroblastoma SK-N-SH cells: activation of inhibitory G protein and homologous desensitization. **Neuroreport**, **8** (8): 1913-8, 1997.
- CHOPIN, P. e BRILEY, M. The benzodiazepine antagonist flumazenil blocks the effects of CCK receptor agonists and antagonists in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, **110** (4): 409-14, 1993.
- CHU, X., XU, N., LI, P. e WANG, J. Q. The nociceptin receptor-mediated inhibition of the rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, **364** (1): 49-53, 1999.
- CICCOCIOPPO, R., PANOCCA, I., POLIDORI, C., REGOLI, D. e MASSI, M. Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats. **Psychopharmacology (Berl)**, **141** (2): 220-4, 1999.

- CICCOCIOPPO, R., BIONDINI, M., ANTONELLI, L., WICHMANN, J., JENCK, F. e MASSI, M. Reversal of stress- and CRF-induced anorexia in rats by the synthetic nociceptin/orphanin FQ receptor agonist, Ro 64-6198. **Psychopharmacology (Berl)**, **161** (2): 113-9, 2002.
- CONNOR, M., VAUGHAN, C. W., CHIENG, B. e CHRISTIE, M. J. Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, **119** (8): 1614-8, 1996.
- CONNOR, M., VAUGHAN, C. W., JENNINGS, E. A., ALLEN, R. G. e CHRISTIE, M. J. Nociceptin, Phe(1)psi-nociceptin(1 - 13), nocistatin and prepronociceptin(154 - 181) effects on calcium channel currents and a potassium current in rat locus coeruleus in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, **128** (8): 1779-87, 1999.
- CONTARINO, A., DELLU, F., KOOB, G. F., SMITH, G. W., LEE, K. F., VALE, W. e GOLD, L. H. Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1. **Brain Res.**, **835**(1): 1-9, 1999.
- CRYAN, J. F., MARKOU, A. e LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, **23** (5): 238-45, 2002.
- CRYAN, J. F., PAGE, M. E. e LUCKI, I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.**, **436** (3): 197-205, 2002.
- DALVI, A. e RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **62** (4): 727-34, 1999.
- DANYSZ, W., KOSTOWSKI, W., KOZAK, W. e HAUPTMANN, M. On the role of noradrenergic neurotransmission in the action of desipramine and amitriptyline in animal models of depression. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, **38** (3): 285-98, 1986.
- DARLAND, T., HEINRICHER, M. M. e GRANDY, D. K. Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. **Trends Neurosci.**, **21** (5): 215-21, 1998.
- DAUGE, V., SEBRET, A., BESLOT, F., MATSUI, T. e ROQUES, B. P. Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. **Neuropsychopharmacology**, **25**(5): 690-8, 2001.
- DAUTZENBERG, F. M., WICHMANN, J., HIGELIN, J., PY-LANG, G., KRATZEISEN, C., MALHERBE, P., KILPATRICK, G. J. e JENCK, F. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **298** (2): 812-9, 2001.
- DETKE, M. J., RICKELS, M. e LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology (Berl)**, **121** (1): 66-72, 1995.
- DEVINE, D. P., WATSON, S. J. e AKIL, H. Nociceptin/orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuroscience**, **102** (3): 541-53, 2001.

- DeVRIES, A. C., YOUNG, W. S. e NELSON, R. J. Reduced aggressive behaviour in mice with targeted disruption of the oxytocin gene. **J. Neuroendocrinol.**, **9**(5): 363-8, 1997.
- DI GIANNUARIO, A., PIERETTI, S., CATALANI, A. e LOIZZO, A. Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats. **Neurosci. Lett.**, **272** (3): 183-6, 1999.
- DUNHAM, N. W. e MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc. (Baltim)**, **46** (3): 208-9, 1957.
- ERB, K., LIEBEL, J. T., TEGEDER, I., ZEILHOFER, H. U., BRUNE, K. e GEISSLINGER, G. Spinally delivered nociceptin/orphanin FQ reduces flinching behaviour in the rat formalin test. **Neuroreport**, **8** (8): 1967-70, 1997.
- FABER, E. S., CHAMBERS, J. P., EVANS, R. H. e HENDERSON, G. Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisectioned spinal cord preparation in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, **119** (2): 189-90, 1996.
- FENDT, M. e FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **23** (5): 743-60, 1999.
- FERNANDEZ, F., MISILMERI, M. A., FELGER, J. C. e DEVINE, D. P. Nociceptin/Orphanin FQ Increases Anxiety-Related Behavior and Circulating Levels of Corticosterone During Neophobic Tests of Anxiety. **Neuropsychopharmacology**, **8**, 2003.
- FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behav. Brain. Res.**, **125** (1-2): 151-7, 2001.
- FILLIOL, D., GHOZLAND, S., CHLUBA, J., MARTIN, M., MATTHES, H. W., SIMONIN, F., BEFORT, K., GAVERIAUX-RUFF, C., DIERICH, A., LEMEUR, M., VALVERDE, O., MALDONADO, R. e KIEFFER, B. L. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. **Nat. Genet.**, **25** (2): 195-200, 2000.
- FISCHER, A., FORSSMANN, W. G. e UNDEM, B. J. Nociceptin-induced inhibition of tachykinergic neurotransmission in guinea pig bronchus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **285** (2): 902-7, 1998.
- FLORIN, S., SUAUDEAU, C., MEUNIER, J. C. e COSTENTIN, J. Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **317** (1): 9-13, 1996.
- FLORIN, S., SUAUDEAU, C., MEUNIER, J. C. e COSTENTIN, J. Orphan neuropeptide NocII, a putative pronociceptin maturation product, stimulates locomotion in mice. **Neuroreport**, **8** (3): 705-7, 1997.
- FLORIN, S., LEBLOND, F., SUAUDEAU, C., MEUNIER, J. C. e COSTENTIN, J. Comparison of behavioural effects of NocII or NocIII, two related pronociceptin-derived peptides. **Life Sci.**, **65** (25): 2727-33, 1999.

