

SANDRO JOSÉ RIBEIRO

**ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NEUROKINÉRGICO NK₃ NA
ANSIEDADE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS AVALIADA
NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.**

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.*

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

Florianópolis - SC

1998

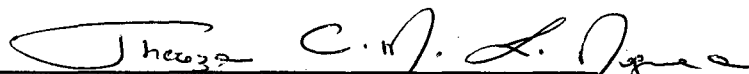
**“ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR NEUROKINÉRGICO NK₃
NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS AVALIADA NO LABIRINTO EM CRUZ
ELEVADO”**

POR

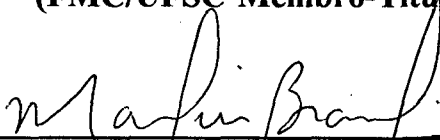
SANDRO JOSÉ RIBEIRO

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

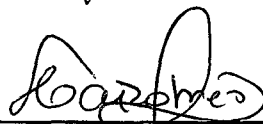
Banca Examinadora:



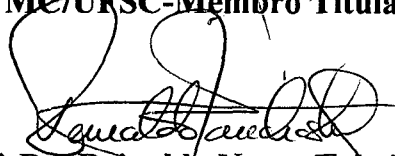
**Thereza Christina M. de Lima Nogueira
(FMC/UFSC-Membro-Titular)**



**Marcus Lira Brandão
(FFCLRP/USP-Membro Titular)**



**Antonio de Pádua Carobrez
(FMC/UFSC-Membro Titular)**



**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador, em exercício, do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, fevereiro de 1998.

RIBEIRO, Sandro José. **Envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado.** Florianópolis, 1998. 83p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira

Defesa: 28/02/98

O presente estudo investiga os efeitos da injeção intracerebroventricular (5 µl) de agonistas e antagonistas seletivos do [receptor neurocinérgico NK₃] no comportamento de camundongos no teste do [labirinto em cruz elevado] (LCE). Os resultados indicam que a administração central de agonistas ou antagonistas neurocinérgicos podem modular a [ansiedade] experimental avaliada no LCE. A interação entre os sistemas neurocinérgico e [opióide] foi investigada pela administração sistêmica de naloxona seguida da administração central de agonistas ou antagonistas do receptor NK₃. Os dados apresentados indicam uma possível inter-relação entre os sistemas neurocinérgico e opióide na modulação da ansiedade experimental avaliada, em camundongos, no labirinto em cruz elevado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto pela contribuição na realização deste trabalho.

À Rosana Maria Ostroski pelo auxílio técnico.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
INTRODUÇÃO	1
<i>Ansiedade– aspectos gerais</i>	1
<i>Bases neuroanatomicas e neuroquímicas da ansiedade</i>	3
<i>Neuropeptídeos e neurocininas – aspectos gerais</i>	5
<i>Envolvimento das neurocininas na modulação da ansiedade</i>	9
<i>Caracterização do receptor NK₃</i>	12
<i>Envolvimento dos peptídeos opióides na modulação da ansiedade</i>	16
<i>Interação dos sistemas neurocinérgico e opióide</i>	18
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	23
<i>Animais</i>	23
<i>Drogas e soluções</i>	23
<i>Administração das drogas</i>	24
<i>Procedimentos e aparelhos</i>	26

<i>Análise estatística</i>	28
RESULTADOS	29
<i>Efeito da injeção i.c.v. de agonistas do receptor NK₃</i>	29
<i>Efeito da injeção i.c.v. de antagonistas do receptor NK₃</i>	34
<i>Efeito da co-injeção de agonistas e antagonistas do receptor NK₃</i>	39
<i>Influência do tratamento prévio com a naloxona sobre a ação de agonistas e antagonistas do receptor NK₃</i>	47
<i>Avaliação da atividade locomotora em caixas de movimentação espontânea</i>	55
<i>Avaliação da coordenação motora no teste do rota-rod</i>	56
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	57
ABSTRACT	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

Figura 3: AHIA = área amigdalohipocampal

Apir = área amigdalopiriforme

BLA = porção anterior do núcleo amigdalóide basolateral

BLP = porção posterior do núcleo amigdalóide basolateral

BLV = porção ventral do núcleo amigdalóide basolateral

BM = núcleo amigdalóide basomedial

BST = núcleo do leito da estria terminal

CG = matéria cinzenta central

IC = colículo inferior

LH = área hipotalâmica lateral

LSV = porção ventral do núcleo septal lateral

PVN = núcleo hipotalâmico paraventricular

RD = núcleo dorsal da rafe

Rpn = núcleo pontino da rafe

SHy = núcleo septohipotalâmico

SNR = porção reticulada da substância negra

SNC = porção compacta da substância negra

STh = núcleo subtalâmico

VTA = área tegmental ventral

Figura 4: ABL = núcleo amigdalóide basolateral

ACO = núcleo amigdalóide cortical

AME = núcleo amigdalóide medial

BST = núcleo do leito da estria terminal

CL = tálamo centrolateral

CM = tálamo central

CPU = caudado putame

DMH = hipotálamo dorsomedial

FCX = cortex frontal

IC = colículo inferior

LD = tálamo dorsolateral

LS = septo lateral

MS = septo medial

PAG = matéria cinzenta periaquedutal

PV = tálamo paraventricular

RD = rafe dorsal

SC = colículo superior

SNC = porção compacta da substância negra

SNR = porção reticulada da substância negra

VL = tálamo ventrolateral

VM = tálamo ventromedial

VTA = área tegmental ventral

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de origem das neurocininas e seus precursores em mamíferos.....	9
Figura 2: Estrutura proposta para o receptor NK ₃ humano.....	13
Figura 3: Representação esquemática de seções coronais mostrando a distribuição de RNAm de NK ₃ em cérebro de rata.....	14
Figura 4: Distribuição de receptores opióides no cérebro de rato.....	17
Figura 5: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de senktide sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	30
Figura 6: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de senktide sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	31
Figura 7: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de neurocinina B sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	32
Figura 8: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de neurocinina B sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em amboa os braços do LCE, em camundongos.....	33
Figura 9: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de [Trp ⁷ β-Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	35
Figura 10: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de [Trp ⁷ β	

-Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	36
Figura 11: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SR 142801 sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	37
Figura 12: Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SR 142801 sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	38
Figura 13: Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide e [Trp ⁷ β -Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	41
Figura 14: Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide e [Trp ⁷ β-Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	42
Figura 15: Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide e SR 142801 sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	43
Figura 16: Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide e SR 142801 sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	44
Figura 17: Efeito da co-injeção i.c.v. de neurocinina B e [Trp ⁷ β -Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	45
Figura 18: Efeito da co-injeção i.c.v. de neurocinina B e [Trp ⁷ β -Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	46

Figura 19: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de senktide sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	49
Figura 20: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de senktide sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	50
Figura 21: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de [Trp ⁷ β-Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	51
Figura 22: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de [Trp ⁷ β-Ala ⁸]NKA ₍₄₋₁₀₎ sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	52
Figura 23: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de SR 142801 sobre a frequência de entradas e sobre o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, em camundongos.....	53
Figura 24: Influência do tratamento prévio com naloxona no efeito da injeção i.c.v. de SR 142801 sobre o número de entradas nos braços abertos e sobre o número total de entradas em ambos os braços do LCE, em camundongos.....	54

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1: Classificação dos transtornos de ansiedade segundo a DSM-IV.....	2
Tabela 2: Sequência primária dos aminoácidos de taquicininas naturais.....	7
Tabela 3: Efeito dos diferentes tratamentos na atividade locomotora de camundongos.....	55
Tabela 4: Efeito dos diferentes tratamentos na performance de camundongos no teste do rota-rod.....	56

RESUMO

O presente estudo investiga os efeitos da injeção intracerebroventricular de agonistas e antagonistas seletivos do receptor neurocinérgico NK₃ no comportamento de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). Os camundongos foram tratados i.c.v. com veículo (PBS) ou 1, 10, 100 ou 500 pmol de neurocinina B ou senktide ([succinil-Asp⁶, MePhe⁸]substância P₍₆₋₁₁₎), agonistas seletivos natural e sintético, respectivamente, para o receptor NK₃. Outros camundongos receberam doses similares de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ or SR 142801 ((S)-N-(1-(3-(1-benzoil-3-(3,4-diclorofenil)-piperidina-3-il)propil)-4-fenil-piperidina-4-il)-N-metilacetamida), antagonista seletivos peptídico e não-peptídico, respectivamente, para o receptor neurocinérgico NK₃. O senktide aumentou significativamente a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, o que é compatível com uma ação do tipo ansiolítica. O tratamento com neurocinina B não alterou de forma significativa os parâmetros analisados no LCE. Por outro lado, o [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, mas não o SR142801, promoveu um efeito do tipo ansiogênico, reduzindo a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. A injeção conjunta de senktide e Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, ou de senktide e SR 142801, bloqueou os efeitos do tipo ansiolíticos promovidos por esse agonista NK₃. Esses resultados indicam que a administração central de agonistas ou antagonistas neurocinérgicos podem modular a ansiedade. A interação entre os sistemas neurocinérgico e opióide foi investigada pela administração sistêmica de naloxona (2 mg/kg), antagonista opióide clássico, seguido da

administração central de senktide, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ ou SR 142801. O tratamento prévio com naloxona potencializou o efeito do tipo ansiolítico do senktide e inibiu a ação do tipo ansiogênica promovida pelo Trp7. Esses dados indicam uma possível inter-relação entre os sistemas neurocinérgico e opióide na modulação da ansiedade experimental avaliada, em camundongos, no labirinto em cruz elevado.

INTRODUÇÃO

Ansiedade - aspectos gerais

A palavra ansiedade, etimologicamente, deriva do termo grego *Anshein*, que significa “estrangular, sufocar, oprimir”. O termo refere-se, metaforicamente, à experiência subjetiva, sempre associada a sintomas fisiológicos característicos da ansiedade. Numa abordagem evolucionária, tanto o medo quanto a ansiedade têm suas raízes nas reações de defesa dos animais diante dos perigos encontrados no seu meio ambiente (Graeff, 1993).

Diferentemente de outros transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia ou a depressão, a ansiedade pode existir tanto como uma emoção normal quanto como um transtorno psiquiátrico (Nutt, 1990). Um certo nível de ansiedade favorece o desempenho das tarefas motoras e cognitivas sendo assim considerada fisiológica. No entanto, passa a ser indesejada, ou patológica, quando interfere com o desempenho normal do indivíduo (Graeff, 1993).

Este transtorno psiquiátrico pode ser observado clinicamente sob várias formas e aspectos. A distinção entre os diferentes estados clínicos que a ansiedade assume nem sempre é clara ou evidente, sendo por isso motivo de constantes discussões e polêmicas nas áreas da psicologia e psiquiatria. Um dos sistemas de classificação dos transtornos mentais mais amplamente aceito é o proposto pela Associação Psiquiátrica Americana (*American Psychiatric Association*), o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (“*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*”), atualmente na sua quarta edição (DSM-IV, 1994; tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos transtornos de ansiedade segundo a DSM-IV.

Agorafobia sem história de transtorno de pânico
Transtorno de pânico
com agorafobia
sem agorafobia
Fobia social
Fobia específica
Transtorno obsessivo-compulsivo
Transtorno de estresse pós-traumático
Transtorno de estresse agudo
Transtorno de ansiedade generalizada
Transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral
Transtorno de ansiedade induzido por substâncias químicas
Transtorno de ansiedade sem outra especificação

De acordo com o DSM-IV, o transtorno de ansiedade generalizada, aquele de maior incidência entre os transtornos de ansiedade, é caracterizado por ansiedade e preocupações excessivas acerca de diversos eventos ou atividades que ocorrem frequentemente e são dificilmente controlados pelo indivíduo. A intensidade, a duração ou a frequência da ansiedade ou da preocupação, são desproporcionais à real probabilidade da ocorrência ou ao possível impacto do evento temido. Estas preocupações e a ansiedade são ainda acompanhadas de sintomas psicológicos e fisiológicos como inquietação, fadiga, irritabilidade, dificuldade de concentração, tensão muscular e distúrbios do sono.

A ansiedade é, por sua vez, descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo, que é experienciado de maneira subjetiva como sendo desagradável, com as características do medo, apreensão, temor e sentimentos correlatos (Graeff, 1983). A sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (Graeff, 1989). Ao contrário do medo, que se manifesta em situações em que o perigo é iminente, a ansiedade se manifesta em situações onde o perigo é apenas potencial e incerto (Graeff, 1993).

Bases neuroanatômicas e neuroquímicas da ansiedade

As manifestações psicológicas e fisiológicas da ansiedade têm sido extensamente estudadas, mas os mecanismos biológicos envolvidos na sua regulação não são completamente conhecidos. Estudos animais sugerem que reações análogas ao medo humano são mediadas e integradas por substratos neuroanatômicos localizados no sistema límbico, como amígdala, septo, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (Kopchia *et al.*, 1992; Yadin *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Graeff, 1994; Sanders e Shekhar, 1995; Aguiar e Brandão, 1996; De Sousa *et al.*, 1997). Considerando-se que a ansiedade está relacionada com o medo, uma reação básica de defesa, seu substrato neural surgiu prematuramente na escala evolutiva e as estruturas do sistema límbico, que são elementos básicos dos sistemas motivacionais primários, não sofreram alterações qualitativas importantes no processo evolutivo das espécies (Graeff, 1983).

Muito do conhecimento existente sobre a ansiedade humana foi obtido pela experimentação animal. Através do emprego de modelos animais,

procura-se reproduzir em laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia ou do tratamento da ansiedade (Zangrossi Jr., 1995). Até a década de 70 os paradigmas experimentais mais empregados no estudo da ansiedade, como o teste de Geller-Seifter, os testes de esquiva ativa e passiva, o sobressalto acústico potenciado, entre outros, envolviam situações em que era necessário o condicionamento dos animais, empregando-se para tal estímulos aversivos (Rodgers *et al.*, 1997). A partir da década de 80, uma maior atenção passou a ser dada aos modelos animais de ansiedade etologicamente fundamentados. Esses modelos se baseiam nas respostas inatas de medo de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas como lugares novos, confronto com um intruso e iluminação intensa (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987).

Entre os modelos de ansiedade etologicamente fundamentados e de grande aceitação atualmente, encontra-se o labirinto em cruz elevado (LCE). O modelo experimental do LCE foi validado para roedores e tem sido extensivamente usado na descoberta de agentes ansiolíticos e na investigação das bases neuroquímicas da ansiedade (Hogg, 1996). O modelo é rápido, simples, pouco dispendioso e mostra-se altamente sensível tanto a efeitos de agentes ansiolíticos como a ansiogênicos (Handley e Mithani, 1984; Lister, 1990). Além disso, em alguns laboratórios esse teste tem se mostrado capaz para detectar possíveis compostos ansiolíticos que não mostram resultados consistentes em modelos animais clássicos de ansiedade, ou seja, naqueles baseados no condicionamento aversivo (Dawson e Tricklebank, 1995).

Os estudos experimentais, em adição às observações clínicas, permitiram não só a determinação dos substratos neuroanatômicos da

ansiedade, mas foram especialmente úteis no entendimento dos substratos neuroquímicos deste transtorno. Neurotransmissores clássicos inibitórios, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), e excitatórios (p.e., o glutamato) parecem modular tonicamente a ansiedade (Davis *et al.*, 1994), enquanto outros, como a serotonina, parecem modular fasicamente esta patologia (Handley, 1995). A este respeito, nos últimos anos vem crescendo o número de evidências clínicas e experimentais envolvendo diferentes neuropeptídeos (neuropeptídeo Y, hormônio liberador de corticotropina, peptídeo natriurético atrial, e a colecistocinina) na modulação da ansiedade (Harro *et al.*, 1993; Liebsch *et al.*, 1995; Wettstein *et al.*, 1995; Ströhle *et al.*, 1997).

Neuropeptídeos e neurocininas - aspectos gerais

A descoberta de neuropeptídeos como uma classe nova singular de compostos com atividade biológica é um dos maiores eventos da fisiologia moderna. Este fato marcou uma revolução na fisiologia tradicional, unindo-a à endocrinologia, à neurofisiologia, às ciências comportamentais e, por fim, à imunologia. Os neuropeptídeos agem como neuromediadores ou neuromoduladores, afetando a atividade elétrica e a permeabilidade iônica das células nervosas e, como os hormônios, os neuropeptídeos influenciam a secreção de outros hormônios, o metabolismo, a circulação, a termoregulação, entre outros aspectos fisiológicos (Klavdieva, 1995).

O termo neuropeptídeo foi primeiramente introduzido por de Wied (1971) para denotar fragmentos de hormônios peptídicos sem a atividade da molécula hormonal, mas capazes de produzir mudanças comportamentais. Ficou estabelecido que estes peptídeos são caracterizados por aspectos

comuns tais como sua origem (tecido nervoso e células secretoras de peptídeos presentes em vários órgãos como as vísceras, a placenta, o coração e os pulmões), sua biossíntese, sua secreção e sua enorme eficiência (os neuropeptídeos são biologicamente ativos em concentrações extremamente baixas). De acordo com uma das definições modernas, sugerida por Ganong (apud Klavdieva, 1995), um neuropeptídeo é um peptídeo encontrado no sistema nervoso que possui efeitos biológicos quando injetado nos organismos vivos.

Estudos em animais têm demonstrado que os neuropeptídeos modulam diversas funções e que alterações nos sistemas de neuropeptídeos podem ser fatores etiológicos de desordens psiquiátricas e neurológicas (de Wied e van Ree, 1989). Nos terminais sinápticos do sistema nervoso central (SNC) existe uma quantidade significativa de neuropeptídeos que possuem um importante efeito na neurotransmissão. Entre eles estão a substância P (SP), a colecistocinina, a neurotensina, o neuropeptídeo Y e a somatostatina (Stone, 1995). Muitos desses neuropeptídeos coexistem com neurotransmissores clássicos como a dopamina, a acetilcolina, a serotonina, o GABA e os opióides (Pernow, 1983; Hökfelt *et al.*, 1987; Chang, 1988; Smith *et al.*, 1994; Marksteiner *et al.*, 1995; Zacharko *et al.*, 1995).

O estudo das cininas, em particular, levou a identificação de substâncias biologicamente ativas na pele de anfíbios e em moluscos como a fisalaemina, kassinina e a eledoisina, as quais, juntamente com a SP, formaram uma nova família de peptídeos, as taquicininas (Klavdieva, 1995; ver tabela 2). Atualmente vários grupos de pesquisadores preferem agrupar as taquicininas presentes em mamíferos sob a designação genérica de

neurocininas. O termo taquicininas, por sua vez, refere-se aos peptídeos encontrados em não-mamíferos (Regoli *et al.*, 1994).

Tabela 2 - Sequência primária dos aminoácidos de taquicininas naturais. A sequência carboxi-terminal está sublinhada.

Mamíferos												
SP	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Gln	<u>Phe</u>	<u>Phe</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
NKA		His	Lys	Thr	Asp	Ser	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
NKB		Asp	Met	His	Asp	Phe	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
NPK	[26 resíduos]	His	Lys	Thr	Asp	Ser	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
NP γ	[11 resíduos]	His	Lys	Thr	Asp	Ser	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
Não mamíferos												
Kassinina	Asp	Val	Pro	Lys	Ser	Asp	Gln	<u>Phe</u>	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>
Fisalaemina		Ala	Asp	Pro	Asn	Lys	<u>Phe</u>	<u>Tyr</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	
Eledoisina		^p Glp	Pro	Ser	Lys	Asp	Ala	<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>
Filomedusina		^p Glu	Asn	Pro	Asn	Arg	<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Leu</u>	<u>Met-NH₂</u>	

Adaptado de Guard & Watson (1991); Tian *et al.* (1996).

As neurocininas (NKs) incluem a SP, a neurocinina A (NKA), a neurocinina B (NKB) e as formas expandidas de NKA (neuropeptídeo K = NPK; neuropeptídeo γ = NP γ). Suas atividades "agonísticas" estão associadas ao domínio carboxi-terminal (C-terminal = Phe-X-Gli-Leu-Met-NH₂), que é comum a todos estes peptídeos (Mussap *et al.*, 1993). O domínio amino-terminal (N-terminal), por sua vez, confere seletividade aos diferentes tipos de receptores (para revisão ver Piedimonte, 1995).

As NKs encontram-se amplamente distribuídas no sistema nervoso de mamíferos e estão envolvidas na regulação de várias funções fisiopatológicas (Nakanishi, 1991; para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993; Horwell, 1995; Patacchini e Maggi, 1995), como a transmissão dolorosa, vasodilatação,

broncoconstrição, contração da musculatura lisa, ativação do sistema imunológico, inflamação neurogênica e respostas comportamentais (Pernow, 1983; Maggio, 1988).

As NKs são sintetizadas no corpo celular a partir do gene da pré-pró-taquicininina A ou do gene da pré-pró-taquicininina B. A transcrição do gene da pré-pró-taquicininina A origina os RNAs mensageiro (RNAm) da pré-pró-taquicininina α que forma a SP, da pré-pró-taquicininina β que forma a SP, a NKA e o NPK e o RNAm da pré-pró-taquicininina γ , responsável pela formação da SP, da NKB e do Npy. A transcrição do gene da pré-pró-taquicininina B origina os RNAm das pré-pró-taquicinininas do tipo α e β que neste caso são, ambas, responsáveis pela formação da NKB (ver figura 1).

Os efeitos fisiológicos das neurocininas são mediados por três tipos de receptores, NK₁, NK₂ e NK₃ (Regoli *et al.*, 1989; para revisão ver Guard e Watson, 1991; Nakanishi, 1991; Seabrook *et al.*, 1995). As neurocininas endógenas podem interagir com os três tipos de receptores, com diferentes graus de afinidade. Assim, a SP é o agonista preferencial do receptor NK₁, enquanto a NKA e a NKB são agonistas naturais preferenciais para os receptores NK₂ e NK₃, respectivamente (Maggi *et al.*, 1993; Stables *et al.*, 1994; Culman e Unger, 1995; Patacchini e Maggi, 1995).

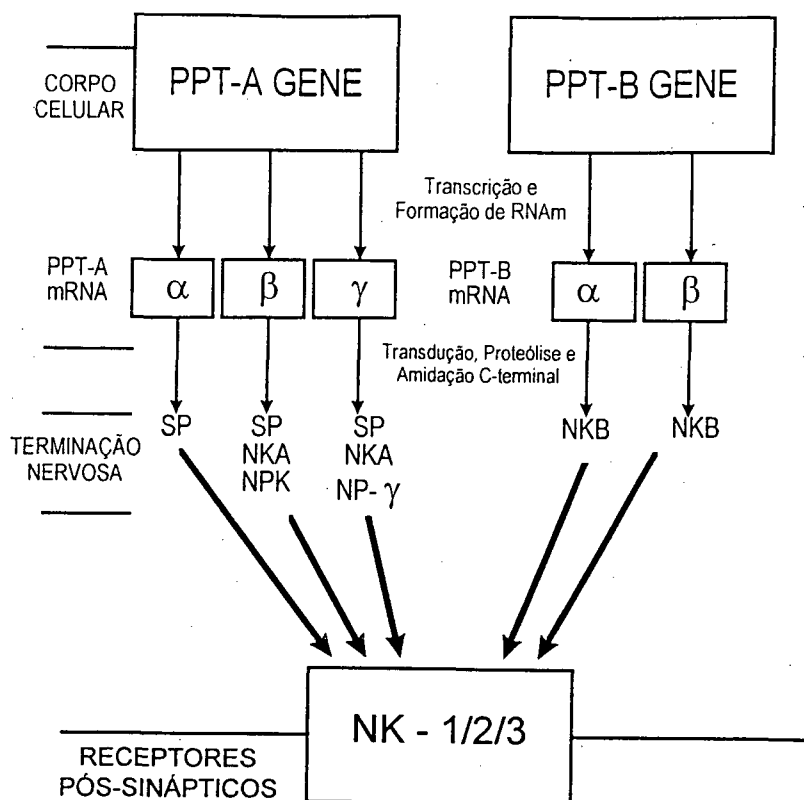


Figura 1 - Esquema de origem das neurocininas e seus precursores em mamíferos. Adaptado de Guard e Watson (1991).

