

RAQUEL MARIA TEIXEIRA

**INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS
DE RECEPTORES DE NEUROKININAS NO COMPORTAMENTO DE
CAMUNDONGOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.


Florianópolis, 1995.

***INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO INTRACEREBRAL DE
AGONISTAS E ANTAGONISTAS SELETIVOS DE
RECEPTORES DE NEUROKININAS NO COMPORTAMENTO
DE CAMUNDONGOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

POR

RAQUEL MARIA TEIXEIRA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Prof.^a Dr.^a Thereza Christina M.L. Nogueira



Prof. Dr. Carlos Alberto B. Tomaz



Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez

Florianópolis, junho de 1995.

**Aos meus pais, pela formação;
Ao Sandro pelo incentivo;
Aos meus filhos, Frederico e Marcelle.**

O que é essencial:

- 1. Conhecimento certo, para lhe dar os instrumentos certos para sua "viagem";*
- 2. Sabedoria, para lhe garantir que está usando o conhecimento acumulado no passado, do melhor modo a servir ao descobrimento de sua presença, do seu "agora";*
- 3. Compaixão, para ajudá-lo a aceitar os outros, cujos caminhos possam ser diferentes dos seus, com delicadeza e compreensão, quando você se mover com eles ou por meio deles ou em volta deles, no seu próprio caminho;*
- 4. Harmonia, para poder aceitar o fluxo natural da vida;*
- 5. Criatividade, para ajudá-lo a perceber e reconhecer as novas alternativas e caminhos não traçados, na "viagem";*
- 6. Força, para se dispor contra o medo e avançar, a despeito da insegurança, sem garantia nem pagamento;*
- 7. Paz, para conservá-lo centralizado;*
- 8. Alegria, para conservá-lo cantando, rindo e dançando pelo caminho;*
- 9. Amor, para ser seu guia contínuo em direção ao nível mais alto do consciente de que o homem seja capaz;*
- 10. Unidade, que nos traz de volta ao ponto de onde partimos; o ponto em que estamos unidos como nós mesmos e todas as coisas.*

(Leo Buscaglia)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira pela orientação e compreensão para a realização de mais uma etapa em minha formação.

Um agradecimento especial aos professores doutores João B. Calixto e Giles A. Rae pela inestimável colaboração na concretização deste trabalho.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, especialmente às Dras. Gina S. Morato e Yara S. Medeiros.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelo incentivo.

Ao Orlando Ribeiro de Campos Filho, diretor do LAFESC, por possibilitar minha dispensa para a realização desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), pelo estímulo.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação, em especial à Sandra Regina Braga de Oliveira, Rosana Ostrosky, Elizabete Ganzer Ramos e ao Juarez S. Polidoro.

Aos funcionários do Biotério da Coordenadoria Especial de Farmacologia, em especial ao Sr. Amaro José da Silva, sem os quais não haveria possibilidade de trabalhar.

Ao Edson José Schneider, à Cláudia Alves da Silva, ao Carlos E. S. de Castro, ao Sandro J. Ribeiro pela ajuda técnica.

Um agradecimento especial ao colega da turma Adair Roberto Soares dos Santos pela valiosa colaboração.

À Josane Andrada, pela digitação deste trabalho e ajuda na sua parte formal.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Síntese e distribuição das neurocininas	3
1.2 - Neurocininas e SNC.....	7
1.3 - Receptores das neurocininas.....	11
1.4 - Ações biológicas das neurocininas.....	14
1.5 - Ansiedade e modelos experimentais	20
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Animais	27
3.2 - Drogas.....	27
3.3 - Administração de drogas	29
3.4 - Procedimentos gerais e equipamentos	30
3.4.1 - Labirinto em cruz elevado.....	31
3.4.2 - Rota-rod.....	32
3.4.3 - Caixa de movimentação espontânea.....	33
3.5 - Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	51
6. PERSPECTIVAS PARA O USO DAS NEUROKININAS/TAQUICININAS NA CLÍNICA MÉDICA.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

O presente estudo avalia os efeitos da administração central de agonistas e antagonistas seletivos dos receptores das neurocininas, NK₁, NK₂ e NK₃, num modelo experimental de ansiedade, o labirinto em cruz elevado, em camundongos.

Os animais foram injetados ic.v. com 5 µl de 1, 10, 100 e 500 pmol de substância P (SP) ou dos agonistas seletivos dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente, SP-metil éster (SPME), [β-Ala⁸]neurocinina A₄₋₁₀ (β-Ala) e senktide (SENK). Outros camundongos receberam tratamento semelhante com os compostos FK 888 (FK) ou SR 48968 (SR), antagonistas seletivos dos receptores NK₁ e NK₂, respectivamente, ou veículo (PBS).

Imediatamente após a injeção das drogas, os animais foram colocados no rotarod, na caixa de movimentação espontânea ou no labirinto em cruz elevado. De maneira geral, todas as drogas não alteraram a performance motora avaliada no rotarod, nem a ambulação observada na caixa de movimentação espontânea.

No labirinto em cruz elevado, os agonistas dos receptores NK₁, SP ou SPME, nas doses de 1 e 10 pmol reduziram significativamente a percentagem de entradas nos braços abertos ($p < 0,05$), ao contrário do antagonista desses receptores, FK, que aumentou a percentagem de tempo dispendido nos braços abertos ($p < 0,05$).

O agonista dos receptores NK₂, βAla, por sua vez, promoveu um aumento na frequência de entradas nos braços fechados ($p < 0,05$), e o respectivo antagonista, SR,

em contraste, aumentou de maneira dose-dependente não só a percentagem de entradas como também o tempo de permanência nos braços abertos do LCE ($p < 0,05$).

Por outro lado, o SENK, agonista seletivo dos receptores NK_3 também aumentou de maneira dose-dependente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos.

Todos os tratamentos, com exceção da β Ala, não foram capazes de alterar os parâmetros número de entradas nos braços fechados e número total de entradas em ambos os braços (abertos mais fechados).

A co-injeção de SP e FK mostrou um provável antagonismo do efeito do agonista pelo antagonista nos parâmetros frequência de entradas e tempo dispendido nos braços abertos. Os antagonistas de receptores NK_1 e NK_2 , FK e SR, no entanto, não foram capazes de reverter as ações dos respectivos agonistas seletivos, SPME e β Ala, em nenhum dos parâmetros estudados no LCE, quando administrados conjuntamente.

Os resultados obtidos sugerem que a administração central dos agonistas e antagonistas dos receptores das neurocininas podem modular a ansiedade, avaliada no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. A ativação dos receptores NK_1 , e , provavelmente, dos NK_2 também, leva a uma ação ansiogênica, enquanto o bloqueio desses receptores, NK_1 ou NK_2 , bem como a estimulação dos receptores NK_3 parecem promover uma ação ansiolítica.

ABSTRACT

The neurokinins substance P (SP), neurokinin A and neurokinin B are involved in the regulation of several physiological and pathological functions. Such peptides, acting via NK₁, NK₂ and NK₃ receptors, seem to play a role in central functions such as analgesia, cardiovascular control and defence behavior (Maggi et al., 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993; Regoli et al., 1994). Recently, it was showed that NK₂ antagonists have an anxiolytic activity in some experimental models of anxiety (Stratton et al., 1993, 1994).

The present study assesses the central effects of selective agonists and antagonists of neurokinin NK₁, NK₂ and NK₃ receptors in an ethological model of anxiety, the elevated plus-maze. Mice were injected i.c.v. with 5 µl of 1, 10, 100 or 500 pmol of SP or the selective NK₁, NK₂ and NK₃ receptor agonists SP-methylester (SPME), [β-Ala⁸]neurokinin A₄₋₁₀ (β-Ala) or senktide (SENK), respectively. Other mice received similar doses of FK 888 (FK) or SR 48968 (SR), selective NK₁ and NK₂ receptor antagonists or vehicle (PBS). Immediately after drug injection the animals were placed in a rota-rod apparatus, an automated activity cage or an elevated plus-maze. All drugs did not alter motor performance either in the rota-rod or the activity cage. In the elevated plus-maze test, the NK₁ agonists, SP or SPME, significantly reduced the frequency of open arm entries ($p < 0.05$). In sharp contrast, the NK₁ antagonist, FK, enhanced the percentage of time spent in the open arms ($p < 0.05$). On the other hand,

the NK₂ agonist, β -Ala, just augmented the frequency of entries in the closed arms ($p < 0.05$), whereas the NK₂ antagonist SR dose-dependently increased the frequency of entries and percentage of time spent in the open arms ($p < 0.05$). SENK, a NK₃ agonist, also enhanced in a dose-dependent manner the number of entries and time spent in open arms. All treatments, except β -Ala, failed to affect the number of entries in the closed arms and the total number of entries (open plus closed arms). The co-injection i.c.v. of agonists and antagonists of NK₁ and NK₂ receptors, i.e., SP plus FK, SPME plus FK and β -Ala plus SR, respectively failed to show an antagonism of the agonists' effects.

In conclusion, the results obtained suggest that the centrally administered neurokinin receptor agonists and antagonists can modulate anxiety, as evaluated in the elevated plus-maze test in mice. NK₁ activation promotes an anxiogenic effect, while blockade of NK₁ or NK₂ receptors, as well as NK₃ stimulation seem each to promote an anxiolytic action. Further experiments are underway to re-evaluate the effects of combined treatment of NK-receptor agonists and antagonists, injected in different routes, in this model. The cellular mechanisms and sites of action underlying the influences of NK receptor systems in anxiety remain to be elucidated.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos vêm se acumulando evidências de que um grande número de peptídeos está presente nos neurônios do sistema nervoso central (SNC). Desde então, seu provável papel como neurotransmissores tem sido extensamente discutido. Snyder, já em 1980, antecipou que o número de neuropeptídeos ativos no SNC excederia a 200. Os inúmeros trabalhos subsequentes parecem confirmar não só essa previsão, mas também a importância desses peptídeos em diversas funções fisiológicas e patológicas (Hökfejt et al., 1984; Myers, 1994).

A substância P (SP) foi o primeiro neuropeptídeo a ser descoberto, tendo sido identificado por von Euler e Gaddum (1931) no cérebro e no intestino de cavalos. A origem dessa denominação, substância P, vem das palavras “preparação” ou “pó”, pois von Euler dizia ter usado uma preparação padrão na forma de pó seco, convenientemente abreviada por “P” (Otsuka e Yoshioka, 1993). Várias tentativas foram feitas no sentido de estudá-la nas décadas de 50 e 60, embora a purificação e a determinação de sua estrutura primária só tenha ocorrido no início dos anos 70 (Chang e Leeman, 1970; Chang et al., 1971), sendo que em 1971 Tregear et al. a sintetizaram. A caracterização da SP, a partir do hipotálamo de bovinos, evidenciou que esse peptídeo pertence à família das taquicininas, que possui a mesma seqüência de aminoácidos no carbono (C) terminal: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde “X” é, ou um resíduo aromático (Phe, Tyr) ou um resíduo alifático hidrofóbico (Val, Ile; Erspamer, 1981). Sob a denominação comum de taquicininas (TKs) está agrupada uma série de

peptídeos com prováveis funções de neurotransmissão/ neuromodulação central. Esta denominação decorre do fato desses peptídeos induzirem uma despolarização rápida do músculo liso em contraste com a bradicinina, peptídeo já conhecido na época, que realiza a mesma ação lentamente (Bertaccini, 1976).

Desde a descrição e isolamento da SP, outros membros da família das TKs foram também isolados de outras espécies que não-mamíferos, como a fisalaemina e kassinina (pele de sapo) e a eledoisina (glândulas salivares da *Eledone moschata*; Erspamer, 1981). Há cerca de 10 anos atrás, o único membro da família das TKs reconhecidamente presente no SNC de mamíferos era a SP. Entretanto, em 1983, quatro grupos de pesquisadores independentes (Kangawa et al., 1983; Kimura et al., 1983; Maggio et al., 1983; Schimada et al., 1987) relataram a existência de duas outras TKs no SNC de mamíferos: a neurocinina A (NKA, substância K, neuromedina α ou neurocinina alfa) e a neurocinina B (NKB, neuromedina K). Além disso, Tatemoto et al. (1985) isolaram outra TK, a neurocinina K (neuropeptídeo K) e, mais recentemente, uma quinta TK, a neurocinina γ (neuropeptídeo γ), foi identificada por Kage et al. (1988; ver tabela 1). Na verdade, a denominação TKs refere-se aos peptídeos de não-mamíferos, identificados por Erspamer e colaboradores. Os peptídeos de mamíferos, por sua vez, são mais apropriadamente designados como neurocininas (NKs), de acordo com a sugestão obtida no encontro de Maidstone e confirmada no Simpósio de Montreal (Regoli et al., 1994). Na presente dissertação empregaremos esta última terminologia, Nks, sempre que nos referirmos a esses peptídeos.

Tabela 1 - Sequência de aminoácidos das neurocininas e taquicininas naturais. A sequência do carbono (C) terminal comum aos peptídeos da família das taquicininas encontra-se em negrito

ORIGEM	NEUROKININA / TAQUICININA	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	REFERÊNCIA
Mamíferos	SP	H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂	Von Euler e Gaddum, 1931
	NKA	H-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	Kimura et al., 1983; Nawa et al., 1984
	NKB	H-Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	Kimura et al., 1983; Kangawa et al., 1983
	Neuropeptídeo K (NPK)	H-Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Kys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Ile-Ser-His-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	Tatemoto et al., 1985
	Neuropeptídeo γ (NP γ)	H-Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂	Kage et al., 1988
Não mamíferos	Eledoisina (Ele)	pGlu-Pro-Ser-Lys-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ (<i>Eledone moschata</i>)	Erspamer e Anastasi, 1962
	Fisalaemina (PH ₁)	pGlu-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂ (<i>Physalaemus fuscumaculatus</i>)	Erspamer et al., 1964
	Kassinina (Kas)	H-Asp-Val-Pro-Lys-Ser-Asp-Gly-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂ (<i>Kassina senegalensis</i>)	Anastasi et al., 1977

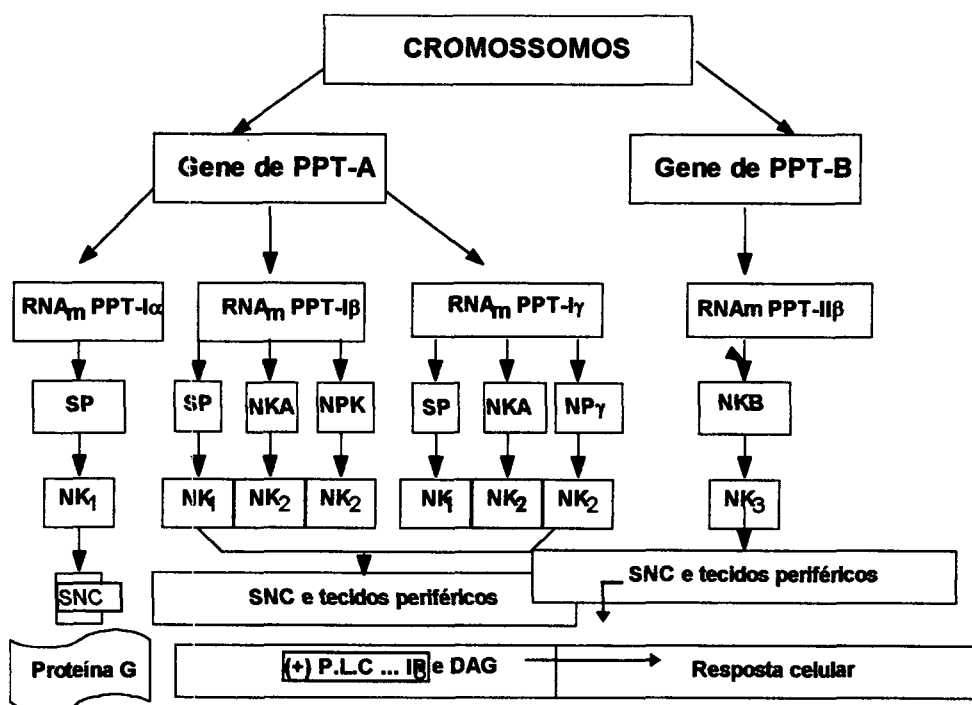
Adaptado de Regoli et al. (1994).

1.1 - Síntese e distribuição das neurocininas

Trabalhos recentes, empregando técnicas de biologia molecular e análise sequencial de DNA, revelaram que as NKs são sintetizadas a partir de dois genes distintos: o gene da PPT-I ou PPT-A (pré-prótaquicinina A) e o gene da PPT-II ou PPT-B (pré-prótaquicinina B), no corpo celular. A transcrição do gene da PPT-A origina a produção de três RNAs de NKs distintas (alfa, beta e gama-pré-prótaquicininas). A PPT-I- α origina a SP, enquanto a PPT-I- β origina tanto a SP quanto a NKA, e ainda um análogo da NKA expandido na porção NH₂, o NPK. A PPT-I- γ origina tanto a SP

quanto a NKA, e ainda o análogo da NKA expandido na porção NH₂, o NP_γ (Nawa et al., 1983, 1984; Kotani et al., 1986; Bonner et al., 1987; Krause et al., 1987; Maggio et al., 1983; Guard e Watson, 1991). A PPT-II, por sua vez, codifica a informação para a síntese de uma proteína precursora da NKB (Dornan et al., 1993), como esquematizado na figura 1.

Figura 1 - Esquema da origem dos peptídeos neurocinérgicos e seus precursores em mamíferos.



Adaptado de Regoli et al. (1994).

As NKs são armazenadas em grandes vesículas sinápticas com um tamanho aproximado de 100 nm (para efeito de comparação, a vesícula que armazena noradrenalina, por exemplo, é de 50 nm) e que ficam localizadas na região terminal do axônio (Maggi et al., 1993). A liberação do conteúdo dessas vesículas para a fenda sináptica ocorre por: 1) estímulos externos como capsaicina, potássio ou outros agentes capazes de induzir despolarização neuronal, ou 2) condições fisiopatológicas, podendo ocorrer durante o peristaltismo intestinal, após estímulos térmicos na pele, por aplicação de estímulos dolorosos e não dolorosos na medula, ou ainda podem ser liberadas durante o processo inflamatório. Tanto em um como no outro processo, a liberação das NKs é cálcio-dependente (Otsuka e Yoshioka, 1993).

A SP é sintetizada como um grande precursor, como acontece com os outros peptídeos neurotransmissores. As aminas do carbono terminal são derivadas de alfa-aminogrupos de resíduos de Gly adjacentes. As formas precursoras extensas de SP estão presentes somente nos axônios e corpos celulares de elementos nervosos que sintetizam essa substância (Kream et al., 1985). A enzima responsável pela maturação e amidação da SP é uma monooxigenase, a peptidilglicina alfa-amidase, dependente de cobre (Marchand et al., 1990).

As NKs estão amplamente distribuídas tanto no SNC quanto na periferia (Helke et al., 1990; Otsuka e Yoshioka, 1993). Na periferia, as NKs são encontradas numa variedade de órgãos principalmente nos neurônios aferentes primários da raiz do gânglio dorsal sensíveis à capsaicina, que, na verdade, são a fonte neuronal mais comum de NKs. Os principais neurônios que possuem NKs, além dos neurônios aferentes, são: 1) os neurônios intrínsecos do intestino, segunda maior fonte de NKs,

especialmente os neurônios dos plexos mioentérico e submucoso (Emson, 1979, para revisão ver Jessel, 1983 e Bartho e Holzer, 1985); 2) os neurônios simpáticos (Kessler et al., 1981; Kessler et al., 1983; Roach et al., 1987) e 3) os neurônios parassimpáticos que inervam as glândulas salivares e a bexiga de cobaia (Sharkey e Templeton, 1984; Al-Hadithi, Stauber e Mitchell, 1988) , além dos neurônios do SNC, como descrito adiante.

A distribuição da SP no SNC tem sido extensivamente investigada por técnicas imunocitoquímicas (Nilsson et al., 1974; Höfkelt et al., 1975; Chan e Palay, 1977; Pickel et al., 1977; Cuello e Kanazawa, 1978; Ljungdahl et al., 1978; Barber et al., 1979; Sakanaka et al., 1981; Artynshyan et al., 1985; Uda, 1985; Standaert et al., 1986; Takatsuji et al., 1990) e através de técnicas de histoquímica de hibridização *in situ* (Warden e Young, 1988; Harlan et al., 1989). A SP está presente em altas concentrações em terminais de nervos aferentes sensoriais do corno dorsal da medula espinhal e também em núcleos de nervos cranianos. Dentro do cérebro, a SP está mais concentrada nos neurônios nigroestriatais, encontrando-se também em altas concentrações no hipotálamo, septo, amígdala e na região do núcleo basal magnocelular - globo pálido ventral / complexo da substância inominata (Brownstein et al., 1976; 1977; Cuello e Kanazawa, 1978; Cuello et al., 1985).

A distribuição da neurocinina A (NKA) é similar à distribuição da SP. As vias neuronais contendo NKB, por outro lado, não estão ainda bem documentadas (Otsuka e Yoshioka, 1993).

A SP freqüentemente coexiste com outras neurocininas no mesmo neurônio, mas também comumente coexiste ou interage intimamente com neurotransmissores clássicos, tais como a dopamina (DA), acetilcolina, opiáceos, serotonina e GABA, à semelhança do que ocorre com outros neuropeptídeos (Pernow, 1983; Hökfelt et al., 1987; Chang, 1988).

1.2 - Neurocininas e SNC

As NKs estão ubiquamente distribuídas no SNC, como pode ser constatado na figura 2. A SP está presente no neocórtex em baixas concentrações (Brownstein et al., 1976; Kanazawa e Jessell, 1976; Ljungdahl, Hökfelt e Nilsson, 1978; Hayashi e Oshima, 1986; Taquet et al., 1988). O núcleo caudado e o putamen contêm relativamente altos níveis de SP (Beach e McGeer, 1984), sendo que cerca de 70% do total desses neurônios estriatais, no rato, são neurônios espinhais de tamanho médio que se projetam para a substância negra, área tegmental-ventral e o globo pálido (Bolam et al., 1981; Loopuijt e Van der Kooy, 1985). Acredita-se que a principal fonte de terminais imunorreativos à SP no globo pálido sejam os neurônios de projeções estriatais (Nauta e Mehier, 1966; Haber e Nauta, 1983). Em primatas, o segmento interno do globo pálido dorsal e pálido ventral é preenchido totalmente por uma firme rede de fibras imunorreativas à SP, enquanto que o segmento externo do globo pálido apresenta baixa imunorreatividade à SP (Beach e McGeer, 1987; Haber e Watson, 1985).