- FUKUDA, K., KATO, S., MORI, K., NISHI, M., TAKESHIMA, H., IWABE, N., MIYATA, T., HOUTANI, T. e SUGIMOTO, T. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. **FEBS Lett.**, **343** (1): 42-6, 1994.
- GAVIOLI, E.C., VAUGHAN, C.W., MARZOLA, G., GUERRINI, R., MITCHELL, V.A., ZUCCHINI, S., DE LIMA, T.C.M., RAE, G.A., SALVADORI, S., REGOLI, D. e CALO', G. Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidences in rats and mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, *submitted*, 2003.
- GARD, P. R., HAIGH, S. J., CAMBURSANO, P. T. e WARRINGTON, C. A. Strain differences in the anxiolytic effects of losartan in the mouse. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **69**(1-2): 35-40, 2001.
- GIULIANI, S. e MAGGI, C. A. Inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide. **Br. J. Pharmacol.**, **118** (7): 1567-9, 1996.
- GIULIANI, S., TRAMONTANA, M., LECCI, A. e MAGGI, C. A. Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **333** (2-3): 177-9, 1997.
- GLASS, M. J., BILLINGTON, C. J. e LEVINE, A. S. Opioids and food intake: distributed functional neural pathways? **Neuropeptides**, **33** (5): 360-8, 1999.
- GRIEBEL, G., PERRAULT, G. e SANGER, D. J. Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. **Brain Res.**, **836** (1-2): 221-4, 1999.
- GRISEL, J. E., MOGIL, J. S., BELKNAP, J. K. e GRANDY, D. K. Orphanin FQ acts as a supraspinal, but not a spinal, anti-opioid peptide. **Neuroreport**, **7** (13): 2125-9, 1996.
- GRIEBEL, G., SIMIAND, J., SERRADEIL-LE GAL, C., WAGNON, J., PASCAL, M., SCATTON, B., MAFFRAND, J. P. e SOUBRIE, P. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **99**(9): 6370-5, 2002.
- GUERRINI, R., CALO, G., RIZZI, A., BIANCHI, C., LAZARUS, L. H., SALVADORI, S., TEMUSSI, P. A. e REGOLI, D. Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. **J. Med. Chem.**, **40** (12): 1789-93, 1997.
- HAEFELY, W. The GABA-benzodiazepine interaction fifteen years later. **Neurochem. Res.**, **15** (2): 169-74, 1990.
- HALFORD, W. P., GEBHARDT, B. M. e CARR, D. J. Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. **J. Neuroimmunol.**, **59** (1-2): 91-101, 1995.
- HAO, J. X., XU, I. S., WIESENFELD-HALLIN, Z. e XU, X. J. Anti-hyperalgesic and anti-allodynic effects of intrathecal nociceptin/orphanin FQ in rats after spinal cord injury, peripheral nerve injury and inflammation. **Pain**, **76** (3): 385-93, 1998.

- HAWES, B. E., GRAZIANO, M. P. e LAMBERT, D. G. Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms. **Peptides**, **21** (7): 961-7, 2000.
- HELYES, Z., NEMETH, J., PINTER, E. e SZOLCSANYI, J. Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. **Br. J. Pharmacol.**, **121** (4): 613-5, 1997.
- HERNANDO, F., FUENTES, J. A., ROQUES, B. P. e RUIZ-GAYO, M. The CCKB receptor antagonist, L-365,260, elicits antidepressant-type effects in the forced-swim test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **261**(3): 257-63, 1994.
- HIGGINS, G. A., KEW, J. N., RICHARDS, J. G., TAKESHIMA, H., JENCK, F., ADAM, G., WICHMANN, J., KEMP, J. A. e GROTTICK, A. J. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. **Eur. J. Neurosci.**, **15** (5): 911-22, 2002.
- HIRAMATSU, M. e INOUE, K. Effects of nocistatin on nociceptin-induced impairment of learning and memory in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **367** (2-3): 151-5, 1999.
- HIRAMATSU, M. e INOUE, K. Nociceptin/orphanin FQ and nocistatin on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. **Br. J. Pharmacol.**, **127** (3): 655-60, 1999.
- HOKFELT, T., BARTFAI, T. e BLOOM, F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. **Lancet Neurol**, **2** (8): 463-72, 2003.
- HOKFELT, T., BROBERGER, C., XU, Z. Q., SERGEYEV, V., UBINK, R. e DIEZ, M. Neuropeptides--an overview. **Neuropharmacology**, **39** (8): 1337-56, 2000.
- HOKFELT, T., JOHANSSON, O., LJUNGDAHL, A., LUNDBERG, J. M. e SCHULTZBERG, M. Peptidergic neurones. **Nature**, **284** (5756): 515-21, 1980.
- HOUTANI, T., NISHI, M., TAKESHIMA, H., NUKADA, T. e SUGIMOTO, T. Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **219** (3): 714-9, 1996.
- INOUE, M., KAWASHIMA, T., ALLEN, R. G. e UEDA, H. Nocistatin and prepro-N/OFQ160-187 cause nociception through activation of Gi/oin capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **28**, 2003.
- INOUE, M., KOBAYASHI, M., KOZAKI, S., ZIMMER, A. e UEDA, H. Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **95** (18): 10949-53, 1998.
- INOUE, M., SHIMOHIRA, I., YOSHIDA, A., ZIMMER, A., TAKESHIMA, H., SAKURADA, T. e UEDA, H. Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **291** (1): 308-13, 1999.