Envolvimento de neurocininas na modulação da ansiedade

Devido à importância biológica das NKs na regulação de funções corporais, há uma grande expectativa de que antagonistas dos receptores neurocinérgicos possam ser úteis no tratamento de doenças humanas como dor, artrite, asma, emese, ansiedade e esquizofrenia (Longmore *et al.*, 1995, Chan *et al.*, 1996).

A SP, agonista natural preferencial dos receptores NK₁, induz reações cardiovasculares de defesa em ratos (Unger *et al.*, 1988) e apresenta efeitos pró-aversivos quando micro-injetada na substância cinzenta periaquedutal dorsal (Aguiar e Brandão, 1996). Estes achados experimentais concordam com

os dados clínicos obtidos por Fehder *et al.* (1997), que verificaram um aumento dos níveis sanguíneos periféricos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos. Esses autores propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas por estresse. A este respeito, Ikeda *et al.* (1995) sugeriram que a SP estaria envolvida na defecação induzida pelo estresse em ratos. Outros estudos mostram que a SP está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa, em ratos (Brodin *et al.*, 1994) e gatos (Shaikh *et al.*, 1993), no sistema límbico. Estudos clínicos, por sua vez, mostraram uma relação inversa entre os níveis de SP no líquido céfalo-raquidiano e a intensidade de "tensão interna" e "ansiedade psíquica" de pacientes (Almay *et al.*, 1988). A maioria desses pacientes, entretanto, apresentavam um quadro de dor crônica, e é bem conhecido que os estímulos dolorosos aumentam a liberação de met-enkefalina (Le Bars *et al.*, 1987) que, por sua vez, inibe a liberação de SP (Yaksh *et al.*, 1980).

Estudos prévios demonstram que os níveis de ansiedade experimental podem ser modulados pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem os receptores neurocinérgicos NK₁ ou NK₂. A administração intraperitoneal de um antagonista do receptor NK₁, CP 96345, em camundongos, aumenta tanto a latência para entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro, como o tempo dispendido no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1993). No entanto, como o CP 96345 também reduz a atividade motora e o comportamento de levantar dos animais nas mesmas doses, fica difícil separar a influência do efeito depressor motor da possível ação ansiolítica do antagonista NK₁ em questão. Estudos prévios em nossos

laboratórios mostraram que a injeção intracerebroventricular de agonistas seletivos (naturais ou sintéticos) de receptores NK₁, como a SP e a SP-metiléster, levou a uma redução na frequência de entradas e no tempo dispendido nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, enquanto o bloqueio seletivo deste receptor pelo FK-888 promoveu efeito contrário (Teixeira, 1995, Teixeira *et al.*, 1995, 1996). Recentemente, outro antagonista NK₁, CGP 49823, mostrou efeitos ansiolíticos no teste de interação social em ratos (File, 1997), reforçando a hipótese de que a SP desempenha papel modulatório nos estados de ansiedade.

Os antagonistas NK₂ (GR 100679, SR 48969, GR 159897), por sua vez, administrados sistêmica (subcutaneamente) ou centralmente (núcleo dorsal da rafe), reduziram os comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos (caixa claro-escuro, teste de interação social, labirinto em cruz elevado e teste de resposta a um intruso humano) e espécies animais (camundongos, ratos e primatas), respectivamente (Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995; Walsh *et al.*, 1995). A administração central de agonistas (NKA e β -Ala⁸-NKA) e do antagonista (SR 48968) seletivos de receptores NK₂, resultou em efeitos do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no labirinto em cruz elevado (Teixeira *et al.*, 1996). Resumindo, os diferentes estudos mostraram que a estimulação dos receptores NK₁ e NK₂ promove efeito do tipo ansiogênico, enquanto seu bloqueio exerce efeito contrário, isto é, do tipo ansiolítico.

Outros estudos preliminares em nossos laboratórios (Teixeira, 1995, Teixeira *et al.*, 1995) mostraram que o senktide, um agonista seletivo NK₃ (Wörmser *et al.*, 1986), produz um aumento dose-dependente na frequência de

entradas e no tempo de permanência nos braços abertos, característico de uma ação do tipo ansiolítica. Estes dados são indicativos do envolvimento do receptor NK₃ na ansiedade experimental.

Caracterização do receptor NK₃

O receptor NK₃ é definido como o mediador das ações biológicas codificadas pela sequência C-terminal das neurocininas, para as quais a NKB é um agonista mais potente que a NKA ou a SP (Patacchini e Maggi, 1995). Na figura 2 está representada a estrutura proposta por Tian *et al.* (1996) para o receptor NK₃ humano. Esta estrutura foi concebida, baseando-se no exame da estrutura genética dos três tipos de receptores neurocinérgicos (NK₁, NK₂ e NK₃), que revelou que os mesmos são codificados por uma estrutura genética de cinco *exons* e que, além disso, os sítios de ligação *exon/intron* nesses três tipos de receptores são inteiramente conservados. É concebível, portanto, que os genes dos três tipos de receptores neurocinérgicos possam ter se originado de um gene ancestral comum e que a sequência protéica codificada individualmente por um *exon* possa servir como substrato funcional para estes três receptores (Tian *et al.*, 1996).

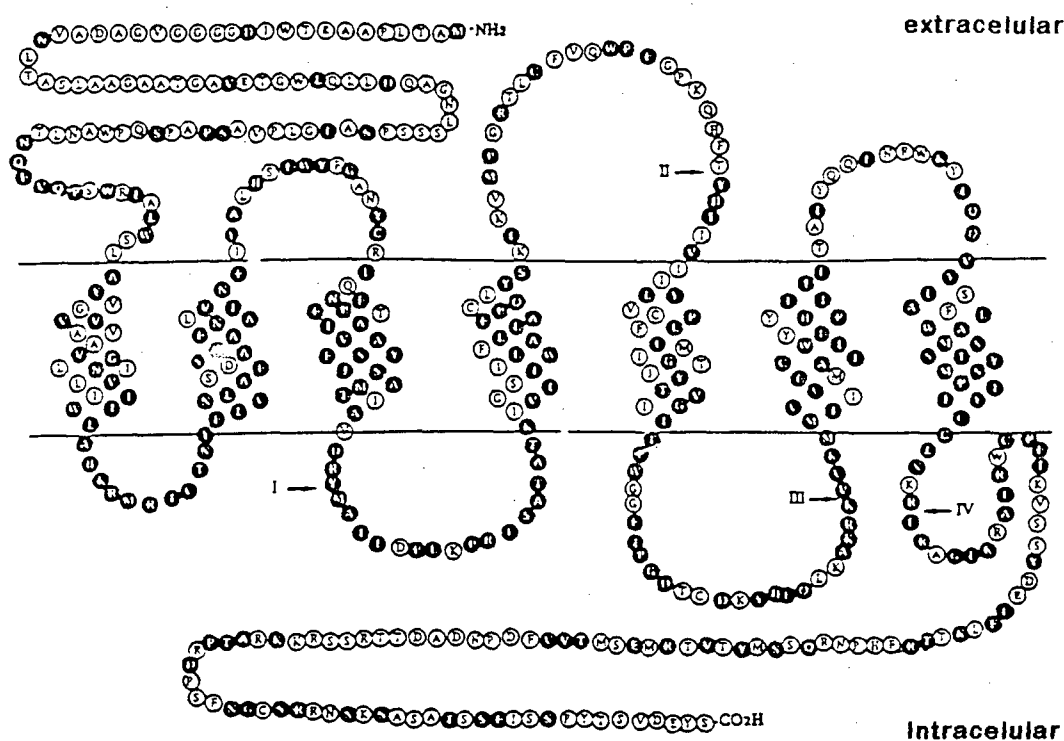


Figura 2 - Estrutura proposta para o receptor NK_3 humano. Os círculos pretos com letras brancas indicam os resíduos de aminoácidos conservados entre os receptores humanos NK_1 e NK_3 . Os círculos brancos com letras pretas indicam resíduos de aminoácidos específicos dos receptores NK_3 humanos. As setas indicam as junções entre *exons* adjacentes (Tian *et al.*, 1996).

Através de técnicas de imunohistoquímica e de hibridização *in situ*, a presença de receptores neurocinérgicos NK_3 foi determinada em diversas áreas cerebrais, pertencentes ao sistema límbico, tais como núcleo medial do septo, núcleo do leito da estria terminal, áreas hipotalâmicas dorsal e lateral, amígdala e substância cinzenta periaquedutal (Ding *et al.*, 1996; Shughrue *et al.*, 1996). Estas áreas, entre outras, estão envolvidas nos mecanismos subjacentes à ansiedade (Yadin *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Graeff, 1994; Pesold e Treit, 1995; Lee e Davis, 1996; De Souza *et al.*, 1997; Figura 3).

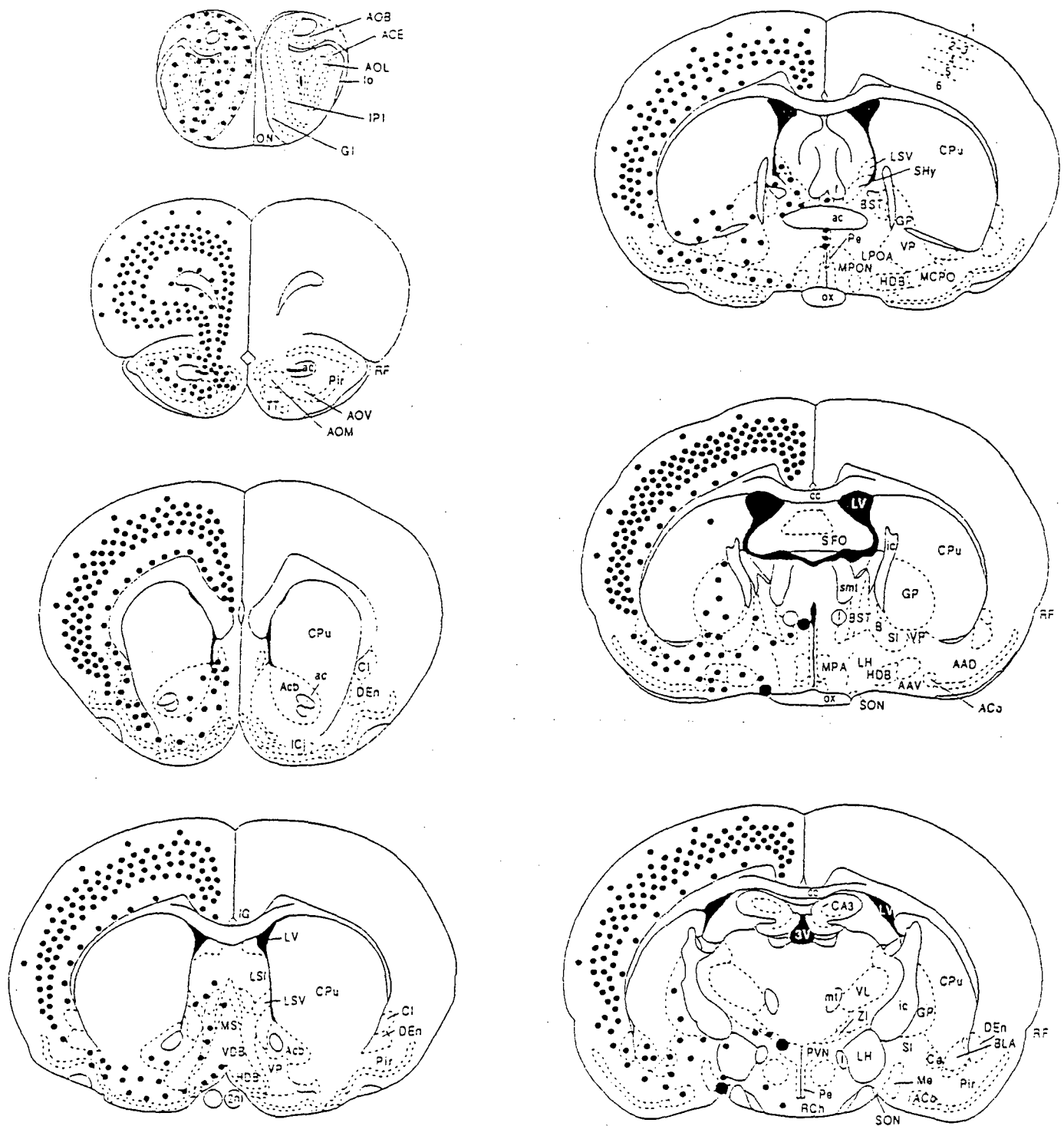


Figura 3 - Representação esquemática de seções coronais mostrando a distribuição de RNAm de NK₃ em cérebro de rata. (Shughrue *et al.*, 1996).

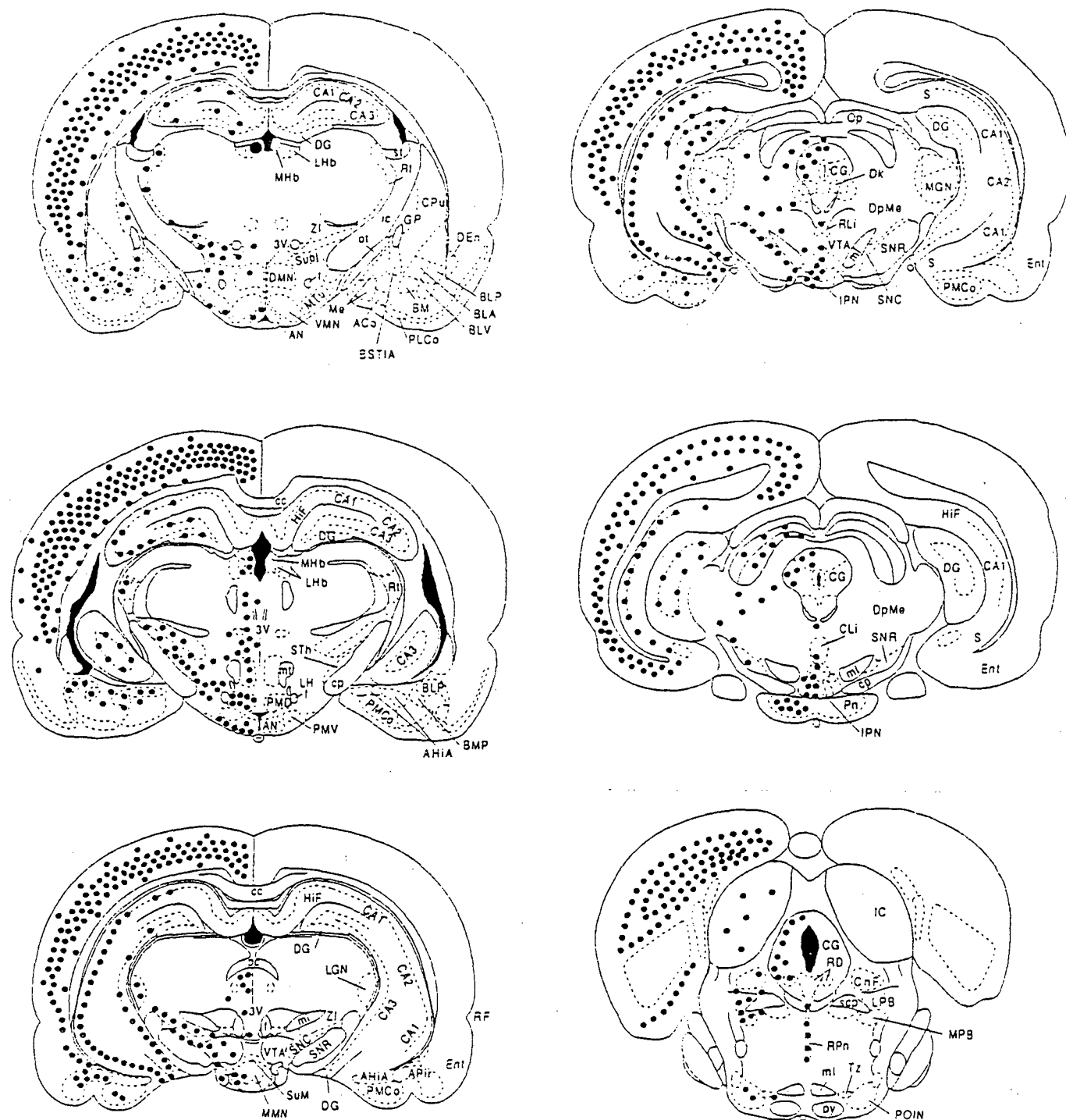
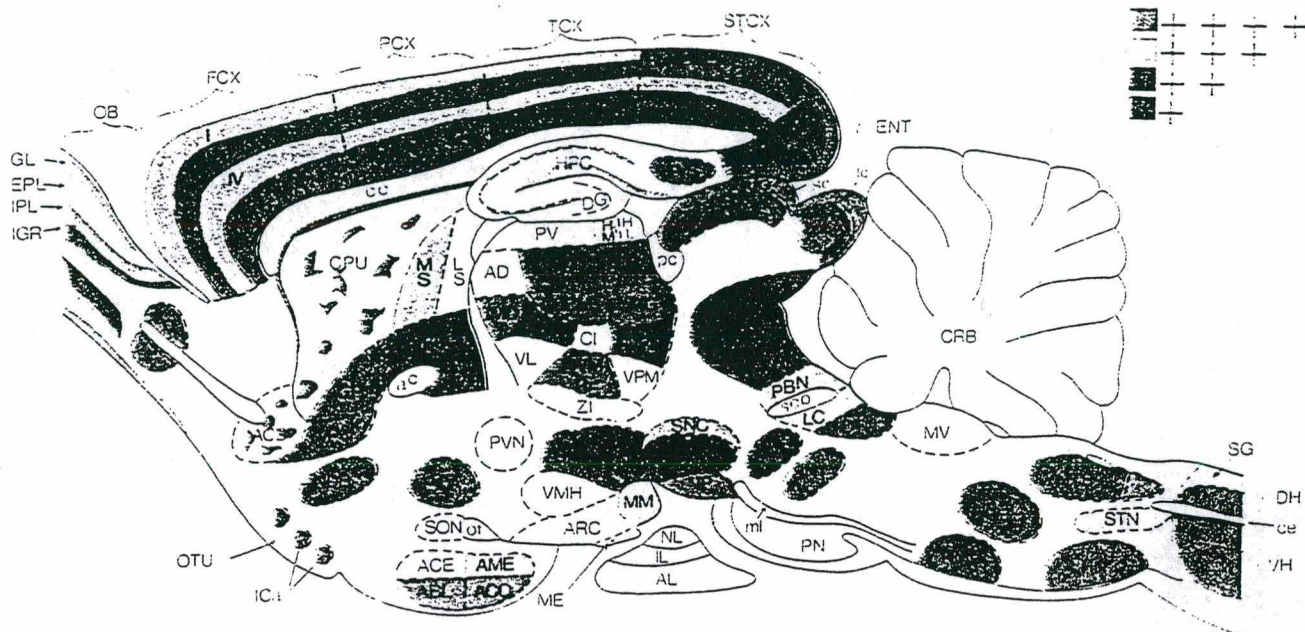


Figura 3 (continuação) - Representação esquemática de seções coronais mostrando a distribuição de RNAm de NK₃ em cérebro de rata. (Shughrue *et al.*, 1996).

Envolvimento dos peptídeos opióides na modulação da ansiedade

A presença nas diferentes áreas do sistema límbico, de uma grande concentração de receptores opióides (Paden *et al.*, 1987; Mansour *et al.*, 1988; para revisão ver Mansour *et al.*, 1995; figura 4) sugerem o possível envolvimento de peptídeos opióides na modulação da ansiedade. A este respeito, Agmo *et al.* (1995) e Tsuda *et al.* (1996) relatam que o efeito anti-conflito do diazepam, em camundongos, é abolido pelo tratamento prévio com naloxona, sendo que esta mesma droga "per se" apresentou efeito pró-conflito (Tsuda *et al.*, 1996). Por outro lado, investigando a influência da naloxona sobre os efeitos de doses sub-efetivas de benzodiazepínicos e da buspirona, ansiolíticos clássicos, em camundongos, no teste do labirinto em cruz elevado, Belzung e Agmo (1997), observaram que este antagonista opióide (10 mg/kg) não possui efeito intrínseco, contudo é capaz de potencializar os efeitos ansiolíticos dessas drogas. Agmo *et al.*, (1995), no entanto, demonstraram que a naloxona (5 e 10 mg/kg) bloqueia o efeito ansiolítico promovido pelo diazepam neste mesmo modelo experimental. Outra evidência da participação do sistema opióide na modulação do comportamento aversivo foi obtida por Motta *et al.* (1995), que observaram que microinjeções de agonistas opióides μ e κ na substância cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG) leva a inibição e ativação, respectivamente do substrato neural aversivo. Coimbra *et al.* (1996), adicionalmente, mostraram que os opióides endógenos eliciam reações aversivas através da estimulação do colículo superior, e da dPAG.

Receptores opióides μ



Receptores opióides κ

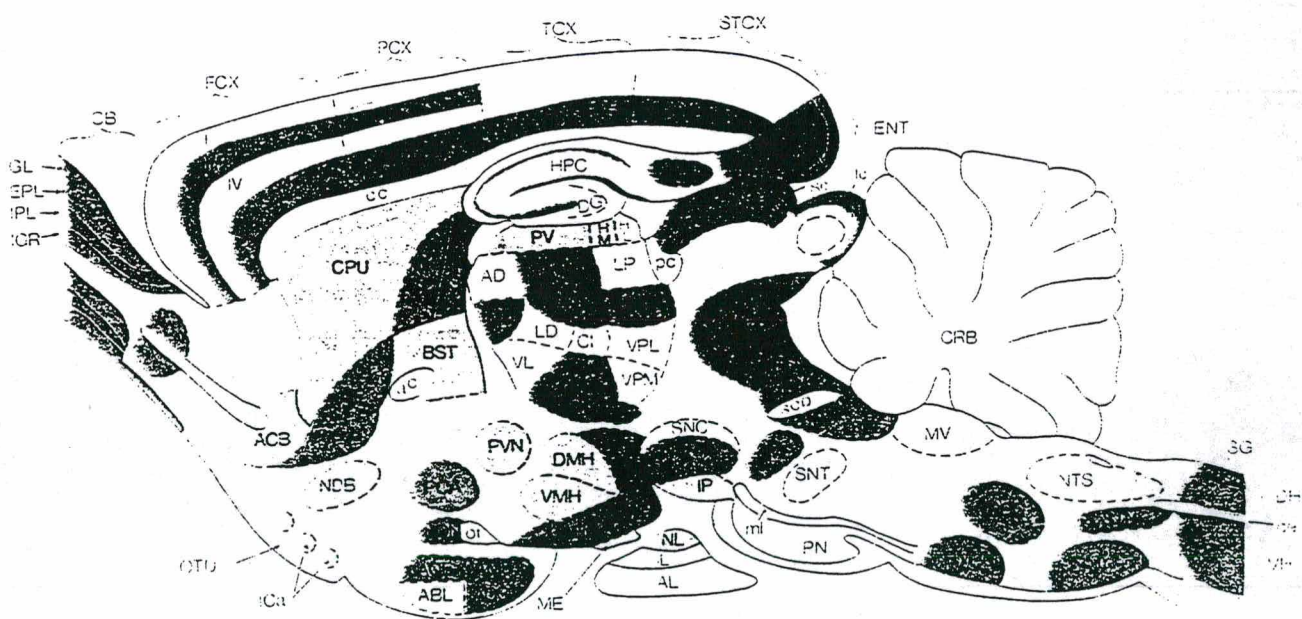


Figura 4 - Distribuição de receptores opióides no cérebro de rato. Adaptado de Mansour *et al.* (1988).