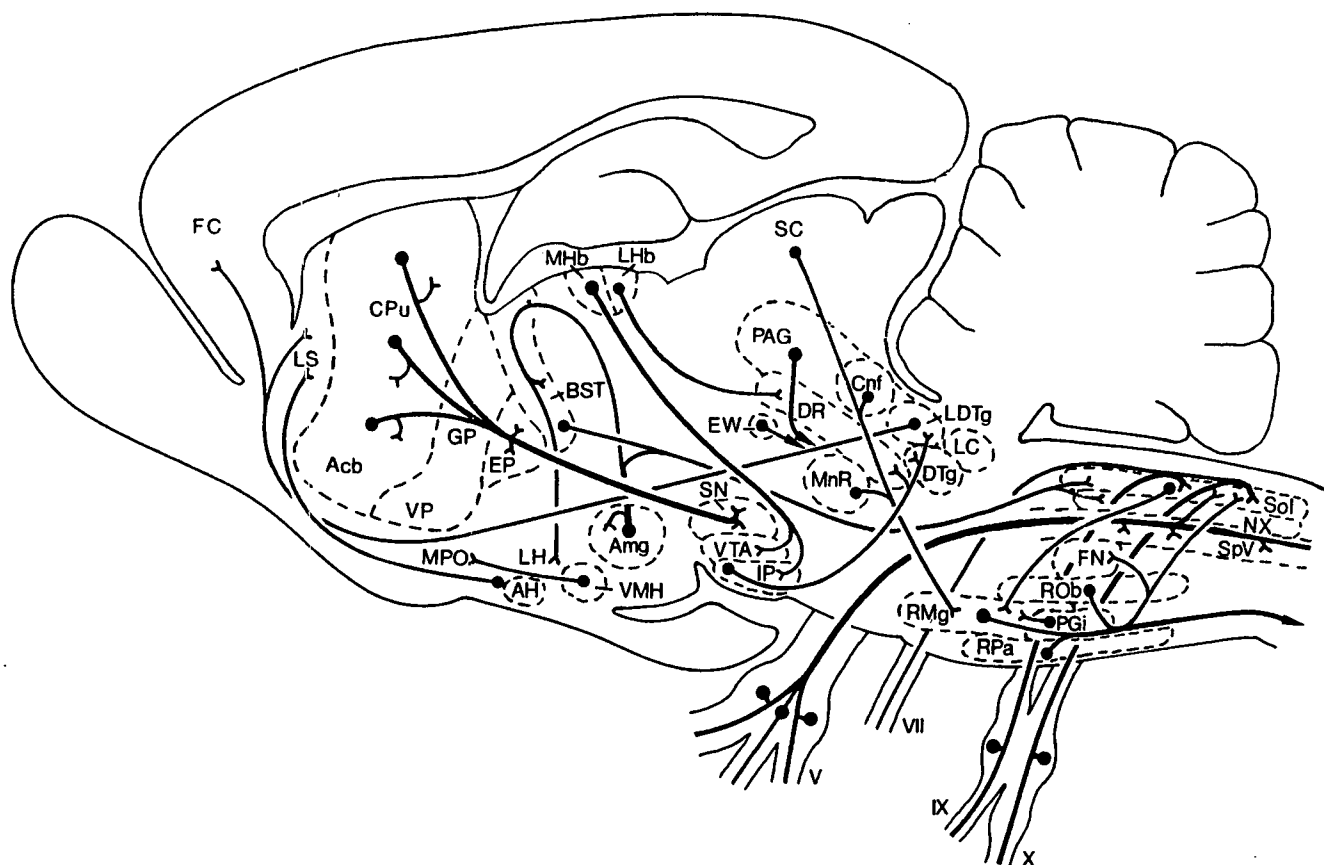


Figura 2 - Distribuição esquemática dos grupos de células e fibras que possuem substância P (SP) no SNC, num corte sagital do cérebro de rato. A maioria dos dados apresentados são derivados do rato, porém alguns provêm de outros mamíferos. Legenda: CPu = caudado putamen; EP = núcleo entopenduncular; VMH = núcleo hipotalâmico ventromedial; MPO = área pré-óptica medial; AH = núcleo hipotalâmico anterior; LH = núcleo hipotalâmico lateral; LS = núcleo septal lateral; Amg = complexo amigdalóide; BST = estria terminal; NX = nervo vago; Sol = núcleo solitário; MHB = habênula mediana; IP = núcleo interpeduncular; VTA = área tegmental ventral; LHB = habênula lateral; DR = núcleo dorsal da rafe; DTg = núcleo tegmental dorsal; LDTg = núcleo tegmental laterodorsal; EW = núcleo Edinger-Westphal; FN = núcleo facial; PAG = matéria cinzenta periaquedutal central; RMg = núcleo magno da rafe; RPa = núcleo pálido da rafe; ROb = núcleo obscuro da rafe; Cnf = núcleo cuneiforme; SC = colículo superior; MnR = núcleo mediano da rafe; PGI = núcleo reticular paragigantocelular; V = nervo trigeminal; SpV = núcleo espinhal trigêmeo; VII = fibras aferentes na face; IX = glossofaríngeo; X = nervo vago; GP = globo pálido; LC = loco cerúleo; VP = núcleo pálido ventral (Adaptado de Otsuka e Yoshioka, 1993).

Na verdade, entre as várias regiões do cérebro, a substância negra é a que contém níveis mais elevados de SP (Brownstein et al., 1976; Kanazawa e Jessel, 1976; Gale et al., 1978; Emson et al., 1980; Cooper et al., 1981; Douglas e Brownstein, 1982). As fibras nervosas contendo SP fazem contato sináptico com os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (Tamiya et al., 1990) que, por sua vez, enviam axônios para o núcleo accumbens, córtex pré-frontal e outras regiões do prosencéfalo. Os neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral inervam particularmente o núcleo accumbens. A ativação dessa via mesolímbica leva provavelmente ao aumento da atividade locomotora observado quando da administração local de SP (Randrup e Munkvad, 1966; Kelly, Sevour e Iversen, 1975). Estudos imuno-histoquímicos têm mostrado que os terminais que contêm SP também fazem contato com neurônios colinérgicos no núcleo prosencefálico basal de ratos (Bolam et al., 1986) e humanos (Beach et al., 1987).

Por outro lado, embora as concentrações de SP no hipocampo de mamíferos sejam baixas, elas são duas a dez vezes mais elevadas que em outras regiões corticais, tanto em macacos quanto em humanos (Kanazawa e Jessel, 1976; Cooper et al., 1981; Hayashi e Oshima, 1986; Beal e Mazurek, 1987). Dentro do hipocampo, os terminais nervosos contendo SP estão distribuídos predominantemente na camada piramidal e granular, enquanto que os corpos celulares ricos em SP são particularmente abundantes na camada polimórfica (Vicent e McGeer, 1981; Sakamoto et al., 1987; Del Fiacco et al., 1987). Comparativamente, as concentrações de SP na amígdala são consideravelmente altas em ratos e baixas em humanos (Kanazawa e Jessell, 1976; Cooper et al., 1981). Em estudos de radioimunoensaio com SP em

cérebro de ratos, o núcleo interpeduncular é o segundo em concentrações de SP, perdendo somente para a *pars reticulata* da substância negra (Brownstein et al., 1976).

O hipotálamo de mamíferos, por sua vez, contém uma alta concentração de SP (Brownstein et al., 1976; Kanazawa e Jessel, 1976; Cuello e Kanazawa, 1978; Ljungdahl et al., 1978; Tsuruo et al., 1983; Panula et al., 1984), enquanto foram observadas concentrações apenas moderadas de fibras imunorreativas a NKs distribuídas em todos os núcleos do tálamo de macaco e humanos, exceção feita aos núcleos ventrais póstero-lateral e intermédio, que são completamente desprovidos de fibras imunorreativas a esse neuropeptídeo (Cooper et al., 1981; Molinari et al., 1987; Hirai e Jones, 1989). Uma distribuição similar de fibras imunorreativas à SP foi encontrada na substância gelatinosa do núcleo espinhal do trigêmeo e na medula espinhal de rato (Cuello et al., 1978; Del Fiacco et al., 1980; Priestley et al., 1982), principalmente nas lâminas I e II externas (Priestley et al., 1982).

O núcleo do trato solitário (NTS) também possui concentrações elevadas de SP, enquanto que as concentrações de NKA e NKB aí encontradas são mais baixas (Nagashima et al., 1989). Os núcleos da rafe apresentam densidades médias de imunorreatividade à SP (Ljungdahl et al., 1978), enquanto os nervos terminais que formam sinapses axodendríticas com os neurônios noradrenérgicos do loco cerúleo também apresentam imunorreatividade à SP (Pickel et al., 1979). No núcleo intermediolateral (IML) os receptores de NKs estão localizados nos neurônios pré-ganglionares simpáticos (Maurin et al., 1984). No entanto, uma maior densidade de fibras imunorreativas à SP, além dos receptores para esse neuropeptídeo, tem sido observada no núcleo parassimpático sacral (NPS; Hancock, 1979). Já o corno ventral

da medula espinhal contém uma quantidade significativa de SP, sendo sua maior fonte a via descendente do núcleo da rafe medular (Jessel et al., 1979).

1.3 - Receptores das neurocininas

As respostas biológicas das principais NKs em mamíferos são mediadas por alguns tipos de receptores farmacologicamente definidos, três dos quais foram recentemente clonados: NK₁, NK₂ e NK₃ (Regoli et al., 1989; Nakanishi, 1991; Seabrook, 1995).

As NKs endógenas, SP, NKA e NKB, ligam-se preferencialmente, mas não exclusivamente, aos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente (Regoli et al., 1988, Helke et al., 1990, Iversen et al., 1990). A SP é o agonista preferencial para o receptor do tipo NK₁, enquanto que a NKA, o NP γ e a NKA(3-10) demonstram alta afinidade para o NK₂ e a NKB para o receptor NK₃ (Regoli et al., 1988; Helke et al., 1990). A distribuição dos três diferentes tipos de receptores tem sido investigada empregando-se técnicas farmacológicas autorradiográficas, de radioligantes e, mais recentemente, também de biologia molecular (Regoli et al., 1989; Nakanishi, 1991; Seabrook, 1995).

Os três tipos de receptores são constituídos de pequenas proteínas com 350 a 500 resíduos de aminoácidos e pertencem à superfamília de receptores semelhantes aos da rodopsina, com sete domínios hidrofóbicos transmembrana, conectados pelas alças intra e extracelulares. Esses receptores mostram forte semelhança com os

receptores adrenérgicos e muscarínicos, além de numerosos outros receptores acoplados às proteínas G (Regoli et al., 1994).

Os receptores NK_1 são codificados pelo gene *spr* e apresentam a seguinte ordem de afinidade pelas NKs naturais: SP > NKA > NKB. Esses receptores foram isolados no cérebro e glândulas salivares de rato (Yokota et al., 1989; Hershey e Krause, 1990), em linfoblastos IM-9 (Gerard et al., 1991; Takeda et al., 1991), pulmão humano (Gerard et al., 1991; Hopkins et al., 1991) e no genoma de camundongo (Sundelin et al., 1992). Os receptores NK_1 estão localizados principalmente no bulbo olfatório, corpo estriado, hipocampo e loco cerúleo no SNC. Pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G, cuja ativação leva à estimulação da via dos fosfoinosítídeos e elevação do cálcio intracelular (Nakanishi, 1991; Guard e Watson, 1991). Lew et al. (1990) sugeriram uma heterogeneidade de receptores NK_1 , propondo a existência de subtipos NK_1A e NK_1B . A esse respeito, Sakurada et al. (1991) confirmaram, através de estudos funcionais, a existência desses subtipos na medula de camundongos, enquanto Petit et al. (1992) propuseram também a existência desses subtipos no íleo de cobaia.

Os receptores NK_2 , por sua vez, são codificados pelo gene *skr*, e apresentam a seguinte ordem de afinidade: NKA > NKB >> SP. Esses receptores foram isolados de estômago de bovinos (384 aminoácidos; Masu et al., 1987), estômago de ratos (390 aminoácidos; Sasai e Nakanishi, 1989), traquéia humana (398 aminoácidos; Gerard et al., 1990; Graham et al., 1991), jejuno humano (398 aminoácidos; Kris et al., 1991) e genoma de camundongos (384 aminoácidos; Sundelin et al., 1992). Apesar de inúmeras controvérsias sobre a existência dos receptores NK_2 para NKs no SNC,

vários estudos comportamentais sugerem sua presença em inúmeras regiões do cérebro, incluindo a substância negra (Hagan et al., 1993), o corpo estriado (Poncelet et al., 1993), o núcleo mediano da rafe (Mason e Elliot, 1992) e o hipocampo (Hagan et al., 1993). Outras regiões que apresentam receptores do tipo NK₂ são o córtex pré-frontal, o septo e a área tegmental ventral (Otsuka e Yoshioka, 1993). Esse subtipo de receptor neurocinérgico também pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G e com produção de fosfoinosítídeos. Alguns estudos funcionais classificam esses receptores em subtipos NK_{2A} e NK_{2B} (Dion et al., 1990; Brunelleschi, 1992; Maggi et al., 1992).

Já os receptores NK₃, codificados pelo gene *nkr*, têm afinidade por NKB > NKA > SP. Os receptores NK₃ foram isolados do cérebro de rato e possuem 452 aminoácidos (Shigemoto et al., 1990). Sua localização no SNC é a seguinte: córtex, hipocampo, núcleo interpeduncular, além das lâminas I e II da medula espinhal (Otsuka e Yoshioka, 1993). Esses receptores são também ligados à produção de fosfoinosítídeos, via estimulação da fosfolipase C (PLC), por uma proteína G acoplada ao receptor. No entanto, esses são os receptores menos estudados e, até recentemente, não se dispunha de agonistas ou antagonistas com alta seletividade para os receptores NK₃. Para um resumo dessas informações sobre os receptores de neurocininas ver a tabela 2.

Outros estudos recentes demonstram a existência de receptores para as NKs também em linhagens de células gliais de ratos, em culturas de astrócitos de camundongos e ratos, em linhagens de células de astrocitoma de humanos e em cicatrizes gliais do nervo óptico transectado do coelho (Perrone et al., 1986).

Tabela 2 - Características farmacológicas principais dos receptores de neurocininas.

RECEPTORES	NK ₁	NK ₂	NK ₃
Ordem de potência dos agonistas	SP > NKA > NKB	NKA > NKB >> SP	NKB > NKA > SP
Agonistas seletivos	SP metil-éster [Sar ⁹]SP sulfona [Pro ⁹]SP	[βAla ⁸]NKA(4-10) [Nle ¹⁰]NKA (4-10) GR 64349	Senktide [MePhe]NKB [Pro ⁷]NKB
Antagonistas seletivos	FK 888 SR 140333 RP 67580	SR 48968 L659877ciclo [Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-Met]	SR 142801 [Trp ⁷ ,[βAla ⁸]NKA(4-10)
Segundos mensageiros	IP ₃ /DG AMP _c	IP ₃ /DG AMP _c	IP ₃ /DG AMP _c
Gene	<i>spr</i>	<i>skr</i>	<i>nkr</i>

Adaptado de Regoli et al. (1994).

1.4 - Ações biológicas das neurocininas

As NKs exercem uma variedade de ações biológicas, muitas das quais determinadas pela sua seqüência comum do C terminal (Munekata et al., 1987;

Quartara et al., 1992) e mediadas por um ou mais dos três receptores conhecidos: NK₁, NK₂, NK₃ (Regoli et al., 1989; Nakanishi, 1991). Todas as três NKs, SP, NKA e NKB, estão amplamente distribuídas no SNC e várias ações farmacológicas foram descritas para esses peptídeos (Itoi et al., 1988, 1992; Unger et al., 1988). Já há algum tempo tem sido proposto um papel neurotransmissor e/ou neuromodulador da SP no SNC, especialmente em centros de controle autonômico, endócrino ou comportamental (Glowinski et al., 1980). No entanto, apesar de sua participação inequívoca como neurotransmissor nos gânglios periféricos autonômicos e na medula espinhal (para revisão ver Otsuka e Konishi, 1983), nenhum papel fisiológico foi demonstrado com clareza para a SP no cérebro (Itoi et al., 1994).

A administração i.c.v. de SP ou NKA, agonistas de receptores do subtipo NK₁, em ratos conscientes promoveu aumento da pressão arterial, frequência e débito cardíacos, além de exacerbação na atividade locomotora, atenção e comportamentos de auto-limpeza (Unger et al., 1988; Itoi et al., 1992; Tschöpe et al., 1992). Os agonistas seletivos de receptores NK₁ produzem também uma gama de respostas comportamentais nociceptivas, que incluem comportamentos compulsivos de coçar, morder e lamber os membros posteriores (Papir-Kricheli et al., 1987; Laneuville et al., 1988), ou o abdômen e o tórax em ratos e camundongos. Além disso, a administração central de agonistas NK₁ produz batidas vigorosas e repetitivas das patas posteriores, acompanhadas de cromadocriorréia, em gerbils (Rupniak e Williams, 1994). Zernig et al. (1992) observaram também que a administração periférica de CP-96345, um antagonista seletivo de receptores NK₁, reduz a atividade locomotora, por sedação e

alteração na performance motora, de camundongos testados em uma caixa claro-escuro.

Os receptores neurocinérgicos do tipo NK₂, por sua vez, estão amplamente distribuídos na periferia onde medeiam várias ações fisiológicas, como a contração da musculatura lisa nos sistemas gastrintestinal, respiratório, geniturinário e vascular (para revisão ver Maggi et al., 1993). Embora sua distribuição no SNC seja limitada, e sua presença controversa, esses receptores parecem estar envolvidos também na modulação central da nocicepção, homeostase hídrica e atividade locomotora (Hagan et al., 1993). Recentemente foi descrita ainda uma provável ação ansiolítica dos antagonistas de receptores NK₂ em modelos experimentais de ansiedade (Hagan e McLean, 1993; Stratton et al., 1993).

Já os receptores do tipo NK₃, que ocorrem predominantemente na substância negra (Stoessl, 1994), não têm suas funções fisiológicas completamente delineadas até o momento, além daquelas relacionadas á nocicepção (para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993). Isso se deve, em grande parte, à ausência de antagonistas seletivos adequados para esses receptores. Sabe-se, entretanto, que a administração central de NKB ou senktide produz aumentos na pressão arterial e na frequência cardíaca, acompanhados do comportamento peculiar de "wet dog shakes" (Itoi et al., 1992). Muito recentemente, Emonds-Alt et al. (1995) descreveram que a administração i.p. ou v.o. de um novo antagonista NK₃, o SR 142801, inibiu de modo dose-dependente o comportamento de girar induzido pela administração intra-estriatal de senktide, um agonista seletivo nestes receptores.

Assim, de uma maneira geral, esses neuropeptídeos têm sido implicados em uma variedade de funções como o controle da atividade motora, funções endócrina e autonômica (para revisão ver Maggi et al., 1993), além de exercer importantes funções na transmissão sensorial. Seu papel como neurotransmissor da nocicepção é dos mais estudados, sendo que seu envolvimento se dá tanto a nível da percepção quanto da transmissão do estímulo nociceptivo envolvendo os três tipos de receptores, NK₁, NK₂ e NK₃ (Henry, 1977; Pernow, 1983; Lembeck, 1988). Vários neuropeptídeos, em particular a substância P (SP) e outras neurocininas, têm sido propostos como neurotransmissores e/ou neuromoduladores da transmissão dolorosa (Otsuka e Yoshioka, 1993). A neurocinina A e a SP coexistem em populações de neurônios sensoriais primários de rato (Dalsgaard et al., 1985), e estímulos nocivos aplicados em sítios periféricos resultam na sua liberação no gânglio medular dorsal (Yaksh et al., 1980; Duggan et al., 1992), bem como na excitação de neurônios dorsais medulares (Henry, 1976). A aplicação iontoforética de agonistas e antagonistas dos receptores neurocinérgicos na substância gelatinosa de gato podem facilitar ou atenuar a resposta nociceptiva para a estimulação térmica, mas não para mecânica, respectivamente (Fleetwood-Walker & Mitchell, 1989). Além disso, a lesão ou inflamação de tecidos periféricos em animais induz hiperalgesia na resposta reflexa da medula espinhal (Woolf, 1983; Ferrell et al., 1988), resposta esta que pode ser aumentada com a aplicação de estímulos elétricos de alta intensidade ou por administração intratecal de neurocininas (Woolf & Wiesenfeld-Hallin, 1986). Duggan et al. (1988), demonstraram que a estimulação nociva prolongada ou intensa da medula

espinhal de rato induz o aumento da liberação da SP. Adicionalmente, Henry (1976) demonstrou que a SP excita neurônios do corno dorsal medular de gato em resposta a estímulos nocivos cutâneos. Esse efeito foi confirmado por estudos autoradiográficos mostrando que existe uma quantidade abundante de SP nesta preparação (de Koninck et al., 1992), e que a estimulação nociva cutânea é inibida por antagonistas de SP (de Koninck & Henry, 1991). Hylden & Wilcox (1981) demonstraram ainda que a aplicação intratecal de SP em camundongos induz comportamentos de mordidas, lambidas e batidas na pata posterior, síndrome típica que reflete sensação dolorosa, sendo esses comportamentos bloqueados por antagonistas de SP (Lembeck et al., 1981; para revisão ver Otsuka & Yanagisawa, 1990). A aplicação intratecal de SP em ratos também facilita o reflexo nociceptivo espinhal (Yashpal & Henry, 1983), efeito esse confirmado por vários outros autores (Laneuville et al., 1988; Otsuka & Yanagisawa, 1988; Picard et al., 1993). Tem sido também demonstrado que a estimulação das fibras aferentes nociceptivas do tipo "C" promove efeito similar à injeção intratecal de SP (Woolf e Wiesenfeld-Hailin, 1986). Leah et al. (1985), demonstraram que muitas fibras aferentes tipo "C" têm receptores silenciosos para as neurocininas, que podem ser sensibilizados por processos inflamatórios (Häbler et al., 1990). Essa observação foi confirmada por Hope et al. (1990), que mostrou que os níveis de SP e NKA estão aumentados no gânglio medular dorsal de gato após aplicação de estímulos mecânicos em modelos de dor inflamatória (Schaible et al., 1990). Assim, o envolvimento da SP e outras neurocininas na transmissão dolorosa é suportado por grande número de

experimentos, sendo que esse envolvimento parece ser espécie-dependente e estar acentuado em condições patológicas, especialmente nos processos inflamatórios.