- INOUE, M., KAWASHIMA, T., TAKESHIMA, H., CALO, G., INOUE, A., NAKATA, Y. e UEDA, H. In Vivo Pain-Inhibitory Role of Nociceptin/Orphanin FQ in Spinal Cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **305** (2): 495-501, 2003.
- JAIM-ETCHEVERRY, G. e ZIEHER, L. M. DSP-4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. **Brain Res.**, **188** (2): 513-23, 1980.
- JENCK, F., MOREAU, J. L., MARTIN, J. R., KILPATRICK, G. J., REINSCHEID, R. K., MONSMA, F. J., JR., NOTHACKER, H. P. e CIVELLI, O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **94** (26): 14854-8, 1997.
- JENCK, F., WICHMANN, J., DAUTZENBERG, F. M., MOREAU, J. L., OUAGAZZAL, A. M., MARTIN, J. R., LUNDSTROM, K., CESURA, A. M., POLI, S. M., ROEVER, S., KOLCZEWSKI, S., ADAM, G. e KILPATRICK, G. A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **97** (9): 4938-43, 2000.
- JENKINSON, D. H., BARNARD, E. A., HOYER, D., HUMPHREY, P. P., LEFF, P. e SHANKLEY, N. P. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **47** (2): 255-66, 1995.
- JONSSON, G., HALLMAN, H., PONZIO, F. e ROSS, S. DSP4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine)--a useful denervation tool for central and peripheral noradrenaline neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, **72** (2-3): 173-88, 1981.
- KAMEI, J., OHSAWA, M., SUZUKI, T., SAITOH, A., ENDOH, T., NARITA, M., TSENG, L. F. e NAGASE, H. The modulatory effect of (+)-TAN-67 on the antinociceptive effects of the nociceptin/orphanin FQ in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **383** (3): 241-7, 1999.
- KANG, W., WILSON, S. P. e WILSON, M. A. Changes in nociceptive and anxiolytic responses following herpes virus-mediated preproenkephalin overexpression in rat amygdala are naloxone-reversible and transient. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **877**: 751-5, 1999.
- KAPUSTA, D. R. Neurohumoral effects of orphanin FQ/nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function. **Peptides**, **21** (7): 1081-99, 2000.
- KAPUSTA, D. R. e KENIGS, V. A. Cardiovascular and renal responses produced by central orphanin FQ/nociceptin occur independent of renal nerves. **Am. J. Physiol.**, **277** (4 Pt 2): R987-95, 1999.
- KAPUSTA, D. R., SEZEN, S. F., CHANG, J. K., LIPPTON, H. e KENIGS, V. A. Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). **Life Sci.**, **60** (1): PL15-21, 1997.
- KAWAMOTO, H., OZAKI, S., ITOH, Y., MIYAJI, M., ARAI, S., NAKASHIMA, H., KATO, T., OHTA, H. e IWASAWA, Y. Discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL1) antagonist: 1-[(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1, 3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (J-113397). **J. Med. Chem.**, **42** (25): 5061-3, 1999.



- KING, M. A., ROSSI, G. C., CHANG, A. H., WILLIAMS, L. e PASTERNAK, G. W. Spinal analgesic activity of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. **Neurosci. Lett.**, **223** (2): 113-6, 1997.
- KITA, A., IMANO, K., SETO, Y., YAKUO, I., DEGUCHI, T. e NAKAMURA, H. Antinociceptive and antidepressant-like profiles of BL-2401, a novel enkephalinase inhibitor, in mice and rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, **75** (4): 337-46, 1997.
- KO, M. C., NAUGHTON, N. N., TRAYNOR, J. R., SONG, M. S., WOODS, J. H., RICE, K. C. e MCKNIGHT, A. T. Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, **135** (4): 943-50, 2002.
- KOLESNIKOV, Y. A. e PASTERNAK, G. W. Peripheral orphanin FQ/nociceptin analgesia in the mouse. **Life Sci.**, **64** (22): 2021-8, 1999.
- KONIG, M., ZIMMER, A. M., STEINER, H., HOLMES, P. V., CRAWLEY, J. N., BROWNSTEIN, M. J. e ZIMMER, A. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. **Nature**, **383** (6600): 535-8, 1996.
- KORPI, E. R., GRUNDER, G. e LUDDENS, H. Drug interactions at GABA(A) receptors. **Prog. Neurobiol.**, **67** (2): 113-59, 2002.
- KOSTER, A., MONTKOWSKI, A., SCHULZ, S., STUBE, E. M., KNAUDT, K., JENCK, F., MOREAU, J. L., NOTHACKER, H. P., CIVELLI, O. e REINSCHIED, R. K. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **96** (18): 10444-9, 1999.
- KRAMER, M. S., CUTLER, N., FEIGHNER, J., SHRIVASTAVA, R., CARMAN, J., SRAMEK, J. J., REINES, S. A., LIU, G., SNAVELY, D., WYATT-KNOWLES, E., HALE, J. J., MILLS, S. G., MACCOSS, M., SWAIN, C. J., HARRISON, T., HILL, R. G., HEFTI, F., SCOLNICK, E. M., CASCIERI, M. A., CHICCHI, G. G., SADOWSKI, S., WILLIAMS, A. R., HEWSON, L., SMITH, D., RUPNIAK, N. M. e ET AL. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, **281**(5383): 1640-5, 1998.
- LACHOWICZ, J. E., SHEN, Y., MONSMA, F. J., JR. e SIBLEY, D. R. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. **J. Neurochem.**, **64** (1): 34-40, 1995.
- LAURSEN, S. E. e BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods**, **16** (4): 355-7, 1986.
- LE CUDENNEC, C., NAUDIN, B., DO REGO, J. C. e COSTENTIN, J. Nociceptin/orphanin FQ and related peptides reduce the increase in plasma corticosterone elicited in mice by an intracerebroventricular injection. **Life Sci.**, **72** (2): 163-71, 2002.
- LEVENTHAL, L., MATHIS, J. P., ROSSI, G. C., PASTERNAK, G. W. e BODNAR, R. J. Orphan opioid receptor antisense probes block orphanin FQ-induced hyperphagia. **Eur. J. Pharmacol.**, **349** (1): R1-3, 1998.

- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, **92** (2): 180-5, 1987.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav. Pharmacol.**, **8** (6-7): 523-32, 1997.
- MADEDDU, P., SALIS, M. B., MILIA, A. F., EMANUELI, C., GUERRINI, R., REGOLI, D. e CALO, G. Cardiovascular effects of nociceptin in unanesthetized mice. **Hypertension**, **33** (3): 914-9, 1999.
- MAGUE, S. D., PLIAKAS, A. M., TODTENKOPF, M. S., TOMASIEWICZ, H. C., ZHANG, Y., STEVENS, W. C., JR., JONES, R. M., PORTOGHESE, P. S. e CARLEZON, W. A., JR. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **305** (1): 323-30, 2003.
- MALIN, D. H., LAKE, J. R., MOON, W. D., MOY, D., MONTELLANO, A. L., MOY, E., CAMPBELL, T. D., BELL, M. V., BRYANT, D., HARRISON, L. M. e GRANDY, D. K. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) induces a quasi-morphine abstinence syndrome in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, **151** (4): 344-50, 2000.
- MALINOWSKA, B., GODLEWSKI, G. e SCHLICKER, E. Function of nociceptin and opioid OP4 receptors in the regulation of the cardiovascular system. **J. Physiol. Pharmacol.**, **53** (3): 301-24, 2002.
- MAMIYA, T., NODA, Y., NISHI, M., TAKESHIMA, H. e NABESHIMA, T. Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. **Brain Res.**, **783** (2): 236-40, 1998.
- MANABE, T., NODA, Y., MAMIYA, T., KATAGIRI, H., HOUTANI, T., NISHI, M., NODA, T., TAKAHASHI, T., SUGIMOTO, T., NABESHIMA, T. e TAKESHIMA, H. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. **Nature**, **394** (6693): 577-81, 1998.
- MANSBACH, R. S., BROOKS, E. N. e CHEN, Y. L. Antidepressant-like effects of CP-154,526, a selective CRF1 receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **323**(1): 21-6, 1997.
- MAO, L. e WANG, J. Q. Microinjection of nociceptin (Orphanin FQ) into nucleus tractus solitarius elevates blood pressure and heart rate in both anesthetized and conscious rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **294** (1): 255-62, 2000.
- MARTI, M., STOCCHI, S., PAGANINI, F., MELA, F., DE RISI, C., CALO, G., GUERRINI, R., BARNES, T. A., LAMBERT, D. G., BEANI, L., BIANCHI, C. e MORARI, M. Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex. **Br. J. Pharmacol.**, **138** (1): 91-8, 2003.
- McCARTHY, M. M., MCDONALD, C. H., BROOKS, P. J. e GOLDMAN, D. An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. **Physiol. Behav.**, **60** (5): 1209-15, 1996.
- McEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res.**, **886** (1-2): 172-189, 2000.

- McLEOD, R. L., BOLSER, D. C., JIA, Y., PARRA, L. E., MUTTER, J. C., WANG, X., TULSHIAN, D. B., EGAN, R. W. e HEY, J. A. Antitussive effect of nociceptin/orphanin FQ in experimental cough models. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, **15** (3): 213-6, 2002.
- MEIS, S. e PAPE, H. C. Control of glutamate and GABA release by nociceptin/orphanin FQ in the rat lateral amygdala. **J. Physiol.**, **532** (Pt 3): 701-12, 2001.
- MEUNIER, J. C., MOLLEREAU, C., TOLL, L., SUAUDEAU, C., MOISAND, C., ALVINERIE, P., BUTOUR, J. L., GUILLEMOT, J. C., FERRARA, P. e MONSARRAT, B. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. **Nature**, **377** (6549): 532-5, 1995.
- MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, **70** (2): 83-244, 2003.
- MOGIL, J. S. e PASTERNAK, G. W. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. **Pharmacol. Rev.**, **53** (3): 381-415, 2001.
- MOGIL, J. S., GRISEL, J. E., REINSCHIED, R. K., CIVELLI, O., BELKNAP, J. K. e GRANDY, D. K. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. **Neuroscience**, **75** (2): 333-7, 1996.
- MOLLEREAU, C. e MOULEDOUS, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. **Peptides**, **21** (7): 907-17, 2000.
- MOLLEREAU, C., SIMONS, M. J., SOULARUE, P., LINERS, F., VASSART, G., MEUNIER, J. C. e PARMENTIER, M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **93** (16): 8666-70, 1996.
- MOLLEREAU, C., PARMENTIER, M., MAILLEUX, P., BUTOUR, J. L., MOISAND, C., CHALON, P., CAPUT, D., VASSART, G. e MEUNIER, J. C. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. **FEBS Lett.**, **341** (1): 33-8, 1994.
- MURPHY, N. P. e MAIDMENT, N. T. Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis. **J. Neurochem.**, **73** (1): 179-86, 1999.
- MURPHY, N. P., LY, H. T. e MAIDMENT, N. T. Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. **Neuroscience**, **75** (1): 1-4, 1996.
- MURPHY, N. P., LEE, Y. e MAIDMENT, N. T. Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. **Brain Res.**, **832** (1-2): 168-70, 1999.
- NAGATANI, T., YAMAMOTO, T., TAKAO, K., HASHIMOTO, S., KASAHARA, K., SUGIHARA, T. e UEKI, S. Pharmacological profile of a potential anxiolytic: AP159, a new benzothieno-pyridine derivative. **Psychopharmacology (Berl)**, **104** (4): 432-8, 1991.