Receptores opióides δ

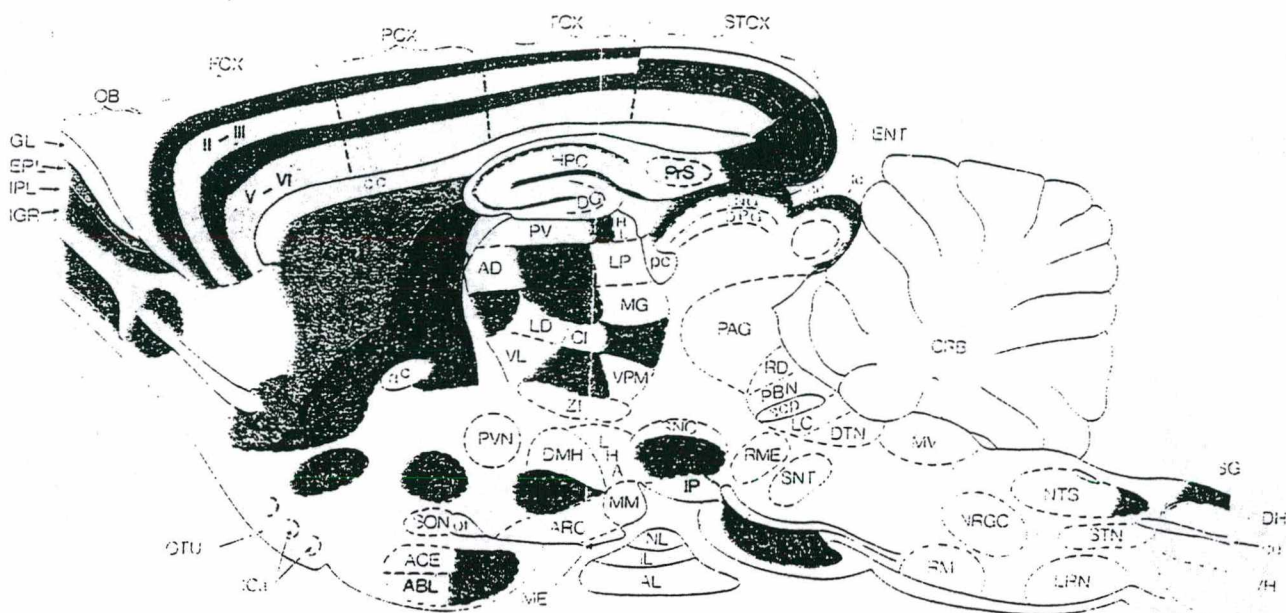


Figura 4 (continuação) - Distribuição de receptores opióides no cérebro de rato. Adaptado de Mansour *et al.* (1988).

Interação dos sistemas neurocinérgico e opióide

Existem diversas evidências experimentais de que os sistemas neurocinérgico e opióide estão inter-relacionados. Há uma sobreposição na distribuição dos dois sistemas na distribuição de suas fibras, especialmente em partes do substrato neural das reações de defesa (Cuello *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1994; Rosén *et al.*, 1995). Um estudo comparativo do desenvolvimento desses sistemas, no núcleo do leito da estria terminal e no caudado-putamen, por exemplo, mostrou que ambos se desenvolvem de forma que a expressão de cada um se distribui sobre a região aonde o outro peptídeo expressou-se primeiramente (Song e Harlan, 1995). No hipotálamo, as NKs parecem exercer

um controle excitatório na regulação da β -endorfina (Magoul e Tramu, 1997). O pré-tratamento de cobaias com morfina aumenta a liberação de SP no núcleo central da amígdala, embora reduza-a no mesencéfalo (Cantarella e Chahi, 1996). A SP, por sua vez, impede o desenvolvimento da tolerância aguda à morfina e atenua a expressão da síndrome de abstinência aos opiáceos em camundongos (Kreeger e Larson, 1996).

Além disso, recentemente foi clonado um receptor neurocinérgico, inicialmente considerado um receptor opióide, baseado nas suas características de "binding" (Donaldson *et al.*, 1996). Esse receptor foi, posteriormente, caracterizado como um subtipo do receptor neurocinérgico NK₃ clássico, ou um novo tipo de receptor neurocinérgico, "NK₄", que é funcionalmente antagonizado por peptídeos opióides endógenos. Este fato, mais o conhecimento da ampla distribuição e coexistência de neurocininas e opióides em áreas comuns do sistema límbico (Cuello *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1994; Rosén *et al.*, 1995; comparar figuras 3 e 4), levaram-nos à especulação do possível envolvimento de peptídeos opióides na modulação da ansiedade pelas neurocininas, em especial, no que diz respeito aos receptores NK₃.

Assim, primeiramente, para melhor caracterizar o envolvimento do receptor NK₃ na modulação da ansiedade experimental, verificamos, no presente estudo, como os tratamentos com agonistas (NKB e senktide) e antagonistas (SR 142801 e [Trp⁷ β -Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎) seletivos desse receptor influenciam o comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado.

Posteriormente, para estudar a possível interação entre esses dois sistemas, neurocinérgico e opióide, investigamos também, no presente estudo, a influência do pré-tratamento sistêmico com naloxona, um antagonista opióide

clássico, sobre os efeitos produzidos pela administração central de agonistas e antagonistas seletivos do receptor NK₃ na ansiedade experimental, avaliada pelo mesmo paradigma experimental, o labirinto em cruz elevado, em camundongos.

OBJETIVOS

O presente trabalho investigou a participação dos receptores neurocinérgicos NK₃ na modulação da ansiedade experimental, avaliada pelo teste do labirinto em cruz elevado, em camundongos. Para tal, caracterizou-se os efeitos da administração central de:

- um agonista seletivo natural do receptor NK₃, NKB;
- um agonista seletivo sintético do receptor NK₃, senktide;
- um antagonista seletivo peptídico do receptor NK₃, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎;
- um antagonista seletivo de natureza não peptídica do receptor NK₃, SR142801;
- a interação entre o agonista sintético (senktide) e os antagonistas peptídico, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, e não peptídico (SR142801) do receptor NK₃;
- a interação entre o agonista natural (NKB) e os antagonistas peptídico, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ do receptor NK₃.

Além disso, uma possível inter-relação, nesta modulação, entre o receptor neurocinérgico NK₃ e o sistema opióide foi também investigada pelo tratamento sistêmico prévio dos animais com naloxona, um antagonista relativamente inespecífico de receptores opióides, e posterior administração central de:

- um agonista seletivo sintético do receptor NK₃, senktide;
- um antagonista seletivo peptídico do receptor NK₃, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎;
- um antagonista seletivo de natureza não peptídica do receptor NK₃, SR142801.

Para avaliar a ação desses diferentes compostos sobre a atividade e performance motora dos animais, e possível interferência com os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado, os camundongos foram também avaliados em caixas de registro automático da movimentação espontânea e no teste do rota-rod.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados cerca de 400 camundongos Suíços machos (3 meses de idade), pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos até o momento dos experimentos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia. A temperatura ambiente, 23 ± 2 °C, e o ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz das 6:00 às 18:00 h), foram controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais (n = 7 - 10 para cada grupo) foram escolhidos aleatoriamente. Cada animal foi utilizado somente uma vez.

Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas:

Agonistas NK₃, adquiridos da Peninsula Labs. (Belmonte, EUA):

- Neurocinina B (NKB), ligante natural preferencial para o receptor neurocinérgico NK₃ (Emonds-Alt *et al.*, 1995);
- Senktide ([succinil-Asp⁶,MePhe⁸] substância P₍₆₋₁₁₎), agonista seletivo sintético para o receptor neurocinérgico NK₃ (Wörmser *et al.*, 1986).

Antagonistas NK₃:

- [Trp⁷β-Ala⁸]neurocinina A₍₄₋₁₀₎, antagonista peptídico seletivo para o receptor neurocinérgico NK₃ (Drapeau *et al.*, 1990), adquirido do Peninsula Lab. (Belmont, EUA);

SR 142801, (S)-N-(1-(3-(1-benzoil-3-(3,4-diclorofenil)-piperidina-3-il)propil)-4-penilpiperidina-4-il)-N-metilacetamida (Crocchi *et al.*, 1995), gentilmente doado por Sanofi Recherche (Montpellier, França).

Antagonista Opióide:

- Cloridrato de naloxona, antagonista opióide preferencial do receptor μ (Dafny *et al.*, 1983), gentilmente doado por Du Pont Pharmaceuticals (Delaware, EUA).

Os agonistas e antagonistas NK₃ foram preparados como soluções estoque (1 mM) em salina fosfatada tamponada, PBS ("phosphate-buffered saline"): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Chem., St. Louis, EUA) e estocadas a -20°C, em tubos Eppendorf. Todas as drogas, exceto a naloxona, foram diluídas em PBS (pH = 7,4), nas concentrações estabelecidas, 2h antes de serem usadas. A naloxona foi diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9 %).

Administração das drogas

A técnica empregada para a administração dos agonistas e antagonistas neurocinérgicos foi a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) "free hand", desenvolvida por Haley e McCormick (1957) e modificada por Laursen e Belknap (1986). Os animais foram anestesiados com éter e a agulha posicionada num plano inclinado (45°) em relação ao crânio com seu bisel voltado para cauda do animal. Uma linha imaginária foi traçada rostralmente em relação as orelhas dos animais, introduzindo-se a agulha 3,5 mm no sentido dorso-ventral e aproximadamente 2 mm lateralmente à linha mediana. A injeção foi realizada com o auxílio de uma microseringa Hamilton 701 N (10

μl), conectada a um tubo de polietileno (PE 20; Plastics One Inc., Virginia, EUA) de 15 cm de comprimento. A agulha (13 x 4,5; 26G1/2; Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Curitiba, PR), empregada para injeção i.c.v. estava conectada à outra extremidade do tubo de polietileno. As drogas foram injetadas nas doses de 1,10, 100 ou 500 pmol (5 μl). Os grupos controle foram tratados, pela mesma via, com o mesmo volume de veículo (PBS).

Para a co-injeção de agonistas e antagonistas do receptor neurocinérgico NK_3 , 2,5 μl de agonista foram aspirados no tubo de polietileno acoplado à microseringa, seguido de uma bolha de ar entre 0,1 μl e 0,2 μl e, por fim, 2,5 μl de antagonista foi também colocado no mesmo tubo de polietileno. Desta forma, quando executada a injeção i.c.v. nos camundongos o antagonista foi injetado imediatamente antes do agonista.

A naloxona (2 mg/kg) foi administrada por via intraperitoneal (i.p.), 5 min antes dos animais receberem a injeção i.c.v. O grupo controle foi tratado com solução salina (NaCl 0,9%; 0,1 ml/10 g de peso), pela mesma via.

Imediatamente após a injeção i.c.v. e a recuperação do reflexo postural, os animais foram avaliados nos testes comportamentais. Ao fim das observações comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a localização correta da injeção i.c.v. foi verificada, a *fresco*, com o auxílio dum bisturí. O cérebro de cada animal foi cortado no plano coronal e verificamos se a posição da cicatriz deixada pela agulha injetora coincidia com a localização de qualquer um dos ventrículos laterais. Os resultados obtidos com animais cuja a localização da injeção estava incorreta e/ou ainda daqueles que apresentaram sinais de hemorragia foram descartados.

Procedimentos e aparelhos

Todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00 h. No dia de cada experimento os animais foram habituados às condições experimentais em uma ante-sala do próprio laboratório por um período de, pelo menos, 1 h antes do início de cada experimento. Os aparelhos utilizados estavam numa sala iluminada somente com uma luz vermelha de 15 w, na qual a temperatura foi mantida a 22 ± 1 °C.

Imediatamente após o tratamento i.c.v. e a recuperação do reflexo postural, cada camundongo foi colocado, individualmente, no centro de uma arena de acrílico (35 x 35 x 15 cm), com assoalho de cor preta e com paredes transparentes. Cada animal permaneceu nesse aparelho por 5 min, para que se adaptasse ao novo ambiente. A seguir, cada animal foi transferido ao centro do LCE, com sua face voltada para um dos braços fechados. O LCE foi construído em acrílico, de acordo com as especificações de Lister (1987). Sucintamente, o aparelho consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) cruzados em ângulo reto com outros dois braços do mesmo tamanho, cercados por uma parede de acrílico transparente de 15 cm de altura (braços fechados). O assoalho do aparelho é de acrílico preto. Para evitar a queda dos animais, uma borda de 0,25 cm de altura cerca os braços abertos. O aparelho está elevado a 45 cm do nível do chão. Os quatro braços delimitam uma área central de 5 x 5 cm, designada como plataforma central. Antes de cada animal ser avaliado, o aparelho era limpo com uma solução de etanol a 10% e seco com papel toalha. Os animais eram testados no LCE por 5 min.

No LCE, foram registrados os parâmetros clássicos: frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, a frequência de

entradas nos braços fechados e a frequência total de entradas, obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Foi considerada como entrada em um dos braços quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço (Rodgers *et al.*, 1995). Para análise estatística dos dados e para a elaboração dos gráficos a percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas e este índice foi multiplicado por cem ($[A/A + F] \times 100$). De maneira similar, calculou-se a percentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços em relação ao somatório de tempo de permanência nos braços abertos e fechados ($[T/A + T/F] \times 100$; Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Treit *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1994). De uma maneira geral, drogas/situações ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, enquanto drogas/situações ansiogênicas promovem efeitos opostos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985).

Para certificarmos da influência dos vários tratamentos na atividade locomotora, outros animais foram colocados, individualmente, imediatamente após a injeção i.c.v., em caixas de registro automático de movimentação espontânea. O aparelho consiste em uma caixa retangular (40 x 12 x 20 cm), com três fotocélulas paralelas, dispostas ao longo do seu eixo horizontal (Siegel, 1946; Dews, 1953). A atividade locomotora foi registrada como o número de interrupções dos feixes de luz a cada 5 min, por um período total de 15 min.

A capacidade motora dos animais foi avaliada no teste do rota-rod

originalmente desenvolvido por Dunham e Miya (1957), e adaptado por Carlini *et al.* (1986). O aparelho consiste de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, dividida em seis compartimentos, elevada a 25 cm de altura, que gira a 12 r.p.m. Vinte e quatro horas antes do teste os animais foram testados em sessões de 1 min, sendo selecionados aqueles que permaneceram na barra giratória todo o tempo de duração da sessão. No dia do experimento, os animais ($n = 10/\text{grupo}$) foram injetados i.c.v. (5 μl) com veículo ou as drogas e, 5 min após, foram submetidos ao teste, em sessões de 1 min de duração. Foram registrados, durante a sessão de teste, o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas do aparelho.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Cada valor reflete a média de 7 - 10 animais por grupo nos testes realizados. Os resultados referentes às injeções i.c.v. de agonistas ou antagonistas NK_3 (curvas dose-resposta) foram tratados pela análise de variância univariada (ANOVA), tendo como variável independente o fator tratamento, seguida pelo teste de Dunnett. Para análise dos resultados das co-injeções de agonistas e antagonistas NK_3 foi utilizado o teste "t" de Student (não pareado e bicaudal), entre o grupo controle e o co-injetado. Os resultados obtidos com o tratamento prévio com naloxona seguido da injeção i.c.v. de agonistas ou antagonistas NK_3 foram tratados pela análise de variância univariada (ANOVA), seguida pelo teste de Student Newman-Keuls. Quando $p < 0,05$, as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Efeito da injeção i.c.v. de agonistas do receptor NK₃

A microinjeção de senktide, agonista peptídico sintético do receptor NK₃, em um dos ventrículos laterais do cérebro de camundongos, promoveu um aumento significativo na frequência de entradas nos braços abertos ($F_{(4,33)} = 4,731$, $p < 0,05$), nas doses de 10 e 100 pmol, comparando-se com os valores do grupo controle. Este agonista, porém não alterou significativamente a percentagem do tempo de permanência nesses mesmos braços ($p > 0,05$; figura 5) na dose de 10 pmol. Estes resultados são indicativos de um efeito do tipo ansiolítico para o senktide. Em relação ao número de entradas nos braços fechados e ao número total de entradas em ambos os braços, a droga não promoveu nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$; figura 6) nesses parâmetros.

Por sua vez a injeção i.c.v. de neurocinina B, agonista natural do receptor neurocinérgico NK₃, não modificou de maneira significativa nenhum dos parâmetros clássicos avaliados no LCE, ou seja, a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos ($F_{(7,72)} = 0,3914$ e $F_{(7,72)} = 1,771$, respectivamente, $p > 0,05$; figura 7), o número de entradas nos braços fechados ($F_{(7,72)} = 1,002$, $p > 0,05$) e o número total de entradas nos braços abertos e fechados ($F_{(7,72)} = 1,582$, $p > 0,05$; figura 8).

Assim, os efeitos observados com o agonista sintético dos receptores NK₃, senktide, no LCE, sugerem uma ação do tipo ansiolítica, que não é observada para o agonista endógeno preferencial dos mesmos receptores, NKB.

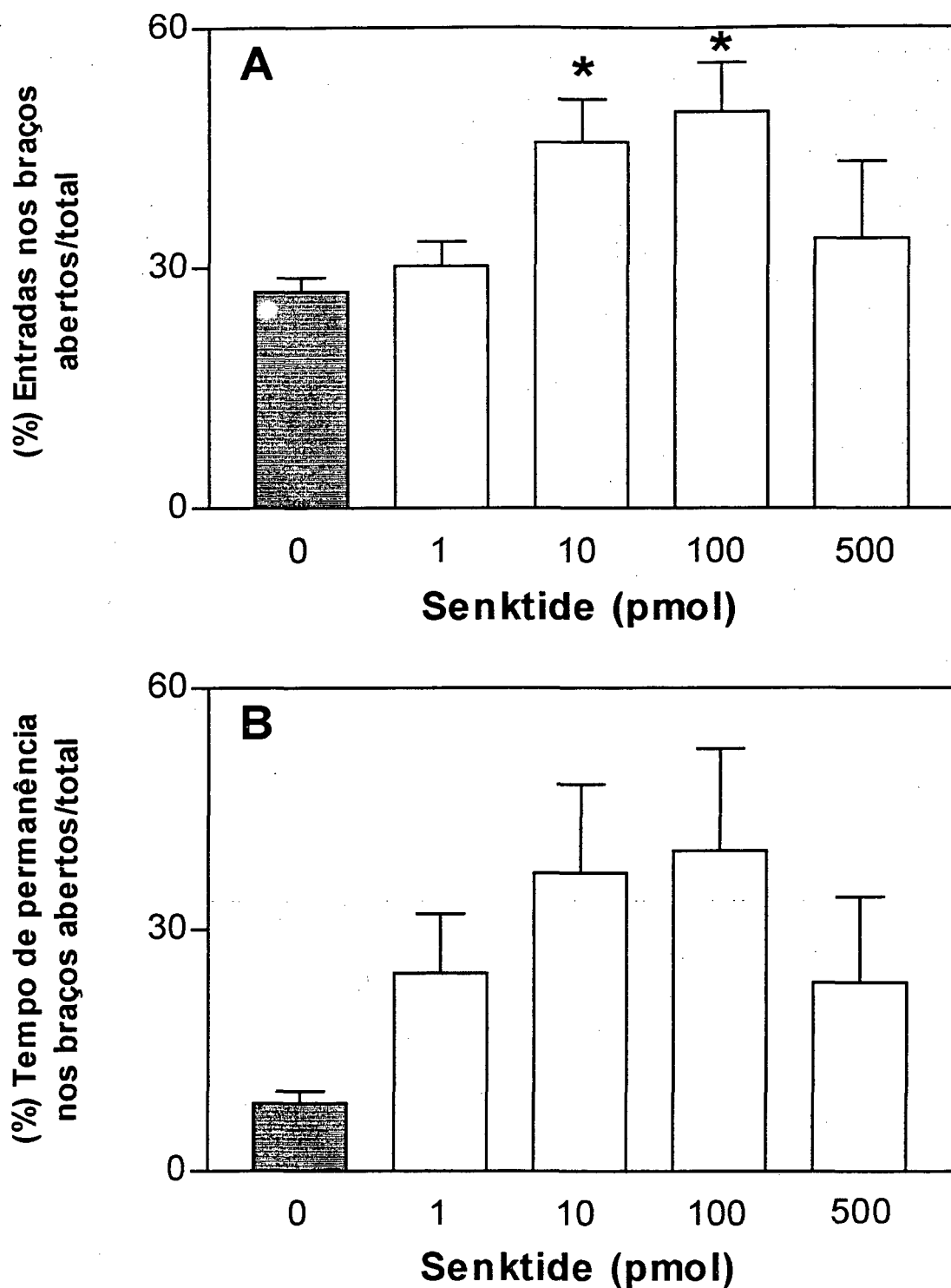


Figura 5 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de senktide sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo controle (0) empregando-se a análise de variância univariada (ANOVA) seguida do teste de Dunnett (A). Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

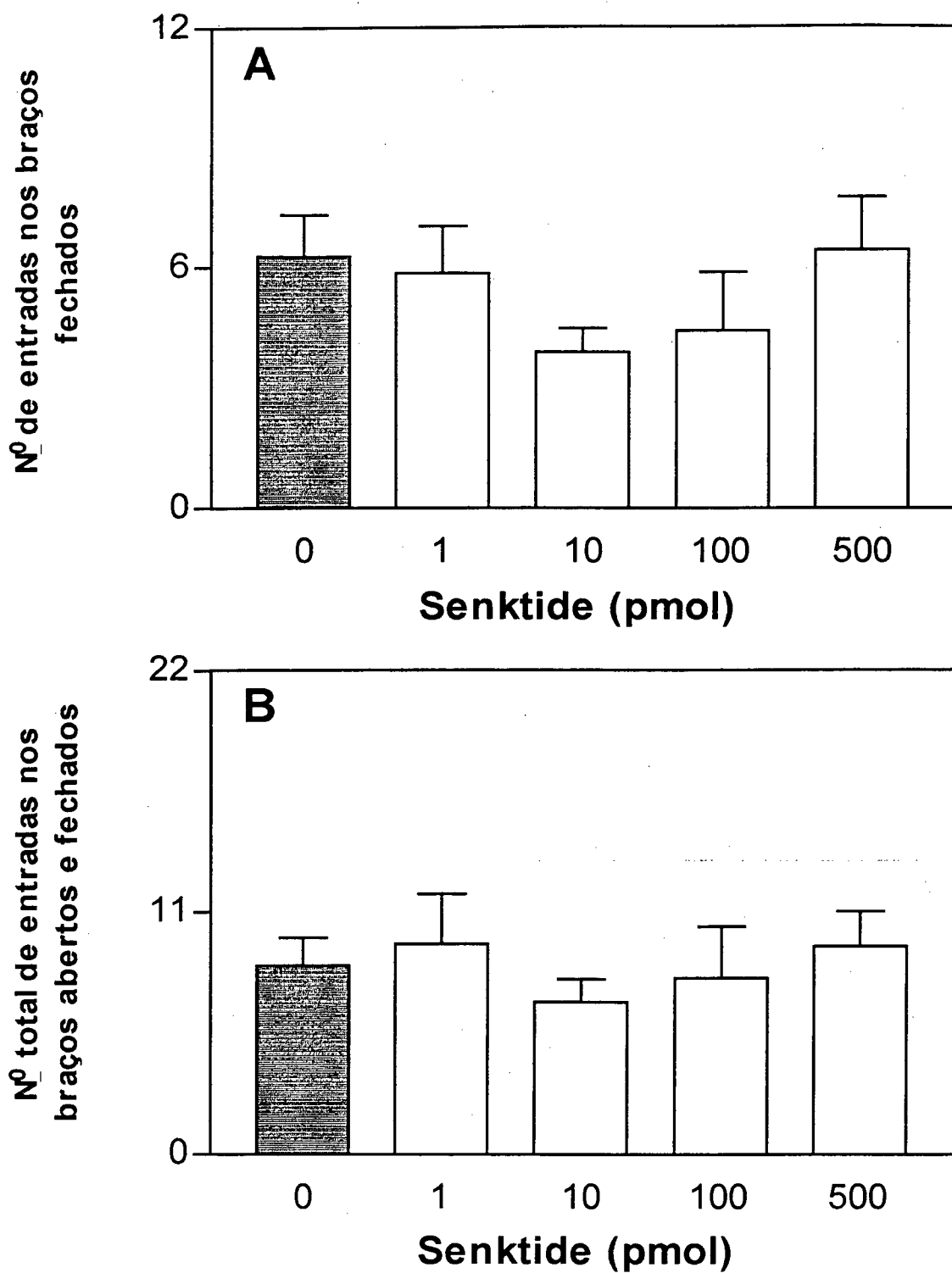


Figura 6 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de senktide sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