Existem ainda evidências de um possível papel das NKs em processos neurotróficos, tais como em funções regulatórias do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso e na regeneração de lesões do tecido nervoso (Manthey et al., 1989; Thoenen, 1991). Outras evidências mostram que a SP pode excitar certos neurônios corticais e vários núcleos envolvidos no controle respiratório e cardiovascular (Picard et al., 1994), além de estimular a liberação do hormônio do crescimento e da prolactina (Pernow, 1983). Só mais recentemente, porém, é que outros efeitos, principalmente os comportamentais, têm sido demonstrados pela administração intracranial ou periférica de neurocininas em roedores (Huston et al., 1993). A esse respeito, certos componentes do comportamento motor (Kelly et al., 1985; Greidanus e Maigret, 1988), assim como a agressão induzida pelo isolamento (Stern e Hadzovic, 1973; Hall e Stewart, 1984) e o comportamento consumatório (Cador et al., 1986; De Caro et al., 1988) parecem evidenciar uma importante participação neurocinérgica, além de também ter sido observada uma influência modulatória desses peptídeos na resposta fisiológica ao estresse (Oehme et al., 1980; Hall e Stewart, 1983).

Vários estudos têm sugerido também que a SP está envolvida em processos de aprendizado e de memória, promovendo e reforçando esses processos (Huston e Stäubli, 1981; Huston e Oitzl, 1989, Huston e Hasenhörl, 1995). Esses efeitos parecem ser codificados por diferentes seqüências de SP, já que a porção aminoterminal (1-7) melhora a memória, enquanto as terminações carboxílicas de seqüências hepta e hexapeptídicas têm papel reforçador. Esses efeitos comportamentais diferenciais

parecem, na verdade, ser decorrentes de diferentes alterações neuroquímicas do sistema dopaminérgico produzidas pelas diversas seqüências de SP em várias regiões cerebrais (Huston e Hasenöhrl, 1995).

1.5 - Ansiedade e seus modelos experimentais

A palavra ansiedade provém do latim *anxietas*; *anxietatem* = ânsia, angústia, aflição, incerteza afetiva, atribulação causada pelo receio de que sobrevenha alguma desgraça, desejo ardente ou veemente, sofreguidão e impaciência (Laudelino Freire, 1940).

Para o psicofarmacologista clínico britânico Malcolm Lader (apud Graeff, 1993) a ansiedade caracteriza-se por uma sensação de perigo iminente, sem que se possa identificar uma ameaça real ou sem que essa pareça aos demais proporcional à intensidade da emoção. Portanto, a ansiedade poderia ser definida como um estado patológico de medo exagerado ou de causa indefinida. Alguns autores admitem a existência de um estado de ansiedade normal ou basal necessário ao desempenho de tarefas do dia a dia. Esse estado só seria qualificado como patológico quando prejudicasse o desempenho diário e, só nesse caso, seria passível de tratamento com terapias e/ou com drogas ansiolíticas, de acordo com cada caso.

A maioria das pesquisas na área da ansiedade está relacionada à busca de uma droga ansiolítica mais eficaz e sem efeitos colaterais indesejáveis. Para tal

utilizam-se inúmeros testes comportamentais em animais baseados em situações experimentais que incluem estímulos que induzam medo ou aversão (Sanger, 1991; Handley e McBlane, 1993).

Dentre os modelos experimentais de ansiedade, o labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste de investigação da ação de drogas ansiolíticas ou ansiogênicas que tem sido bastante utilizado, por diversas razões (ver Hagan e McClean, 1993). Montgomery (1955) foi o pioneiro desse modelo, desenvolvendo um labirinto elevado no qual a intensidade do medo natural induzido poderia ser medida pela variação da proporção de exploração (comportamento exploratório) entre os braços abertos e fechados. Como consequência, os ratos controles tendem a evitar os braços abertos e permanecem por mais tempo nos braços fechados do LCE (Cruz et al., 1994). Esse modelo foi validado farmacologicamente por Handley e Mithani (1984) para ratos, sendo confirmados posteriormente por Pellow et al. (1985). Lister (1987) demonstrou que o LCE poderia também detectar a atividade de agentes ansiogênicos e ansiolíticos em camundongos. De uma forma geral, drogas ansiolíticas aumentam, enquanto agentes ansiogênicos diminuem a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Quando confinados nos braços abertos, os ratos mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como congelamento, defecação e aumento de corticosteróides plasmáticos (Pellow et al., 1985). Trabalhos recentes indicam que espaços abertos ou, mais especificamente, a impossibilidade de roedores executarem a tigmotaxia nos braços abertos, ao invés da altura, é a principal causa do medo nesta situação experimental (Treit et al., 1993).

As vantagens do LCE são muitas: como modelo etológico podemos destacar que ele é rápido e fácil de usar, não é um equipamento caro, não requer treinamento dos animais nem privação de comida ou água, além de utilizar estímulos aversivos naturais. Podemos destacar ainda que suas medidas basais são consistentes e reprodutíveis dentro e entre os laboratórios, especialmente no que diz respeito aos estudos envolvendo drogas que atuam sobre o sistema GABAérgico. Teoricamente os animais podem ser reutilizados e é um teste que prediz bem o potencial das drogas ansiolíticas, especialmente os benzodiazepínicos, em humanos (Pellow et al., 1985). No entanto, como qualquer outro modelo, o LCE possui também desvantagens. Ao ser usado como modelo etológico, os efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos podem ser mascarados por alterações induzidas pelas drogas na atividade locomotora dos animais; as medidas basais são sujeitas às variações do dia a dia; em alguns estudos, particularmente aqueles envolvendo a administração crônica de benzodiazepínicos, os animais não podem ser reutilizados pois há habituação ao equipamento e, por fim, dependendo da classe de drogas em estudo, os efeitos freqüentemente não podem ser reproduzidos dentro e entre laboratórios ((Dawson e Tricklebank, 1995), como no caso de estudos envolvendo drogas que atuam sobre o sistema serotoninérgico. As discrepâncias observadas nestes estudos são provavelmente decorrentes do fato que a serotonina é responsável por uma modulação fásica do comportamento, e portanto o efeito de drogas que alteram este sistema depende do nível basal em que o animal se encontra, em contraste com a modulação GABAérgica, que é tônica, assim, os efeitos de drogas que atuam nesta transmissão seriam mais previsíveis. Por outro lado,

quando são empregados modelos de condicionamento para avaliação da atividade ansiolítica/ansiogênica de drogas, também há várias outras desvantagens como o fato dos animais terem que ser submetidos a um longo treinamento, a necessidade da privação de água ou comida, o fato de somente os benzodiazepínicos apresentarem efeitos consistentes, além dos efeitos sedativos e relaxantes musculares poderem afetar a capacidade do animal executar o comportamento (Dawson e Tricklebank, 1995).. Assim, o LCE, quando empregado em conjunto com outros testes que o completem, é um teste absolutamente adequado para a avaliação de novas drogas ansiolíticas ou ansiogênicas

Nos últimos 30 anos, um grande número de drogas benzodiazepínicas têm sido empregadas no tratamento da ansiedade (Hamon, 1994). Os benzodiazepínicos exercem não só ação ansiolítica, como também ações anticonvulsivantes e hipnóticas, além de promoverem amnésia, sedação e potencialização dos efeitos depressores do álcool em humanos (Lader, 1990). Na tentativa de evitar esses efeitos colaterais indesejáveis, novas classes de ligantes dos receptores benzodiazepínicos, como as β -carbolinas, as pirazoloquinolinas e as pirazolopiridinas, têm sido identificadas e estudadas (Petersen et al., 1984; Williams et al., 1989, 1990). Os estudos têm também demonstrado a participação de receptores serotoninérgicos na ansiedade, pois compostos como a buspirona (um agonista parcial 5-HT_{1A}), a ritanserina (um antagonista 5-HT₂) e o ondansetron (um antagonista 5-HT₃) apresentam efeitos ansiolíticos (Jones et al., 1988; New, 1990). Além disso, muitos esforços têm sido empreendidos no sentido de encontrar agentes ansiolíticos mais seguros e, se possível, mais potentes. Entre os últimos estudos nesta direção estão aqueles

envolvendo os receptores de colecistocinina (CCK), pois foi observado que os antagonistas CCK_B, como o L365260, o CI988 e o PD135158, mostraram propriedades anticonflito (Hughes et al., 1990) e ansiolíticas (Harro et al., 1993) em roedores. Fortalecendo essas observações experimentais, foram descritas ações ansiogênicas após administração central ou periférica de peptídeos relacionados ao CCK, tanto em roedores como em humanos (Harro et al., 1993).

A busca pelo desenvolvimento de novas drogas ansiolíticas não-benzodiazepínicas é, pelos diversos motivos acima expostos, muito importante, não só para a obtenção de novas armas terapêuticas, mas também para a ampliação do conhecimento das bases neuroquímicas da ansiedade. Na verdade, muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos na gênese e modulação da ansiedade, entre eles a noradrenalina, a serotonina, a dopamina, o GABA, a glicina, os aminoácidos excitatórios, o fator de liberação da corticotropina (CRF), a corticosterona e a própria colecistocinina (CCK), como acabamos de mencionar (Graeff et al., 1993). Sabendo-se que a SP pode existir como um co-transmissor de alguns desses neurotransmissores citados (Otsuka e Yoshioka, 1993) e que as NKs, como já descrito, estão distribuídas por inúmeras regiões do SNC, como amígdala, hipocampo, núcleos da rafe, substância cinzenta periaquedutal, áreas cerebrais inequivocadamente envolvidas no estado de ansiedade (Graeff, 1994), existe a possibilidade de que as NKs, a exemplo de outros neuropeptídeos, desempenhem um papel na modulação do estado de ansiedade.

Assim, no presente estudo, procurou-se avaliar a participação das neurocininas na modulação da ansiedade experimental. Para tal, foram avaliados os

efeitos de drogas agonistas e antagonistas seletivas dos receptores de NKs utilizando o LCE, um modelo experimental de ansiedade simples e confiável, na tentativa de verificar possíveis efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos desses compostos e de demonstrar a participação do sistema de NKs na modulação da ansiedade experimental em camundongos.

2. OBJETIVOS

No presente trabalho investigou-se a possível participação do sistema de neurocininas (NKs) na modulação da ansiedade avaliada pelo teste do labirinto em cruz elevado em camundongos. Esta avaliação foi realizada observando-se os efeitos de drogas agonistas e antagonistas seletivos dos receptores para NKs, injetadas centralmente. Com o intuito de minimizar possíveis interpretações errôneas por ação dos compostos em estudo sobre a performance motora e a atividade locomotora dos animais, o efeito dos agonistas e antagonistas de receptores para NKs foi também avaliado no rota-rod e na caixa de movimentação espontânea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados 680 camundongos machos adultos (3 meses de idade) pesando de 25 a 30 g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Esses animais receberam água e ração *ad libitum*, exceto durante a vigência das observações comportamentais. A temperatura ambiente, 23 ± 2 °C, e o ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luz das 6h às 18h) do biotério foram controlados automaticamente. Os animais permaneceram por, pelo menos, uma semana em habituação no Biotério da Coordenadoria Especial de Farmacologia antes de serem utilizados. Cada animal foi empregado apenas uma vez.

3.2 - Drogas

Foram empregadas as seguintes drogas:

- AGONISTAS, provenientes da Peninsula Labs., San Carlos, EUA:

- **Substância P** = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (von Euler e Gaddum, 1931);

- **Substância P metil éster** = Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-OMe (Watson et al., 1983);
- [β Ala⁸] NKA₍₄₋₁₀₎ = H-Asp-Ser-Phe-Val- β -Ala-Leu-Met- NH₂ (Rovero et al., 1989);
- **Senktide** = Succinil [Asp⁶,MePhe⁸] substância P₍₆₋₁₁₎ (Wörmser et al., 1986).

- ANTAGONISTAS:

- **FK 888** ({(4R) - 4 - hidroxil - 1 -[1-metil-1H-indol-3-yl] carbonil-propil]-L-N-benzil-N-metil-3-(2-(2-naftil)-L-alaninamida)} (NK₁) (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japão; Fujii et al., 1991)
- **SR 48968** { (S) - N - metil - N - 4 [4 - acetilamino -4-fenilpiperidina-2- (3,4-diclorofenil)butil] benzamida) (Sanofi Recherche, Montpellier, França; Emonds-Alt et al., 1992).

Como solução controle empregou-se o veículo **PBS** ("phosphate buffer solution"), solução de tampão fosfato: NaCl 137 mM, KCl 1,7 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Chemical, St. Louis, EUA).

Todos os agonistas foram dissolvidos em solução fisiológica isotônica, e os antagonistas em etanol, na concentração de 10^{-3} M, e armazenados em tubos Eppendorf a -20 °C até o momento do uso. Imediatamente antes dos experimentos, as alíquotas das drogas foram diluídas em PBS pH 7,4 para as doses estabelecidas.

Foram também empregados os seguintes compostos como drogas de referência para as atividades ansiolítica e ansiogênica, com os respectivos veículos como solução controle:

- **Diazepam** (Cristália, Brasil) diluído em PBS, pH 7,4, com 10% de propilenoglicol;
- **Pentilenotetrazol** (Sigma, St. Louis, EUA) dissolvido em PBS, pH 7,4;
- **DMCM** = metil- 6,7 -dimetoxi- 4 - etil - β -carbolina-3-carboxilato (Schering Aktiengesellschaft, Berlim, Alemanha) dissolvido em PBS acrescido de 2 gotas de Tween 80.

3.3 - Administração das drogas

Todas as drogas foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.) com auxílio de uma micro-seringa Hamilton 701 N (10 μ l). Um tubo de polietileno (PE 10) de \pm 12 mm de comprimento foi acoplado à agulha da micro-seringa tendo na sua parte terminal uma agulha odontológica de 3,7 mm de comprimento. Cada animal foi levemente anestesiado com éter e a seringa foi posicionada em plano inclinado (45°) ao crânio, com o bisel da agulha voltado para a cauda do animal. Uma linha imaginária foi traçada rostralmente às orelhas do animal e a agulha foi introduzida (3,5 mm) cerca de 2 mm lateralmente à linha mediana. O volume injetado da solução foi de 5 μ l por animal. Esse volume de solução foi injetado durante um período de 2 a 3 segundos, de acordo com o método de Emonds-Alt et al. (1995). Após cada experimento os animais foram sacrificados e observou-se a posição da agulha, sendo descartados os animais

nos quais a agulha não estava na região dos ventrículos, ou em caso de hemorragia (Haley e McCormick, 1957, modificado por Laursen e Belknap, 1986).

Para uma confirmação mais acurada da localização das cânulas, um grupo de animais, que não participou dos testes comportamentais, foi previamente injetado com 5 μ l de solução de azul de Evans 0,5%, pela mesma via (i.c.v.) com igual procedimento, e cinco minutos depois anestesiado com Equitesin intraperitoneal e perfundido intracardiacamente com solução salina seguida de formaldeído 10%. Os cérebros desses animais foram então retirados e fixados em solução de formaldeído 10%/sacarose 30%. O corte sagital desses cérebros mostrou a localização correta das cânulas em 100% dos animais desse grupo, assim como a difusão da solução de azul de Evans, pelo sistema ventricular, para todo o cérebro até a altura do tronco cerebral (dados não apresentados).

3.4 - Procedimentos gerais e equipamentos

Todos os experimentos foram realizados entre 8 h e 13 h. No dia dos experimentos os animais ficaram numa ante-sala no laboratório por um período de, pelo menos, 30 minutos antes da injeção das drogas ou veículo.

3.4.1 - Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi baseado no modelo validado por Lister (1987) e consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), também opostos. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e o piso são de acrílico preto, enquanto que as paredes laterais dos braços fechados são de acrílico transparente.

O aparelho foi elevado a uma altura de 45 cm do nível do piso. Para evitar a queda dos animais dos braços abertos, esses foram circundados por 0,25 cm de acrílico transparente. Foi também utilizado um campo aberto (35 x 35 x 15 cm), confeccionado em acrílico transparente com piso em acrílico preto para habituação dos animais por 5 min, imediatamente antes do teste no LCE.

Os aparelhos usados nos experimentos estavam localizados numa sala com luz vermelha (15 W). Os aparelhos foram limpos com solução de etanol a 10% Após cada animal ter sido testado. Imediatamente após as injeções das diversas drogas (N= 10 para cada dose de cada tratamento), os animais foram colocados individualmente no campo aberto, por 5 minutos e, após esse período de habituação, foram transferidos para o LCE. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e observou-se o seu comportamento por 5 minutos (Pellow et al., 1985).

As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos e nos fechados. A frequência total de entradas foi obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entradas no braço aberto foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice foi multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados. Durante o tempo em que os animais permaneceram no campo aberto, foram também observadas, mas não sistematicamente registradas, as presenças dos seguintes comportamentos: coçar, lambeo, morder, bater cauda/pata posterior.

3.4.2 - Rota-rod

O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocado a 25 cm de altura e girando a 12 rpm. O teste do rota-rod foi empregado para avaliar a performance motora dos animais.

Os animais foram selecionados em sessões de 1 minuto de duração, 24 h antes da injeção das drogas, sendo escolhidos aqueles que permaneciam na barra giratória por, pelo menos, 1 minuto. Os animais selecionados foram, no dia do teste, injetados i.c.v. com as drogas (N = 10 para cada tratamento) e, 5 minutos após, passaram pelo teste do rota-rod por 1 minuto. Foram registrados o tempo de

permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas durante a duração do teste (Duham e Myia, 1957).

3.4.3 - Caixa de movimentação espontânea

O aparelho consiste de uma caixa retangular (40 x 12 x 20 cm) com três fotocélulas orientadas ao longo de seu eixo horizontal para registro dos efeitos dos agentes farmacológicos na atividade motora de camundongos (Siegel, 1946; Dews, 1953). Os camundongos foram injetados com as respectivas drogas, agonistas ou antagonistas neurocinérgicos seletivos, e/ou solução controle i.c.v. (N = 8 para cada tratamento) e, após 5 minutos, os animais foram colocados individualmente nas caixas de movimentação espontânea. O número de vezes que os animais interromperam os feixes de luz foram registrados como índice da movimentação dos mesmos. Este registro foi procedido a cada 5 minutos até o máximo de 15 minutos.

3.5 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm EPM. As comparações estatísticas foram realizadas pela análise de variância univariada (ANOVA), tendo como variável independente o fator tratamento. As comparações múltiplas foram realizadas pelo testes de Dunnett ou "t" de Student não pareado, conforme adequado e indicado na legenda das figuras. O nível de significância estatística considerado foi $p < 0.05$.

4 - RESULTADOS

Os efeitos das drogas de referência, diazepam (DZP) pentilenotetrazol (PTZ) e DMCM, no comportamento de camundongos no LCE são mostrados na figura 3. O DZP foi usado como controle positivo para ações ansiolíticas, apresentando diferenças estatisticamente significantes na dose de 7 nmol/5 μ l. Nesta dose o DZP, como esperado, aumentou a percentagem de freqüência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, $F_{(3,45)} = 3,564$ ($p < 0,01$) e $F_{(3,44)} = 3.164$ ($p < 0.05$), respectivamente.

O PTZ e o DMCM foram usados como drogas de referência para efeitos ansiogênicos. O PTZ diminuiu a percentagem de tempo de permanência nos braços abertos nas doses de 200 e 300 nmol/5 μ l, $F_{(3,44)} = 5,466$ ($p < 0,01$ e 0,05, respectivamente). O DMCM (130 nmol/5 μ l) reduziu os parâmetros de freqüência de entrada e tempo de permanência nos braços abertos, $t = 2,795$ ($p < 0,01$) e $t = 3,302$ ($p < 0,01$), respectivamente. Os outros parâmetros registrados no LCE, isto é, o número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas, não foram alterados significativamente pela administração central destas drogas de referência.

Na figura 4 estão representados os efeitos de diferentes doses de substância P (SP), um agonista que atua preferencialmente em receptores NK_1 , nos diversos parâmetros de exploração registrados no LCE. A SP promoveu diminuição da freqüência de entradas nos braços abertos nas doses de 1 e 10 pmol, $F_{(5,54)} = 2,844$ ($p < 0,01$ e 0,05, respectivamente), não alterando significativamente as outras medidas em estudo.

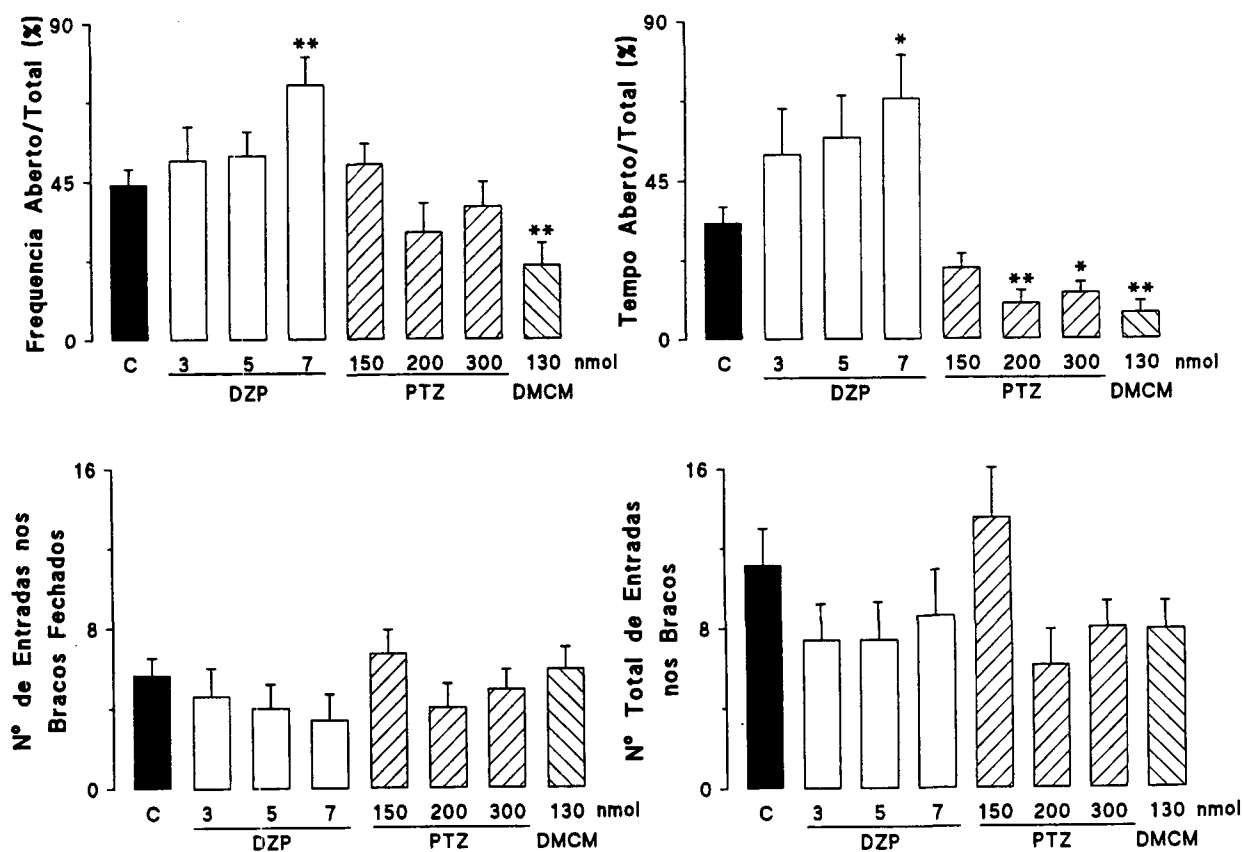


Figura 3 - Efeito da injeção i.c.v. de diazepam (DZP), pentilenotetrazol (PTZ) ou DMCM nas medidas de exploração do LCE em camundongo, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett, exceto para o DMCM no qual foi empregado o teste "t" de Student não pareado. Número de animais empregados por tratamento: C = 22; DZP 3 nmol = 10; DZP 5 nmol = 9; DZP 7 nmol = 8; PTZ 150 nmol = 10; PTZ 200 nmol = 10; PTZ 300 nmol = 8; DMCM 130 nmol = 8.