- NAKAGAWA, T., KANEKO, M., INAMURA, S. e SATOH, M. Intracerebroventricular administration of nocistatin reduces inflammatory hyperalgesia in rats. **Neurosci. Lett.**, **265** (1): 64-6, 1999.
- NAKANO, H., MINAMI, T., ABE, K., ARAI, T., TOKUMURA, M., IBII, N., OKUDA-ASHITAKA, E., MORI, H. e ITO, S. Effect of intrathecal nocistatin on the formalin-induced pain in mice versus that of nociceptin/orphanin FQ. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **292** (1): 331-6, 2000.
- NARAYANAN, S. e MAIDMENT, N. T. Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **63** (2): 271-7, 1999.
- NEAL, M. J., CUNNINGHAM, J. R., PATERSON, S. J. e MCKNIGHT, A. T. Inhibition by nociceptin of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones. **Br. J. Pharmacol.**, **120** (8): 1399-400, 1997.
- NEAL, C. R., JR., MANSOUR, A., REINSCHIED, R., NOTHACKER, H. P., CIVELLI, O. e WATSON, S. J., JR. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, **406** (4): 503-47, 1999a.
- NEAL, C. R., JR., MANSOUR, A., REINSCHIED, R., NOTHACKER, H. P., CIVELLI, O., AKIL, H. e WATSON, S. J., JR. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. **J. Comp. Neurol.**, **412** (4): 563-605, 1999b.
- NICHOLSON, J. R., AKIL, H. e WATSON, S. J. Orphanin FQ-induced hyperphagia is mediated by corticosterone and central glucocorticoid receptors. **Neuroscience**, **115** (2): 637-43, 2002.
- NICOL, B., LAMBERT, D. G., ROWBOTHAM, D. J., SMART, D. e MCKNIGHT, A. T. Nociceptin induced inhibition of K<sup>+</sup> evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. **Br. J. Pharmacol.**, **119** (6): 1081-3, 1996.
- NICOL, B., LAMBERT, D. G., ROWBOTHAM, D. J., OKUDA-ASHITAKA, E., ITO, S., SMART, D. e MCKNIGHT, A. T. Nocistatin reverses nociceptin inhibition of glutamate release from rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.**, **356** (2-3): R1-3, 1998.
- NISHI, M., TAKESHIMA, H., MORI, M., NAKAGAWARA, K. e TAKEUCHI, T. Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse kappa-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **205** (2): 1353-7, 1994.
- NISHI, M., HOUTANI, T., NODA, Y., MAMIYA, T., SATO, K., DOI, T., KUNO, J., TAKESHIMA, H., NUKADA, T., NABESHIMA, T., YAMASHITA, T., NODA, T. e SUGIMOTO, T. Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. **Embo J.**, **16** (8): 1858-64, 1997.
- NODA, Y., MAMIYA, T., NABESHIMA, T., NISHI, M., HIGASHIOKA, M. e TAKESHIMA, H. Loss of antinociception induced by naloxone benzoylhydrazone in nociceptin receptor-knockout mice. **J. Biol. Chem.**, **273** (29): 18047-51, 1998.

- OKADA, K., SUJAKU, T., CHUMAN, Y., NAKASHIMA, R., NOSE, T., COSTA, T., YAMADA, Y., YOKOYAMA, M., NAGAHISA, A. e SHIMOHIGASHI, Y. Highly potent nociceptin analog containing the Arg-Lys triple repeat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **278** (2): 493-8, 2000.
- OKUDA-ASHITAKA, E. e ITO, S. Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. **Peptides**, **21** (7): 1101-9, 2000.
- OKUDA-ASHITAKA, E., MINAMI, T., TACHIBANA, S., YOSHIHARA, Y., NISHIUCHI, Y., KIMURA, T. e ITO, S. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. **Nature**, **392** (6673): 286-9, 1998.
- OKUYAMA, S., SAKAGAWA, T., SUGIYAMA, F., FUKAMIZU, A. e MURAKAMI, K. Reduction of depressive-like behavior in mice lacking angiotensinogen. **Neurosci. Lett.**, **261**(3): 167-70, 1999.
- OKUYAMA, S., SAKAGAWA, T., CHAKI, S., IMAGAWA, Y., ICHIKI, T. e INAGAMI, T. Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. **Brain Res.**, **821**(1): 150-9, 1999.
- OLSZEWSKI, P. K., SHAW, T. J., GRACE, M. K., BILLINGTON, C. J. e LEVINE, A. S. Nocistatin inhibits food intake in rats. **Brain Res.**, **872** (1-2): 181-7, 2000.
- OSINSKI, M. A., PAMPUSCH, M. S., MURTAUGH, M. P. e BROWN, D. R. Cloning, expression and functional role of a nociceptin/orphanin FQ receptor in the porcine gastrointestinal tract. **Eur. J. Pharmacol.**, **365** (2-3): 281-9, 1999.
- PAGE, M. E., DETKE, M. J., DALVI, A., KIRBY, L. G. e LUCKI, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, **147** (2): 162-7, 1999.
- PAN, Y. X., XU, J., WAN, B. L., ZUCKERMAN, A. e PASTERNAK, G. W. Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. **FEBS Lett.**, **435** (1): 65-8, 1998.
- PATEL, H. J., GIEMBYCZ, M. A., SPICUZZA, L., BARNES, P. J. e BELVISI, M. G. Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nociceptin. **Br. J. Pharmacol.**, **120** (5): 735-6, 1997.
- PEISER, C., UNDEM, B. J. e FISCHER, A. Nociceptin effects in the airways. **Peptides**, **21** (7): 995-8, 2000.
- PELUSO, J., LAFORGE, K. S., MATTHES, H. W., KREEK, M. J., KIEFFER, B. L. e GAVERIAUX-RUFF, C. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. **J. Neuroimmunol.**, **81** (1-2): 184-92, 1998.
- POLIDORI, C., DE CARO, G. e MASSI, M. The hyperphagic effect of nociceptin/orphanin FQ in rats. **Peptides**, **21** (7): 1051-62, 2000a.