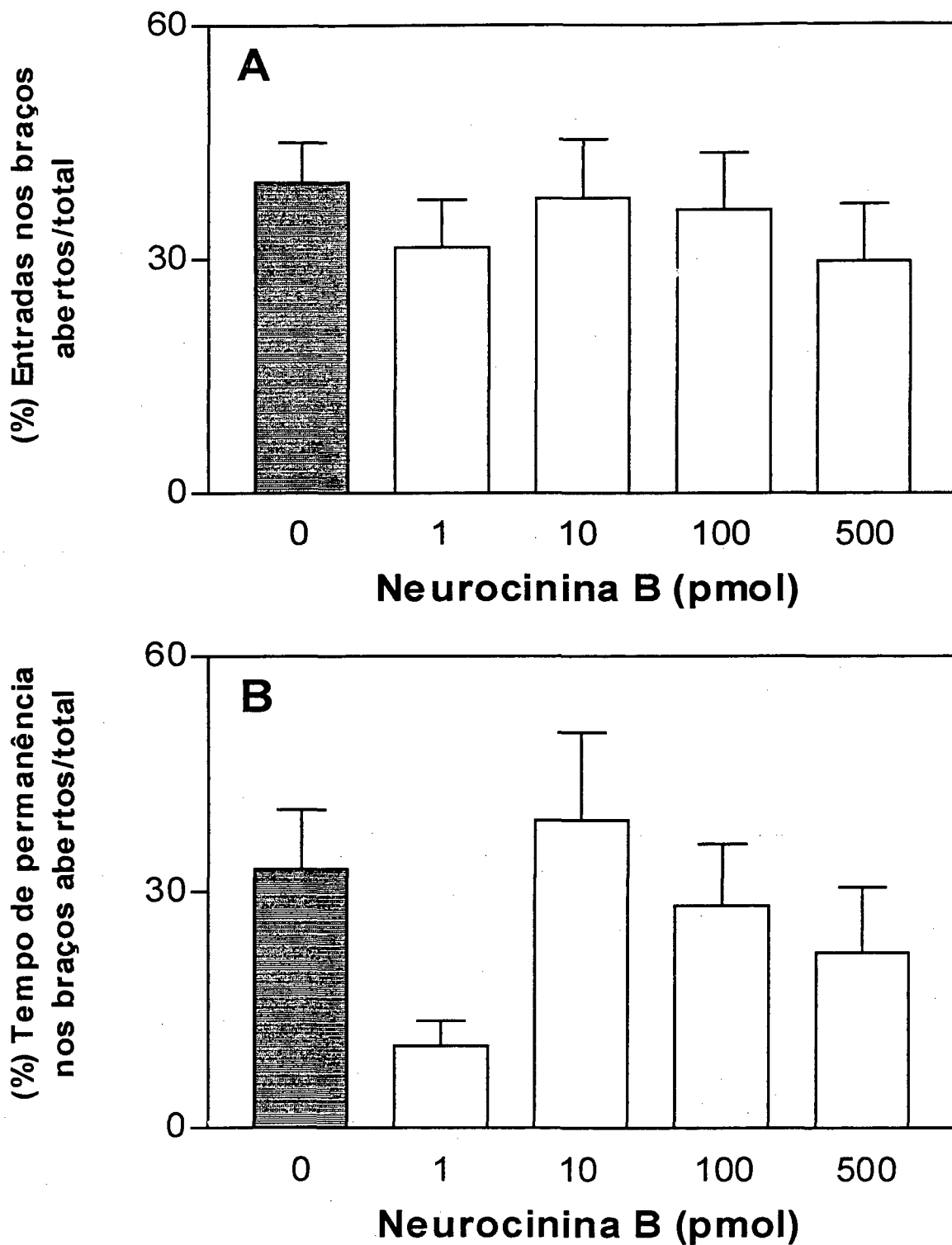


Figura 7 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de neurocinina B sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

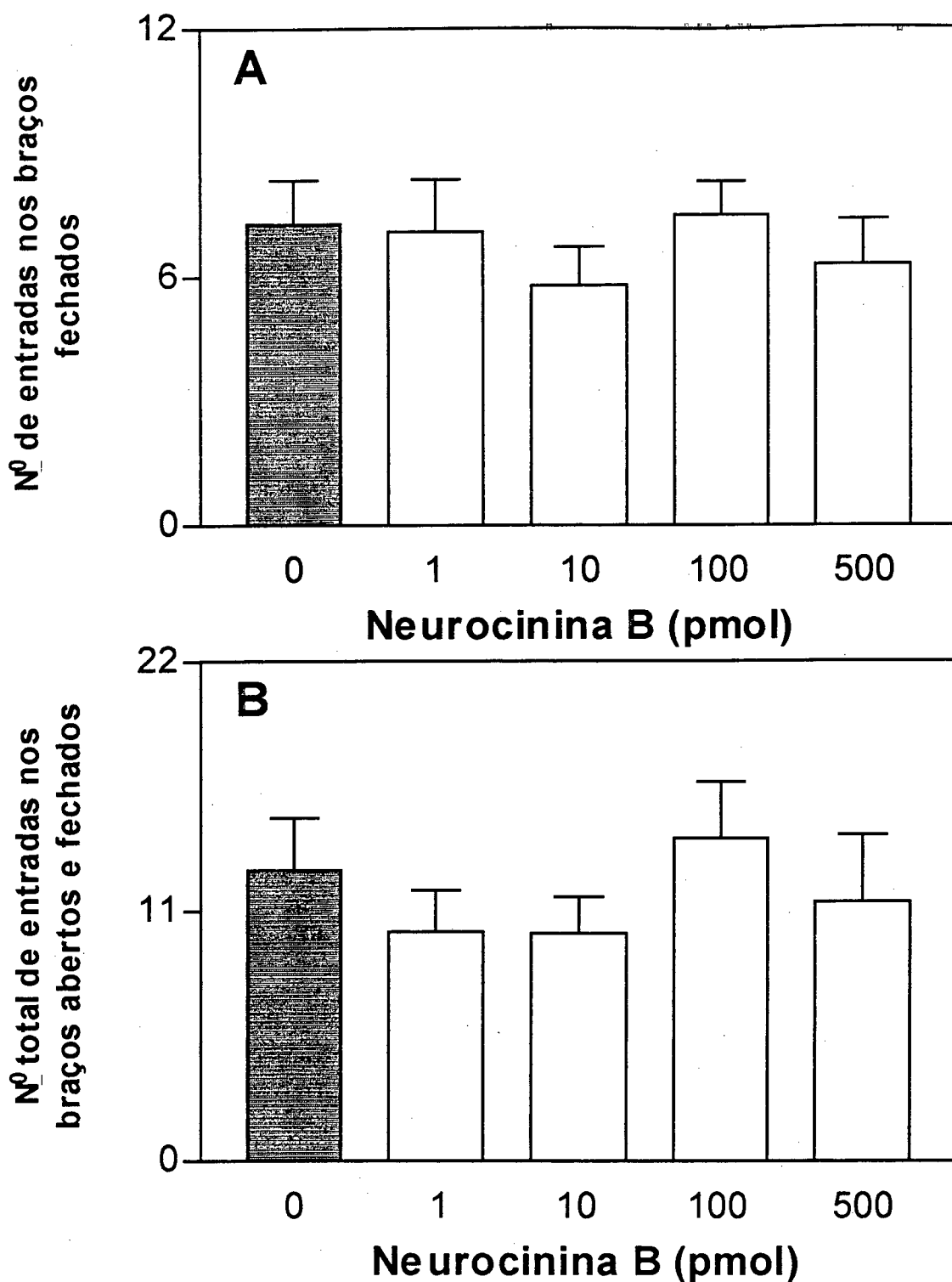


Figura 8 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de neurocinina B sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

Efeito da injeção i.c.v. de antagonistas do receptor NK₃

A injeção de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, antagonista peptídico do receptor neurocinérgico NK₃, diminuiu significativamente a frequência de entradas ($F_{(4,45)} = 2,878$, $p < 0,05$) e a percentagem do tempo de permanência ($F_{(4,45)} = 4,396$, $p < 0,05$) nos braços abertos, no LCE, na dose de 10 pmol (figura 9), quando comparado ao grupo controle (PBS), indicando um efeito do tipo ansiogênico deste antagonista. Como ilustrado na figura 10, nenhuma das doses de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ alterou o número de entradas nos braços fechados ou o número total de entradas nos braços abertos e fechados ($F_{(4,45)} = 0,6809$ e $F_{(4,45)} = 2,010$, respectivamente; $p > 0,05$), quando comparadas aos valores dos animais controle.

A administração de SR 142801, um antagonista não-peptídico seletivo para o receptor neurocinérgico NK₃, não promoveu, em nenhuma das doses usadas, alterações estatisticamente significativas na frequência de entradas ($F_{(4,45)} = 0,0817$; $p > 0,05$) e na percentagem do tempo de permanência ($F_{(4,45)} = 0,4024$; $p > 0,05$) nos braços abertos, no número de entradas nos braços fechados ($F_{(4,45)} = 1,556$, $p > 0,05$) ou no número total de entradas em ambos os braços ($F_{(4,45)} = 1,389$, $p > 0,05$; figuras 11 e 12) do LCE, em relação aos dados obtidos no grupo controle.

Esses resultados indicam que o antagonista peptídico do receptor neurocinérgico NK₃, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, apresenta um perfil do tipo ansiogênico no LCE, embora o antagonista não peptídico dos mesmos receptores, SR 14280, não altere o comportamento dos animais nesse paradigma experimental.

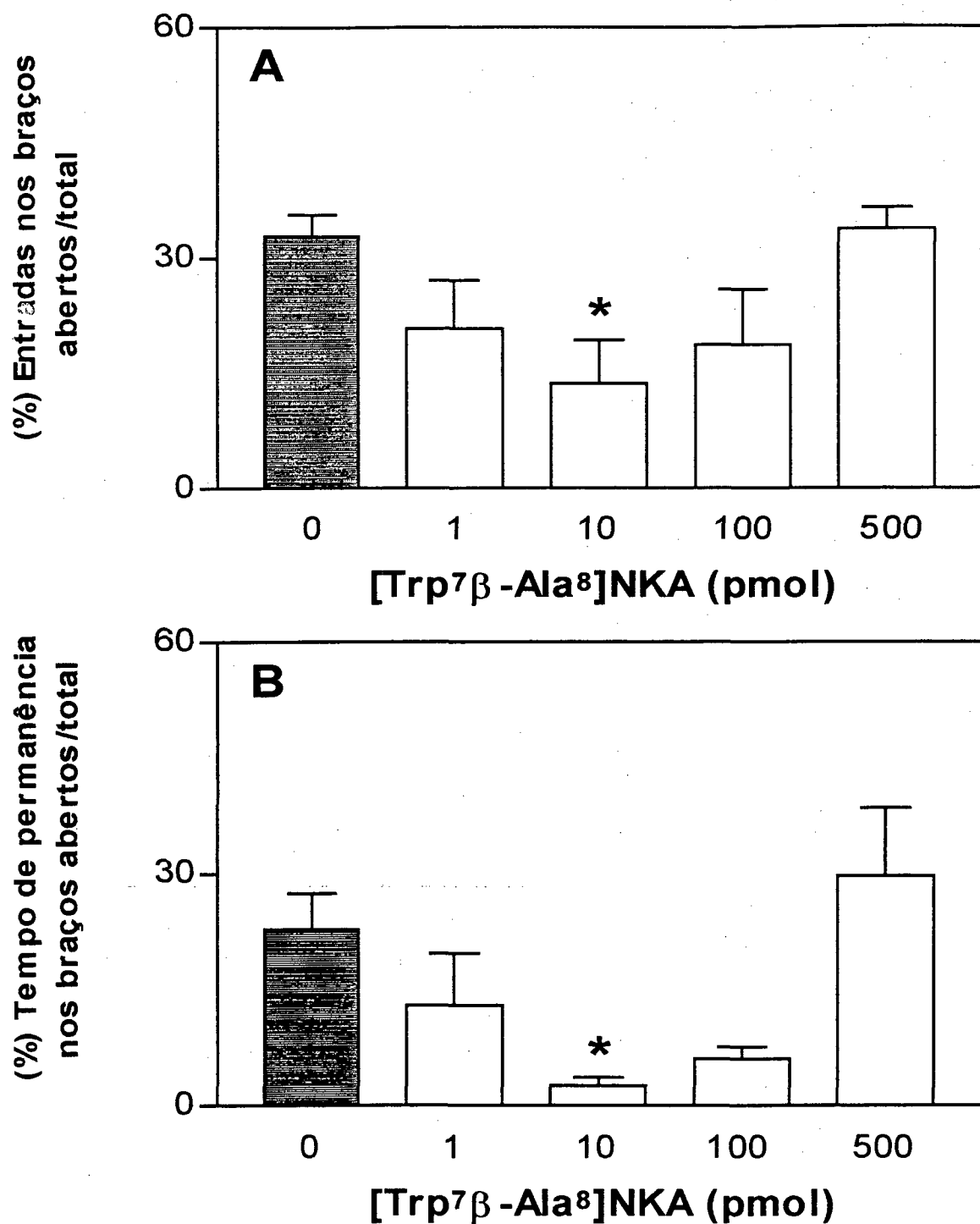


Figura 9 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo controle (0) empregando-se a análise de variância univariada (ANOVA) seguida do teste de Dunnett (A e B). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

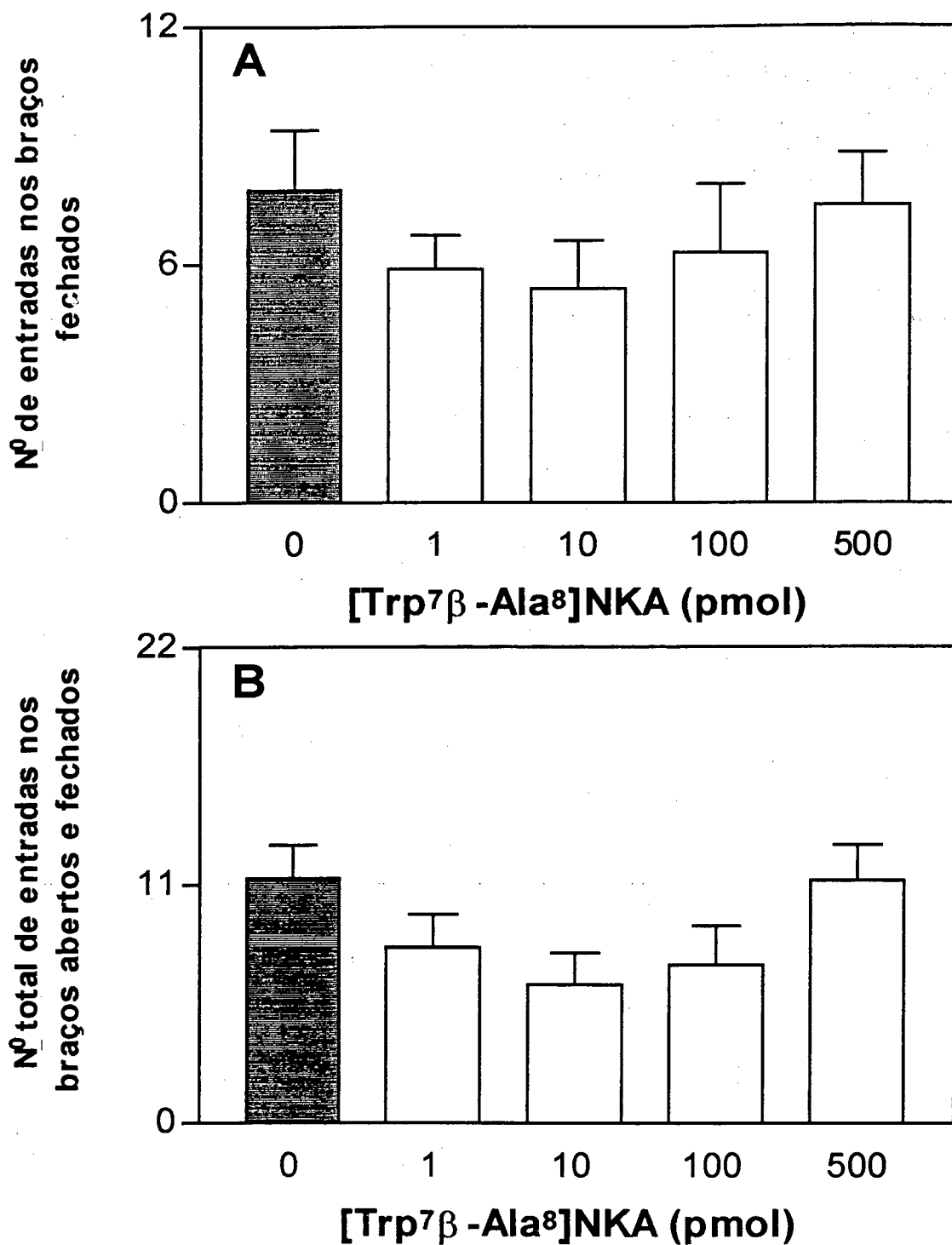


Figura 10 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

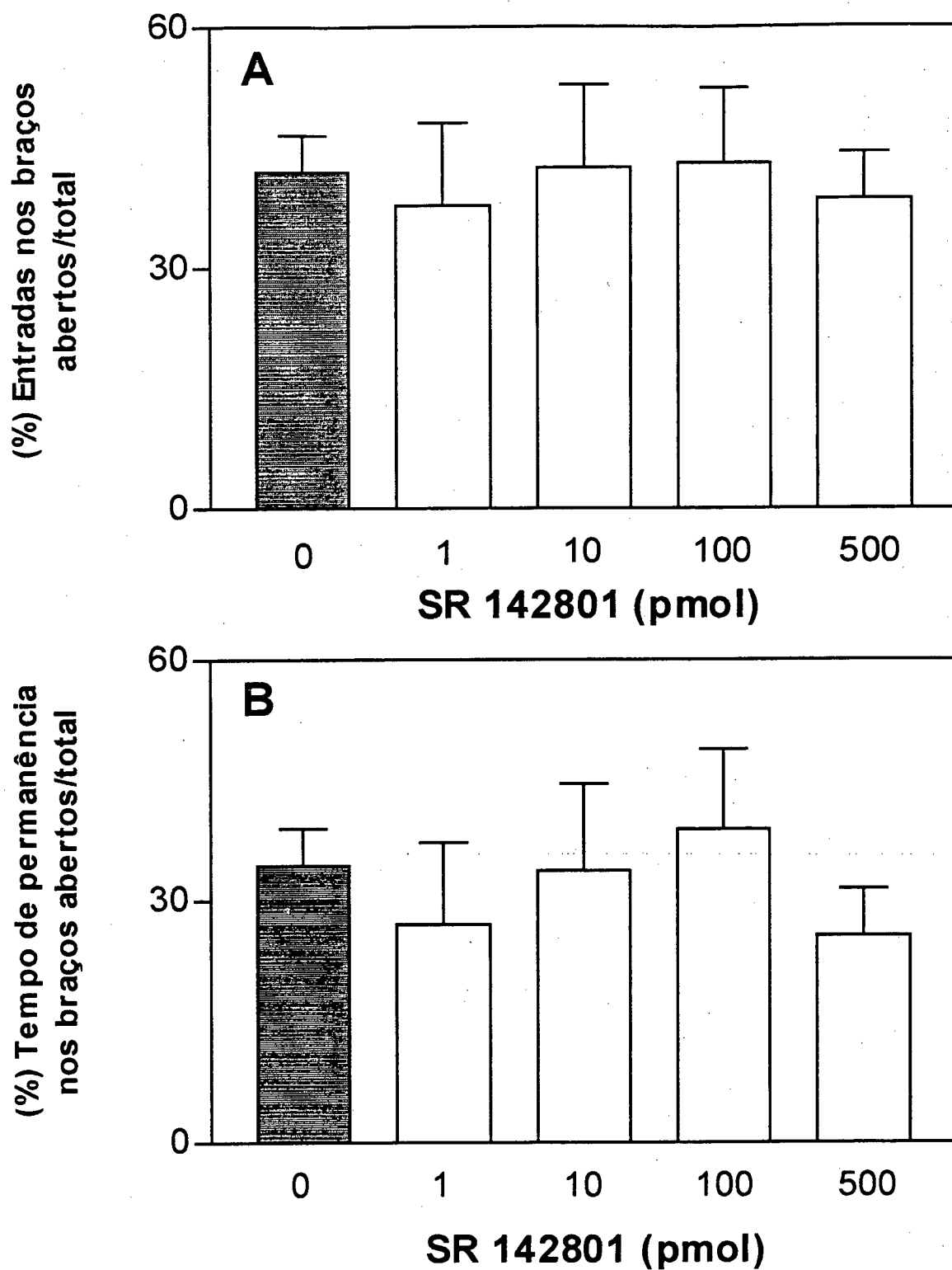


Figura 11 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SR 142801 sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

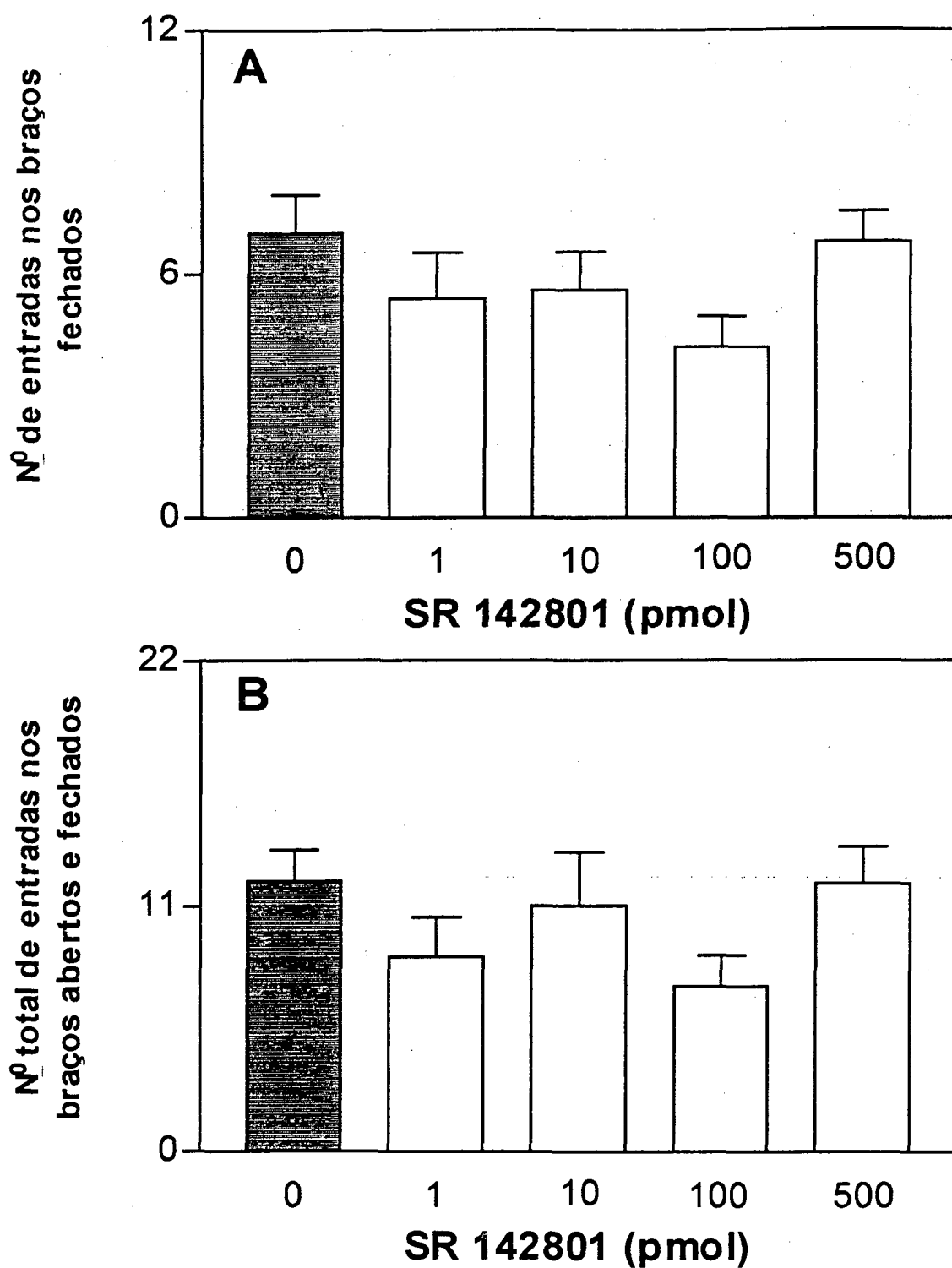


Figura 12 - Efeito da injeção i.c.v. de concentrações crescentes de SR 142801 sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

Efeito da co-injeção de agonistas e antagonistas do receptor NK₃

A co-injeção de senktide (10 pmol) e [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ (100 pmol) reverteu o efeito ansiolítico promovido pelo senktide administrado isoladamente, como pode ser verificado nos parâmetros frequência de entradas nos braços abertos e percentagem do tempo de permanência nesses braços, porém essa redução não alcançou, em relação ao tratamento isolado com SENK, significância estatística ($p > 0,05$). O número de entradas nos braços fechados, por sua vez, foi aumentado de forma significativa pela injeção conjunta de Trp7 com SENK em relação ao tratamento isolado com senktide ($p < 0,05$, alcançando nível semelhante ao do grupo controle. O número total de entradas nos braços abertos e fechados também alcançou nível semelhante ao do grupo controle quando a co-injeção foi realizada. Os dados são mostrados nas figuras 13 e 14 juntamente com os dados obtidos com a administração Individual das drogas, transpostos das figuras 5 e 6, 9 e 10.