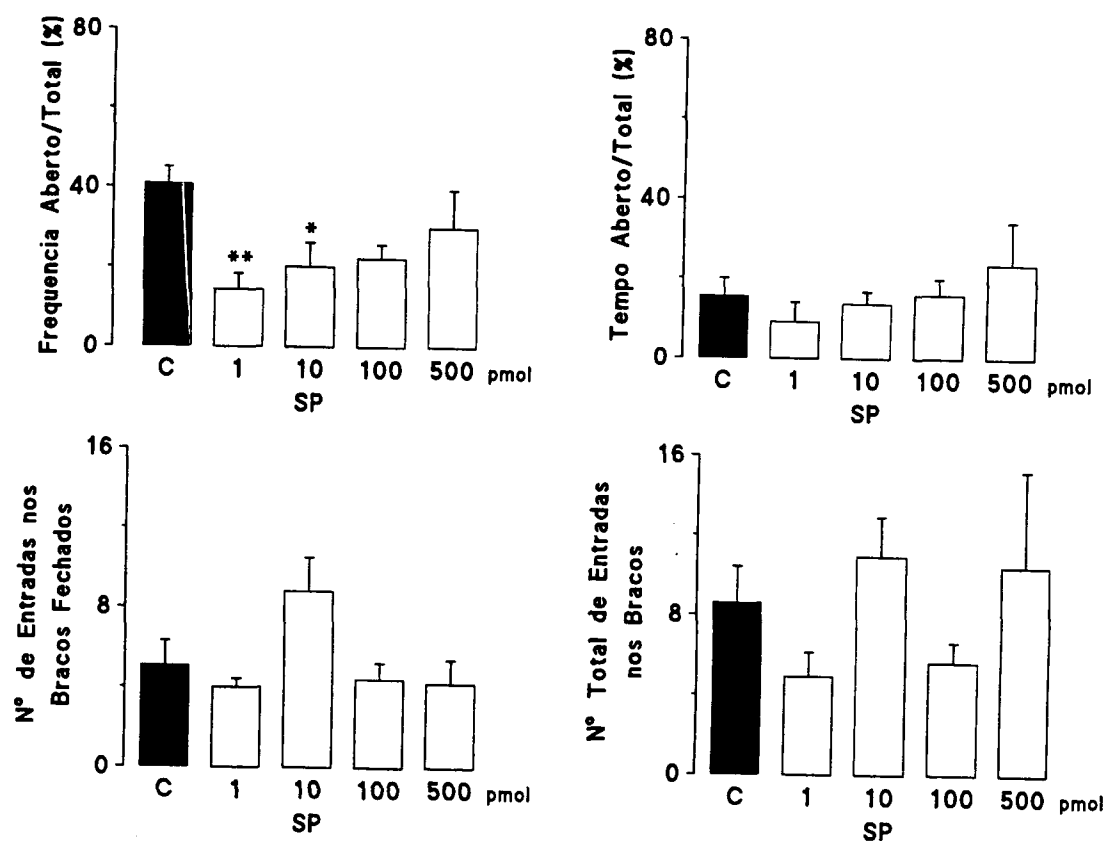


Figura 4 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SP sobre as medidas de exploração do LCE: em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

Os efeitos da administração i.c.v de substância P metil éster (SPME), um agonista seletivo dos receptores do tipo NK₁, no LCE, são mostrados na figura 5. A SPME diminuiu o parâmetro de percentagem de frequência de entrada nos braços abertos nas doses de 1 e 10 pmol, $F_{(4,45)} = 2,822$ ($p < 0,05$) e aumentou a frequência de entradas nos braços fechados na dose de 100 pmol, $F_{(4,45)} = 2,622$ ($p < 0,05$). O tempo de permanência nos braços abertos, assim como o número de entradas total (braços abertos mais braços fechados) não foi modificado significativamente pela injeção i.c.v. de SPME em nenhuma das doses empregadas.

A figura 6 ilustra os efeitos da injeção i.c.v. da β -Ala⁸ neurocinina A₍₄₋₁₀₎ (β -Ala), um agonista seletivo de receptores NK₂, nas medidas de exploração no LCE. Pode ser observado que a β -Ala aumentou tanto os parâmetros de frequência de entradas nos braços fechados, $F_{(5,54)} = 4,244$ ($p < 0,01$), como de entradas em ambos os braços, $F_{(5,54)} = 4,151$ ($p < 0,05$), na dose de 500 pmol. Os parâmetros percentagem de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, no entanto, não foram alterados de modo significativo por este agonista.

O senktide (SENK), um agonista seletivo de receptores NK₃, aumentou os parâmetros de percentagem de frequência de entradas nos braços abertos, nas doses de 100 e 500 pmol, $F_{(4,45)} = 4,790$ ($p < 0,05$) e de tempo de permanência nos braços abertos nas doses de 10, 100 e 500 pmol, $F_{(4,45)} = 9,074$ ($p < 0,05$, 0,01 e 0,01, respectivamente), como representado na figura 7. Além disso, este agonista não promoveu nenhuma mudança significativa nos dois outros parâmetros registrados no LCE, ou seja, no número de entradas nos braços fechados e no de entradas totais nos braços abertos e fechados.

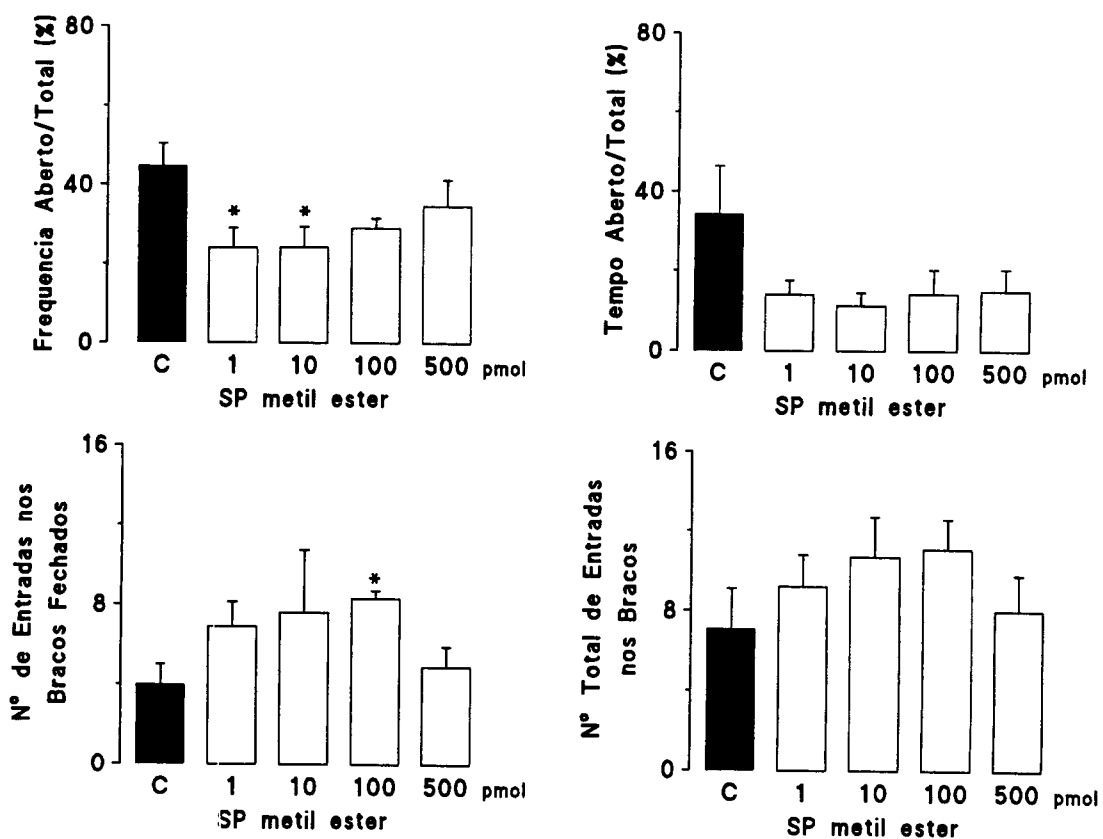


Figura 5 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SPME sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

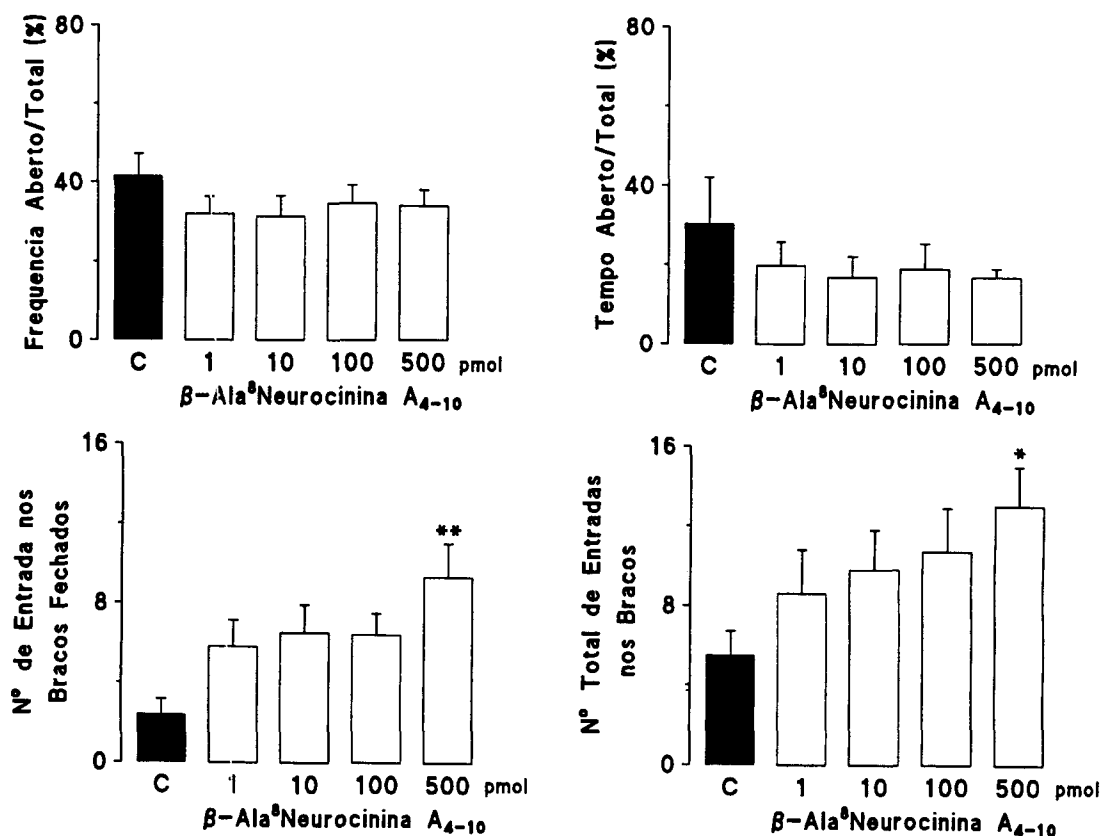


Figura 6 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de β -Ala⁸-neurocinina A(4-10) sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

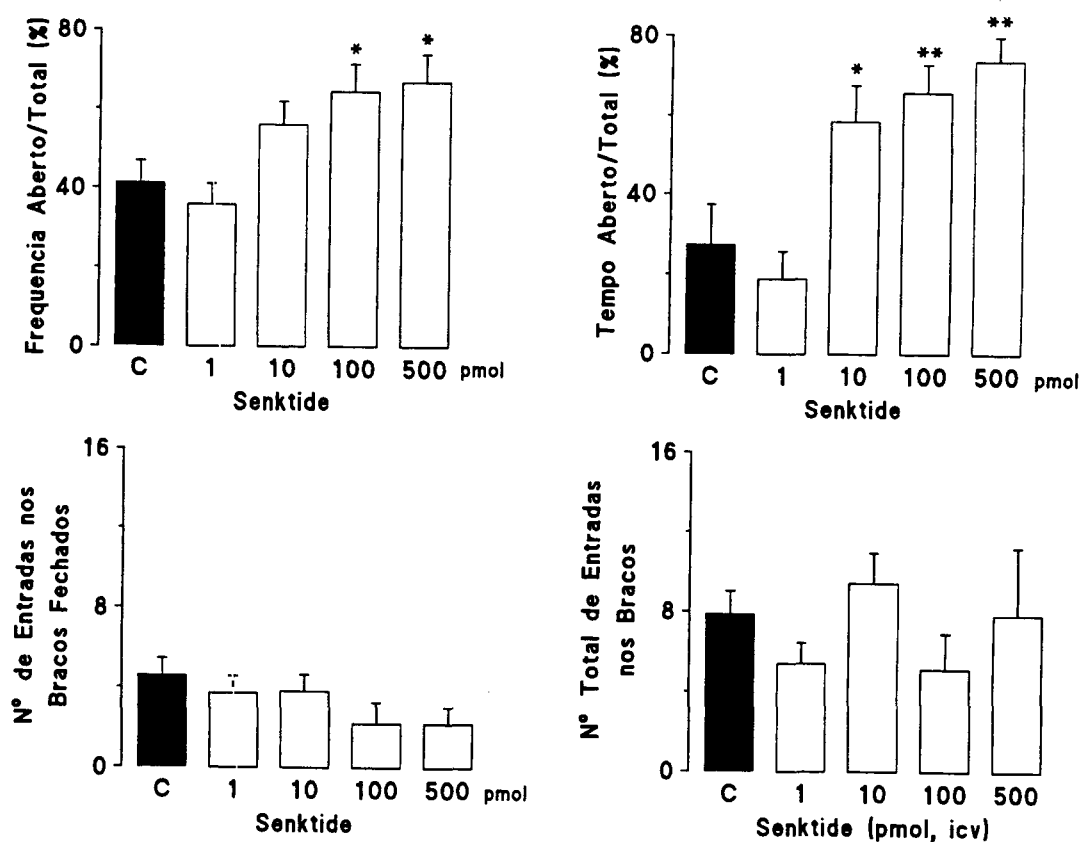


Figura 7 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de senktide sobre as medidas de exploração do LCE: em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

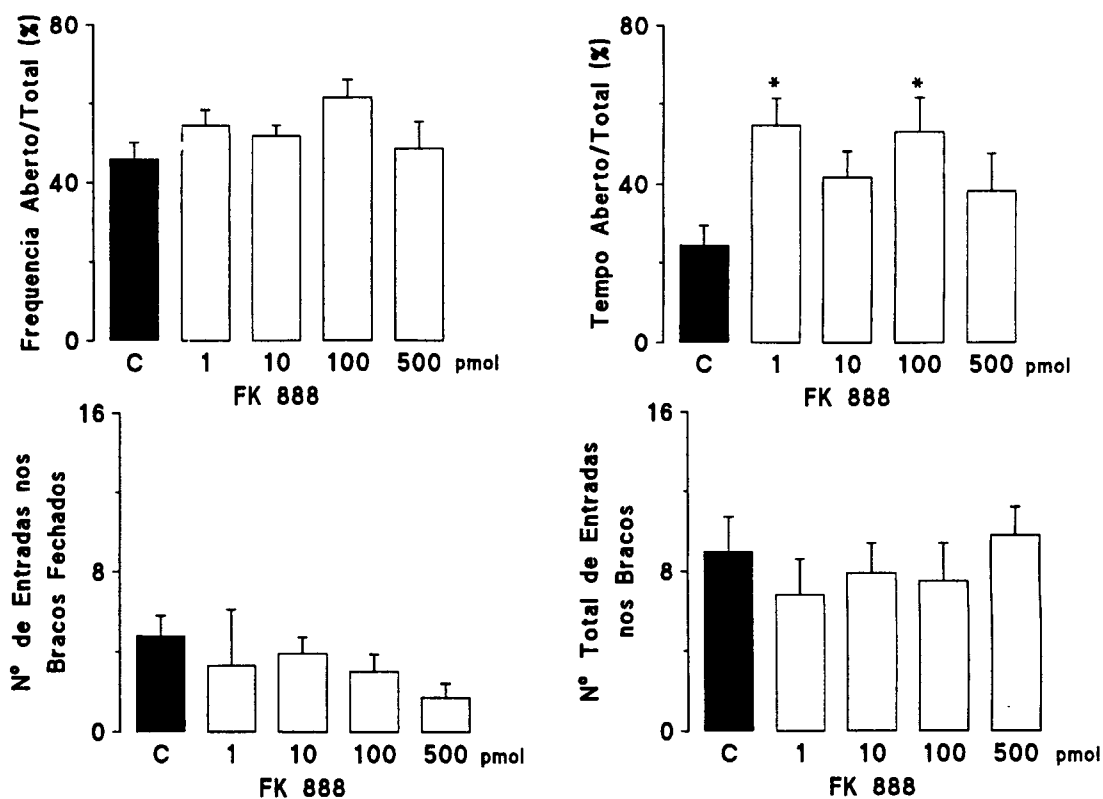


Figura 8 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de FK 888 sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

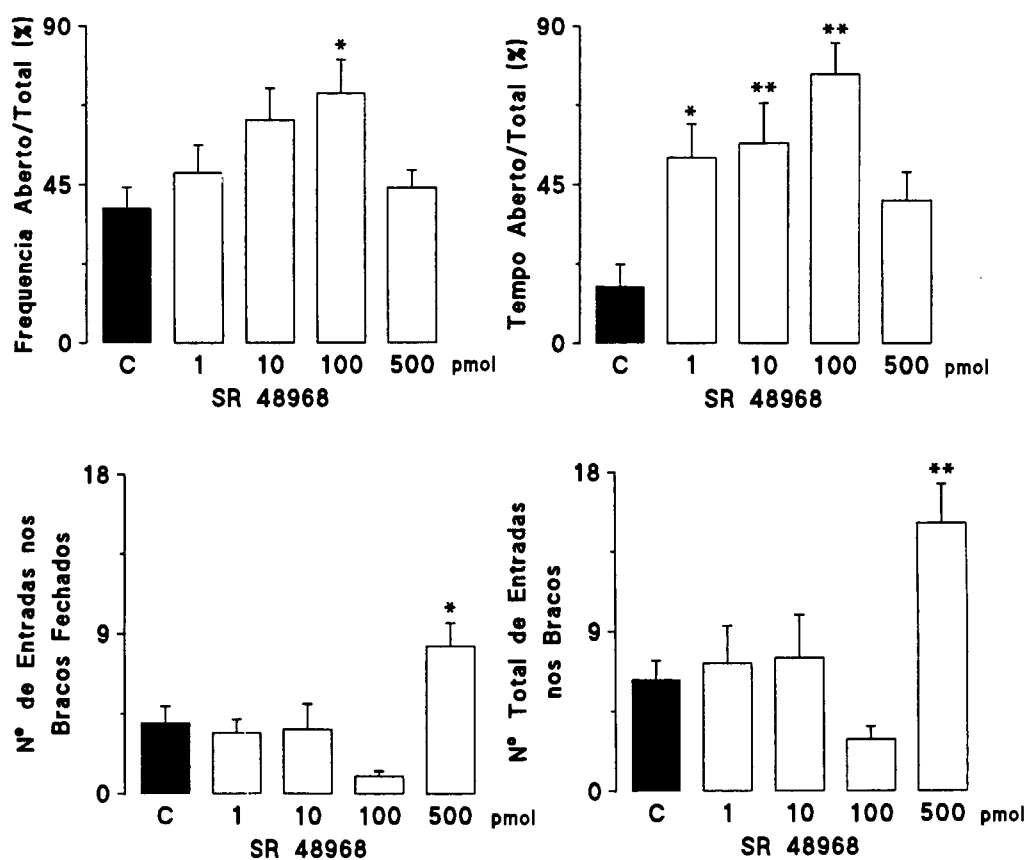


Figura 9 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SR 48968 sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$) em relação ao valor obtido no grupo controle (C) empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett). Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

Conforme demonstra a figura 8, o FK 888 (FK), um antagonista seletivo de receptores NK_1 , promoveu apenas aumento no parâmetro percentagem de permanência nos braços abertos, nas doses de 1 e 100 pmol, $F_{(4,45)} = 2,674$ ($p < 0,05$). O FK não alterou de maneira significativa nenhuma das outras medidas obtidas no LCE.

Os efeitos das várias doses de SR 48968 (SR), um antagonista seletivo de receptores NK_2 , são apresentados na figura 9. É possível observar que o SR aumentou a percentagem de freqüência de entradas nos braços abertos na dose de 100 pmol, $F_{(4,45)} = 3,141$ ($p < 0,05$) e, também, a do tempo de permanência nesses braços nas doses de 1, 10 e 100 pmol, $F_{(4,45)} = 6,060$ ($p < 0,05, 0,01$ e $0,01$, respectivamente). Além disso, este antagonista NK_2 aumentou a freqüência de entradas nos braços fechados, $F_{(4,45)} = 6,905$ ($p < 0,01$) e a de entradas totais em ambos os braços, $F_{(4,45)} = 5,898$ ($p < 0,01$) na maior dose injetada (500 pmol).