- POLIDORI, C., CALO, G., CICCOCIOPPO, R., GUERRINI, R., REGOLI, D. e MASSI, M. Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperphagia: identification of a selective antagonist. **Psychopharmacology (Berl)**, **148** (4): 430-7, 2000b.
- PORSOLT, R. D., BERTIN, A. e JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, **229** (2): 327-36, 1977.
- PORSOLT, R. D., ANTON, G., BLAVET, N. e JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.**, **47** (4): 379-91, 1978.
- POMONIS, J. D., BILLINGTON, C. J. e LEVINE, A. S. Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. **Neuroreport**, **8** (1): 369-71, 1996.
- PRZEGALINSKI, E., TATARCZYNSKA, E. e CHOJNACKA-WOJCIK, E. The influence of the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil on the anxiolytic-like effects of CGP 37849 and ACPC in rats. **Neuropharmacology**, **39** (10): 1858-64, 2000.
- REDROBE, J. P., CALO, G., REGOLI, D. e QUIRION, R. Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the mouse forced swimming test. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **365** (2): 164-7, 2002.
- REDROBE, J. P., CALO, G., GUERRINI, R., REGOLI, D. e QUIRION, R. [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. **Br. J. Pharmacol.**, **131** (7): 1379-84, 2000.
- REDROBE, J. P., DUMONT, Y., FOURNIER, A. e QUIRION, R. The neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor subtype mediates NPY-induced antidepressant-like activity in the mouse forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, **26** (5): 615-24, 2002.
- REINSCHEID, R. K. e CIVELLI, O. The orphanin FQ/nociceptin knockout mouse: a behavioral model for stress responses. **Neuropeptides**, **36** (2-3): 72-6, 2002.
- REINSCHEID, R. K., ARDATI, A., MONSMA, F. J., JR. e CIVELLI, O. Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. **J. Biol. Chem.**, **271** (24): 14163-8, 1996.
- REINSCHEID, R. K., NOTHACKER, H. P., BOURSON, A., ARDATI, A., HENNINGSEN, R. A., BUNZOW, J. R., GRANDY, D. K., LANGEN, H., MONSMA, F. J., JR. e CIVELLI, O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. **Science**, **270** (5237): 792-4, 1995.
- REVEL, L., MENNUNI, L., GAROFALO, P. e MAKOVEC, F. CR 2945: a novel CCKB receptor antagonist with anxiolytic-like activity. **Behav. Pharmacol.**, **9** (3): 183-94, 1998.
- RIBEIRO, S. J., TEIXEIRA, R. M., CALIXTO, J. B. e DE LIMA, T. C. Tachykinin NK(3)receptor involvement in anxiety. **Neuropeptides**, **33**(2): 181-8, 1999.

- RIPOLL, N., DAVID, D. J., DAILLY, E., HASCOET, M. e BOURIN, M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. **Behav. Brain Res.**, **143** (2): 193-200, 2003.
- RIZZI, A., BIGONI, R., MARZOLA, G., GUERRINI, R., SALVADORI, S., REGOLI, D. e CALO, G. Characterization of the locomotor activity-inhibiting effect of nociceptin/orphanin FQ in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, **363** (2): 161-5, 2001.
- RODGERS, R. J. e DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **21** (6): 801-10, 1997
- RODGERS, R. J., COLE, J. C., ABOUALFA, K. e STEPHENSON, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative 'anxiogenic' agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **52** (4): 805-13, 1995.
- RODGERS, R. J., CAO, B. J., DALVI, A. E HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **30** (3): 289-304, 1997.
- RODGERS, R. J., HALLER, J., HOLMES, A., HALASZ, J., WALTON, T. J. e BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiol. Behav.**, **68** (1-2): 47-53, 1999.
- ROMINGER, A., FORSTER, S., ZENTNER, J., DOOLEY, D. J., MCKNIGHT, A. T., FEUERSTEIN, T. J., JACKISCH, R. e VLASKOVSKA, M. Comparison of the ORL1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in human and rat neocortical slices. **Br. J. Pharmacol.**, **135** (3): 800-6, 2002.
- ROSSI, G. C., MATHIS, J. P. e PASTERNAK, G. W. Analgesic activity of orphanin FQ2, murine prepro-orphanin FQ141-157 in mice. **Neuroreport**, **9** (6): 1165-8, 1998.
- ROSSI, G. C., PELLEGRINO, M., SHANE, R., ABBADIE, C. A., DUSTMAN, J., JIMENEZ, C., BODNAR, R. J., PASTERNAK, G. W. e ALLEN, R. G. Characterization of rat prepro-orphanin FQ/nociceptin((154-181)): nociceptive processing in supraspinal sites. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **300** (1): 257-64, 2002.
- ROTHMAN, R. B. A review of the role of anti-opioid peptides in morphine tolerance and dependence. **Synapse**, **12** (2): 129-38, 1992.
- RUPNIAK, N. M., CARLSON, E. J., WEBB, J. K., HARRISON, T., PORSOLT, R. D., ROUX, S., DE FELIPE, C., HUNT, S. P., OATES, B. e WHEELDON, A. Comparison of the phenotype of NK1R<sup>-/-</sup> mice with pharmacological blockade of the substance P (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. **Behav. Pharmacol.**, **12**(6-7): 497-508, 2001.
- SAKOORI, K. e MURPHY, N. P. Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, **170**(2), 2003.
- SAKURADA, T., KATSUYAMA, S., SAKURADA, S., INOUE, M., TAN-NO, K., KISARA, K., SAKURADA, C., UEDA, H. e SASAKI, J. Nociceptin-induced scratching,