A co-injeção i.c.v. de senktide (10 pmol) com SR 142801 (100 pmol), respectivamente agonista e antagonista seletivos do receptor neurocinérgico NK₃, reduziu significativamente a frequência de entradas dos animais nos braços abertos ($p < 0,05$), mostrando a reversão do efeito da administração isolada de senktide, mas não alterou significativamente a percentagem do tempo de permanência nesses braços ($p > 0,05$). O mesmo tratamento aumentou significativamente o número de entradas nos braços fechados ($p < 0,05$), mas não o número total de entradas em ambos os braços ($p > 0,05$), quando comparados àqueles resultados obtidos com a administração isolada de senktide, elevando-os a valores equivalentes aos dos animais controle. Os

resultados estão ilustrados nas figuras 15 e 16, juntamente com os dados obtidos com a administração individual de cada uma das drogas, transpostos das figuras 5 e 6, 11 e 12.

A injeção conjunta de $[\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ (100 pmol) com neurocinina B (10 pmol), respectivamente, antagonista e agonista do receptor neurocinérgico NK_3 , promoveu um aumento estatisticamente significativo da frequência de entradas e da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos ($F_{(3,36)} = 3,759$ e $F_{(3,36)} = 4,307$; $p < 0,05$) quando comparado aos animais injetados somente com Trp7, demonstrando a reversão da tendência a um efeito ansiogênico promovida por este antagonista. O número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas nos braços não foram significativamente alterados pela injeção conjunta de Trp7 com NKB ($F_{(3,36)} = 0,9119$ e $2,602$, respectivamente; $p > 0,05$). Para facilitar as comparações, os resultados estão ilustrados nas figuras 17 e 18, juntamente com os dados obtidos com a administração individual de cada droga, transpostos das figuras 7 e 8, 9 e 10.

Todas as co-injeções foram realizadas com a finalidade de verificar a especificidade da ação das drogas neurocinérgicas utilizadas, através do bloqueio dos receptores NK_3 por antagonistas seletivos.

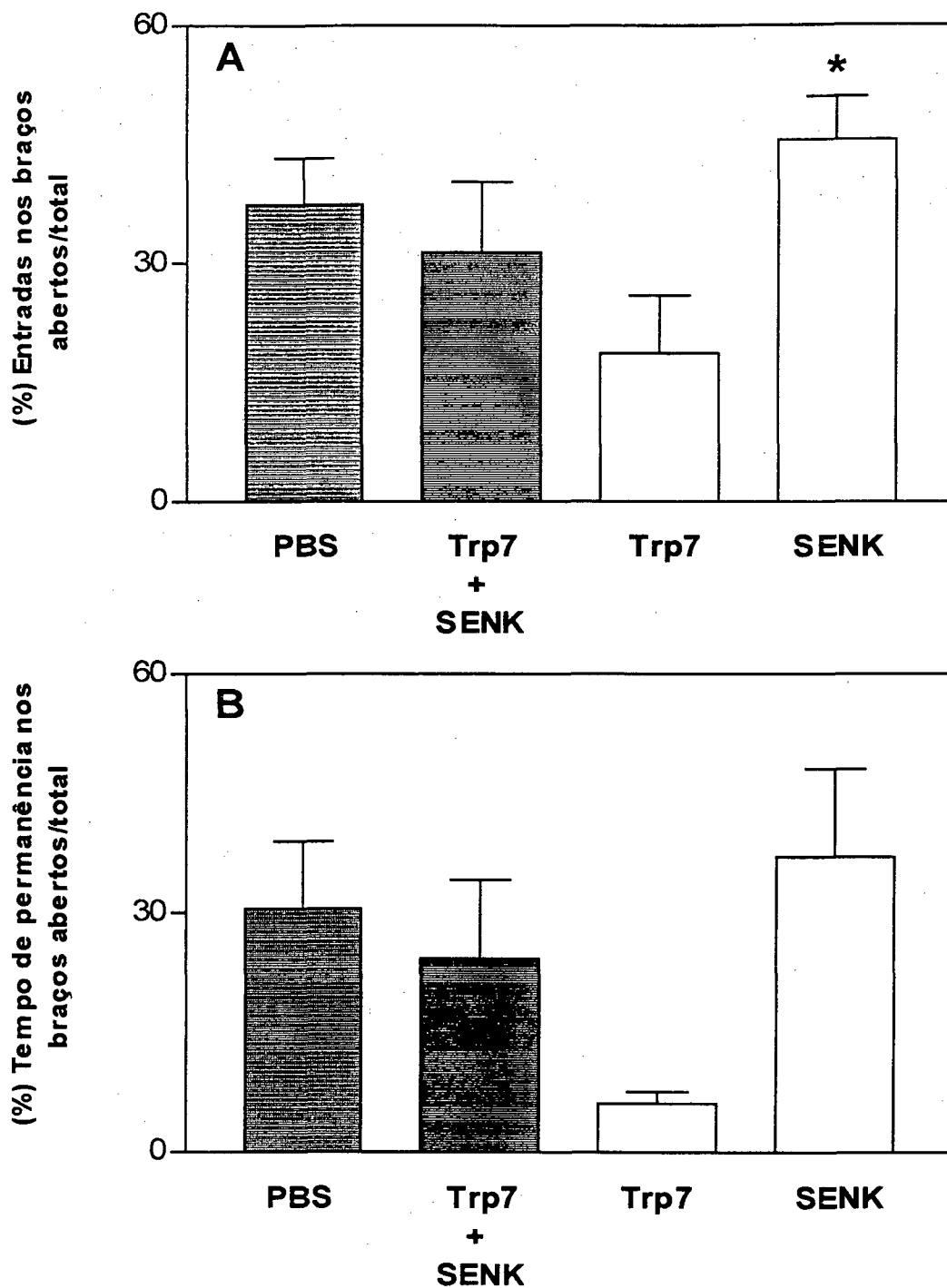


Figura 13 - Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide (SENK 10 pmol) e $[\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7 100 pmol) sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao valor obtido no respectivo grupo controle, empregando-se a análise de variância univariada (ANOVA) seguida do teste de Dunnett (A). Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

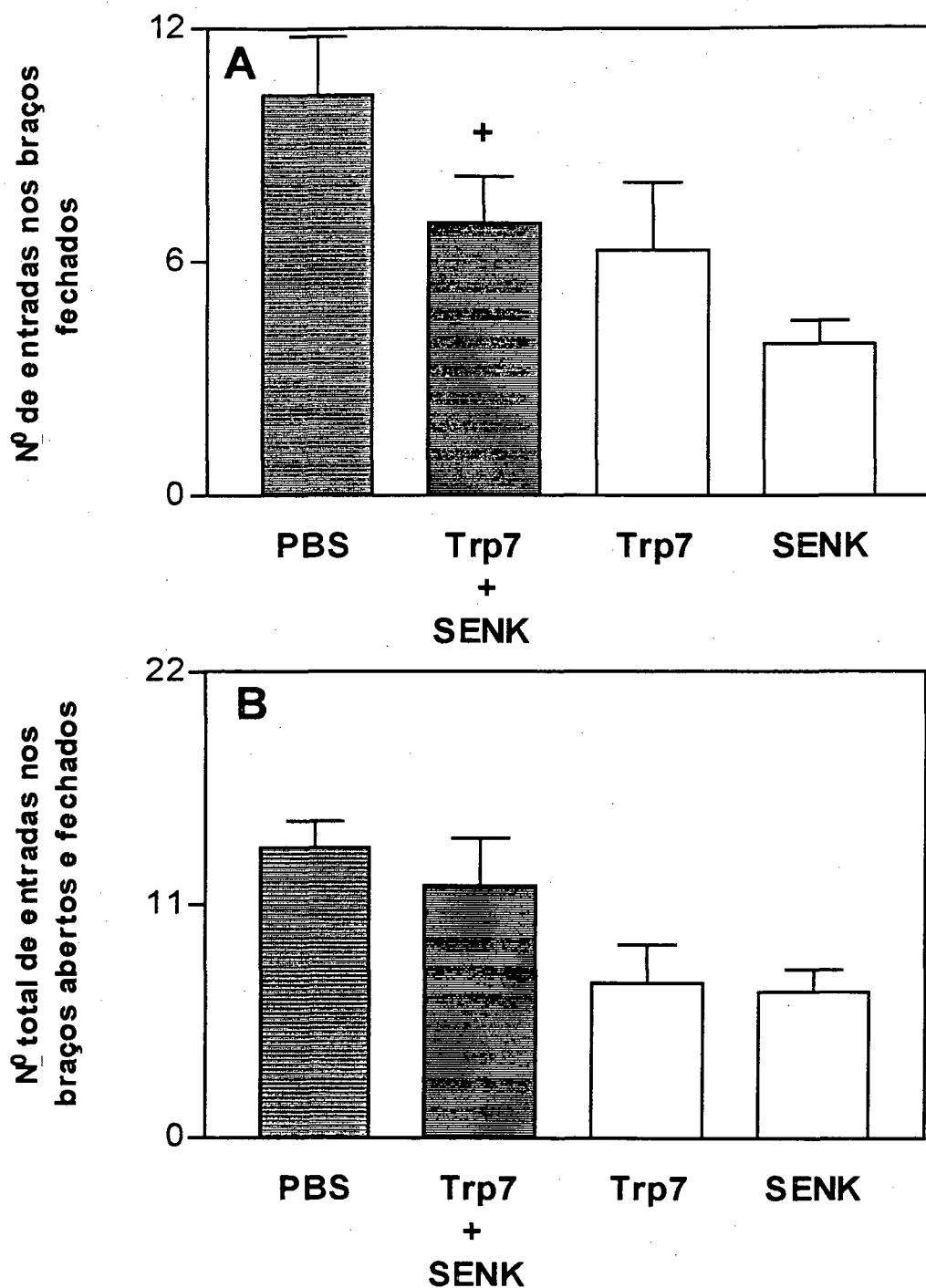


Figura 14 - Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide (SENK 10 pmol) e $[\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7 100 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. As cruzes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo tratado com SENK, empregando-se o teste "t" de Student não pareado bicaudal (A e B). Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

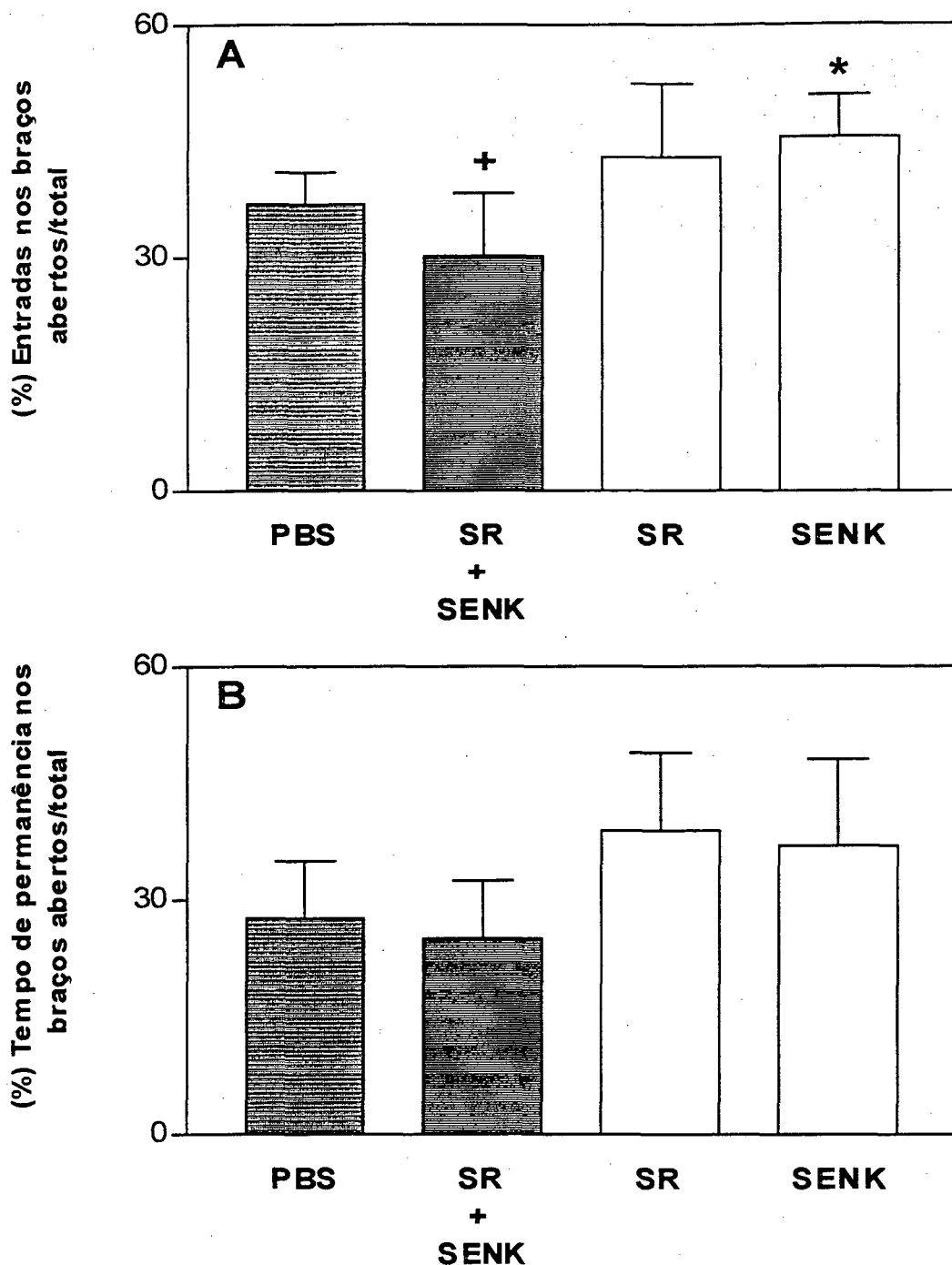


Figura 15 - Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide (SENK, 10 pmol) e SR 142801 (SR, 100 pmol) sobre a freqüência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. As colunas representam a média dos resultados e as barras verticais os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle, empregando-se a análise de variância univariada (ANOVA) seguida do teste de Dunnett (A e B); as cruces, diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado com SENK, empregando-se o teste "t" de Student não pareado bicaudal (A). Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

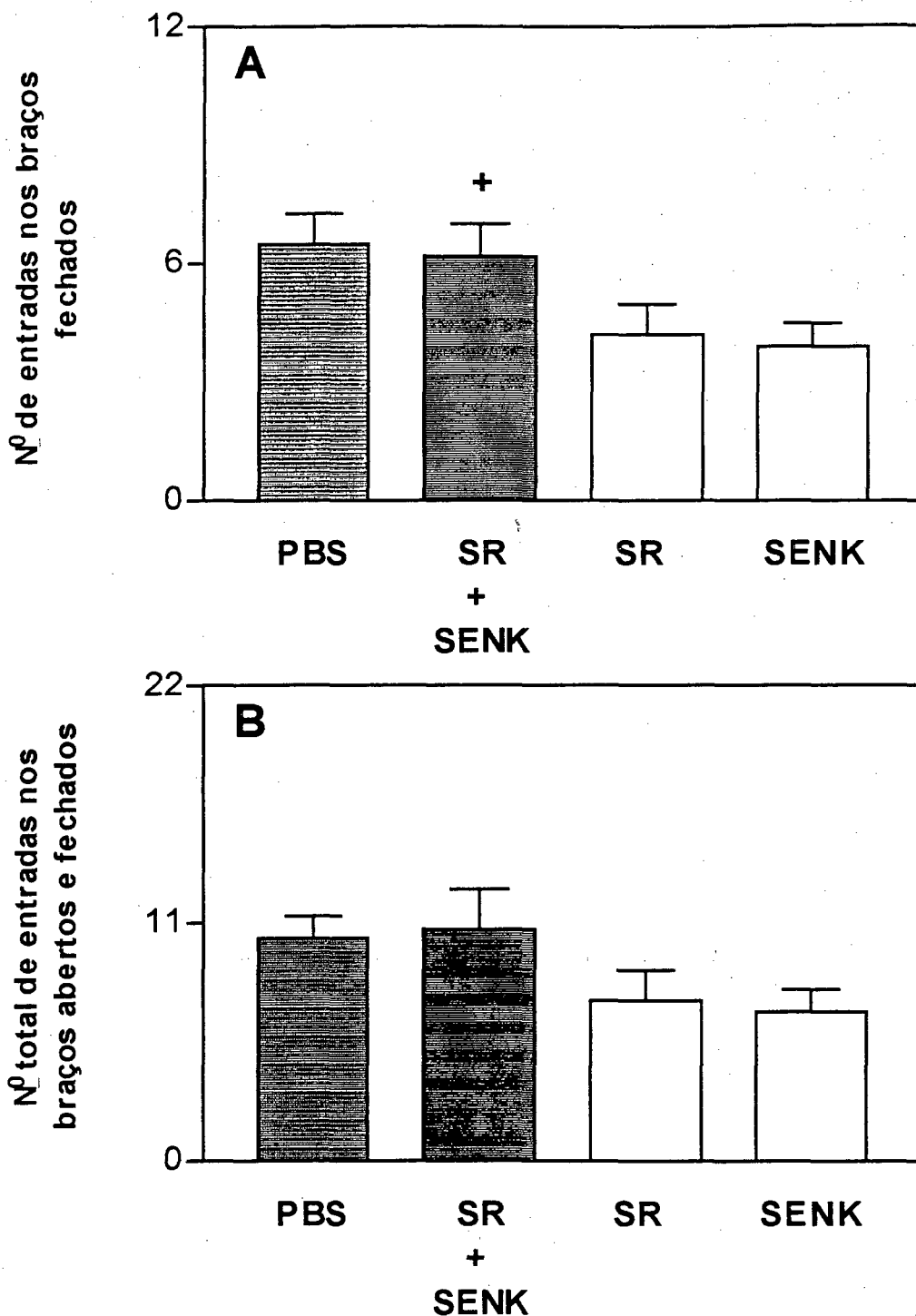


Figura 16 - Efeito da co-injeção i.c.v. de senktide (SENK, 10 pmol) e SR 142801 (SR, 100 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (A + F; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. As cruzes denotam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo tratado com senktide, empregando-se o teste "t" de Student não pareado bicaudal (A). Número de animais empregados em cada experimento = 7 - 10.

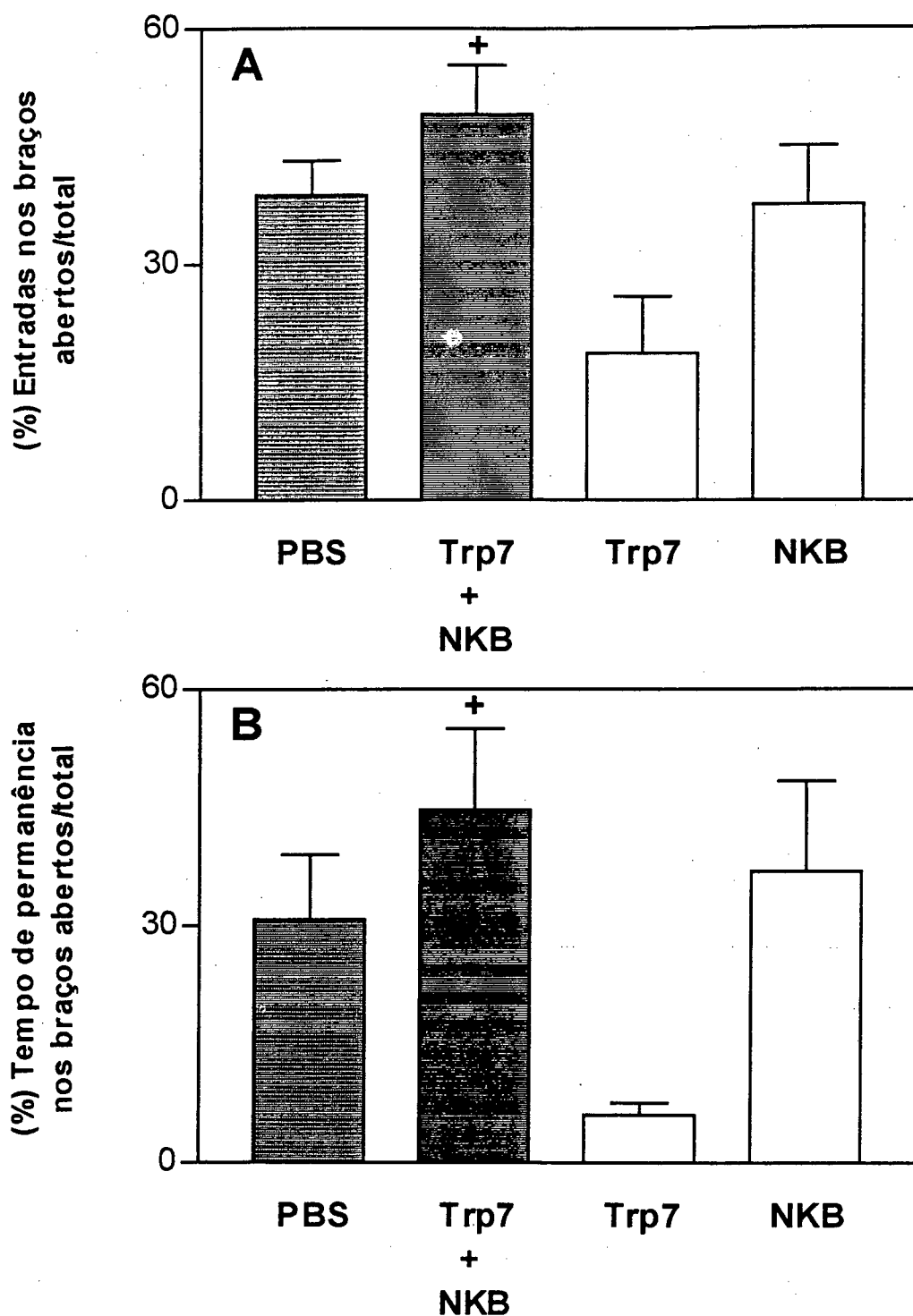


Figura 17 - Efeito da co-injeção i.c.v. de neurocinina B (NKB, 10 pmol) e $[\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7, 100 pmol) sobre a freqüência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. As cruzes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao valor obtido no grupo controle (PBS) e no grupo tratado com Trp7, empregando-se o teste "t" de Student não pareado bicaudal (A e B). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