As figuras 10, 11 e 12 apresentam os efeitos da co-injeção de agonistas e antagonistas seletivos de receptores NK_1 e NK_2 , nos parâmetros comportamentais observados no LCE, juntamente com os dados obtidos quando da administração individual de cada um dos compostos (transpostos das figuras 4 e 8, 5 e 8, 6 e 4, respectivamente) para facilitar a análise dos resultados. É possível notar que houve um antagonismo das ações da SP pelo FK 888 (figura 10). A co-injeção de FK com SP promoveu aumento no parâmetro de percentagem de freqüência de entradas nos braços abertos ($t = 2,194$; $p < 0,05$), efeito este inverso à redução observada neste parâmetro, quando da administração central do agonista sozinho e similar ao observado para a ação do antagonista *per se*. Da mesma forma que as drogas

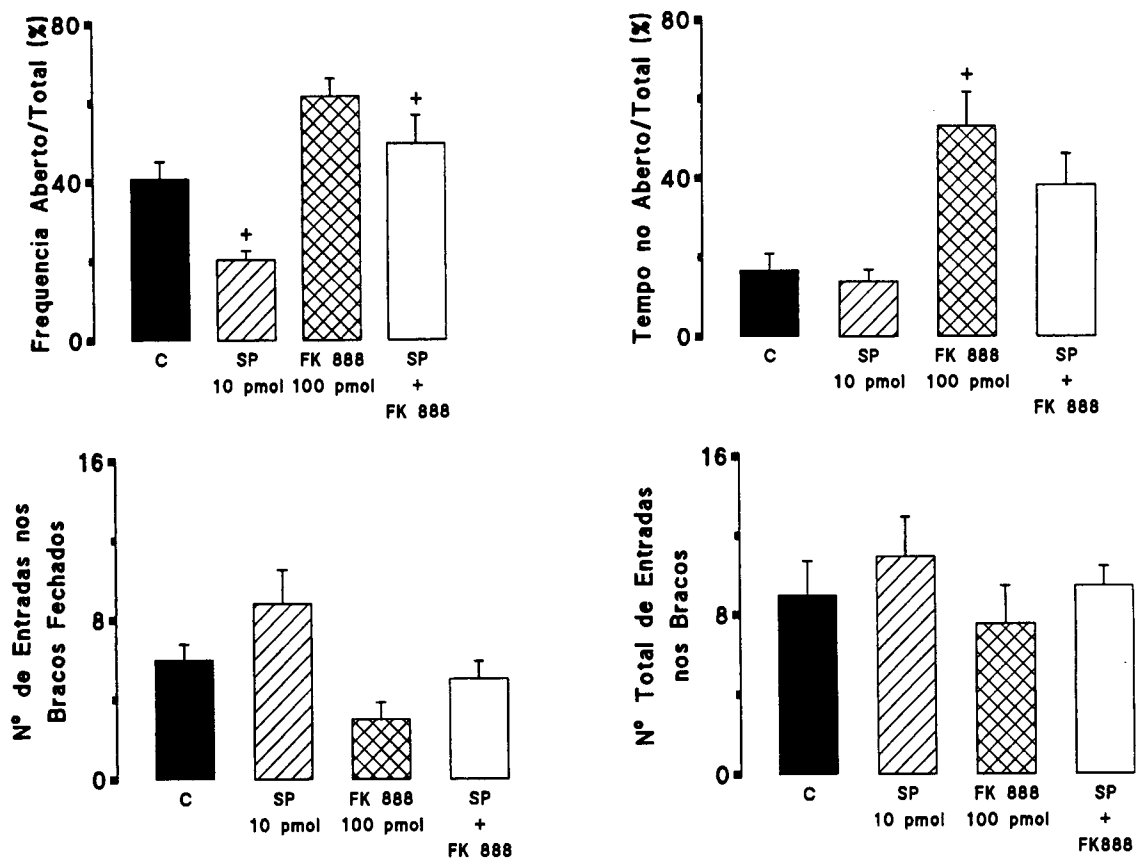


Figura 10 - Efeito da co-injeção i.c.v. de SP 10 pmol e FK 888 100 pmol sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos e cruzes denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$; + $p < 0,05$) em relação ao valor obtido no respectivo grupo controle (C) empregando-se o teste "t" de Student não pareado e a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett, respectivamente. Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

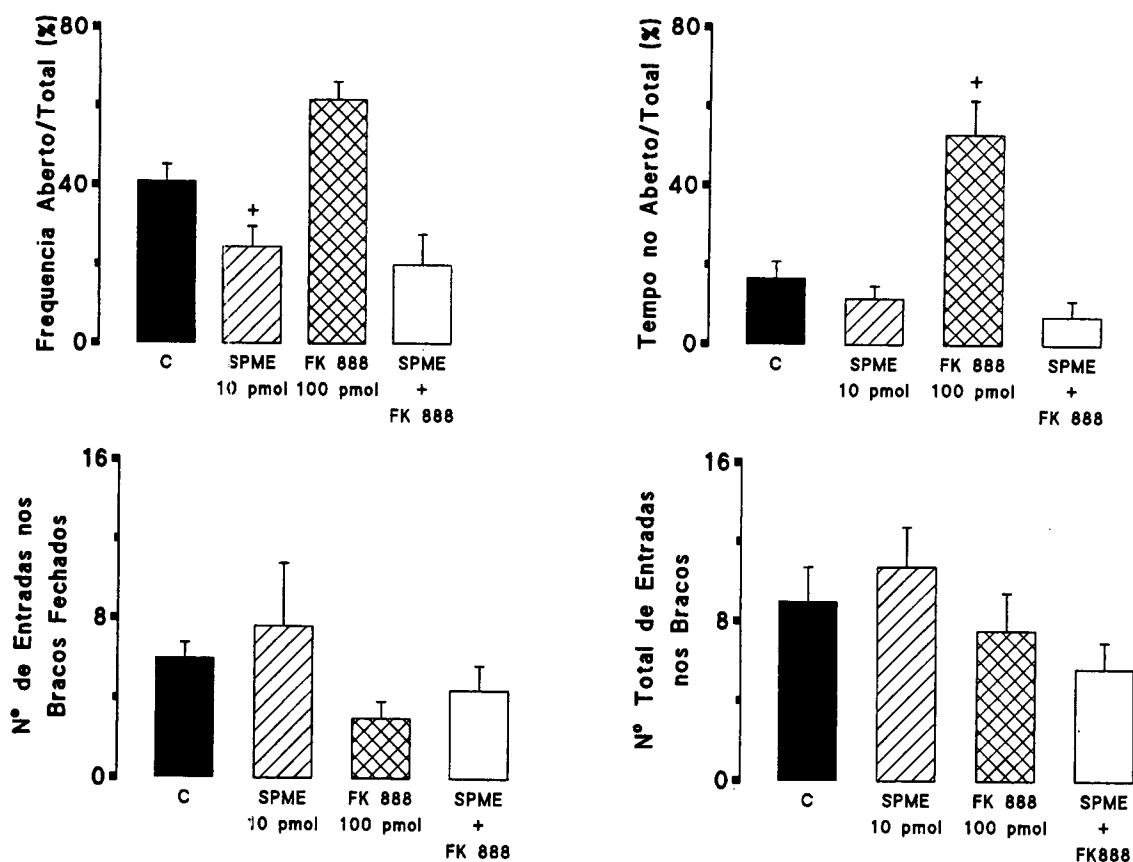


Figura 11 - Efeito da co-injeção i.c.v. de SPME 10 pmol e FK 888 100 pmol sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Cruzes denotam diferenças significantes (+ $p < 0,05$) em relação ao valor obtido no respectivo grupo controle (C) empregando-se o teste "t" de Student não pareado e a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett, respectivamente. Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

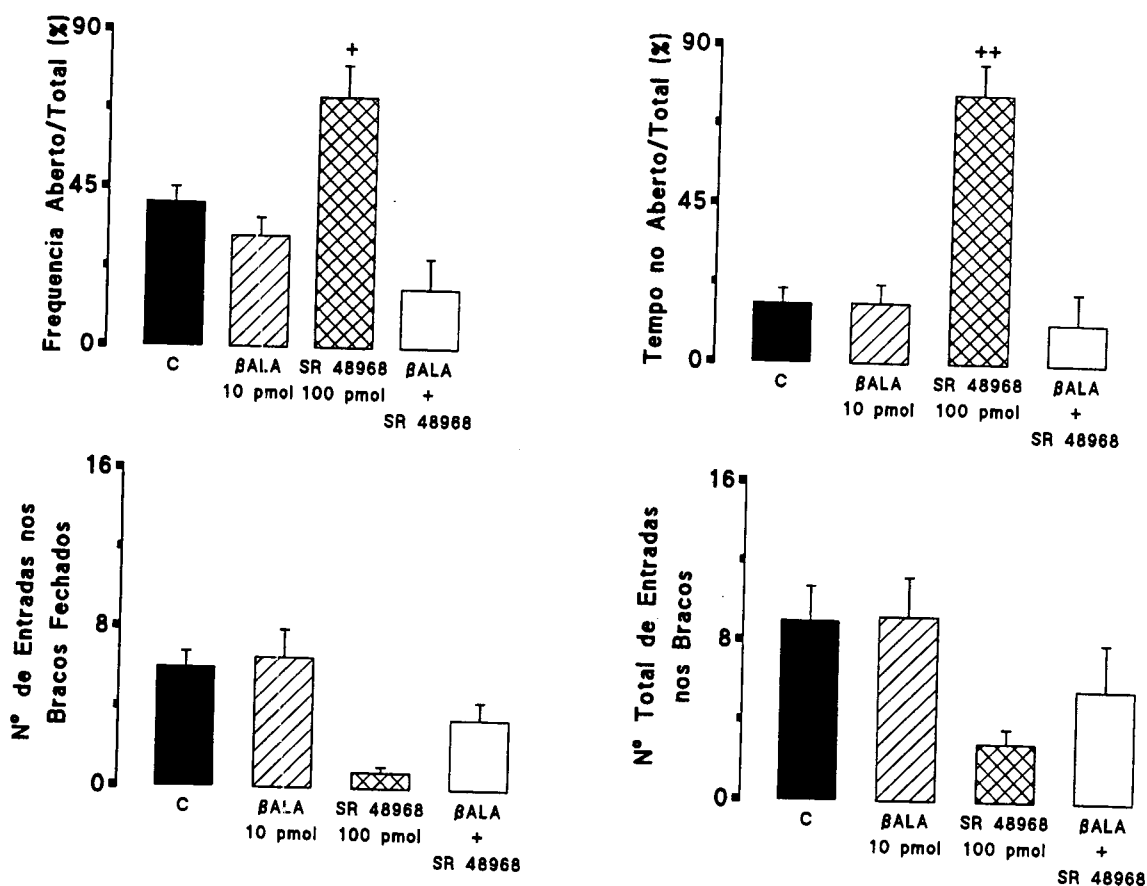


Figura 12 - Efeito da co-injeção de β -Ala 10 pmol e SR 48968 100 pmol sobre as medidas de exploração do LCE em camundongos por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. Asteriscos e cruces denotam diferenças significantes (* $p < 0,05$; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$) em relação ao valor obtido no respectivo grupo controle (C) empregando-se o teste "t" de Student não pareado e a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett, respectivamente. Número de animais empregados em cada tratamento = 10.

agonista e antagonista injetadas individualmente não mudaram as outras medidas registradas no LCE (número de entradas totais e nos braços fechados), a sua co-administração também não alterou estes parâmetros (figura 10).

Por outro lado, a co-injeção de SPME e FK, agonista e antagonista seletivos de receptores do tipo NK_1 , respectivamente, não alterou significativamente o padrão de resposta previamente obtido com a administração central do agonista SPME *per se* (figura 11). A combinação desses dois compostos (SPME e FK) apenas manteve os parâmetros de percentagem de entradas e de tempo dispendido nos braços abertos em níveis semelhantes aos obtidos nos animais do grupo controle e tratados com o agonista sozinho, e oposto àqueles encontrados quando da administração individual do antagonista.

A figura 12 mostra que a co-administração i.c.v. de β -Ala e SR, agonista e antagonista seletivos NK_2 , respectivamente, reduziu significativamente a frequência de entradas nos braços abertos ($t = 2.745$; $p < 0,05$). Desta maneira, os animais que receberam a combinação do agonista e do antagonista NK_2 continuaram apresentando basicamente o mesmo tipo de comportamento já obtido com a droga agonista sozinha, no caso, β -Ala. Esses efeitos, na verdade, se contrapõem frontalmente aos observados para o antagonista sozinho (SR). Sendo assim, a co-injeção de agonista e antagonista de receptores NK_2 resultou no desaparecimento dos efeitos significantes do SR sobre os parâmetros de frequência e de tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Na Tabela 3 podemos visualizar os efeitos mais proeminentes dos diversos tratamentos descritos até este ponto.

TABELA 3 - Quadro esquemático resumindo os efeitos mais característicos das diferentes drogas injetadas i.c.v. nos parâmetros do labirinto em cruz elevado em camundongos.

TRATAMENTO	% A/T (Freq)	% A/F (Tempo)	Entradas fechados	Total
DZP	↑↑	↑↑	-	-
PTZ	-	↓↓	-	-
DMCM	↓↓	↓↓	-	-
SP	↓↓	-	-	-
SPME	↓↓	-	↑↑**	-
βAla	-	-	↑*	↑*
SENK	↑↑	↑↑	-	-
FK 888	-	↑↑	-	-
SR 48968	↑↑	↑↑	↑*	↑*
SP + FK 888	-	↑↑	-	-
SPME + FK 888	-	-	-	-
βAla + SR	↓↓	-	-	-

A/A + F = número de entradas nos braços abertos/número de entradas nos braços

T/A/T + TF = tempo de permanência nos braços abertos/tempo de permanência nos

braços

↑↑ = aumento

↓↓ = redução

- = sem alteração

* Na dose de 100 pmol

** Na dose de 500 pmol.

A avaliação da coordenação motora dos animais no rota-rod, 5 minutos após a injeção i.c.v. das diversas drogas mostrou que os diferentes tratamentos não alteraram substancialmente o número de quedas neste teste e, tampouco modificaram o tempo de permanência dos animais na barra giratória, em relação aos volumes do grupo controle.

TABELA 4 - Efeito da injeção i.c.v. dos diferentes agonistas e antagonistas de receptores neurocinérgicos e de drogas de referência na performance motora de camundongos avaliada no rota-rod ($\bar{X} \pm \text{EPM}$)

DROGAS	DOSE	Nº DE QUEDAS	TEMPO DE PERMANÊNCIA (segundos)
Controle	-	0,1 \pm 0,1	54,2 \pm 5,8
DZP	7 nmol	0,2 \pm 0,13	53,0 \pm 5,2
PTZ	300 nmol	0,1 \pm 0,1	56,0 \pm 3,5
DMCM	130 nmol	0,5 \pm 0,31	48,0 \pm 6,7
SP	100 pmol	0,5 \pm 0,4	52,5 \pm 5,6
SMPE	100 pmol	0,1 \pm 0,1	57,0 \pm 3,0
β Ala	100 pmol	0,2 \pm 0,1	49,6 \pm 6,9
SENK	100 pmol	0 \pm 0	60,0 \pm 0
FK	100 pmol	0,8 \pm 0,4	42,4 \pm 8,0
SR	100 pmol	0 \pm 0	60,0 \pm 0

$P > 0,05$, ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett.

O efeito dos diferentes tratamentos no padrão de ambulação dos animais nas caixas de movimentação espontânea está apresentado na tabela 5. É possível verificar

que o tratamento dos camundongos via i.c.v. com uma dose alta dos vários compostos não levou a qualquer modificação significativa na atividade exploratória normal dos animais ($p > 0,05$). Igualmente, não se observou nenhum comportamento relacionado com a nocicepção (lamber, morder, coçar os membros posteriores, etc.).

TABELA 5 - Efeito da injeção i.c.v. dos diferentes agonistas e antagonistas de receptores neurocinérgicos e de drogas de referência na movimentação espontânea de camundongos avaliada cumulativamente ($\bar{X} \pm EPM$), em diferentes tempos após a injeção das drogas.

TRATAMENTO	DOSE	5 min	10 min	15 min
Controle	-	25,75 \pm 6,8	52,1 \pm 12,6	76,5 \pm 24
DZP	7 nmol	18,3 \pm 5,4	32 \pm 9,6	48 \pm 14,4
PTZ	300 nmol	17,9 \pm 5,3	30,4 \pm 8,1	50 \pm 12,4
SP	100 pmol	31,25 \pm 6,5	46,4 \pm 11,54	65,9 \pm 14
SPME	100 pmol	34,25 \pm 7,5	59,4 \pm 13,0	86,8 \pm 23,3
β Ala	100 pmol	31,6 \pm 9,6	58,8 \pm 17,2	94,5 \pm 25,6
SENK	100 pmol	25,5 \pm 9,9	50 \pm 17,2	59,2 \pm 16
FK	100 pmol	23,9 \pm 5,3	46,4 \pm 15,3	66 \pm 15,3
SR	100 pmol	26,6 \pm 6,2	40,7 \pm 10,3	49 \pm 13

$P > 0,05$, ANOVA univariada seguida do teste de Dunnett.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que drogas agonistas ou antagonistas dos receptores de neurocininas dos tipos NK₁, NK₂ e NK₃, exibem efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos no labirinto em cruz elevado em camundongos, após administração intracerebroventricular. Estes efeitos parecem ser específicos, devido provavelmente a uma ação direta ou indireta dos agonistas ou antagonistas neurocinérgicos nas áreas e/ou vias neuronais envolvidas no controle dos comportamentos relacionados à ansiedade, uma vez que as doses empregadas das drogas em estudo foram extremamente menores que aquelas descritas na literatura, produzindo efeitos comportamentais e cardiovasculares (Picard et al., 1994), e que, à exceção da modificação dos parâmetros no LCE, esses compostos não promoveram alterações da atividade locomotora dos animais nem na sua performance motora, como investigado pelos outros testes aqui descritos. Essas drogas não produziram também padrões comportamentais nociceptivos específicos da estimulação de receptores do tipo NK₁, NK₂ e NK₃, como comportamentos de morder, coçar os membros posteriores, de auto-limpeza, aumento da atividade locomotora e/ou 'wet dog shakes' (Unger et al., 1988; Itoi et al., 1992; Smith et al., 1994; Culman et al., 1995).

Inúmeras pesquisas no campo da ansiedade têm demonstrado que as raízes biológicas da ansiedade encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em resposta a diferentes estímulos em situações de perigo (Graeff et al., 1993). Está bem estabelecido que existem estruturas no SNC fortemente implicadas nos

comportamentos defensivos. Entre estas estruturas, as principais são: o septo, o hipocampo e a amígdala, que servem de interface entre o neocórtex e o sistema límbico subcortical, o núcleo mediano da rafe, o hipotálamo medial e a substância cinzenta periaquedutal dorsal. A área septo-hipocampal parece desempenhar um papel controlador que, detectando uma discrepância entre o esperado e o acontecido, aumenta o nível de vigilância e dirige a atenção do animal para às possíveis fontes de perigo. Esse estado é denominado por Gray (1982) como a própria ansiedade. Os estímulos discretos, por sua vez, parecem ser processados diretamente pela amígdala, que se comunica com o hipocampo por meio de vias polissinápticas. Parece ser também na amígdala que os sinais de perigo ganham uma conotação afetiva e onde o grau de ameaça que esses sinais representam para o organismo é avaliado. Da amígdala partem vias nervosas que se projetam sobre estruturas límbicas profundas, como o hipotálamo e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) do mesencéfalo. Inúmeras evidências indicam que a MCP dorsal é a via final comum da reação de defesa afetiva, tanto comportamental como neurovegetativa (Handley, 1994). Já o hipotálamo parece mobilizar as alterações endócrinas que acompanham as reações de defesa, como liberação de ACTH, prolactina, endorfinas, entre outros hormônios e peptídeos. Essa função do hipotálamo é realizada através de suas ligações com a hipófise anterior, via sistema porta-hipofisário e, mais diretamente, com a hipófise posterior pelas vias neuro-secretórias (Graeff et al., 1993).

As NKs e seus receptores têm tido sua localização e a de seus receptores extensivamente estudada, como descrito na Introdução da presente dissertação (Seabrook et al., 1995). No SNC, as NKs estão amplamente distribuídas, inclusive nas

regiões implicadas no comportamento defensivo. Neurônios com imunorreatividade à SP estão presentes na MCP e enviam axônios para o núcleo accumbens (Li et al., 1990). No hipocampo, a SP também está presente, embora em concentrações menores (Kanazawa e Jessel, 1976). Na amígdala, as concentrações de SP são elevadas em ratos, embora baixas em humanos (Kanazawa e Jessel, 1976). No hipotálamo de mamíferos existem concentrações variáveis de SP (Kanazawa e Jessel, 1976), dependendo da espécie estudada. Quando Saija et al. (1989) injetaram NKs marcadas dentro do ventrículo lateral (VL) de ratos, observaram uma ampla distribuição desses peptídeos no cérebro, que se estendia para as regiões mais distantes do tronco cerebral, porém desigual nas diversas regiões do cérebro. A distribuição de $[H^3]$ -SP e $[I^{125}]$ -NKA no hipotálamo foi superior a de outras regiões, enquanto o hipocampo e o corpo estriado mostraram uma distribuição intermediária. Uma distribuição consistente foi também observada na amígdala. Esses achados em geral concordam com a distribuição dos receptores de NKs relatados em estudos autorradiográficos, como citado no item 1.2 - Neurocininas e SNC . Além disso, a distribuição das NKs pelas estruturas do SNC foi rápida, alcançando seu pico dentro de 2 minutos após as injeções intraventriculares. Esse mesmo estudo mostrou que em algumas regiões, tais como o córtex, ocorreu uma diminuição imediata dos níveis exógenos de NKs, enquanto em outras regiões, as NKs marcadas persistiram por até 15 minutos após as injeções. Nossas observações com a injeção intraventricular de azul de Evans mostraram a difusão deste composto pelas estruturas periventriculares, alcançando até o tronco cerebral cinco minutos após, sugerindo que, provavelmente, a injeção dos compostos em estudo também tenha tido igual difusão. Assim sendo, a injeção

intraventricular de agonistas e antagonistas de NKs poderia ativar áreas periventriculares envolvidas na modulação dos comportamentos defensivos e, em última análise, na regulação da ansiedade.