- biting and licking in mice: involvement of spinal NK1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, **127** (7): 1712-8, 1999.
- SALIS, M. B., EMANUELI, C., MILIA, A. F., GUERRINI, R. e MADEDDU, P. Studies of the cardiovascular effects of nociceptin and related peptides. **Peptides**, **21** (7): 985-93, 2000.
- SANDERS-BUSH, E., BUSHING, J. A. e SULSER, F. p-Chloroamphetamine--inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase. **Biochem. Pharmacol.**, **21** (10): 1501-10, 1972.
- SANDIN, J., GEORGIEVA, J., SCHOTT, P. A., OGREN, S. O. e TEREINIUS, L. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. **Eur. J. Neurosci.**, **9** (1): 194-7, 1997.
- SANDIN, J., OGREN, S. O. e TEREINIUS, L. Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. **Brain Res.**, **997** (2): 222-33, 2004.
- SBRENNNA, S., MARTI, M., MORARI, M., CALO, G., GUERRINI, R., BEANI, L. E BIANCHI, C. L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa- and mu- but not delta- and opioid receptor like-1 receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **291** (3): 1365-71, 1999.
- SBRENNNA, S., MARTI, M., MORARI, M., CALO, G., GUERRINI, R., BEANI, L. e BIANCHI, C. Modulation of 5-hydroxytryptamine efflux from rat cortical synaptosomes by opioids and nociceptin. **Br. J. Pharmacol.**, **130** (2): 425-33, 2000.
- SCHLICKER, E. e MORARI, M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. **Peptides**, **21** (7): 1023-9, 2000.
- SCHLICKER, E., WERTHWEIN, S., KATHMANN, M. e BAUER, U. Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL1 receptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, **358** (4): 418-22, 1998.
- SHIMOHIRA, I., TOKUYAMA, S., HIMENO, A., NIWA, M. e UEDA, H. Characterization of nociceptin-stimulated in situ [35S]GTPgammaS binding in comparison with opioid agonist-stimulated ones in brain regions of the mice. **Neurosci. Lett.**, **237** (2-3): 113-6, 1997.
- SHINKAI, H., ITO, T., IIDA, T., KITAO, Y., YAMADA, H. e UCHIDA, I. 4-Aminoquinolines: novel nociceptin antagonists with analgesic activity. **J. Med. Chem.**, **43** (24): 4667-77, 2000.
- SHIRASAKA, T., KUNITAKE, T., KATO, K., TAKASAKI, M. e KANNAN, H. Nociceptin modulates renal sympathetic nerve activity through a central action in conscious rats. **Am. J. Physiol.**, **277** (4 Pt 2): R1025-32., 1999.
- SIEGHART, W. GABAA receptors: ligand-gated Cl<sup>-</sup> ion channels modulated by multiple drug-binding sites. **Trends Pharmacol. Sci.**, **13** (12): 446-50, 1992.



- SIM, L. J. e CHILDERS, S. R. Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. **J. Comp. Neurol.**, **386** (4): 562-72, 1997.
- SINISCALCHI, A., RODI, D., BEANI, L. e BIANCHI, C. Inhibitory effect of nociceptin on [3H]-5-HT release from rat cerebral cortex slices. *Br. J. Pharmacol.*, **128** (1): 119-23, 1999.
- SINISCALCHI, A., RODI, D., MORARI, M., MARTI, M., CAVALLINI, S., MARINO, S., BEANI, L. e BIANCHI, C. Direct and indirect inhibition by nociceptin/orphanin FQ on noradrenaline release from rodent cerebral cortex in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, **136** (8): 1178-84, 2002.
- STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B. e SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, **85** (3): 367-70, 1985.
- STOGNER, K. A. e HOLMES, P. V. Neuropeptide-Y exerts antidepressant-like effects in the forced swim test in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **387**(2): R9-10, 2000.
- STRATFORD, T. R., HOLAHAN, M. R. e KELLEY, A. E. Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. **Neuroreport**, **8** (2): 423-6, 1997.
- TAKAHASHI, L. K. Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **25**(7-8): 627-36, 2001.
- TAKAHASHI, L. K., HO, S. P., LIVANOV, V., GRACIANI, N. e ARNERIC, S. P. Antagonism of CRF(2) receptors produces anxiolytic behavior in animal models of anxiety. **Brain Res.**, **902** (2): 135-42, 2001.
- TEIXEIRA, R. M., SANTOS, A. R., RIBEIRO, S. J., CALIXTO, J. B., RAE, G. A. e DE LIMA, T. C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **311**(1): 7-14, 1996.
- TEJEDOR-REAL, P., MICO, J. A., MALDONADO, R., ROQUES, B. P. e GIBERT-RAHOLA, J. Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **52** (1): 145-52, 1995.
- TIAN, J. H., XU, W., ZHANG, W., FANG, Y., GRISEL, J. E., MOGIL, J. S., GRANDY, D. K. e HAN, J. S. Involvement of endogenous orphanin FQ in electroacupuncture-induced analgesia. **Neuroreport**, **8** (2): 497-500, 1997.
- TSUDA, M., SUZUKI, T., MISAWA, M. e NAGASE, H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **307** (1): 7-14, 1996.
- UEDA, H., INOUE, M., TAKESHIMA, H. e IWASAWA, Y. Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. **J. Neurosci.**, **20** (20): 7640-7, 2000.