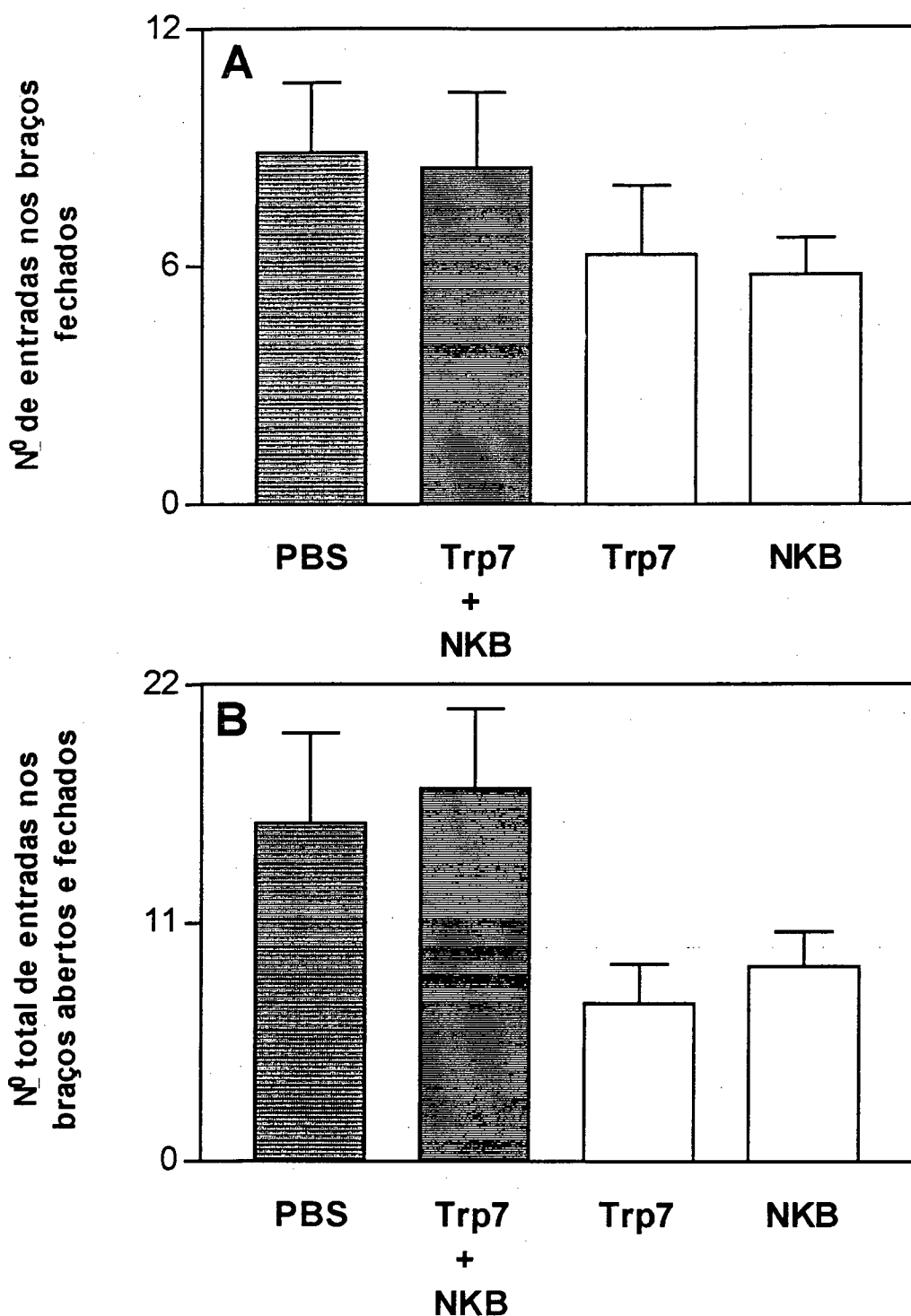


Figura 18 - Efeito da co-injeção i.c.v. de neurocinina B (NKB, 10 pmol) e $[\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8]\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7, 100 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

Influência do tratamento prévio com naloxona sobre a ação de agonistas ou antagonistas do receptor NK₃

O tratamento prévio dos camundongos com naloxona (2 mg/kg; i.p.) aumentou significativamente a frequência de entradas ($F_{(3,36)} = 7,145$; $p < 0,05$) e a percentagem do tempo de permanência ($F_{(3,36)} = 20,067$; $p < 0,05$, figura 19) nos braços abertos dos animais tratados com senktide (grupo NXL/SENK), em relação ao grupo de animais controle (SAL/PBS). O mesmo tratamento promoveu, também, um aumento significativo da percentagem do tempo de permanência nos braços fechados quando comparado aos animais tratados com SAL/SENK ($p < 0,05$), potencializando o efeito do tipo ansiolítico do senktide. Em contrapartida, o tratamento prévio com naloxona diminuiu, de modo estatisticamente significativo, o número de entradas destes animais nos braços fechados ($F_{(3,36)} = 5,552$; $p < 0,05$, figura 20), em relação aos animais controle (SAL/PBS).

O tratamento prévio com naloxona promoveu o aumento da frequência de entradas e da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos, além do número total de entradas em ambos os braços, dos animais tratados com [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ (grupo NXL/Trp7; $F_{(3,36)} = 4,460$, $3,261$ e $4,125$, respectivamente; $p < 0,05$, figuras 21 e 22), revertendo o efeito tipo ansiogênico do antagonista peptídico (Trp7). O mesmo tratamento prévio, seguido da administração i.c.v. de SR 142801 promoveu uma diminuição acentuada, porém não estatisticamente significativa, da frequência de entradas e da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos ($p > 0,05$; figura 23), quando comparados com o grupo de animais tratados com SAL/PBS. Da mesma forma o número de entradas nos braços fechados e o

número de entradas totais em ambos os braços (braços abertos e braços fechados) não foram significativamente alterados em relação ao grupo SAL/PBS (figura 24).

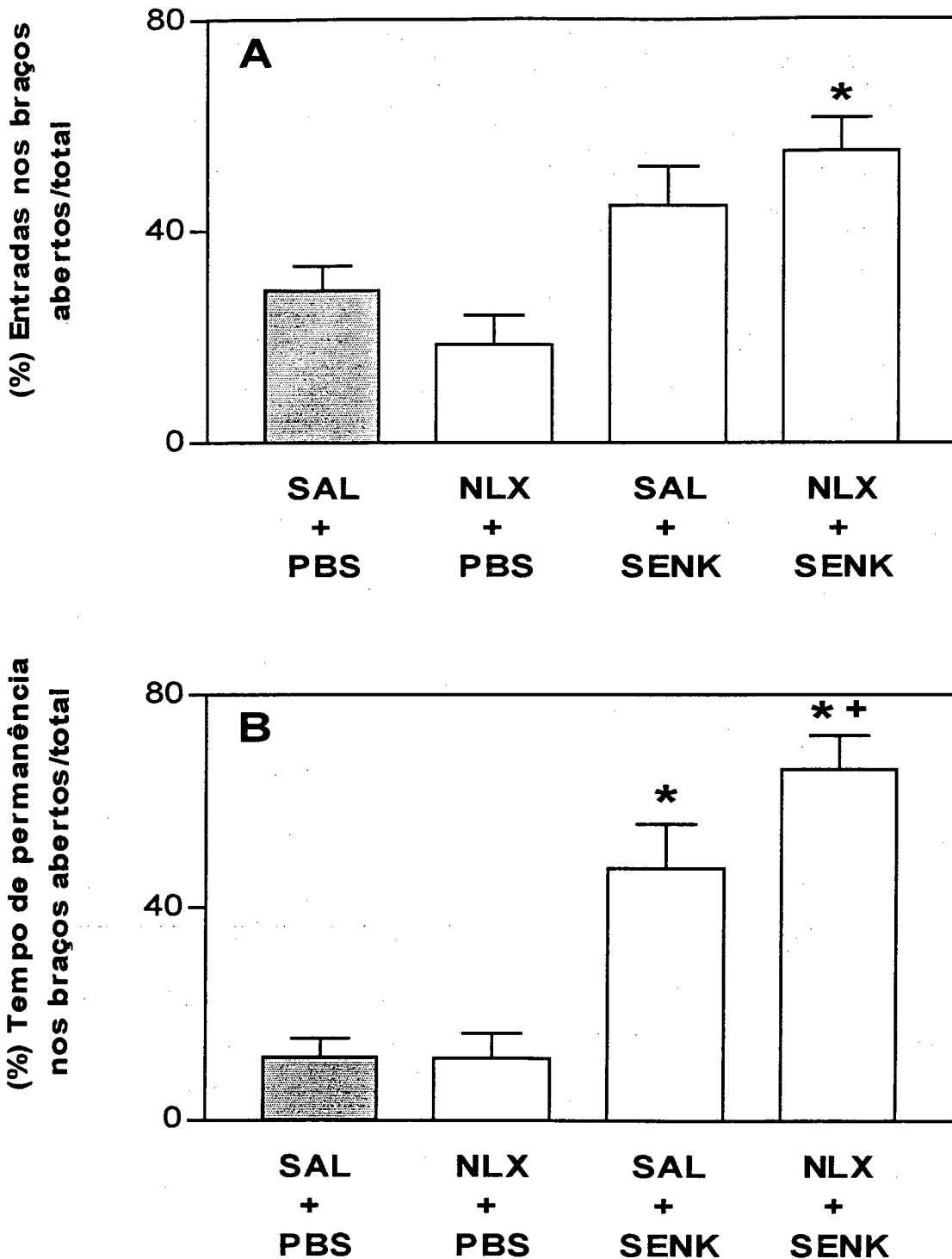


Figura 19 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de senktide (SENK, 10 pmol) sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Asteriscos e cruzes denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo SAL/PBS e SAL/SENK, respectivamente, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Student Newman-Keuls (A e B). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

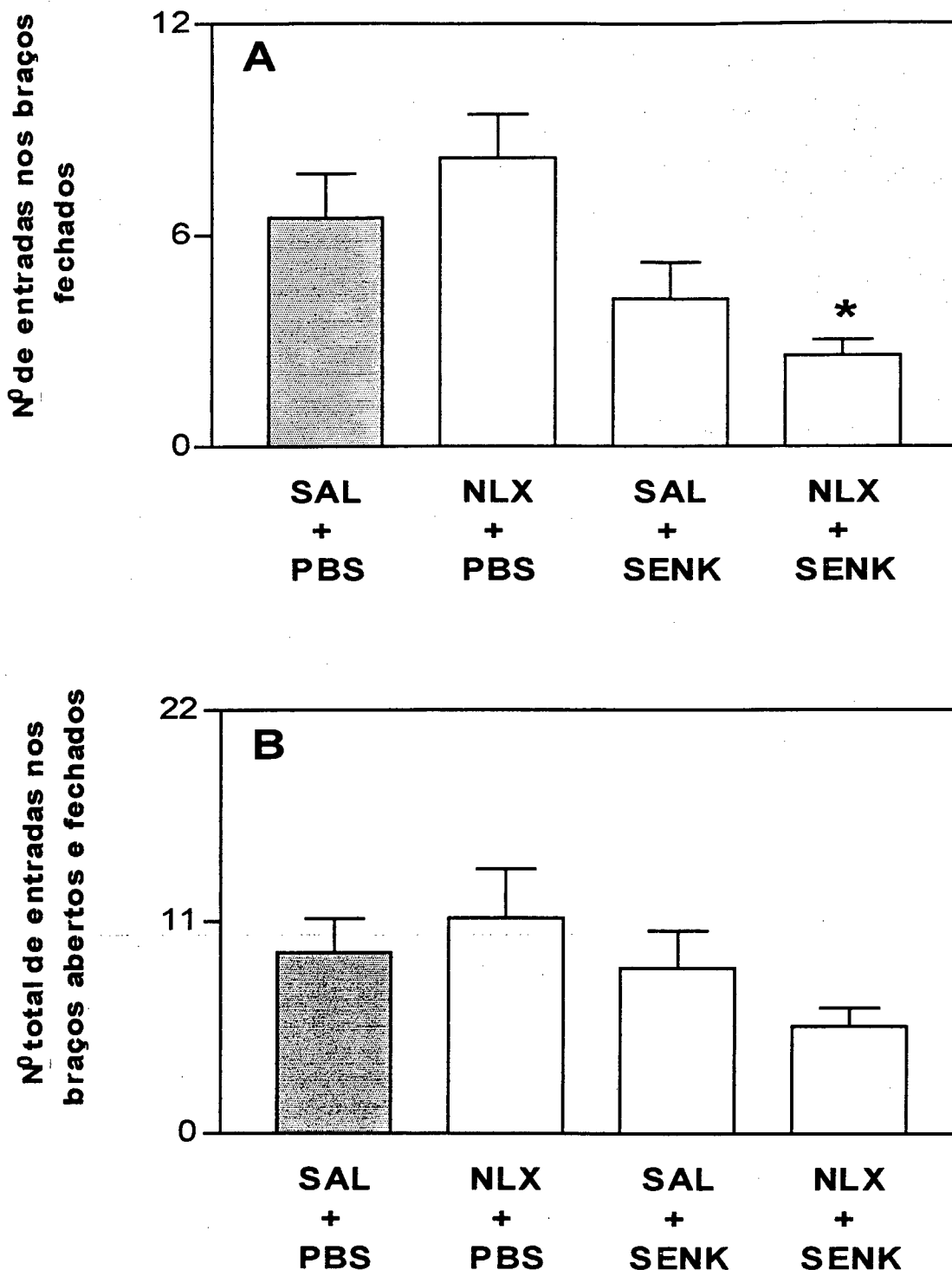


Figura 20 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de senktide (SENK, 10 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo SAL/PBS empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Student Newman-Keuls (A). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

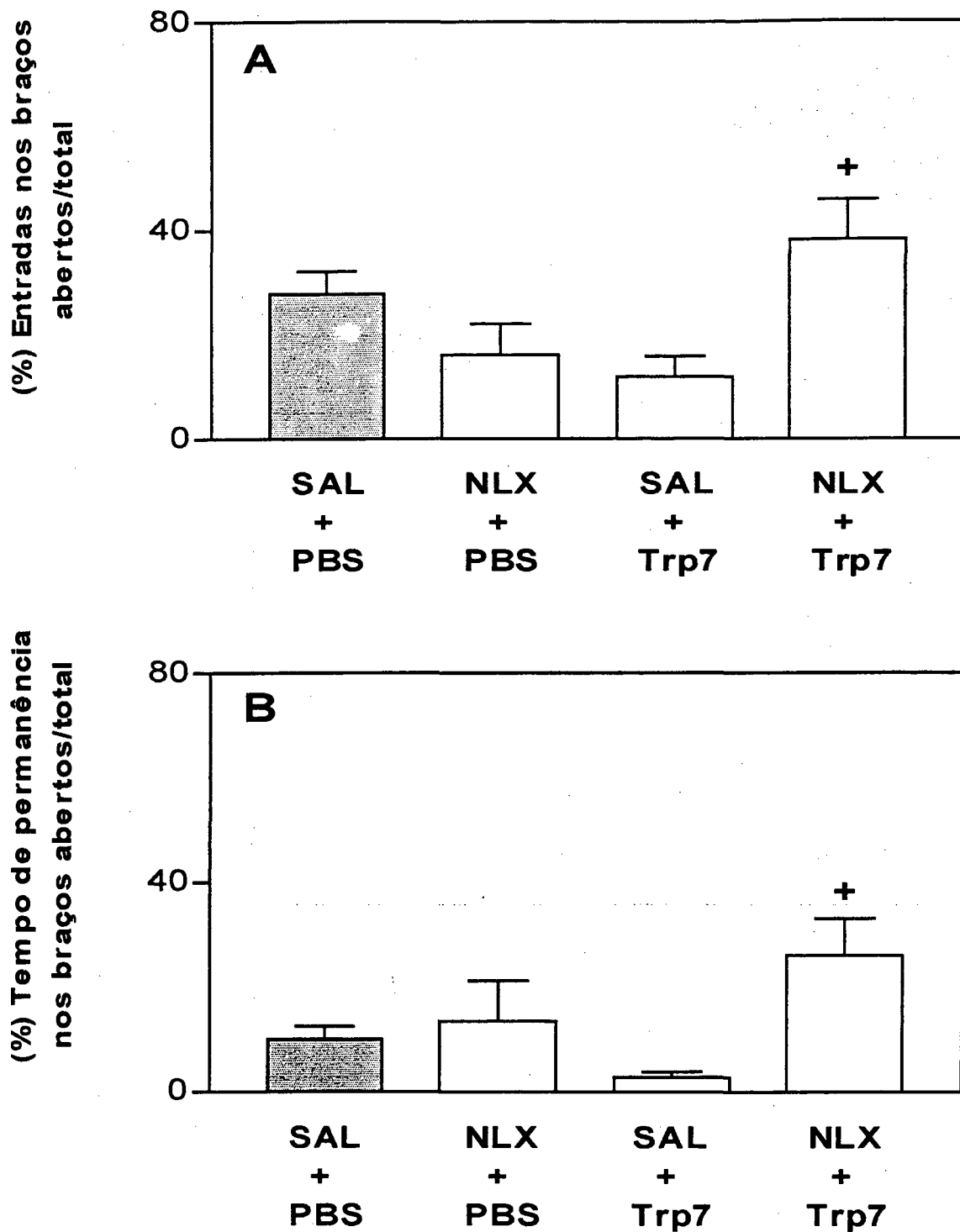


Figura 21 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de $\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7, 100 pmol) sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. As cruces denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao SAL/Trp7 empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Student Newman-Keuls (A e B). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

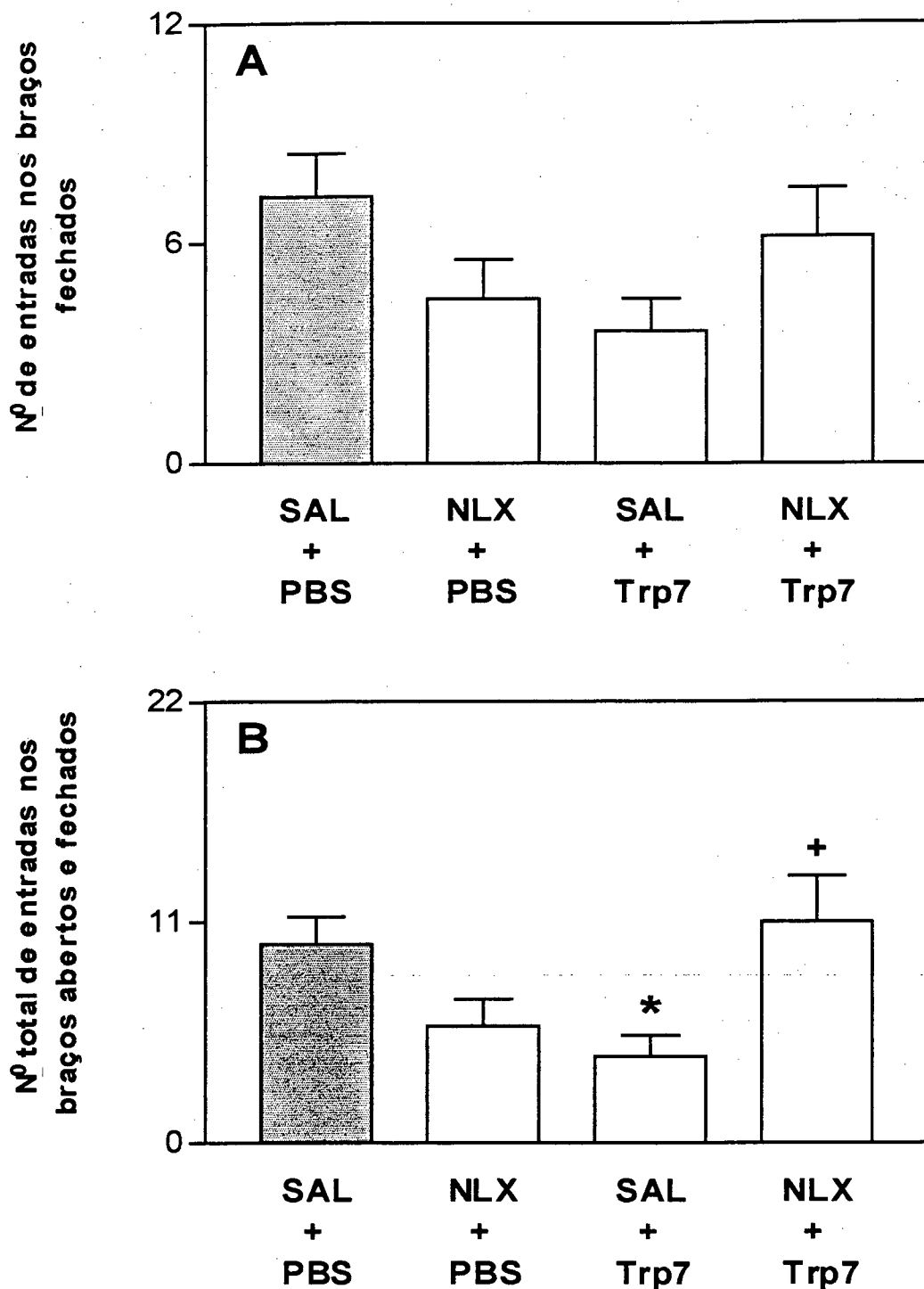


Figura 22 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de $\text{Trp}^7\beta\text{-Ala}^8\text{NKA}_{(4-10)}$ (Trp7, 100 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo SAL/PBS e as cruzes em relação ao grupo SAL/Trp7, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Student Newman-Keuls (B). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

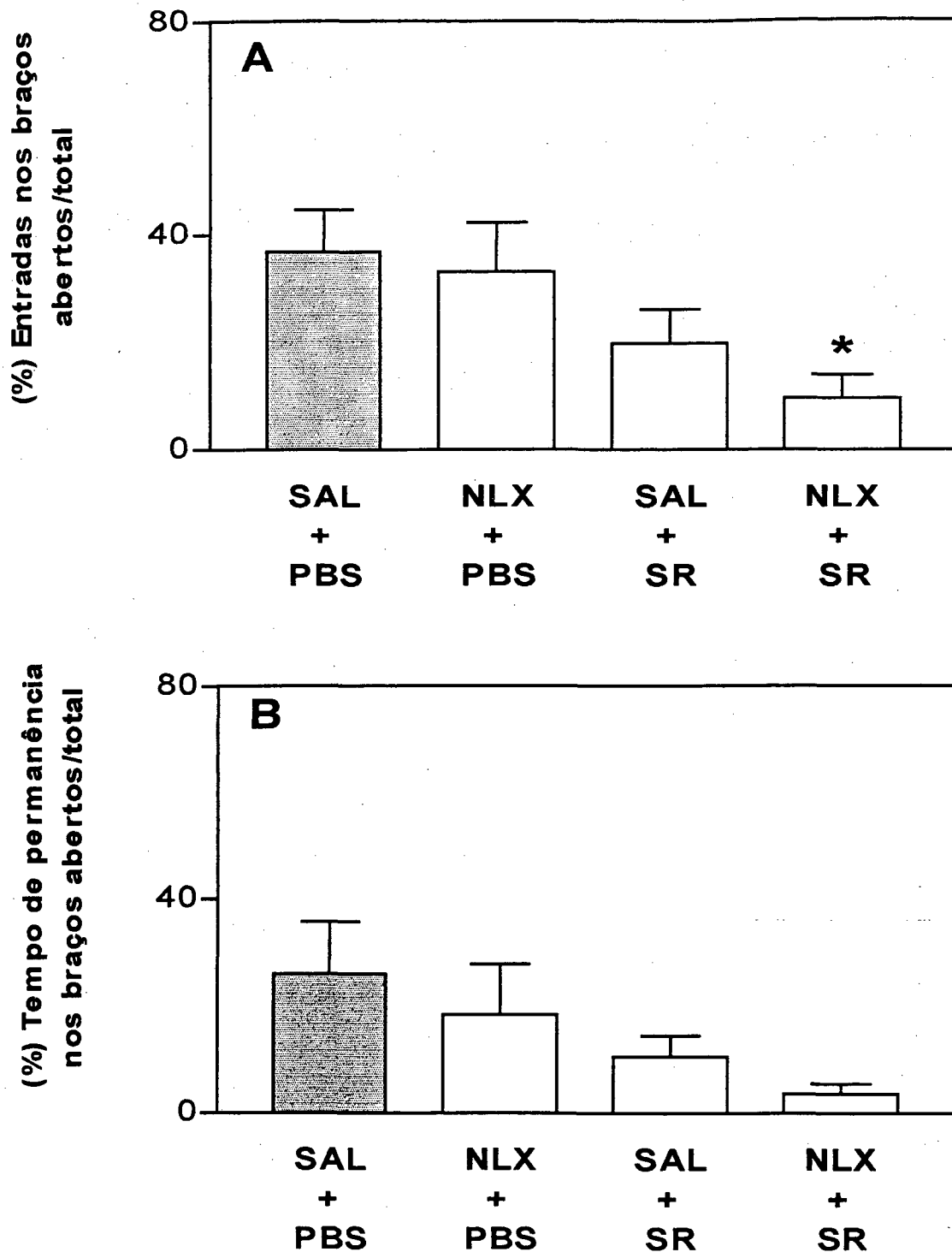


Figura 23 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de SR 142801 (SR, 100 pmol) sobre a frequência de entradas (A) e o tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo SAL/PBS, empregando-se a análise de variância ANOVA univariada seguida do teste de Student Newman-Keuls (A). Número de animais empregados em cada experimento = 10.