A este respeito, existem alguns estudos que mostram o envolvimento das NKs nas reações clássicas de defesa em roedores. A estimulação de receptores NK₁, hipotalâmicos induz uma resposta cardiovascular integrada, caracterizada por aumento na pressão sanguínea e batimentos cardíacos associada com vasoconstrição renal e mesentérica e das patas traseiras, semelhantes, portanto, à clássica reação de defesa, acompanhadas de um aumento na locomoção e de comportamentos de auto-limpeza, além de um aumento na liberação de ocitocina. Essas respostas padrões integradas são compatíveis com as reações dos roedores ao estresse (Unger e Culman, 1994). Resultados obtidos num estudo em gatos sugerem que a amígdala mediana facilita a raiva defensiva a nível do hipotálamo mediano através de um mecanismo que envolve a substância P (Shaikh et al., 1993). Há ainda na literatura alguns estudos tentando correlacionar as NKs e os estados de ansiedade clínicos ou experimentais. Clinicamente, Almay et al. (1988) descreveram uma relação inversa entre os níveis de SP no fluido céfalo-raquidiano e a intensidade de “tensão interna” e “ansiedade psíquica” relatada por 37 voluntários normais e 60 pacientes com dor crônica. Experimentalmente, os únicos relatos a este respeito são os de Zernig et al. (1992), Hagan e McLean (1993) e Stratton et al. (1993; 1994). Os primeiros autores relataram que a administração intraperitoneal do antagonista não-peptídico para receptores NK₁, o CP-96345, promoveu sedação em camundongos, reduzindo de modo dose-dependente a locomoção dos animais na caixa claro-escuro, sem no entanto promover

qualquer efeito ansiogênico. Os antagonistas de receptores do tipo NK₂, GR 159897, GR 100679 e SR 48968, por sua vez, apresentam atividade ansiolítica em modelos experimentais de ansiedade em roedores (interação social, LCE, caixa claro-escuro), sendo os compostos GR 159897 e SR 48968 também efetivos em modelos experimentais de ansiedade em primatas não humanos (Beresford et al., apud Hagan e McLean, 1993). Apenas Stratton et al. (1993) mostraram explicitamente uma ação desinibitória de antagonistas NK₂ (GR 100679 e SR 48968), injetados por via subcutânea em camundongos, sobre comportamentos suprimidos em uma caixa claro-escuro, sugerindo um envolvimento dos receptores NK₂ nos comportamentos relacionados à ansiedade. Esses mesmos autores (1994) mostraram a atividade ansiolítica de outro antagonista NK₂, o GR 159897, em vários modelos experimentais de ansiedade em ratos e sagüis, após administração periférica e central do mesmo composto. De resto, não há maiores informações sobre o possível envolvimento de receptores das NKs na modulação da ansiedade.

Os testes experimentais de ansiedade mais frequentemente empregados envolvem o uso de estímulos dolorosos como o choque nas patas para promover conflito nos animais, além de envolverem também privação de água ou comida, como descrito anteriormente no item Introdução (Sanger, 1991). Tem sido proposto há algum tempo uma nova geração de testes que se baseiam em situações etológicas, como o medo à novidade, a esquiva a áreas iluminadas ou a interação social (Crawley e Goodwin, 1980; Lister, 1987). O teste aqui empregado, LCE, baseia-se no fato de que a exposição de um animal a um braço elevado e aberto leva a uma resposta de fuga, ou esquiva, consideravelmente mais forte que a evocada pela exposição a um

braço fechado, sem ter que submeter os animais a privações ou a punições (Dawson e Tricklebank, 1995). As drogas ansiolíticas como o diazepam, clonazepam e o etanol, aumentam o tempo que os animais permanecem nos braços abertos e/ou a percentagem de frequência de entradas nestes braços. Em contraste, as drogas ansiogênicas, como a picrotoxina, aumentam o medo da área aberta e reduzem a exploração nos braços abertos, um efeito que, às vezes, é acompanhado por uma redução na atividade geral no labirinto (resposta de 'congelamento'; Sanger, 1991). Consistente com esses dados, nossos experimentos com DZP injetado i.c.v. (3, 5 e 7 nmol/5 μ l) mostraram que a dose de 7 nmol/5 μ l foi efetiva em aumentar os parâmetros de exploração dos braços abertos (percentagem de entradas e de tempo de permanência nesses braços), não alterando os outros parâmetros, como o esperado para drogas ansiolíticas. Esta dose foi, portanto, escolhida para efeito de comparação com os compostos com possível atividade ansiolítica. Os estudos realizados com injeções i.c.v. de duas drogas ansiogênicas, o PTZ (150, 200 e 300 nmol/5 μ l) e o DMCM (130 nmol/5 μ l), mostraram que o PTZ, nas maiores doses empregadas, reduziu significativamente apenas o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto o DMCM reduziu ambos os parâmetros de exploração dos braços abertos, isto é, a percentagem de entradas e o tempo de permanência nesses braços, como esperado para drogas com perfil ansiogênico. A dose de 300 nmol de PTZ e a de 130 nmol de DMCM foram então escolhidas para fins de comparação com drogas que apresentassem perfil de ação ansiogênico. Na verdade, os dados obtidos com todas as drogas de referência são compatíveis com os dados prévios da literatura, empregando outras vias de administração (Lister, 1987), e permitem-nos validar o LCE do ponto de

vista farmacológico, já que há uma clara correlação entre os efeitos experimentais e clínicos conhecidos dessas drogas de referência.

Ao usarmos a SP, observamos uma redução no parâmetro de porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE nas doses de 1 pmol e 10 pmol, sem que houvesse modificação dos outros parâmetros, dados estes condizentes com uma atividade ansiogênica. Este resultado contrasta com aqueles obtidos na clínica por Almay et al. (1988), propondo um efeito ansiolítico quando da estimulação dos receptores NK₁, baseado na observação de que existe uma relação inversa entre os níveis de SP e a sensação de ansiedade em humanos.

Sabe-se que a maioria dos agonistas de receptores das NKs pode interagir com mais de um subtipo de receptor em concentrações micromolares (Seabrook et al., 1995), lembrando que a potência dos agonistas é dependente não só da sua afinidade pelos receptores, mas também da sua atividade intrínseca e dos receptores de reserva (Kenakin, 1993). A SP, particularmente, pode atuar em mais de um dos subtipos de receptores neurocinérgicos, porém esse composto interage preferencialmente com o receptor do tipo NK₁ e o perfil de atividade (ansiogênico) apresentado pela SP é bastante semelhante ao observado quando empregamos a SPME, que é um peptídeo sintético com grande seletividade para o mesmo receptor, NK₁. A SPME apresentou um perfil de ação no LCE similar à SP, reduzindo significativamente o parâmetro de frequência de entradas nos braços abertos nas doses de 1 e 10 pmol, além de promover um aumento na frequência de entradas nos braços fechados na dose de 100 pmol, alterações essas que estão de acordo com uma ação ansiogênica como aquela apresentada pelo PTZ e DMCM.

O agonista seletivo de receptor NK_2 (β -Ala), por sua vez, não levou a mudanças significativas nos parâmetros percentagem de frequência de entradas e de permanência nos braços abertos, aumentando apenas a frequência de entradas nos braços fechados, e, em consequência, o número total de entradas em ambos os braços, sugerindo assim um possível efeito ansiogênico. A esse respeito, inúmeros experimentos mostraram que os receptores NK_2 das NKs (para revisão ver Maggi et al., 1993) expressos em espécies diferentes são heterogêneos, particularmente na sua habilidade em reconhecer os antagonistas. A organização dos receptores NK_2 em várias espécies leva, ela própria, à geração de múltiplas isoformas, como NK_2A e NK_2B , embora essa possibilidade deva ser melhor investigada, tendo em vista os vários estudos conflitantes quanto ao que se refere aos efeitos dos agonistas dos receptores NK_2 no SNC, alguns dos quais relatam simplesmente que os efeitos de ligantes seletivos são não específicos, devendo-se, portanto, a ações sobre outros subtipos de receptores da NKs que não os NK_2 .

Por outro lado, o SENK, agonista seletivo de receptor NK_3 , promoveu um aumento na percentagem de entradas nos braços abertos nas doses de 100 e 500 pmol, além de aumentar a percentagem de tempo dispendido nesses braços, nas doses de 10 e 500 pmol, ações estas que indicam uma clara atividade ansiolítica como aquela apresentada pelo DZP.

Quando os antagonistas dos receptores das NKs foram administrados pela mesma via, observou-se, de uma maneira geral, efeitos opostos aos apresentados pelos agonistas dos respectivos receptores. O antagonista de receptores do tipo NK_1 , empregado, o FK, um dipeptídeo sem afinidade para canais de Ca^{2+} do tipo "L", e baixa

atividade nas respostas mediadas pelos receptores NK_2 (Fujii et al., 1992), injetado i.c.v., aumentou a percentagem do tempo de permanência do animal nos braços abertos nas doses de 1 e 100 pmol, sem promover redução na atividade locomotora ou prejuízo motor nos animais. Esses achados são, em parte, conflitantes com os de Zernig et al. (1992) que, usando o antagonista de receptor NK_1 , o CP-95345, observaram sedação e prejuízo motor em camundongos na caixa claro-escuro, teste originalmente planejado por Crawley e Goodwin (1980) e validado posteriormente por Costall et al. (1989), como modelo experimental de ansiedade. Por um lado, o composto CP-96345, ao contrário do FK, possui afinidade para os canais de Ca^{2+} do tipo "L", o que poderia levar ao efeito depressor do SNC observado. Fica difícil, no entanto, comparar efeitos obtidos com vias de administração completamente diferentes, com processos de absorção e distribuição possivelmente diversos, além de não podermos comparar em bases equimolares as doses empregadas com os diferentes antagonistas. Por outro lado, o fato do CP-96345 ter aumentado o tempo de permanência no lado claro, assim como a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa claro-escuro, parece-nos indicativo de uma ação ansiolítica, exatamente o que encontramos em nossos estudos com o FK, embora os autores apenas comentem que o referido antagonista não apresentou atividade ansiogênica.

O antagonista não-peptídico dos receptores NK_2 (SR) aumentou de modo significativo a percentagem de entradas nos braços abertos na dose de 100 pmol e também a percentagem do tempo de permanência nos mesmos braços nas doses de 1, 10 e 100 pmol. Este antagonista aumentou ainda a frequência de entradas nos braços fechados e a frequência total de entradas nos braços na dose de 500 pmol.

Esses efeitos corroboram os achados de Stratton et al. (1993) usando o mesmo antagonista, que relataram uma ação ansiolítica do composto em questão, só que empregando o modelo experimental da caixa claro-escuro. Nossos dados com este antagonista também estão de acordo com aqueles observados por Beresford (apud Hagan e Mc Clean, 1993), utilizando os antagonistas dos receptores NK₂ GR 15987, GR 100679 e SR 48968, e demonstrando uma atividade ansiolítica em modelos de ansiedade em roedores como a interação social, o LCE e a caixa claro-escuro. Adicionalmente, Stratton et al. (1994) observaram o mesmo tipo de efeito ansiolítico para outro antagonista NK₂, o GR 159897. Estes estudos sugerem, portanto, que os receptores NK₂ podem estar envolvidos em importantes funções no SNC, apesar de estarem esparsamente distribuídos no cérebro. O fato de termos obtido um efeito ansiolítico tão claro quando empregamos o antagonista NK₂(SR), mas não uma ação ansiogênica evidente quando usamos o agonista deste receptor (β -Ala), provavelmente deve-se a que os receptores do tipo NK₂ são acoplados à proteína G e podem existir em dois estados de afinidade. Enquanto os antagonistas normalmente ligam-se aos dois estados com igual afinidade, os agonistas ligam-se preferencialmente ao estado de alta afinidade, acoplado à proteína G, apresentando baixa afinidade pelo receptor desacoplado (Beresford et al., 1995), o que poderia explicar o efeito muito mais evidente para o antagonista de receptores NK₂ que para o agonista.

Para verificar a especificidade dos efeitos observados a administração isolada de cada composto sozinho, escolhemos a dose de 10 pmol para os agonistas para ser co-injetada com a dose de 100 pmol dos antagonistas, pois nos pareceu pelos estudos anteriores serem doses efetivas no modelo experimental escolhido. Os agonistas e os

antagonistas dos receptores NKs, dos tipos 1 e 2, foram então co-injetados i.c.v. num volume total de 5 μ l com o intuito de observar a especificidade dos efeitos observados no LCE, isto é, se os antagonistas bloqueariam os efeitos dos respectivos agonistas. Assim, a SP co-injetada com o FK, que é um antagonista seletivo dos receptores NK₁, teve seu efeito ansiogênico abolido pelo antagonista nas medidas registradas no LCE. No entanto, a co-injeção do agonista e antagonista seletivos para os receptores NK₁, SPME e FK, respectivamente, não alterou o perfil ansiogênico anteriormente observado quando da injeção do agonista sozinho. O mesmo ocorreu quando da co-injeção do agonista e antagonista dos receptores NK₂, β -Ala e SR, respectivamente, pois não se observou qualquer antagonismo no efeito do agonista sozinho. Essas observações podem ser explicadas pela diferente afinidade de agonistas e antagonistas pelos seus receptores, uma vez que a injeção concomitante de ambas as drogas provavelmente não permitiu a ligação dos antagonistas nos receptores específicos, o que impediria a ligação dos agonistas a seus receptores, e, portanto, antagonizaria seus efeitos. Para investigar melhor esta possibilidade, estamos no momento injetando os antagonistas dos receptores estudados por via sistêmica e, posteriormente, os agonistas por via i.c.v., incluindo neste estudo em andamento um antagonista não-peptídico de receptores do tipo NK₃, o SR 142801, que só recentemente foi descrito (Emonds-Alt et al., 1995).

Esses resultados observados no LCE não parecem ser decorrentes de ações inespecíficas dos compostos em estudo, como alterações na performance motora ou uma inibição ou estimulação inespecífica na atividade locomotora dos animais. Essa possibilidade pode ser descartada porque numa dose relativamente alta (100 pmol) de

cada droga, dentre aquelas empregadas no presente estudo, não houve modificações importantes na coordenação motora dos animais avaliada no teste de rota-rod, e nem na sua atividade locomotora avaliada na caixa de movimentação espontânea.

Em conclusão, nossos achados sugerem que os três tipos de receptores de NKs parecem estar envolvidos na modulação da ansiedade avaliada experimentalmente no LCE em camundongos. A estimulação de receptores do tipo NK₁ e NK₂ promove uma ação ansiogênica. Assim, os antagonistas destes receptores apresentam efeitos ansiolíticos. A estimulação dos receptores do tipo NK₃, por outro lado, exerce uma atividade ansiolítica, mostrando uma modulação dos comportamentos observados no LCE, como modelo experimental de ansiedade, pelos diferentes tipos de receptores neurocinérgicos. Estes resultados indicam que os receptores neurocinérgicos centrais participam na expressão de comportamentos emocionais característicos da ansiedade e sugerem a participação de subtipos específicos de receptores neurocinérgicos centrais nessa modulação. Entretanto, outros estudos são necessários para esclarecer os sítios específicos de ação nos quais estas drogas podem estar atuando e a forma como o fazem. É preciso averiguar também se estes efeitos aqui descritos são devidos a um mecanismo de ação direto e/ou indireto das NKs no SNC, uma vez que, no SNC, estes neuropeptídeos estão intimamente relacionados a outros neurotransmissores, principalmente a serotonina e o GABA, que sabidamente modulam os estados de ansiedade(Seabrook et al., 1995).

6. PERSPECTIVAS PARA O USO DAS NEUROKININAS/TAQUICININAS NA CLÍNICA MÉDICA

As NKs e seus receptores estão amplamente distribuídos no SNC e tecidos periféricos, parecendo desempenhar papel relevante em várias funções fisiológicas. No SNC elas controlam os neurônios dopaminérgicos da substância negra e área tegmental ventral, os neurônios colinérgicos do núcleo prosencefálico e os noradrenérgicos do loço cerúleo. As NKs podem assim estar envolvidas em muitas patologias, tais como doença de Huntington, doença de Parkinson, esquizofrenia, doença de Alzheimer, síndrome de Hirschsprung, além de alergia do tipo I, constipação e inflamação crônica, artrite reumatóide, enxaqueca, *Herpes zoster*, síndrome carcinóide, asma, dentre outras (Otsuka e Yoshioka, 1993).

Face às importantes funções fisiopatológicas das NKs, têm-se esperado o desenvolvimento de compostos altamente seletivos a elas relacionados, na expectativa de que alguns venham a ser clinicamente úteis como drogas para modular essas diversas funções. A aplicação prática destas substâncias que parece mais promissora atualmente é a do emprego dos antagonistas de receptores específicos das NKs para produção de analgesia (para revisão, ver Otsuka e Yanagisawa, 1990), especialmente nas enxaquecas (Markowitz, Saito e Moskowitz, 1987, Saito, Markowitz Moskowitz, 1988; Moskowitz e Buzzi, 1991; Buzzi et al., 1991). No sistema nervoso periférico, os antagonistas das NKs poderiam ser usados no controle das reações inflamatórias e na contratilidade do músculo liso, bem como no tratamento inicial do edema provocado por

lesão térmica em humanos (Saria, 1984). Os antagonistas das NKs poderiam ser úteis também no tratamento de doenças como artrite reumatóide, artrites, asma, hiperatividade bronquial (Barnes, 1986; Maggi, 1990; Frossard e Advenier, 1991; Solway e Leff, 1991), doenças inflamatórias crônicas do intestino (Koch, Carney e Go, 1987; Goldin et al., 1989). Ao lado dos antagonistas das NKs, os agonistas dos receptores NK₁ podem ser úteis em doenças ulcerativas da pele (Maggi et al, 1987), e os agonistas dos receptores NK₂ poderiam ser usados para promover o aumento da motilidade intestinal (ação pro-cinética) ou para promover esvaziamento da bexiga em pacientes com retenção urinária (Maggi et al., 1991).

Por outro lado, a síntese de NKs no SNC mostra-se modificada após a administração de drogas antipsicóticas, além de terem sido detectadas alterações no metabolismo das monoaminas após a administração central dos agonistas de receptores das NKs (Hong, 1983; Elliot, Bannon e Iversen, 1986; Shibata, Harvestick e Bannon, 1990; Humpel et al., 1990; Humpel, Saria e Regoli, 1991). Em conformidade com essas ações pode ser proposto um papel importante a ser desempenhado pelas drogas que atuam nos receptores das NKs no tratamento das desordens afetivas, de movimento e neurodegenerativas (Pernow, 1987; Iversen, 1989; Barker, 1991). Uma outra ação especulativa dos receptores das NKs no SNC envolveria também uma possível atividade anticonvulsivante (Garant, Iadarola e Gale, 1986). Pelo presente trabalho, em concordância a outros achados da literatura (Zernig et al., 1992; Hagan e McLean, 1993; Stratton et al., 1993), os receptores das NKs parecem estar envolvidos em mecanismos relacionados à ansiedade, podendo-se num futuro próximo chegar-se à síntese de compostos seletivos ansiolíticos com vantagens sobre os

benzodiazepínicos. Como o principal problema do uso de benzodiazepínicos como agentes ansiolíticos reside no fato destes compostos produzirem amnésia, sedação e potencializarem os efeitos do álcool, é possível que as drogas que atuam no sistema neurocinérgico e possuem uma atividade ansiolítica possam vir a ser de importância terapêutica, pois parecem promover ansiólise sem produzir efeitos depressores de monta sobre o SNC. Por outro lado, os efeitos desses compostos em estudo sobre a memória e aprendizagem devem ser melhor investigados, uma vez que já existem vários estudos mostrando o envolvimento da SP nesses processos (para revisão ver Huston e Hasenöhr, 1995). De qualquer maneira, a perspectiva do uso de drogas seletivas neurocinérgicas no tratamento da ansiedade parece um campo interessante e que deve ser melhor explorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-HADITHI, A.K.; STAUBER, V.; MITCHEL, J. The co-localization of substance P and VIP in cholinergic type terminals of the rat parotid gland. J. Anatomy, 159: 83-92, 1988.
- ALMAY, B.G.; JOHANSSON, F.; VON KNORRING, L.; LE GREVES, P.; TERENIUS, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. Pain, v. 33, p. 3-9, 1988.
- ARTYMYSHYAN, R.; MURRAY, M. Substance P in the interpeduncular nucleus of the rat: normal distribution and effects of deafferentation. J. Comp. Neurol., 231: 78-90, 1985.
- BARBER, R.; VAUNGHM, J.; SLEMMON, J.; SALVATERRA, P.; ROBERTS, E.; LEEMAN, S. The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. J. Comp. Neurol., 184: 331-351, 1979.
- BARKER, R. Substance P and neurodegenerative disorders. A speculative review. Neuropeptides, 20: 73-78, 1991.
- BARKER, R.; LARNER, A. Substance P and multiple sclerosis. Med. Hypotheses, 37: 40-43, 1992.
- BARNES, P.J. Asthma as an axon reflex. Lancet, 1: 242-245, 1986.
- BARTHO, L.; HOLZER, P. Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. Neuroscience, 16: 1-32, 1985.
- BEACH, T.G.; MCGEER, E.G. The distribution of substance P in the primate basal ganglia: an immunohistochemical study of baboon and human brain. Neuroscience, 13: 29-52, 1984.
- BEACH, T.G.; TAGO, H.; MCGEER, E.G. Light microscopic evidence for a substance P-containing innervation of the human nucleus basalis of Meynert. Brain Res., 408: 251-257, 1987.
- BEAL, M.F.; MAZUREK, M.F. Substance P-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. Neurology, 37: 1205-1209, 1987.
- BERESFORD, I.J.M.; SHELDRIK, R.L.G.; BALL, D.I.; TURPIN, M.P.; WALSH, D.M.; HAWCOCK, A.B.; COLEMAN, R.A.; HAGAN, R.M.; TYERS, M.B. GR

- 159897, a potent non-peptide antagonist at tachykinin NK₂ receptors. Eur. J. Pharmacol., 272: 241-248, 1995.
- BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. Pharmacol. Rev., 28: 127-177, 1976.
- BOLAM, J.P.; INGHAM, C.A.; IZZO, P.N.; LEVEY, A.I.; RYE, D.B.; SMITH, A.D.; WARNER, B.M. Substance P-containing terminals in synaptic contact with cholinergic neurons in the neostriatum and basal forebrain: a double immunocytochemical study in the rat. Brain Res., 397: 279-289, 1986.
- BOLAM, J.P.; POWELL, J.F.; TOTTERDELL, S.; SMITH, A.D. The proportion of neurons in the rat neostriatum that project to the substantia nigra demonstrated using horseradish peroxidase conjugated with agglutinin. Brain Res., 220: 339-343, 1981.
- BONNER, T.; AFFOLTER, M.U.; YOUNG, A.C.; YOUNG, W.S. A cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide neurokinin B. Mol. Brain Res., 2: 243-249, 1987.
- BROWNSTEIN, M.J.; MROZ, E.A.; KIZER, J.S.; PALKOVITS, M.; LEEMAN, S.E. Regional distribution of substance P in the brain of the rat. Brain Res., 116: 229-305, 1976.
- BROWNSTEIN, M.J.; MROZ, E.A.; TAPPAZ, M.L.; LEEMAN, S.E. On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. Brain Res., 135: 315-323, 1977.
- BRUNELLESCHI, S. Tachykinin actions on alveolar macrophages. Neuropeptides, 22: 11-12, 1992.
- BUZZI, M.G.; CARTER, N.B.; SHIMIZU, T.; MEATH III, M.; MASCOWITZ, M.A. Dihydroergotomine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. Neuropharmacology, 30: 1193-1200, 1991.
- CADOR, M.; KELLEY, A.; LE MOAL, M.; STINIUS, L. Ventral tegmental area infusion of substance P, neurotensin and enkephalin: differential effects of feeding behavior. Neuroscience, 18: 659-669, 1986.