- UEDA, H., YAMAGUCHI, T., TOKUYAMA, S., INOUE, M., NISHI, M. e TAKESHIMA, H. Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. **Neurosci. Lett.**, **237** (2-3): 136-8, 1997.
- VAUGHAN, C. W. e CHRISTIE, M. J. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. **Br. J. Pharmacol.**, **117** (8): 1609-11, 1996.
- VAUGHAN, C. W., INGRAM, S. L. e CHRISTIE, M. J. Actions of the ORL1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro. **J. Neurosci.**, **17** (3): 996-1003, 1997.
- VAUGHAN, C. W., CONNOR, M., JENNINGS, E. A., MARINELLI, S., ALLEN, R. G. e CHRISTIE, M. J. Actions of nociceptin/orphanin FQ and other prepronociceptin products on rat rostral ventromedial medulla neurons in vitro. **J. Physiol.**, **534** (Pt 3): 849-59, 2001.
- WALKER, J. R., SPINA, M., TERENIUS, L. e KOOB, G. F. Nociceptin fails to affect heroin self-administration in the rat. **Neuroreport**, **9** (10): 2243-7, 1998.
- WALTHER, T., VOIGT, J. P., FUKAMIZU, A., FINK, H. e BADER, M. Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. **Behav. Brain Res.**, **100** (1-2): 1-4, 1999.
- WANG, J. B., JOHNSON, P. S., IMAI, Y., PERSICO, A. M., OZENBERGER, B. A., EPPLER, C. M. e UHL, G. R. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. **FEBS Lett.**, **348** (1): 75-9, 1994.
- WANG, J. L., ZHU, C. B., CAO, X. D. e WU, G. C. Distinct effect of intracerebroventricular and intrathecal injections of nociceptin/orphanin FQ in the rat formalin test. **Regul. Pept.**, **79** (2-3): 159-63, 1999.
- PAXINOS, G. e WATSON, C. **The rat brain** – in stereotaxic coordinates. 2 ed. Australia: Academic Press, 1986.
- WHITING, P. J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? **Drug Discov. Today**, **8** (10): 445-50, 2003.
- WICK, M. J., MINNERATH, S. R., ROY, S., RAMAKRISHNAN, S. e LOH, H. H. Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptor mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. **Mol. Brain Res.**, **32** (2): 342-7, 1995.
- WICK, M. J., MINNERATH, S. R., LIN, X., ELDE, R., LAW, P. Y. e LOH, H. H. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. **Mol. Brain Res.**, **27** (1): 37-44, 1994.
- YAMAMOTO, T., NOZAKI-TAGUCHI, N. e KIMURA, S. Analgesic effect of intrathecally administered nociceptin, an opioid receptor-like1 receptor agonist, in the rat formalin test. **Neuroscience**, **81** (1): 249-54, 1997.
- YAMAMOTO, T. e SAKASHITA, Y. Effect of nocistatin and its interaction with nociceptin/orphanin FQ on the rat formalin test. **Neurosci. Lett.**, **262** (3): 179-82, 1999.

- YU, T. P. e XIE, C. W. Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. **J. Neurophysiol.**, **80** (3): 1277-84, 1998.
- YU, T. P., FEIN, J., PHAN, T., EVANS, C. J. e XIE, C. W. Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus. **Hippocampus**, **7** (1): 88-94, 1997.
- ZARATIN, P. F., PETRONE, G., SBACCHI, M., GARNIER, M., FOSSATI, C., PETRILLO, P., RONZONI, S., GIARDINA, G. A. e SCHEIDELER, M. A. Modification of nociception and morphine tolerance by the selective ORL-1 antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2003.
- ZAVERI, N. Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents. **Life Sci.**, **73** (6): 663-78, 2003.
- ZEILHOFER, H. U., SELBACH, U. M., GUHRING, H., ERB, K. e AHMADI, S. Selective suppression of inhibitory synaptic transmission by nocistatin in the rat spinal cord dorsal horn. **J. Neurosci.**, **20** (13): 4922-9, 2000.
- ZHAO, C. S., LI, B. S., ZHAO, G. Y., LIU, H. X., LUO, F., WANG, Y., TIAN, J. H., CHANG, J. K. e HAN, J. S. Nocistatin reverses the effect of orphanin FQ/nociceptin in antagonizing morphine analgesia. **Neuroreport**, **10** (2): 297-9, 1999.
- ZHAO, R. J., WOO, R. S., JEONG, M. S., SHIN, B. S., KIM, D. G. e KIM, K. W. Orphanin FQ/nociceptin blocks methamphetamine place preference in rats. **Neuroreport**, **14** (18): 2383-5, 2003.
- ZHU, C. B., CAO, X. D., XU, S. F. e WU, G. C. Orphanin FQ potentiates formalin-induced pain behavior and antagonizes morphine analgesia in rats. **Neurosci. Lett.**, **235** (1-2): 37-40, 1997.