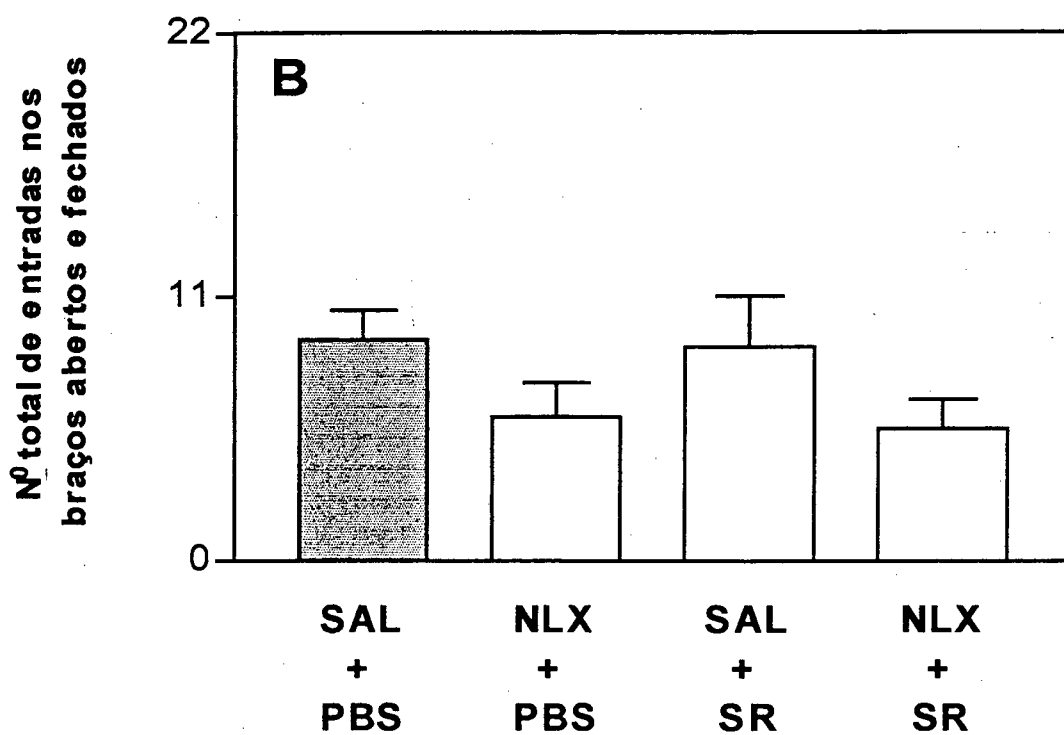
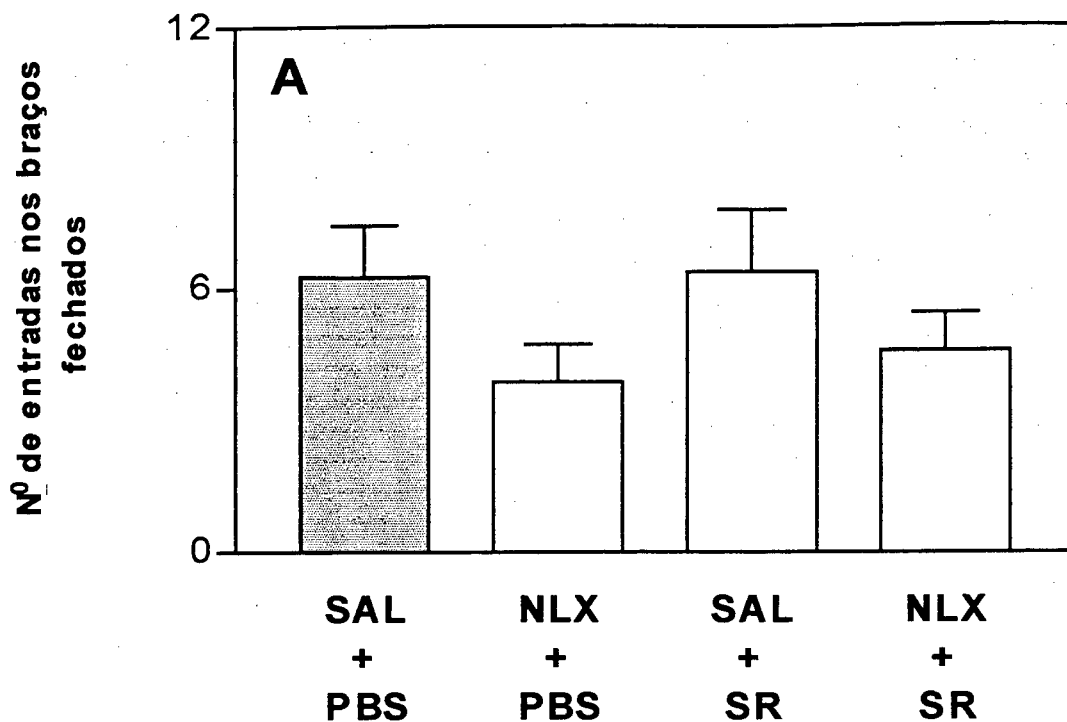


Figura 24 - Influência do tratamento prévio com naloxona (NLX, 2 mg/kg; i.p.) no efeito da injeção i.c.v. de SR 142801 (SR, 100 pmol) sobre o número de entradas nos braços fechados (A) e o número total de entradas (braços abertos + fechados; B) do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os e.p.m. Número de animais empregados em cada experimento = 10.

Avaliação da atividade locomotora em caixas de movimentação espontânea

A injeção i.c.v. de 100 pmol de neurocinina B, senktide, SR 142801, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ ou a injeção i.p. de 2 mg/kg de naloxona não produziram alterações estatisticamente significativas na atividade locomotora dos animais aos 5, 10 e 15 min após os tratamentos, ($F_{(5,54)} = 0,5297; 1,590; 3,125$, respectivamente; $p > 0,05$), quando comparados aos animais tratados com veículo (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos na atividade locomotora de camundongos. Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	Dose (pmol)	Número de cruzamentos		
		5 min	10 min	15 min
PBS	0	90,80 ± 16,60	81,10 ± 10,64	67,00 ± 12,66
NKB	100	84,10 ± 16,33	94,20 ± 16,37	105,80 ± 24,02
SENK	100	74,10 ± 23,54	78,30 ± 13,97	72,30 ± 10,43
SR 142801	100	80,80 ± 16,14	102,20 ± 23,53	124,90 ± 29,49
Trp7	100	107,70 ± 18,9	72,60 ± 8,59	58,20 ± 8,64
NLX	2 mg/kg	76,00 ± 7,16	50,50 ± 4,61	42,40 ± 6,84

PBS = controle

NLX = naloxona

NKB = neurocinina B

SENK = senktide

SR = SR 142801

Trp7 = [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎.

Avaliação da coordenação motora no teste do rota-rod

Nenhum dos agonistas ou antagonistas do receptor neurocinérgico NK₃ na dose de 100 pmol administrados centralmente, nem o antagonista opióide naloxona (2 mg/kg) administrado sistemicamente, produziu alteração estatisticamente significativa no tempo de permanência na barra giratória ($F_{(5,54)} = 1,081$; $p > 0,05$) ou no número de quedas dos animais do rota-rod ($F_{(5,54)} = 1,185$; $p > 0,05$), quando comparados aos animais tratados com veículo (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito dos diferentes tratamentos na performance de camundongos no teste do rota-rod. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	Dose (pmol)	Número de quedas	Tempo de permanência (s)
PBS	0	0,30 \pm 0,15	58,30 \pm 0,87
NKB	100	0,10 \pm 0,10	59,30 \pm 0,70
SENK	100	0,00 \pm 0,00	60,00 \pm 0,00
SR 142801	100	0,00 \pm 0,00	60,00 \pm 0,00
Trp7	100	0,40 \pm 0,31	58,10 \pm 1,51
NLX	2 mg/kg	0,10 \pm 0,10	59,50 \pm 0,50

PBS = controle

NLX = naloxona

NKB = neurocinina B

SENK = senktide

SR = SR 142801

Trp7 = [Trp⁷ β -Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho observamos que o agonista sintético seletivo para o receptor NK₃, senktide, promove um aumento no número de entradas dos animais no labirinto em cruz elevado, apresentando uma curva em "sino", isto é, esse efeito do tipo ansiolítico é observado nas doses intermediárias (10 e 100 pmol), enquanto na menor dose (1 pmol) e na maior (500 pmol) não há quaisquer diferenças no comportamento dos animais tratados em relação aos controle. Em contraste, o agonista seletivo natural desse receptor, a neurocinina B, não altera os parâmetros comportamentais registrados nesse modelo experimental.

Levando-se em consideração que drogas ansiolíticas (diazepam, clordiazepóxido e o etanol) aumentam o tempo de permanência dos animais nos braços abertos e/ou o percentual de entradas nesses mesmos braços, e que, ao contrário, drogas ansiogênicas de referência (anfetaminas, cafeína, picrotoxina e pentilenotetrazol) diminuem a exploração dos braços abertos (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Cruz *et al.*, 1994; Rodgers e Cole, 1994; Teixeira *et al.*, 1996), a validação farmacológica do LCE é plenamente aceita pelo fato de haver uma correlação entre os efeitos experimentais e os clínicos dessas drogas nesse modelo. Podemos, então, propor uma ação do tipo ansiolítica para o senktide, uma vez que este composto aumentou significativamente a frequência de entradas e a percentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos. Esses dados parecem ser devidos a uma ação específica, já que esse agonista não altera a atividade motora dos animais, atividade esta avaliada pelo número de

entradas nos braços fechados, como proposto por Rodgers *et al.* (1997) e confirmada na caixa de movimentação espontânea, além de não modificar a performance motora dos animais no teste do rota-rod. Estes dados concordam com aqueles obtidos por Teixeira (1995a e b), que demonstrou um efeito do tipo ansiolítico desse agonista do receptor neurocinérgico NK₃, o senktide, utilizando o mesmo paradigma experimental.

Por outro lado, a NKB, um agonista natural do receptor NK₃, não promoveu alteração estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros analisados no teste do LCE, ou seja, não alterou o comportamento dos animais no LCE. A esse respeito se fazem necessárias algumas considerações: primeiramente, em mamíferos, a maioria das respostas biológicas das principais neurocininas endógenas são mediadas por três tipos de receptores farmacologicamente definidos (NK₁, NK₂ e NK₃). Assim sendo, há a obtenção de determinado efeito de drogas neurocinérgicas, sobretudo as de natureza peptídica, em apenas uma dose da curva; é comum também a obtenção de curvas em forma de "sino" ou, até mesmo, a falta de efeito quando tais drogas são às vezes utilizadas. Tudo isso deve-se ao fato dessas drogas agirem potencialmente em mais de um tipo de receptor, no caso neurocinérgico, mesmo em concentrações micromolares, já que possuem relativa seletividade sem contudo apresentarem alta especificidade em relação aos diferentes receptores (Seabrook *et al.*, 1995). Assim, um efeito obtido com um agonista sintético, como o senktide, com alta seletividade pelo receptor NK₃, é passível de não ser observado utilizando-se agonistas naturais que possuam baixa seletividade pelos diferentes receptores, como a NKB.

Desta forma, é possível que em decorrência da baixa seletividade da

NKB pelo receptor NK₃, a interação desta neurocinina com receptores NK₁ e/ou NK₂ possa mascarar os efeitos produzidos pela estimulação do receptor NK₃, visto que os efeitos mediados por esses outros receptores são inversos aos mediados pelo receptor em questão, conforme o proposto por Teixeira (1995) e Teixeira *et al.* (1995) e como demonstram os resultados aqui descritos com o uso do senktide. Uma segunda possibilidade, que não pode ser descartada, é a rápida metabolização da NKB, em relação à do senktide, pela sua natureza peptídica. Contudo essa possibilidade é pouco provável, pois os metabólitos da reação enzimática são biologicamente ativos, sendo a degradação da terminação NH-2 das neurocininas é considerada como um processo primário de ativação das mesmas (Regoli *et al.*, 1994).

Baseado na aceitação do LCE como um modelo experimental de ansiedade validado, aonde drogas ansiolíticas promovem um aumento na frequência de entradas e/ou no tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que as drogas ansiogênicas promovem efeito inverso, isto é, uma redução dessas medidas, é possível ainda, no presente trabalho, propor uma ação do tipo ansiogênica para o antagonista peptídico NK₃, [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎. Isso é possível porque a administração central desse antagonista promove uma diminuição significativa, em relação ao grupo controle, em ambos os parâmetros, entrada e tempo dispendido nos braços abertos do LCE, resultados estes semelhantes aos obtidos com drogas ansiogênicas de referência descritos na literatura. Considerando-se ainda que a injeção i.c.v. de [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ promoveu efeitos do tipo ansiogênicos, sem alterar a atividade e a coordenação motora dos camundongos, é possível propor que esses efeitos sejam específicos.

Por outro lado, a administração de SR 142801, antagonista não-peptídico NK₃, não produziu qualquer alteração comportamental nos animais avaliados no LCE, em comparação aos animais do grupo controle. O contraste entre as ações dos dois antagonistas aqui empregados, o Trp7 e o SR, pode também ser explicada pela primeira hipótese discutida para o agonista de natureza peptídica, a NKB. Assim, os resultados obtidos com o Trp7, antagonista peptídico do receptor neurocinérgico NK₃, que quando administrado isoladamente produziu nos animais um efeito do tipo ansiogênico, poderia ocorrer pela ação desta droga em outro(s) receptor(es) neurocinérgicos (NK₁ e/ou NK₂), considerando-se, mais uma vez, a ocorrência de respostas inversas obtidas pela estimulação de NK₁/NK₂ ou NK₃ (Teixeira, 1995; Teixeira *et al.*, 1995, 1996; e o presente trabalho). A este respeito, Drapeau *et al.* (1990) relatam que modificações químicas em sequências parciais como NKA₍₄₋₁₀₎, em particular a substituição de Val7 por um resíduo aromático (Trp, p.e.) e a extensão do peptídeo na posição 8, obtido com β -Ala, origina compostos com fraca atividade agonística nos receptores NK₁ e NK₂ e alguns efeitos também no receptor NK₃. Este fato explicaria o efeito do tipo ansiogênico do Trp7 como a expressão da somatória das ações desse antagonista nos diferentes tipos de receptores neurocinérgicos, enquanto que a ausência de efeito do antagonista não peptídico, SR, é perfeitamente compreensível e até mesmo esperada para uma droga sintética seletiva com este perfil farmacológico.

Com o objetivo de verificar a especificidade dos efeitos observados com a administração isolada de cada droga, mais objetivamente falando da injeção i.c.v. dos agonistas, foi procedida a co-injeção dos agonistas (10 pmol) com os antagonistas (100 pmol) do receptor NK₃. Isto é, para certificar se o efeito do

tipo ansiolítico dos agonistas, em especial, do senktide (que apresentou um efeito evidente), seria bloqueado pelos antagonistas seletivos peptídicos (que produzem efeito do tipo ansiogênico "per se") e não peptídico (sem efeito próprio), essas drogas foram injetadas conjuntamente, num volume total (agonista + antagonista) de 5 μ l.

O resultado das co-injeções de SR ou Trp7 com SENK, foi a reversão da ação do tipo ansiolítica do SENK. Isto nos mostra a especificidade deste agonista em relação ao receptor NK₃, já que ambas as drogas (SR e Trp7) são antagonistas preferenciais do receptor neurocinérgico NK₃, embora, como já discutido anteriormente, o Trp7, possa ter uma ação agonística (promovendo um do tipo efeito ansiogênico), pela sua natureza peptídica, nos outros tipos de receptores neurocinérgicos, NK₁ e NK₂, que se contraporia ao efeito do tipo ansiolítico decorrente da estimulação do receptor NK₃, pelo agonista senktide. Este fato, no entanto, não invalida a sugestão aqui colocada de que o efeito do tipo ansiolítico dessa estimulação parece ser específico, pois esse efeito é também revertido pelo antagonista sintético não peptídico, SR, que não apresenta atividade "per se". Além disso, quando administramos conjuntamente Trp7 + NKB constatamos a reversão do efeito tipo ansiogênico promovido pelo primeiro composto, Trp7. É preciso lembrar que o NKB administrado isoladamente não promoveu qualquer efeito nos parâmetros clássicos do LCE. A esse respeito, Drapeau *et al.* (1990) relatam que tais compostos, originados pela substituição da Val7 e pela extensão na posição 8 de sequências parciais com NKA₍₄₋₁₀₎, como ocorre com o Trp7, exercem potente antagonismo contra a NKB no receptor NK₃ na veia porta isolada de rato, uma preparação útil no estudo desse tipo de receptor neurocinérgico. A atividade antagonística é mais

alta quando o Trp⁷ é usado na posição 7 de [β -Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, como é o caso do [Trp⁷ β -Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ utilizado neste trabalho. E mais ainda, esses autores mostram que este antagonismo além de ser seletivo para NKB ou [MePhe⁷]NKB parece ser também específico.

A influência das neurocininas na ansiedade experimental foi anteriormente descrita por diversos autores, como colocado na Introdução do presente trabalho, Teixeira (1995) e Teixeira *et al.* (1995, 1996) demonstraram uma ação tipo ansiogênica de agonistas neurocinérgicos NK₁ e NK₂ e a ação tipo ansiolítica de antagonistas desses mesmos receptores, em camundongos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. O presente trabalho confirma e estende os achados a respeito, mostrando o envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na modulação da ansiedade experimental em camundongos avaliada no LCE, sugerindo para esse tipo de receptor um papel diametralmente oposto ao observado para os receptores NK₁ e NK₂, isto é, a estimulação de receptores NK₃ levando a um efeito do tipo ansiolítico, enquanto seu bloqueio pode promover efeitos do tipo ansiogênico.

O envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na modulação da ansiedade experimental parece bastante plausível frente aos resultados apresentados nessa dissertação por diversos motivos discorridos a seguir. O receptor NK₃ foi primeiramente encontrado no SNC, sendo sua distribuição em tecidos periféricos bastante seletiva. Estudos com radioligantes, autoradiográficos e de hibridização *in situ* têm demonstrado a presença de receptores NK₃ no SNC de ratos, camundongos e cobaias (Helke *et al.*, 1990), além do homem (Tian *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1995, para revisão ver Giardina e Raveglia, 1997). A distribuição de sítios NK₃ mostram densas

concentrações no córtex cerebral, na amígdala, no núcleo medial do septo e no hipotálamo, além de outras áreas (Mussap *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1996). Algumas dessas áreas estão sabidamente envolvidas nos mecanismos de gênese e/ou controle do medo e da ansiedade. Certas áreas cerebrais têm sido repetidamente associadas com a ansiedade em diversos experimentos pré-clínicos e clínicos. Dados obtidos em neurocirurgias têm implicado a amígdala e o lobo frontal (Kuhar, 1986). Vários estudos comportamentais e farmacológicos têm envolvido o loco cerúleo, o trato septo-hipocampal, a amígdala, os corpos mamilares, os núcleos da rafe, a substância cinzenta periaquedutal e o córtex frontal (File *et al.*, 1979; Graeff, 1984; Gray, 1987; Davis, 1990; Motta *et al.*, 1995; Coimbra *et al.*, 1996; De Souza *et al.*, 1997). Essas indicações juntas dão uma visão razoável dos substratos neuroanatômicos chave da ansiedade, que inclui estruturas do sistema límbico (como a amígdala e o hipocampo) e outras áreas que podem modular as regiões límbicas (como o córtex frontal). Na verdade, se propõe que os sistemas neurais recrutados em diferentes condições de ansiedade podem diferir na dependência da condição em si, dando suporte ao fato de existirem diferentes formas clínicas de ansiedade. Isto tem uma importante implicação na descoberta de novos tratamentos para a ansiedade (Pratt, 1993).

A este respeito, é interessante nossa observação de que o pré-tratamento com a naloxona, um antagonista opióide, potencializa os efeitos ansiolíticos produzidos pelo senktide, agonista sintético seletivo NK₃, e reverte os efeitos ansiogênicos promovidos pelo [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, antagonista peptídico seletivo do mesmo receptor. Por outro lado, o tratamento prévio dos animais com naloxona não interfere na ação do SR 142801, antagonista

sintético não peptídico do receptor NK₃, que “per se” não promoveu qualquer efeito. É importante lembrar que o tratamento isolado com o antagonista opióide não produziu qualquer efeito sobre o comportamento dos animais avaliados no LCE. Essa aparente interação entre os dois sistemas de neurotransmissores, o neurocinérgico e o opióide, pode ser decorrente de uma interação real, e não apenas a expressão comportamental da somatória de seus efeitos individuais, em alguma parte do substrato neural das reações de defesa, já que ambos os sistemas apresentam justaposição na distribuição de suas fibras, além da coexistência de neurocininas e opióides em várias estruturas (Cuello *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1994; Rosén *et al.*, 1995), como colocado na Introdução do presente trabalho. Essa possibilidade teria que ser investigada mais profundamente em futuros trabalhos experimentais. Uma outra alternativa para explicar essa possível interação decorre do fato de que é possível que haja um subtipo de receptor NK₃, que apresenta características de “binding” de receptores opióides, como descrito na Introdução desse trabalho. Nossos resultados mostrando uma interação entre os sistemas neurocinérgico e opióide ou, pelo menos, a influência do sistema opióide sobre a modulação exercida pelo receptor neurocinérgico NK₃, poderia ser atribuída à ação das drogas neurocinérgicas e opióides, nesse subtipo de receptor. No entanto, não é possível descartar que essa interação seja apenas, e tão somente, devida ao fato que ambos os sistemas modulam independentemente diferentes partes do substrato neural do medo/ansiedade. Assim, o que vemos como uma potencialização do efeito, no caso do agonista neurocinérgico pelo antagonista opióide, ou uma redução do efeito, no caso do antagonista neurocinérgico pelo antagonista opióide, poderia ser simplesmente o resultado da somatória de

diferentes efeitos dessas drogas, em diversas partes do circuito neural responsável pela modulação do comportamento observado no modelo experimental empregado. Essa hipótese faz sentido quando levamos em consideração os dados do estudo de Belzung e Agmo (1997) mostrando que a naloxona é capaz de potencializar doses sub-efetivas de ansiolíticos clássicos como o diazepam, que atua potencializando a ação do GABA, e a buspirona, que atua no sistema serotoninérgico, no mesmo modelo experimental, o LCE. Tsuda *et al.* (1996), por outro lado, mostra em seu estudo uma ação oposta para esse antagonista opióide, empregando, porém, outro paradigma experimental. Tudo isso, no entanto, não invalida a busca do entendimento dessa possível interação com o uso de antagonistas opióides mais específicos e o emprego de injeções localizadas nas diferentes áreas cerebrais do circuito responsável pelos comportamentos aqui estudados.