- CHAN-PALAY, V.; PALAY, S. Immunocytochemical identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord: light microscopic studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3597-3601, 1977.
- CHAN-PALAY, V.; PALAY, S. Ultrastructural identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord by immunocytochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 4050-4054, 1977.
- CHANG, M.; LEEMAN, S. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. J. Biol. Chem., 245: 4787-4790, 1970.
- CHANG, M.; LEEMAN, S.; NIALL, M. Amino acid sequence of substance P. Nature, 232: 86-87, 1971.
- CHANG, M.T. Substance P-dopamine relationship in the substantia nigra: a light and electron microscopy study of double immunocytochemical labeled materials. Brain Res., 448: 391-396, 1988.
- COOPER, P.E.; FERNSTROM, M.H.; RORSTAD, O.P.; LEEMAN, S.E.; MARTIN, J.B. The regional distribution of somatostatin, substance P and neurotensin in human brain. Brain Res., 218: 219-232, 1981.
- COSTALL, B.; JONES, B.J.; KELLY, M.E.; NAYLOR, R.J.; TOMKINS, D.M. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. Pharmacol. Biochem. Behav., 32: 777, 1989.
- CRAWLEY, J.; GOODWIN, F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacol. Biochem. Behav., 13: 167-170, 1980.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol. Biochem. Behav., 49: 171-176, 1994.
- CUELLO, A.C.; DEL FIACCO, M.; PAXINOS, G. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurones in the rat trigeminal system. Brain Res., 152: 499-509, 1978.

- CUELLO, A.C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. J. Comp. Neurol., 178: 129-156, 1978.
- CUELLO, A.C.; PRIESLLEY, J.V.; PAXINOS, G. Substance P and enkephalin containing pathways. In: PAXINOS, G. (Ed.) The rat nervous system. Australia : Academic Press, 1985. v. 1, p. 441-469.
- CULMAN, J.; WIEGAND, B.; SPITZNAGEL, H.; KLEE, S.; UNGER, T. Effects of the tachykinin NK₁ receptor antagonist, RP 67580, on central cardiovascular and behavioural effects of substance P, neurokinin A and neurokinin B. Br. J. Pharmacol., 114 (6): 1310-1316, 1995.
- DALSGAARD, C.J.; HAEGERSTRAND, A.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; BRODIN, E.; HORFELT, T. Neurokinin A-like immunoreactivity in rat primary sensory neurons: consistence with substance P. Histochemistry, 83: 37-40, 1985.
- DAWSON, S.R.; TRICKLEBANK, B. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. TIPS, v. 16, p. 33-36, 1995.
- DE CARO, G.; PERFUMI, M.; MASSI, M. Tachykinins and body fluid regulation. In: EPSTEIN, A.N.; MORRISON, A.R. (Eds.) Progress in Psychobiology and Physiological Psychology. New York : Academic Press, 1988. p. 31-66.
- DE KONICK, Y.; HENRY, J.L. Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potentials elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 11344-11348, 1991.
- DE KONICK, Y.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; HENRY, J.L.; CUELLO, A.C. Spinal neurons exhibiting a specific noxioreceptive response receive abundant substance P containing synaptic contacts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5073-5077, 1992.
- DEL FIACCO, M. The human hippocampal formation and parahippocampal gyrus: localization of substance P-like immunoreactivity in newborn and adult post-mortem tissue. Neuroscience, 21: 141-150, 1987.
- DEL FIACCO, M.; CUELLO, A.C. Substance P- and enkephalin-containing neurones in the rat trigeminal system. Neuroscience, 5: 803-815, 1980.

- DEL FIACCO, M.; LEVANTI, M.C.; DESSI, M.L.; ZUCCA, G. The human hippocampal formation and parahippocampal gyrus: localization of substance P-line immunoreactivity in newborn and adult post-mortem tissue. Neuroscience, 21: 141-150, 1987.
- DEVILLIER, P.; DESSANGIES, J.F.; RAKOTOSIHANAKA, F.; GHAEM, H.A.; BOUSHEY, M.A.; LOCKHART, A.; MARSOC, J. Nasal response to substance P and methacholine in subjects with and without allergic rhinitis. Eur. Resp. J., 1: 356-361, 1988.
- DEWS, P.B. The measurement of the influence of drugs on voluntary activity in mice. Br. J. Pharmac. Chemother., 8: 46-48, 1953.
- DION, S.; ROUSSI, N.; NANTEL, F.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D.; NALINE, E.; ADVENIER, C. Receptor for neurokinin in human bronchus and urinary bladder are of the NK₂ type. Eur. J. Pharmacol., 178: 215-219, 1990.
- DORNAN, W.A.; WINK, K.L.; MOLEN, P.; SHORT, K.; STRUTHERS, W.; BARRET, C. Site-specific effects in intracerebral injections of three neurokinins (neurokinin A, neurokinin K and neurokinin γ) on the expression of male rat sexual behavior. Physiol. Behav., 54: 249-258, 1993.
- DOUGLAS, F.L.; PALKOVITS, M.; BROWNSTEIN, M.J. Regional distribution of substance P-like immunoreactivity in the lower brain stem of the rat. Brain Res., 245: 376-378, 1982.
- DUGGAN, A.W.; HENDRY, I.A.; GREEN, J.L.; MORTON, C.R.; HUTCHISON, W.D. Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat. Brain Res., 451: 261-273, 1988.
- DUGGAN, A.W.; SCHARBLE, H.G.; HOPE, P.J.; LANG, C.W. Effects of peptidase inhibition on the pattern of intraspinally released immunoreactive substance P detected with antibody microprobes. Brain Res., 579: 261-269, 1992.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. J. Amer. Pharm. Assoc., 46: 208-209, 1957.
- ELLIOT, P.J.; ALPERT, J.E.; BANNON, M.J.; IVERSEN, S.D. Selective activation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain by infusion

- of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area. Brain Res., 363: 145-147, 1986.
- ELLIOT, P.J.; MASON, G.S.; GRAHAM, E.A.; TURPIN, M.P.; HOGAN, R.M. Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. Behav. Brain Res., 51: 77-82, 1992.
- EMONDS-ALT, X.; BICHON, D.; DUCOUX, J.P.; HEAULME, M.; MILOUX, B.; PONCELET, M.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; VILAIN, P.; NELIOT, G.; SOUBRIÉ, P.; LE FUR, G.; BRELIÈRE, J.C. SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK₂ receptor. Life Sci., 56 (1): 27-32, 1995.
- EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; ADVENIER, C.; NALINE, G.; NELIAT, G.; LE FUR, G.; BRELIÈRE, J.C. A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin (NK₂) receptor. Life Science, 50: 101-106, 1992.
- EMSON, P.C. Peptides as neurotransmitter candidates in the mammalian CNS. Prog. Neurobiol., 13: 61-116, 1979.
- EMSON, S.; ROSSOR, M. Regional distribution of methionine-enkephalin and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and Huntington's disease. Brain Res., 199: 147-160, 1980.
- ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. TINS, 4: 267-269, 1981.
- FERRELL, W.R., WOOD, L.; BAXENDALE, R.H. The effect of acute joint inflammation on flexion reflex excitability in the decerebrate, low spinal cat. Q.J.Exp. Physiol., 73: 95-102, 1988.
- FLEETWOOD-WALKER, S.; MITCHELL, R. Role of substance P in nociception. Current Opinion Anaesthesiol., 2: 645-648, 1989.
- FREIRE, L. Grande e novíssimo dicionário da língua portuguesa. Rio de Janeiro : Editora A Noite, 1940.
- FROSSARD, N.; ADVENEIR, C. Tachykinin receptors and the airways. Life Sci., 19541-19553, 1991.
- FUJII, T.; MURAI, M.; MARIMOTO, M.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIWARA, D.; MIYAKE, H.; IKORI, N.; MATSUO, M. Pharmacological profile of a high

- affinity dipeptide NK₁ receptor antagonist, FK888. Br. J. Pharmacol., 107: 785-789, 1992.
- GALE, J.S.; BIRD, E.D.; SPOKE, E.G.; IVERSEN, L.L.; JESSELL, T. Human brain substance P: distribution in controls and Huntington's chorea. J. Neurochem., 30: 633-634, 1978.
- GARANT, D.S.; IADOROLA, M.J.; GALE, K. Substance P antagonists in substantia nigra are anticonvulsant. Brain Res., 382: 372-378, 1986.
- GARRET, C.; CARRUETTE, A.; FARDIN, V.; MOUSSAOUI, S.; PEYRONEL, J.F.; BLANCHARD, J.C.; LADURON, P.M. Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonists. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10208-10212, 1991.
- GERARD, N.P.; EDDY, R.L.; SHOWS, T.B.; GERARD, C. The human neurokinin A (substance K) receptor. J. Biol. Chem., 265: 20455-20462, 1990.
- GERARD, N.P.; GARRAWAY, L.A.; EDDY, R.L.; SHOWS, T.B.; DIJIMA, M.; PAQUET, J.L.; GERARD, C. Human substance P receptor (NK₁): organization of the gene, chromosome localization and functional expression of cDNA clones. Biochemistry, 30: 10640-10646, 1991.
- GIBSON, S.; POLAK, J.; BLOOM, S.; WALL, P. The distribution of peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal (Laminax). J. Comp. Neurol., 201: 65-79, 1981.
- GLOWINSKI, J.; MICHELOT, R.; CHERAMY, A. Role of striato-nigral substance P in the regulation of the activity of the nigro-striatal dopaminergic neurons. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 22: 51-62, 1980.
- GOLDIN, E.; KARMELI, F.; SCLINGER, Z.; ROCHMILEWITZ, D. Colonic substance P levels are increased in ulcerative colitis and decreased in chronic severe constipation. Dig. Dis. Sci., 34: 754-757, 1989.
- GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviour and related emotions in mammals. Braz. J. Med. Biol. Res., 27: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; GUIMARÃES, F.S. Neurobiologia das doenças mentais. São Paulo : Editora Lemos, 1993.

- GRAHAM, A.; HOPKINS, B.; POWELL, S.J.; DANKS, P.; BRIGGS, I. Isolation and characterization of the human lung NK₂ receptor gene using rapid amplification of cDNA ends. Biochem. Biophys. Res. Commun., 177: 8-16, 1991.
- GRAY, J.A. The neuropsychology of anxiety. New York : Oxford University, 1982.
- GREIDANUS, T.B.W.; MAIGRET, C. Grooming behavior induced by substance P. Eur. J. Pharmacol., 154: 217-220, 1988.
- GUARD, S.; WATSON, . Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. Neurochem. Int., 2: 149-165, 1991.
- HABER, S.N.; NAUTA, W.J.H. Ramifications of th globus pallidus in the rat as indicated patterns of immunohistochemistry. Neuroscience, 9: 245-260, 1983.
- HABER, S.N.; WATSON, S.J. The comparative distribution of enkephalin, dynorphin and substance P in the human globus pallidus and basal forebrain. Neuroscience, 14: 1011-1024, 1985.
- HÄBLER, H.J.; JÄNIG, W.; KOLTZENBURG, M. Activation of unmyelinated afferent fibers by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. J. Physiol., 425: 545-562, 1990.
- HAGAN, R.M.; BERESFORD, I.J.M.; STABLES, J.; DUPERE, J.; STUBBS, C.M.; ELLIOT, R.L.N.; SHELDRIK, A.; CHOLLET, A.; KOWASHIMA, E.; McELROY, A.B.; WARD, P. Characterization, CNS distribution and function of NK₂ receptors: new tools for investigating neurokinin function. Neuropeptides, 19: 127-135, 1991.
- HAGAN, R.M.; IRELAND, S.J.; JORDAN, C.C.; BERESFORD, I.J.M.; DEAL, M.J.; WARD, P. Receptor-selective, peptidase-resistant agonists at neurokinin NK-1 and NK-2 receptors: new tools for investigating neurokinin function. Neuropeptides, 19: 127-135, 1991.
- HAGAN, R.M.; McLEAN, S. Stafford Vineyard Peptide Conference bears fruit. TIPS, v. 14, p. 315-318, 1993.
- HALEY, T.J.; McCORMICK, W.G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mice. Br. J. Pharmacol., 12: 12-15, 1957.

- HALL, M.E.; STEWART, J.M. Modulation of isolation-induced fighting by N- and C-terminal analogs of substance P: evidence for multiple recognition sites. Peptides, 5: 85-89, 1984.
- HALL, M.E.; STEWART, J.M. Prevention of stress-induced analgesia by substance P. Behav. Brain Res., 10: 375-382, 1983.
- HAMON, N. Neuropharmacology of anxiety perspectives and prospects. TIPS, 15: 36-39, 1994.
- HANCOCK, M.B.; PEVETA, C.A. Preganglionic neurons in the sacral spinal cord of the rat: an HRP study. Neurosci. Lett., 11: 1-5, 1979.
- HANDLEY, S-L.; MITHANY, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"- motivated behavior. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 327: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S. Future prospects for the pharmacological treatment of anxiety. Drug Ther. CNS Drugs, 2(5): 397-414, 1994.
- HANDLEY, S.L.; McBLANE, J.W. An assessment of the elevated x-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. J. Pharmacol. Toxicol. Meth (3): 129-138, 1993.
- HARLAN, R.E.; GARCIA, M.M.; KRAUSE, J. Cellular localization of substance P- and neurokinin A-encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. J. Comp. Neurol., 287: 179-212, 1989.
- HARRO, J.; VASAR, E.; BRADWYN, C. CCK in animal and human research of anxiety. TIPS, 14: 244-249, 1993.
- HAYASHI, M.; OSHIMA, K. Neuropeptides in cerebral cortex of macaque monkey (*Macaca fusca*): regional distribution and ontogeny. Brain Res., 364: 360-368, 1986.
- HELKE, C.J.; KRAUSE, J.E.; MANTYH, P.W.; COUTURE, R.; BANNON, M.J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides receptors and regulatory mechanisms. FASEB, 4: 1606-1615, 1990.
- HENRY, F.L. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. Brain Res., 114: 439-451, 1976.

- HENRY, J.L. Substance P and pain: a possible relation in afferent neurotransmission. In: VON EULER, V.S.; PERNOW, B. (Eds.) Substance P, Nobel Symposium 37: New York : Raven Press, 1977. p. 231-240.
- HERSHEY, A.D.; KRAUSE, J.E. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the rat substance P receptor. Science, 247: 958-962, 1990.
- HIRAI, T.; JONES, E.C. Distribution of tachykinin and enkephalin-immunoreactive fibers in the human thalamus. Brain Res. Rev., 14: 35-52, 1989.
- HÖFKELT, T.; KELLERTH, J.; NILSSON, G.; PERNOW, B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat pulmonary sensory neurons. Brain Res., 100: 235-252, 1975.
- HÖFKELT, T.; MILLHORN, D.; SEROOGY, K.; TSURUO, Y.; CECCATELLI, S.; LINDH, B.; MEISTER, B.; MELANDER, T.; SCHALLING, M.; BARTFAI, T.; TERENUIS, L. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. Experientia, 43: 768-780, 1987.
- HONG, J.S.; TILSON, H.A.; YOSHIKAWA, K. Effects of lithium and haloperidol administration on the rat brain levels of substance P. J. Pharmacol. Exper. Ther., 224: 590-594, 1983.
- HOPE, P.J.; JARROTT, B.; SCHAIBLE, H.G.; CLARKE, R.W.; DUGGAN, A.W. Release and spread of immunoreactive neurokinin A in the cat spinal cord in a model of acute arthritis. Brain Res., 533: 292-299, 1990.
- HOPKINS, B.; POWELL, S.J.; DONKS, P.; BRIGGS, I.; GRAHAM, A. Isolation and characterization of the human lung NK-1 receptor cDNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 180: 1110-1117, 1991.
- HUGHES, J.; BODEN, P.; DOMENEY, A.; KELLY, E.; HORWELL, D.; HUNTER, J.; PINNOCK, R.; WOODRUFF, G. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6728, 1990.
- HUMPEL, C.; KNAUS, G.A.; AUER, B.; KNAUS, H.G.; HARING, C.; THEODORSSON, E.; SARIA, A. Effects of haloperidol and clozapine on preprotachykinin. A messenger RNA tachykinin tissue levels release and neurokinin 1 receptors in the striato-nigral system. Synapse, 6: 1-9, 1990.

- HUMPEL, C.; SARIA, A.; REGOLI, D. Injection of tachykinins and selective neurokinin receptor ligands into the substantia nigra reticulata increases striatal dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism. Eur. J. Pharmacol., 195: 107-114, 1991.
- HUSTON, J.P.; HASENOHRL, R.U. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. Behav. Brain Res., 66: 117-127, 1995.
- HUSTON, J.P.; HASENÖHRL, R.V.; BOIX, F.; GEHARD, P.; SCHWARTING, R.K.W. Sequence-specific effects of neurokinin, substance P on memory, reinforcement and brain dopamine activity. Psychopharmacology, 112: 147-162, 1993.
- HUSTON, J.P.; OITZL, M.-S. The relationship between reinforcement and memory: parallels in the rewarding and mnemonic effect of the neuropeptide substance P. Neurosci. Biobehav. Rev., 13: 171-180, 1989.
- HUSTON, J.P.; STAUBI, U. Substance P and its effects on learning and memory. In: MARTINEZ, J.L.; JENSEN, R.A.; MESSING, R.N.; RIGTER, M.; MCGAUGH, J.L. (Eds.) Endogenous peptides and learning and memory processes. New York : Academic Press, 1981, p. 521-540.
- HYLDEN, J.L.; WILIOX, G.L. Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behaviour in mice. Brain Res., 217: 212-215, 1981.
- ITOI, K.; BADOER, E.; FATIMUNISSA, Q.; UNGER, Th. Cardiovascular and behavioral actions of substance P in the central nervous system. Therapeutic Res., 9: 143-156, 1988.
- ITOI, K.; JOST, N.; CULMAN, J.; TSCHÖP, C.; UNGER, T. Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain. Brain Res., 668: 100-106, 1994.
- ITOI, K.; TSCHÖPE, C.; JOST, N.; CULMAN, J.; LEBRUM, C.; STAUSS, B.; UNGER, Th. Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in substance P-subclass induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. Eur. J. Pharmacol., 219: 435-44, 1992.
- IVERSEN, L.L. Central actions of substance P and related tachykinins. J. Psychopharmacology, 3: 1-6, 1989.

- IVERSEN, L.L.; McNIGHT, A.T.; FOSTER, A.C.; YOUNG, S.C.; WILLIAMS, N.J. Pharmacology of the tachykinin system. In: SCHWARTZ, T.M.; HILSTED, L.M.; REHFELD, J.F. (Eds.) Neuropeptides and their receptors. Copenhagen : Munksgaard, 1990, p. 363-372.
- JESSEL, T.; TSUNOO, A.; KANAZAWA, I.; OTSUKA, M. Substance P depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. Brain Res., 168: 247-259, 1979.
- JESSELL, T.M. Substance P in the nervous system. In: JESSELL, T.M.; IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; SNYDER, S.M. (Eds.) Handbook of Psychopharmacology, New York: Plenum Press, 1983, v. 16, p. 1-105.
- JONES, B.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.; KELLY, M.; NAYLOR, R.; OAKLEY, N.; TYERS, M. The potential anxiolytic activity of GR 38032F, a 5-HT₃ receptor antagonist. Br. J. Pharmacol., 93: 985, 1988.
- KAGE, R.; MCGREGOR, G.P.; THIM, L.; CONLON, J.M. Neuropeptide γ , a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from γ preprotachykinin mRNA in the female rat brain. J. Neurochem., 50 : 1412-1427, 1988.
- KANAZAWA, I.; JESSEL, T. Post mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. Brain Res., 117: 362-367, 1976.
- KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATUSO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 114: 533-540, 1983.
- KELLY, A.E.; CADOR, M.; STENUS, L. Behavioral analysis of the effect of substance P injected into the vertical mesencephalon on investigatory and spontaneous motor behavior in the rat. Psychopharmacology, 85: 37-46, 1985.
- KELLY, P.M.; SEVIOUR, P.W.; IVERSEN, S.D. Amphetamine and apomorphine responses in the rat following both 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. Brain Res., 94: 507-522, 1975.
- KENAKIN, T. Pharmacological analysis of drug-receptor interaction. New York : Raven Press, 1993. P. 221.

- KESSLER, J.A.; ADLER, J.E.; BOHN, M.C.; BLACK, I.B. Substance P in principal sympathetic neurons: regulation by impulse activity. Science, 214: 335-336, 1981.
- KESSLER, J.A.; BELL, W.O.; BLOCK, I.B. Substance P levels differ in sympathetic target organ terminals and ganglion perikarya. Brain Res., 258: 144-146, 1983.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord. Proc. Jpn. Acad. Series B, 59: 101-104, 1983.
- KOCH, T.R.; CARNEY, A.; GO, V.L.W. Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. Dig. Dis. Sci., 32: 369-376, 1989.
- KOTANI, M.; MOSHIMARU, M.; NAWA, M.; NAKANISHI, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7074-7078, 1986.
- KRAUSE, J.E.; CHIRGWIN, J.M.; CARTER, M.S.; XU, Z.S.; HERSHEY, A.D. Three rat preprotochykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 881-885, 1987.
- KREAM, R.M.; SCHOENFELD, T.A.; MANCUSO, R.; CLANCY, A.N.; ELBERMANI, W.; MACRIDES, F. Precursor forms of substance P (SP) in nervous tissue: detection with antisera to SP, SP-Gly and SP-Gly-Lys. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4832-4836, 1985.
- KRIS, R.M.; SOUTH, V.; SALTZMAN, A.; FELDERS, S.; RICCA, G.A.; JOYE, M.; HUEBNER, K.; KAGAN, J.; GROCE, C.M.; SCHLESINGER, J. Cloning and expression of the human substance K receptor and analysis of its role in mitogenesis. Cell Growth Differentiation. 2: 15-22, 1991.
- LADER, M. Anxiety: social issues of treatment in current and future trends in anticonvulsant, anxiety and stroke therapy. In: MELDRUM, B.; WILLIAMS, M. (Ed.) Progress in clinical and biological research. New York: Wiley Liss, 1990. p. 257.

- LANEUVILLE, D.; DERAIS, J.; COUTURE, R. Characterization of the effects produced by neurokinins and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. Life Sci., 42: 1295-1305, 1988.
- LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.P. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. J. Pharmacol. Met., 16: 155-157, 1986.
- LAVIELLE, S.; CHASSAING, G.; LOEUILLET, D.; CONVERT, O.; TORRENS, Y.; BEAUJOUAN, J.C.; SAFFROY, M.; PETITET, F.; BERGSTROM, L.; GLOWINSKI, J. Selective agonists of tachykinin binding sites. Fundam. Clin. Pharmacol., 4: 257-268, 1990.
- LEAH, J.D.; CAMERON, A.A.; SNOW, P.J. Neuropeptides in physiologically identified mammalian sensory neurons. Neurosci. Lett., 56: 257-264, 1985.
- LEMBECK, F. Substance P: from extract to excitement. Acta Physiol. Scand., 133: 435-454, 1988.
- LEMLECK, F.; FOLKERS, K.; DONNERER, J. Analgesic effect of antagonists of substance P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 103: 1318-1321, 1981.
- LEW, R.; GERAGHTY, D.P.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D.; BURCHER, E. Binding characteristics of [¹²⁵I] Bolton-Hunter [Sar⁹ Met (O₂)¹¹] substance P, a new selective radioligand for the NK₁ receptor. Eur. J. Pharmacol., 184: 97-108, 1990.
- LI, Y. -Q.; RAO, Z.R.; SHI, J.-W. Midbrain periaqueductal gray neurons with substance P - or enkephalin-like immunoreactivity send projection fibers to the nucleus accumbens in the rat. Neurosci. Lett., v. 119, p. 269-271, 1990.
- LISTER, R.G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology, 92: 180-185, 1987.
- LJUNGDAHL, A.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. Neuroscience, 3: 861-943, 1978.
- LOOPUIJT, L.D., VAN DER KOOY, D. Organization of the striatum: collateralization of its efferent axons. Brain Res., 348: 86-99, 1985.

- MAGGI, C.A. Tachykinin receptors in the airways and lung: what should we block? Pharmacol. Res., 22: 527-540, 1990.
- MAGGI, C.A.; BORSINI, F.; SANTICIOLI, P.; GEPPETTI, P.; ABELLI, L.; EVANGELISTA, S.; MANZINI, S.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; SOMMA, V.; AMENTA, F.; BACCIARELLI, C.; MELI, A. Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats - a trophic role of capsaicin - sensitive afferents? Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 336: 538-545, 1987.
- MAGGI, C.A.; GUILIANI, S.; SANTICIOLI, P.; ABELLI, L.; GIANCHETTI, A. Facilitation of reflex micturation by intravesical administration of [β -Ala⁸] neurokinin A₍₄₋₁₀₎ a selective NK₂ tachykinin receptor agonist. J. Virology, 184-187, 1991.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; EGLEZOS, A.; QUARTARA, L.; GUILIANI, S.; GIACHATTI, A. Tachykinin receptors in guinea pig renal pelvis: activation by exogenous and endogenous tachykinin. Br. J. Pharmacol., 107: 27-33, 1992.
- MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; ROVAIS, P.; GIANCHETTI, A. Review tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. J. Auton. Pharmacol., 13: 23-93, 1993.
- MAGGIO, J.E. Tachykinins. Ann. Rev. Neurosci., 11: 13-28, 1988.
- MAGGIO, J.E.; SANDBERG, B.E.B.; BRADLEY, C.V.; IVERSEN, L.L.; SANTIKAN, S. Substance K: A novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: SKRABANEK, P. (Ed.) Substance P. Dublin : Boole, 1983. p. 20-21.
- MANTYH, P.W.; JOHNSON, D.J.; BOCHMER, C.G.; CATTON, M.D.; VINTERS, H.V.; MAGGIO, J.E.; TOO, M.P.; VIGNA, S.R. Substance P receptor binding sites are expressed by glia *in vivo* after neuronal injury. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5193-5197, 1989.
- MARCHAND, J.E.; HERSHMAN, K.; KUMLAR, M.S.A.; THOMPSON, M.L.; KREAM, R.M. Dissulfiram administration affects substance P-like immunoreactive and monoaminergic neural systems in rodent brain. J. Biol. Chem., 265: 264-273, 1990.

- MARKOWITZ, S.; SAITO, K.; MOSKOWITZ, M.A. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. J. Neurosci., 7: 4129-4136, 1987.
- MARLON, R.E.; GARCIA, M.M.; KRAUSE, J. Cellular localization of substance P - and neurokinin-mediating preprotachykinin mRNA in the female rat brain. J. Comp. Neurol., 287: 179-212, 1989.
- MASON, G.S.; ELLIOT, P.J. Behavioral consequences following infusion of selective neurokinin agonists into the median raphe nucleus of the rat. Neuropharmacology, 31: 757, 1992.
- MASU, Y.; NAKAYAMA, K.; TAMAKI, H.; HARADA, Y.; KUNO, M.; NAKANISHI, S. cDNA cloning of bovine substance K receptor through oocyte expression system. Nature, 329: 826-838, 1987.
- MAURIN, Y.; BUCK, S.H.; WAMSLEY, J.K.; BURKS, T.F.; YAMAMURA, H.I. Light microscopic autoradiographic localization of [³H] substance P binding sites in rat thoracic spinal cord. Life Sci., 34: 1713-1716, 1984.
- MOLINARI, M.; HENDRY, S.H.C.; JONES, E.G. Distribution of certain neuropeptides in the primate thalamus. Brain Res., 426: 270-289, 1987.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. J. Comp. Physiol. Psychol., 48: 254-260, 1955.
- MOSKOWITZ, M.A.; BUZZI, M.G. Neuroeffector functions of sensory fibers: implications for headache mechanisms and drug actions. J. Neurol., 238: S18-S22, 1991.
- MUNEKATA, E.; KUJO, K.; TANAKA, M.; OSAKADA, F. Structure-activity studies on heptapeptide derivatives related to substance P, neurokinin A, B and other tachykinins on smooth muscle. Peptides, 8: 169-173, 1987.
- MYERS, R.D. Neuroactive peptides: unique phases in research on mammalian brain over three decades. Peptides, 15: 367-381, 1994.
- NAGASHIMA, A.; TAKANO, Y.; TATEISHI, Y.; MATSUOKA, T.; HAMAOKA, T.; KAMUYA, H. Cardiovascular roles of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitarius of rats. Brain Res., 487: 392-396, 1989.

- NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. Annu. Rev. Neurosci., 14: 123-136, 1991.
- NAUTA, W.J.H.; MEHLER, W.R. Projections of the lentiform nucleus in the monkey. Brain Res., 1: 3-42, 1966.
- NAWA, H.; KOTANI, H.; NAKANISHI, S. Tissue specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. Nature, 312: 729-734, 1984.
- NAWA, M.; MIROSE, T.; TAKASHIMA, M.; INOYAMA, S.; NAKANISHI, S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine substance P precursor. Nature, 306: 32-36, 1983.
- NEW, J.S. The discovery and development of buspirone: a new approach to the treatment of anxiety. Med. Res. Rev., 10: 283, 1990.
- NICOLL, R.A.; SCHENKER, C.; LEEMAN, S. Substance P as a transmitter candidate. Annu. Rev. Neurosci., 3: 227-268, 1980.
- NILSSON, G.; HÖKFELT, T.; PERNOW, B. Distribution of substance P like immunoreactivity in the central nervous system as revealed by immunohistochemistry. Med. Biol., 52: 424-427, 1974.
- OEHME, P.; HECHT, K.; PRIESCHE, L.; MILSEM, M.E.; POPPEI, M. Substance P as a modulator of physiological processes. In: MORSAN, C.A.; TRACZYK, W.Z. (Eds.) Neuropeptides and neural transmission. New York : Raven Press, 1980. p. 73-84.
- OTSUKA, M.; KONISHI, S. Substance P - The first peptide neurotransmitter? Trends Neurosci., 6: 317-320, 1983.
- OTSUKA, M.; YANAGISAWA, M. Effect of a tachykinin antagonist on a nociceptive reflex in the isolated spinal cord-tail preparation of newborn rat. J. Physiol. (Lond)., 395: 255-270, 1988.
- OTSUKA, M.; YANAGISAWA, M. Pain and neurotransmitters. Cell Molec. Neurobiol., 10: 293-302, 1990.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, L. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. Physiol. Rev., 73: 229-308, 1993.

- PANULA, P.; YANG, Y.T.; COSTA, E. Comparative distribution of bombesin/GRP- and substance P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. J. Comp. Neurol., 224: 606-617, 1984.
- PAPIR-KRICHELI, D.; FREY, J.R.; LAUFER, C.; GILON, M.; CHOREV, Z.; SELINGER, DEVOR, M. Behavioural effects of receptors specific substance P agonists. Pain, 31: 263, 1987.
- PELLOW, S.; CHAPIN, P.; FILE, S.E.; BRELEY, M. Validation of open:close arms entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. J. Neurosci. Met. 14: 149-167, 1985.
- PERNOW, B. Research on tachykinins: clinical trends. In: HENRY et al. (Eds.) Substance P and neurokinins. New York : Springer-Verlag, 1987. p. 372-379.
- PERNOW, B. Substance P. Pharmacol. Rev., 35: 85-141, 1983.
- PERRONE, M.H.; LEPORE, R.D.; SHAIN, W. Identification and characterization of substance P receptors on LRM55 glial cells. J. Pharmacol. Exper. Ther., 238: 389-395, 1986.
- PETERSEN, E.N.; JENSEN, L.; HONORE, T.; BRAESTRUP, C.; KEHR, W.; STEPHENS, D.; WACHTEL, H.; SEIDELMAN, D.; SCHMIECHEN, R. ZK 91296, a partial agonist at benzodiazepine receptors. Psychopharmacology, 83: 240, 1984.
- PETITET, F.; SAFFROY, M.; TORRENS, Y.; LAVIELLE, S.; CHASSAING, G.; LOEUILLET, D.; GIOWINSKI, J.; BEAUJOUAN, J.C. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. Peptides, 13: 383-388, 1992.
- PICARD, P.; BOUCHER, S.; REGOLI, D.; GITTER, B.D.; HOWBERT, J.J.; COUTURE, R. Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK-1 and NK-2 receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat. Eur. J. Pharmacol., 232: 255-261, 1993.
- PICARD, P.; REGOLI, D.; COUTURE, R. Cardiovascular and behavioral effects of centrally administered tachykinins in the rat: characterization of receptors with selective antagonists. Br. J. Pharmacol., 112: 240-249, 1994.

- PICKEL, V.; REIS, D.; LEEMAN, S. Ultrastructural localization of substance P in neurons of rat spinal cord. Brain Res., 122: 534-540, 1977.
- PICKEL, V.M.; JOH, T.H.; REIS, D.J.; LEEMAN, S.E.; MILLER, R.J. Electron microscopic localization of substance P and enkephalin in axon terminals related to dendrites of catecholaminergic neurons. Brain Res., 160: 387-400, 1979.
- PONCELET, M.; GUENDET, C.; EMONDSALT, X.; BRELIÈRE, J.C.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Turning behaviour induced in mice by neurokinin A receptor agonist: stereoselective blockade by SR 48968, a non-peptide receptor antagonist. Neurosci. Lett., 149: 40, 1993.
- PRIESTLEY, J.V.; SOMOGYI, P.; CUELLO, A.C. Immunocytochemical localization of substance P in the spinal trigeminal nucleus of the rat: a light and electron microscopic study. J. Comp. Neurol., 211: 31-49, 1982.
- QUARTARA, L.; PATACCHINI, R.; GOSO, C.; ROVERO, P.; MAGGI, C.A. Importance of the C-terminal amide for biological activity of neurokinin A derivative. Neuropeptides, 22: 54, 1992.
- RANDRUP, A.; MUNKVAD, I. Role of catecholamines in the amphetamine excitation response. Nature Lond., 211: 540, 1966.
- REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J.C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. Pharmacological Reviews, v. 46, n. 4, p. 551-589, 1994.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; COUTURE, R. New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological roots for receptor characterization. TIPS, 9: 290-295, 1988.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related neurokinins. Pharmacology, 38: 1-15, 1989.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE, P. Pharmacological receptors of substance P and neurokinins. Life Sci., 40: 109-117, 1987.
- ROACH, A.; ADLER, J.E.; BLACK, I.B. Depolarizing influences regulate preprotachykinin mRNA in sympathetic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84: 5078-5081, 1987.

- ROVERO, P.; PESTELLINI, V.; PATACCHINI, R.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C.A.; MELI, A.; GRACHETTI, A. A potent and selective agonist for the NK₂ tachykinin receptor. Peptides, 10: 593-595, 1989.
- SAIJA, A.; POLIDORI, C.; MASSI, M.; PERFUMI, M.; DE CARO, G.; COSTA, G. Label distribution after injection of labelled tachykinins into the rat lateral cerebroventricle. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, v. 64, n. 1, p. 99-110, 1989.
- SAITO, K.; MARKOWITZ, S.; MASKOWITZ, M.A. Ergot alkaloids block neurogenic extravasation in dura mater: proposed action in vascular headaches. Ann. Neurol., 24: 732-737, 1988.
- SAKAMOTO, N.; MICHEL, J. -P.; KOPP, N.; TOHYAMA, M.; PEARSON, J. Substance P- and enkephalin-immunoreactive neurons in the hippocampus and related areas of the human infant brain. Neuroscience, 22: 801-811, 1987.
- SAKANAKA, M.; SHIOSOKA, S.; TAKATSUKI, K.; INAGAKI, S.; TAKAGI, H.; SENBA, E.; KAWAI, Y.; MATSUZAKI, T.; TAHYAMA, M. Experimental immunohistochemical studies on the amygdalofugal peptidergic (substance P and somatostatin) fibers in the stria terminalis of the rat. Brain Res., 221: 231-242, 1981.
- SAKURADA, T.; YAMADA, T.; TAN-NO, K.; MANOME, Y.; SAKURADA, S.; KISAA, K.; OHBA, M. Differential effects of substance P analogs in NK₁ receptor agonists in the mouse spinal cord. J. Pharmacol. Exper. Ther., 259: 205-210, 1991.
- SANGER, D.J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs neuromethods. In: Animal Models in Psychiatry, v. II, 1991.
- SARIA, A. Substance P and sensory fibers contribute to the development of oedema in the rat hindpaw after thermal injury. Br. J. Pharmacol., 82: 217-222, 1984.
- SASAI, Y.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of rat substance L receptor and its mRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun., 165: 695-702, 1989.

- SCHAIBLE, H.G.; JARROTT, B.; HOPE, P.J.; DUGGAN, A.W. Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. Brain Res., 529: 214-223, 1990.
- SCHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y.; TOHYAMA, M. Coexistence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. Brain Res., 425: 256-262, 1987.
- SEABROOK, G.R.; BOWERY, B.; HILL, R.G. Pharmacology of tachykinin receptors on neurons in the ventral tegmental area of rat brain slices. European Journal of Pharmacology. v. 273, p. 113-119, 1995.
- SHAIKH, M.B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. Brain Res., 625: 283-294, 1993.
- SHARKEY, K.A.; TEMPLETON, D. Substance P in the rat parotid gland: evidence for a dual origin from the otic and trigeminal ganglia. Brain Res., 304: 392-396, 1984.
- SHIBATA, K.; HAVERSTICK, D.M.; BANNON, M.J. Tachykinin gene expression in rat limbic nuclei: modulation by dopamine antagonists. J. Pharmacol. Exper. Ther., 255: 388-392, 1990.
- SHIGEMOTO, R.; YOKOTA, Y.; TSUCHIDA, K.; NAKANISHI, S. Cloning and expression of a rat neuromedin receptor cDNA. J. Biol. Chem., 265: 623-628, 1990.
- SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. J. Psychol., 21: 227-236, 1946.
- SMITH, G.; HARRISON, S.; BOWLERS, J.; NISEMAN, J.; BIRCH, P. Non-specific effects of tachykinin NK₁ receptor antagonist, CP-99,994, in antinociceptive tests in rat, mouse and gerbil. Eur. J. Pharmacol., 271: 481-487, 1994.
- SNIDER, R.M.; CONSTANTINE, J.W.; LOWE III, J.A.; LONGO, K.P.; LABEL, W.S.; WOODY, M.A.; DROZDA, S.E.; DESAI, M.C.; VINICK, F.J.; SPENCER, R.W.; HESS, M.J. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK₁) receptor. Science, 251: 435-437, 1991.

- SNYDER, S.H. Brain peptides as neurotransmitters. Science, 209: 976-983, 1980.
- SOLWAY, J.; LEFF, A.R. Sensory neuropeptides and airway function. J. Appl. Physiol., 71: 2077-2087, 1991.
- STANDAERT, D.; SPOPER, C.B.; RYE, D.; WAINER, N. Colocalization of oreoiopeptin-like immunoreactivity with choline acetyltransferase and substance P immunoreactivity in the pedunculo-pontil and laterodorsal tegmental nuclei in the rat. Brain Res., 382: 163-168, 1986.
- STERN, P.; HADZOVIC, J. Pharmacological analysis of central actions of synthetic substance P. Arch. Int. Pharmacodyn., 202: 259-262, 1973.
- STOESSL, A.J. Localization of striatal and nigral tachykinin receptors in the rat. Brain Res., 646: 13, 1994.
- STRATTON, S.; BERESFORD, I.J.M.; HARVEY, F.J.; TURPIN, M.P.; HOGAN, R.M.; TYERS, M.B. Anxiolytic activity of tachykinin NK₂ receptor antagonists in the mouse light-dark box. Eur. J. Pharmacol., 250: R11-R12, 1993.
- STRATTON, S.C.; BERESFORD, I.J.M.; HAGAN, R.M. GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonists releases suppressed behaviours in a novel aversive environment. Br. J. Pharmacol., 112 (Suppl.) 49 p., 1994.
- SUNDELIN, J.B.; PROVVEDINI, D.M.; WAHLESTEDT, C.; LAURELL, H.; POHL, J.S.; PETERSON, P.A. Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. Eur. J. Biochem., 203: 625-631, 1992.
- TAKATSUJI, K.; MIGUEL-HIDALGO, J.J.; MAGIHIRA, S.; TOHYAMA, M. Appearance of substance P-like immunoreactive neurons in the rat superior colliculus after neonatal eye nucleation. Dev. Brain.Res., 54: 11-19, 1990.
- TAKEDA, Y.; CHOU, K.B.; TAKEDA, J.; SACHAIS, B.S.; KRAUSE, J.E. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 179: 1232-1240, 1991.
- TAMIYA, R.; HANADA, M.; KAWAI, Y.; INAGAKI, S.; TAKAGI, M. Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. Neurosci. Lett., 110: 11-15, 1990.

- TAQUET, H.; JAVOY-AGID, F.; MAUBORGNE, A.; BENOLIEL, J.J.; AGID, Y.; LEGRAND, J.C.; TRAMU, G.; CESSÉLIN, F.; HAMON, M. Biochemical mapping of cholecystokinin - substance P- [Met]-enkephalin-[Leu]-enkephalin and dynorphin A₍₁₋₈₎-like immunoreactivities in the human cerebral cortex. Neuroscience, 27: 871-883, 1988.
- TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J.M.; JORNVALL, M.; MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 128: 947-953, 1985.
- THOENEN, M. The changing scene of neurotrophic factors. TINS, 14: 165-170, 1991.
- TREGGAR, G.; NIOLL, M.D.; POTTS, J.T.; LEEMAN, S.E., CHANG, M.M. Synthesis of substance P. Nature (Lond): 232: 87-89, 1971.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. Pharmacol. Biochem. Behav., 44: 463-469, 1993.
- TSCHÖPE, C.; PICARD, P.; CULMAN, J.; PRAT, A.; ITOI, K.; REGOLI, D.; UNGER, T.; COUTURE, R. Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioural effects of tachykinin on NK₁ and NK₂ receptors in the rat. Br. J. Pharmacol., 107: 750-755, 1992.
- TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; YOKOTA, Y.; NAKANISHI, S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. Eur. J. Biochem., 193: 751-757, 1990.
- TSURUO, Y.; KAWANO, H.; NISHIYAMA T.; MISANO, S.; DAIKOKU, S. Substance P-like immunoreactive neurons in the tuberoinfundibular area of rat hypothalamus light and electron microscopy. Brain Res., 289: 1-9, 1983.
- UDA, K. Immunocytochemical localization of substance P in the rat spinal cord with special reference to fibers with the ventral column of the rostral lumbar segment. Neurosci. Lett., 57: 185-190, 1985.
- UNGER, T.; CULMAN, J. Central tachykinins: mediators of defence reaction and stress reactions. J. Physiol. Pharmacol., 72 (2): 1994.

- VICENT, S.R.; KIMURA, H.; McGEER, E.G. Organization of substance P fibers with the hippocampal formation demonstrated with a biotin avidin immunoperoxidase technique. J. Comp. Neurol., 199: 113-123, 1981.
- VON EULER, V.; GADDUM, J. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J. Physiol., 72: 74-87, 1931.
- WARDEN, M.K.; YOUNG III, I.W.S. Distribution of cells containing nRNAs encoding substance P and neurokinin B in the rat central nervous system. J. Comp. Neurol., 272: 90-113, 1988,
- WATSON, S.P.; SANDBERG, B.E.B.; HANDLEY, M.R.; IVERSEN, L.L. Tissue selectivity of substance P alkylesters suggesting multiple receptors. Eur. J. Pharmacol., 87: 77-84, 1983.
- WILLIAMS, M. Antianxiety agents: a historical perspective in current and future trends in anticonvulsant, anxiety and stroke therapy. In: MELDRUM, B.; WILLIAMS, M. (Ed.) Progress in clinical and biological research. New York : Wiley Lis, 1990. p. 131.
- WILLIAMS, M.; BENNETT, D.A.; LOO, P.S.; BRAWNWALDER, A.F.; AMRICK, C.L.; WILSON, D.E.; THOMPSON, T.N.; SCHMITZ, M.; YOKOYAMA, N.; WASLEY, J.W.F. CGS 20625, a novel pyrazolopyridine anxiolytic. J. Pharmacol. Exper. Ther., 248: 89, 1989.
- WOOLF, C.J. Evidence for a control component of postinjury pain hypersensitivity. Nature, 306: 686-688, 1983.
- WOOLF, C.J.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically maculate the gain of the nociceptive flexor reflex in the rat. Neurosci. Lett., 66: 226-230, 1986.
- WÖRMSE, V.; LAUFER, R.; MART, Y.; CHOREV, M.; GILON, C.; SELINGER, Z. Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. EMBO J., 5: 2805-2808, 1986.
- YAKSH, T.L.; JESSEL, T.M.; GAMSE, R.; MUDGE, A.W.; LEEMAN, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. Nature, 286: 155-157, 1980.

- YASHPAL, K.; HENRY, J.L. Endorphins mediate overshoot of substance P-induced facilitation of a spinal nociceptive reflex. Can. J. Physiol. Pharmacol., 61: 303-307, 1983.
- YOKOTA, Y.; SASAI, Y.; TANAKA, K.; FUJIWARA, T.; TSUCHIDA, K.; SHIGEMOTO, R.; KAKIZUKA, A.; OHKUBO, H.; NAKANISHI, S. Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. J. Biol. Chem., 264: 17649-17652, 1989.
- ZERNIG, G.; DIETRICH, M.; MAGGI, C.A.; SARIA, A. The substance P (NK₁) receptor antagonists (±)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. Neurosci. Lett., 143: 169-172, 1992.