De uma forma geral, os resultados obtidos neste estudo, quando comparados àqueles obtidos com drogas ansiolíticas ou ansiogênicas padrão, descritos por vários autores (Handiey e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Cruz *et al.*, 1994; Rodgers e Cole, 1994; Teixeira *et al.*, 1996), demonstram que agonistas e antagonistas do receptor neurocinérgico do tipo NK₃, injetados centralmente, promovem efeitos do tipo ansiolítico e ansiogênico, respectivamente, em camundongos avaliados no LCE. Em particular, o presente estudo mostra que o efeito ansiolítico promovido pelo SENK, agonista peptídico sintético NK₃, pode ser revertido pela injeção conjunta de antagonistas seletivos, peptídicos ou não, do mesmo receptor, indicando a especificidade da ação do SENK. O presente estudo também mostra uma possível interação entre os sistemas neurocinérgico e opióide, uma

vez que a administração de naloxona (i.p., 2 mg/kg) potencializa o efeito do tipo ansiolítico do SENK, e inibe a ação do tipo ansiogênica promovida pelo Trp7, ambos administrados i.c.v.

Tanto os efeitos promovidos pela injeção i.c.v. dos agonistas ou antagonistas neurocinérgicos, quanto os produzidos pela injeção i.p. de naloxona não podem ser atribuídos a uma ação inespecífica no SNC, como a estimulação motora, prejuízo motor e/ou efeito sedativo, já que o desempenho dos animais nas caixas de registro automático da movimentação espontânea e no teste do rota-rod não foi alterado significativamente por nenhum dos tratamentos. A este respeito, outras medidas registradas no LCE, como, por exemplo, o número de entradas nos braços fechados, que refletem a atividade motora dos animais (Rodgers *et al.*, 1997), também não foi modificado pelos diversos tratamentos.

Atribui-se, assim, a aparente especificidade dessas drogas a uma ação direta ou indireta em áreas e/ou vias neurais envolvidas na gênese e/ou controle de comportamentos relacionados à ansiedade, podendo-se concluir que o receptor neurocinérgico do tipo NK₃ participa da modulação da ansiedade experimental em camundongos, avaliada no LCE. Na verdade, os estudos e a compreensão da participação dos diversos neuropeptídeos, entre eles as neurocininas e os opióides, na modulação de várias funções fisiológicas vêm crescendo nos últimos anos. Os neuropeptídios liberados em diversas áreas do cérebro podem agir como neurotransmissores e moduladores, sendo, na verdade, considerados moduladores ideais pois transportam mais informações que, por exemplo, os aminoácidos, ou tanto quanto as monoaminas, transmissores clássicos permitindo aos animais uma adaptação

rápida às mudanças do ambiente (Landgraf, 1995), fatos que reforçam a hipótese de que as neurocininas, em particular, podem agir como neuromoduladores da ansiedade, abrindo novas fronteiras para o desenvolvimento de fármacos, além de ampliar o conhecimento da regulação neuroquímica dessa patologia (Longmore *et al.*, 1995, Chan *et al.*, 1996).

Evidentemente, outros experimentos são necessários para fundamentar essa sugestão da participação das neurocininas, em particular do receptor NK₃, na modulação da ansiedade experimental em camundongos, injetando-se agonistas e antagonistas neurocinérgicos em áreas específicas do circuito neuroanatômico do medo/ansiedade. É também necessário esclarecer melhor a interação entre o sistema neurocinérgico e outros sistemas de neurotransmissores, especialmente, no nosso caso, o opióide, com o emprego, por exemplo, de drogas mais específicas desse último sistema.

Finalizando, é necessário ter consciência de que um modelo animal pode não reproduzir exatamente a condição modelada (Handiey e McBlane, 1993), neste caso a ansiedade humana. Um modelo é uma condição experimental, uma preparação simplificada para ajudar a entender um fenômeno muito mais complexo (McKinney e Moran, 1981). O estudo aqui apresentado, como a maior parte dos estudos sobre a ansiedade, foi realizado através de experimentos com animais de laboratório, baseando-se na continuidade filogenética do substrato neural envolvido na gênese da ansiedade. Como outros modelos usualmente empregados e outros achados experimentais, nossos resultados podem vir a contribuir não só para um melhor entendimento dos substratos neuroquímicos da ansiedade, a curto ou médio prazo, como também, a médio ou longo prazo, para a descoberta de novos

agentes terapêuticos talvez mais seletivos, com menos efeitos colaterais e com um mecanismo de ação inovador em comparação às drogas ansiolíticas que estão disponíveis no mercado.

ABSTRACT

This study investigates the effects of intracerebroventricular injections of selective agonists and antagonists of tachykinin NK₃ receptor on performance of mice in the elevated plus-maze test. It also studies a putative relationship between the neurokinin NK₃ receptors and the opioid system in the same experimental paradigm. Mice were treated with either vehicle or 1, 10, 100 or 500 pmol of neurokinin B or senktide ([succinil-Asp⁶, MePhe⁸]substance P₍₆₋₁₁₎), natural and synthetic selective NK₃ receptor agonists, respectively. Other mice received similar doses of [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ or SR 142801 ((S)-N-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-piperidin-3-yl)propyl)-4-phenyl-piperidin-4-yl)-N-methylacetamide) tachykinin NK₃ receptor selective peptide and non-peptide antagonists, respectively. Senktide significantly increased the frequency of entries and the time spent in the open arms, which is compatible with an anxiolytic-like action. Neurokinin B treatment did not alter the plus-maze parameters in a significant way. Conversely, the NK₃ peptide antagonist [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, but not SR142801, the non-peptide antagonist, showed a reverse effect, i.e., an anxiogenic profile of action, reducing the frequency and the time spent in the open arms. Co-injection of either senktide plus [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎, or senktide plus SR 142801, blocked the anxiolytic-like effects promoted by senktide, indicating that centrally-administered NK₃ receptor agonists and antagonists can modulate anxiety. To evaluate the relationship between the neurokinin and opioid systems, animals were pretreated with naloxone, an opioid receptor antagonist (2 mg/kg, i.p.), 5 min prior the i.c.v. administration of senktide (10 pmol), [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎ or SR 142801 (100 pmol).

Pretreatment with naloxone increased the senktide's anxiolytic-like effect and inhibited [Trp⁷β-Ala⁸]NKA₍₄₋₁₀₎'s anxiogenic-like action. Altogether these data indicates a putative neurokinin-opioid relationship in the modulation of experimental anxiety evaluated on the plus-maze test in mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, M. S.; Brandão, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of the rats in the plus-maze test. *Physiol. Behav.* 60: 1183-1186. 1996.
- Agmo, A., Galvan, A., Heredia, A., Morales, M. Naloxone blocks the anti-anxiety but not the motor effects of benzodiazepines and pentobarbital: experimental studies and literature review. *Psychopharmacology* 120: 186-194. 1995.
- Almay, B.G., Johansson, F., Von Knorring, L., Le Greves, P., Terenius, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. *Pain* 33, 3-9 , 1988.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington. 1994.
- Belzung, C., Agmo, A. Naloxone potentiates the effects of sub-effective doses of anxiolytic agents in mice. *European J. Pharmacol.* 323: 133-136. 1997.
- Bernatzky, G. ; Saria, A. Behavioral effect of the NK₂ antagonist SR 48968 but not of the NK₁ antagonist SR 140333 in the mouse black and white box model. *Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego, 1995.
- Brodin, E., Rosén, A., Schött, E., Brodin, K. Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropeptides* 26, 253-260,1994.
- Cantarella, P. A., Chahl, L. A. Acute effects of morphine on Substance P concentrations in microdissected regions of guinea-pig brain. *Behav.*

Pharmacol. 7, 470-476, 1996.

- Carlini, E. A.; Contar, J. D. P.; Silva-Filho, A. R.; Silveira-Filho, N. G.; Frochtengarten, M. L.; Bueno, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 17: 37-64. 1986.
- Chan, O. H.; Schmid, H. L.; Kuo, B.S.; Wright, D.S.; Howson, W.; Stewart, B. H. Absorption of Cam-2445, and NK1 neurokinin receptor antagonist: *in vivo*, *in situ*, and *in vitro* evaluations. *J. Pharm. Sci.* 85: 253-257, 1996.
- Chang, H. T. Substance P-dopamine relationship in the rat substantia nigra: a light and electron microscopy study of double immunocytochemically labelled materials. *Brain Res.* 448: 391-396. 1988.
- Chung, F-Z.; Wu, L-H.; Tian, Y.; Vartanian. M. A.; Lee, H.; Bikker, J.; Humblet, C.; Pritchard, M. C.; Raphy, J.; Suman-Chauhan, N.; Horwell, D. C.; Lalwani, N. D.; Oxender, D. L. Two classes of structurally different antagonists display similar species preference for the human tachykinin neurokinin₃ receptor. *Mol. Pharmacol.* 48: 711-716. 1995.
- Coimbra, N. C.; Eichenberger, G. C. D.; Gorchinski, R. T.; Maisonnette, S. Effects of the blockade of opioid receptor in defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. *Brain Res.* 736: 348-352. 1996.
- Croci, T.; Landi, M.; Emonds-Alt, X.; Le Fur, G.; Manara, L. Neuronal NK₃-receptors in guinea-pig ileum and *taenia caeci*: "in vitro" characterization by their first non-peptide antagonist, SR 142801. *Life Sci.* 57: 361-366. 1995.
- 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.; Priestley, J. V.; Paxinos, G. (eds.) *The rat nervous system*. Australia: Academic Press. v. 1, 1985, p. 441-469.
- Culman, J., Unger, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. *J. Physiol. Pharmacol.* 73: 885-891. 1995.
- Dafny, N.; Zielinski, M.; Reyes-Vazquez, C. Alteration of morphine withdrawal to naloxone by interferon. *Neuropeptides* 3: 453-463, 1983.
- Davis, M.; Rainnie, D.; Cassell, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *TINS*. 7: 208-214. 1994.
- Dawson, G. R., Tricklebank, M.D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *TIPS*. 16: 33-36. 1995.
- De Souza, M. M.; Schenberg, L. C., Carobrez, A. P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxi-selective drug effects on plus-maze performance. *Behav. Brain Res.* 1997 (no prelo.).
- de Wied, D. van Ree, J. M. 1989. Neuropeptides: animal behaviour and human psychopathology. *European Arch. Psychiatr. Neurol. Sci.* 238: 323-331., 1989.
- Dews, P. B. The measurement of the influence of drugs on voluntary activity in mice. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 8: 46-48. 1953.
- Ding, Y.-Q., Shigemoto, R., Takada, M., Ohishi, H., Nakanishi, S., Mizuno, N., Localization of the neuromedin K receptor (NK₃) in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 364, 290-310. 1996.
- Donaldson, L. F; Haskell, C. A.; Hanley, M. R. Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor. *Biochem. J.* 320: 1-5. 1996.

- Drapeau, G.; Rouissi, N.; Nantel, F.; Rhaleb, N.E.; Tousignant, C.; Regoli, D. Antagonists for the neurokinin NK-3 receptor evaluated in selective receptor systems. *Regul. Pep.* 31: 125-135, 1990.
- Dunham, N. W., Miya, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Assoc.* 46: 208-210. 1957.
- Emonds-Alt, X., Bichon, D., Ducoux, J.P., Heaulme, M., Miloux, B., Poncelet, M., Proietto, V., Van Broeck, D., Vilain, P., Neliat, G., Soubrié, P., Le Fur, G., Brelière, J.C., 1995. SR 142801, the first potent non-peptide antagonist of the tachykinin NK₃ receptor. *Life Sci.* 56: 27-32. 1995.
- Fehder, W.P., Sachs, J. Uvaydova, M., Douglas, S. D. Substance P as an immune modulator of anxiety. *Neuroimmunomodulation* 4, 42-48, 1997.
- File, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58, 747-752, 1997.
- Geyer, M. A., Russo, P.V., Masten, V.L. Multivariate assessment of locomotor behavior: pharmacological and behavioral analyses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25, 277-288. 1986.
- Giardina, G. A. M.; Raveglia, L. F. Central & peripheral nervous systems. *Exp. Opin. Ther. Pat.* 7: 307-323. 1997.
- Graeff, F. G. Psicobiologia da ansiedade. *J. Bras. Psiq.* 36, 345-350. 1983.
- Graeff, F. G. *Drogas psicotrópicas e seu modo de ação*. 2a. Ed. São Paulo: E.P.U.1989.
- Graeff, F. G. Ansiedade. In: Graeff, F. G. e Brandão, M. L., (eds.) *Neurobiologia das doenças mentais*. São Paulo: Lemos, 1993, p. 109- 144.
- Graeff, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive

- behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 811-829. 1994.
- Guard, S; Watson, S. P. Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.* 18: 149-165. 1991.
- Haley, T. J., McCormick, W.G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 12: 12-15. 1957.
- Handley, S.L. 5-hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmac. Ther.*, 66:103-148, 1995.
- Handley, S. L., McBlane, J. W. Serotonin mechanisms in animal models of anxiety. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 26: 1-13. 1993.
- Handley, S. L., Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 327: 1-5. 1984.
- Harro, J.; Vasar, E.; Bradwejn, J. CCK in animal and human research. *TIPS* 14: 244-249, 1993.
- 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 J.* 4: 1606-1615. 1990.
- Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54: 21-30. 1996.
- Hökfelt, T.; Millhorn, D.; Serogy, K.; Tsuruo, Y.; Ceccatelli, S.; Lindh, B.; Meister, T.; Malander, T.; Schalling, M.; Bartfai, T.; Terenius, L. Co-existence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia.* 43: 768-780. 1987.
- Horwell, D. C. The 'peptoid' approach to the design of non-peptide, small

- molecule agonists and antagonists of neuropeptides. *TIBTECH*. 13: 132-134. 1995.
- Ikeda, K., Miyata, K., Orita, A., Kubota, H., Yamada, T., Tomioka, K. RP 67580, a neurokinin₁ receptor antagonist, decreased restraint stress-induced defecation in rat. *Neurosci. Lett.* 189: 103-106. 1995.
- Klavdieva, M. M. The history of neuropeptides I. *Front. Neuroendocrinol.* 16: 293-321. 1995.
- Kopchia, K. L.; Altman, H. J.; commissaris, R. L. Effects of lesions of the central nucleus of the amygdala on anxiety-like behaviors in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43: 453-461. 1992.
- Kreeger, J. S., Larson, A. A., The substance P amino-terminal metabolite substance P (1-7), administered peripherally, prevents the development of acute morphine tolerance and attenuates the expression of withdrawal in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 662-667, 1996.
- Landgraf, R. Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioural consequences. *J. Neuroendocrinol.* 7: 243-253. 1995.
- Laursen, S. E., Belknap, J.P. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Meth.* 16: 155-157. 1986.
- Le Bars, D., Bourgoin, S., Clot, A. M., Hamon, M., Cesselin, F. Noxious mechanical stimuli increase the release of Met-enkephalin-like material heterosegmentally in the rat spinal cord. *Brain Res.* 402, 188-192, 1987.
- Lee. Y.; Davis, M. The role of the bed nucleus of the *stria terminalis* in CRH-enhanced startle : an animal model of anxiety. *Annals of 26th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, San Diego. vol. 22. p. 465. 1996.

- Liebsch, G. ; Landgraf, R.; Gerstberger, R.; Probst, J.C.; Wotjak, C.T.; Engelmann, M.; Holsboer, F.; Montkowski, A. Chronic infusion of a CRH(1) receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Reg. Pep.* 59: 229-239, 1995.
- Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 92: 180-185. 1987.
- Lister, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac. Ther.* 46: 321-340. 1990.
- Longmore, J.; Swain, C. J.; Hill, R. G. Neurokinin receptors. *DN&P.* 8: 5-23. 1995.
- Maggi, C. A., Patacchini, R., Rovero, P., Giachetti, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 13: 23-93. 1993.
- Maggio, J. E. Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 13-28. 1988.
- Mansour, A.; Fox, C. A.; Akil, H.; Watson, S. J. Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *TINS.* 18, 22-29. 1995.
- Mansour, A.; Khachaturian, H.; Lewis, M. E.; Akil, H.; Watson, S. J. Anatomy of CNS opioid receptors. *TINS.* 11, 308-314. 1988.
- Marksteiner, J.; Lassnig, E.; Humpel, C.; Sieghart, W.; Kaufmann, W., Saria, A. Distribution of GABA_A receptor alpha 1 subunit-like immunoreactivity in comparison with that of enkephalin and substance P in the rat forebrain. *Synapse.* 20: 165-174. 1995.
- Mauborgne, A., Javoy-Agid, F., Legrand, J.C., Agid, Y., Cessetin, F., Decrease of substance P-like immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of

- parkinsonian brains. *Brain Res.* 268: 167-170. 1983.
- McKinney, W. T.; Moran, E. C. Animal models of schizophrenia. *Am. J. Psychiatric.* 138: 477-483. 1981.
- Motta, V., Penha, K., Brandão, M. L. Effects of microinjections of μ and κ receptor agonists into the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. *Psychopharmacology* 120, 470-474, 1995.
- Mussap, C.J., Geraghty, D.P., Burcher, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. *J. Neurochem.* 60: 1987-2009. 1993.
- Nakanishi, S. Mammalian tachykinin receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 14: 123-136. 1991.
- Nutt, D. J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmac. Ther.* 47: 233-266. 1990.
- Otsuka, M., Yoshioka, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol. Rev.* 73: 229-308. 1993.
- Paden, C. M.; Krall, S.; Lynch, W. C. Heterogeneous distribution and upregulation of μ , δ and κ opioid receptors in the amygdala. *Brain Res.* 418: 349-355. 1987.
- Patacchini, R., Maggi, C.A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch. int. Pharmacodyn.* 329: 161-184. 1995.
- Pratt, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol. Ther.* 55: 149-181. 1992.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in rat. *J. Neurosci. Meth.* 14: 149-167. 1985.
- Pellow, S.; File, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory

- activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 525-529. 1986.
- Pernow, B. Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35: 85-141. 1983.
- Pesold, C., Treit, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 671: 213-221. 1995.
- Piedimonte, G. Neurokinin peptides, receptors, and peptidases in airway disease. *Exp. Lung Res.* 21: 809-834. 1995.
- Pratt, J. A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmac. Ther.* 55: 149-181, 1992.
- Regoli, D., Boudon, A., Fauchère, J-L. Receptors and antagonists for substance P related peptides. *Pharmac. Rev.* 46, 551-599. 1994.
- Regoli, D., Drapeau, G., Dion, S., D'Orléans-Juste, P. Receptors for substance P and related tachykinins. *Pharmacology.* 38, 1-15. 1989.
- Rodgers, R. J.; Cole, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology.* John & Sons. pp. 9-44. 1994.
- Rodgers, R. J.; Cole, J. C.; Aboualfa, K.; Stephenson, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative "anxiogenic" agents in the mouse elevated plus-maze. *Pharmac. Biochem. Behav.* 52: 805-813. 1995.
- Rodgers, R. J.; Cao, B. -J.; Daivi, A.; Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 30: 289-304. 1997.
- Rosén, A., Franck, J., Brodin, E. Effects of acute systemic treatment with the 5HT-uptake blocker alaproclate on tissue levels and release of substance P in rat periaqueductal grey. *Neuropeptides.* 28: 317-324. 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.
- Sanders, S. K.; Shekhar, A. Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala. *Pharmac. Biochem. Behav.* 52: 701-706. 1995.
- Seabrook, G. R., Bowery, B.J., Hill, R.G. Pharmacology of tachykinin receptors on neurones in the ventral tegmental area of rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 273: 113-119. 1995.
- Shughrue, P. J.; Lane, M. V.; Merchenthaler. *In situ* hybridization analysis of the distribution of neurokinin-3 mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 372: 395-414. 1996.
- 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. S. T.; Savery, D.; Marden, C.; Costa, J. J. L.; Averill, S.; Priestley, J. V.; Rattray, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. *J. Comp. Neurol.* 350: 23-40. 1994.
- Song, D. D., Harlan, R. E. The development of enkephalin and substance P neurons in the basal ganglia: insights into neostriatal compartments and the extended amygdala. *Develop. Brain Res.* 83, 247-261, 1995.
- Stables, J. M., Beresford, I.J.M., Arkinstall, S., Ireland, S.J., Walsh, D.M., Seale, P.W., Ward, P., Hagan, R.M. GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK₃ receptors. *Neuropeptides.* 27: 333-341. 1994.

- Stone, T. W. *Neuropharmacology*. New York: W.H. Freeman/Spektrum. 1995.
- Stratton, S. C.; Beresford, I. J. M.; Harvey, F. J.; Turpin, M. P.; Hagan, R. M.; Tyers, M. B. Anxiolytic activity of tachykinin NK₂ receptor antagonists in the mouse light-dark box. *European J. Pharmacol.* 250: 11-12. 1993.
- Stratton, S. C.; Beresford, I. J. M.; Hagan, R. M. GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonist, releases suppressed behaviours in a novel aversive environment. *British J. Pharmacol.* 112: 49P, 1994.
- Strohle, A.; Jahn, H.; Montkowski, A.; Liebsch, G.; Boll, E.; Landgraf, R.; Holsboer, F.; Wiedemann, K. Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. *Neuroendocrinology* 65: 210-215, 1997.
- Teixeira, R. M. *Influência da injeção intracerebral da agonistas e antagonistas de receptores de neurocininas no comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, 1995.
- Teixeira, R. M., Santos, A.R.S., Ribeiro, S.J., Calixto, J.B., Rae, G.A., De Lima, T.C.M. Differential roles of neurokinin receptors on an experimental model of anxiety in mice. *Tachykinins'95: from basic science to clinical applications*, Florence, p. 35, 1995.
- Teixeira, R. M., Santos, A.R.S., Ribeiro, S.J., Calixto, J.B., Rae, G.A., De Lima, T.C.M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. *European J. Pharmacol.* 311: 7-14. 1996.
- Tian, Y; Wu, L-H.; Oxender, D. L.; Chung, F-Z. The unpredicted high affinities of a large number of naturally occurring tachykinins for chimeric NK₁/NK₃ receptors suggest a role for an inhibitory domain in determining receptor

- specificity. *J. Biol. Chem.* 271: 20250-20257. 1996.
- Treit, D., Pesold, C., Rotzinger, S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behav. Neurosci.* 107: 770-785. 1993.
- Tsuda, M., Suzuki, T., Misawa, M., Nagase, H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *European J. Pharmacol.* 307: 7-14. 1996.
- Unger, Th., Carolus, S., Demmert, G., Ganten, D., Lang, R. E., Maser-Gluth, C., Steinberg, H., Veelken, R., Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ. Res.* 63, 812-820, 1988.
- Walsh, D. M.; Stratton, S. C.; Harvey, F. J.; Beresford, I. J. M.; Hagan, R. M. The anxiolytic-like activity of GR159897, a non-peptide NK₂ receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety. *Psychopharmacology.* 121: 186-191. 1995.
- Wettstein, J.G.; Earley, B.; Juniens, J.L. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmac. Ther.* 65: 397-414, 1995.
- Wörmser, 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.
- Yadin, E., Thomas, E., Grishkat, H.L., Strickland, C.E. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol. Behav.* 53: 1077-1083. 1993.
- 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.

Zacharko, R. M.; Koszycki, D.; Mendella, P. D.; Bradwejn, J. Behavioral, neurochemical, anatomical and electrophysiological correlates of panic disorder: multiple transmitter interaction and neuropeptide co-localization. *Prog. Neurobiol.* 47: 371-423. 1995.

Zangrossi Jr, H. Z. Heterogeneidade da ansiedade experimental no rato: uma análise comportamental e farmacológica. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. Dissertação de Doutorado em Farmacologia. 1995.

Zernig, G., Troger, J., Saria, A. Different behavioral profiles of the non-peptide substance P (NK₁) antagonists CP-96,345 and RP 67580 in Swiss albino mice in the black-and-white box. *Neurosci. Lett.* 151: 64-66. 1993.