

RAFAELA LARSEN RIBEIRO

**INTERAÇÃO GABA-NEUROKININAS NA
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS**

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

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

Florianópolis - SC

1999

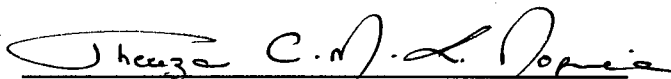
**“INTERAÇÃO GABA- NEUROKININAS NA MODULAÇÃO DA
ANSIEDADE EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS”**

POR

RAFAELA LARSEN RIBEIRO

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pela Banca Examinadora
em sessão de defesa pública em 05 de
Março de 1999.**

Banca Examinadora:



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

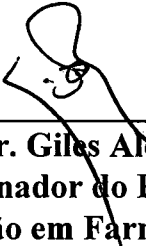


Humberto Milani

(UEM/PR -Membro Titular)



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



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

Florianópolis, 05 de Março de 1999.

RIBEIRO, Rafaela Larsen. Participação GABAérgica na modulação da ansiedade experimental pelos receptores neurocinérgicos. Florianópolis, 1999, 106 pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Defesa: 05/03/1999

A participação do sistema GABAérgico na modulação da ansiedade experimental em camundongos foi avaliada no labirinto em cruz elevado (LCE). Nossos dados mostram que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com DZP foi revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK₂ e antagonista NK₃, respectivamente, mas não pela substância P, agonista NK₁. Por outro lado, a administração central dos antagonistas NK₁ e NK₂, mas não do agonista NK₃, reverteu a ação ansiogênica do tratamento agudo sistêmico com PTZ, observada no labirinto em cruz elevado. A administração central de antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂, FK 888 e SR 48968, respectivamente, produziu efeitos ansiolíticos tanto nos animais controle como naqueles aonde o diazepam, administrado repetidamente, foi retirado abruptamente. No entanto, o agonista de receptores NK₃, senktide, só apresentou seu efeito ansiolítico nos animais do grupo controle. Nossos resultados sugerem que existe uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico na modulação da ansiedade experimental, envolvendo especialmente os receptores dos tipos NK₁ e NK₂, mas o papel dos receptores NK₃ parece não ser relevante a não ser no efeito ansiolítico agudo do diazepam.

"Na vida,
Há que viver, sonhar, voar, ...
Sorrir, lutar, amar, ...
Encontrar-se, conhecer-se, realizar-se...
Envolver, encantar, abraçar...
Com o olhar, com o coração...
Com a alma
E dançar e cantar,
E viver cada dia como se fosse o único, o último...
Partir e deixar saudades...
E alegrar-se por ter a fonte de todas as alegrias,
Que é a fé em Deus.
E o amor no coração...
E recomeçar cada dia,
Com a mesma vontade de viver,
Sorrir, cantar, amar..."

(Leonor Hartmann)

AGRADECIMENTOS

Manifesto aqui minha gratidão a todas as pessoas que de alguma forma sempre estiveram presentes em todos os momentos, dando o incentivo que eu precisava:

Primeiramente, ao Ser mais supremo que simplesmente permitiu a minha existência, **Deus**.

À Professora **Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira** pelo constante incentivo, transmissão de conhecimentos e amor ao S.N.C. e por ter sido minha orientadora na realização deste trabalho, sempre mostrando-se uma pessoa exemplar e amiga.

A todos os outros **professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia** da UFSC, pela dedicação e transmissão de conhecimentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à **Sandra, Terezinha, Juarez, Regina, Rita, Deli, Vilma e Adriane**.

À direção e aos funcionários do Biotério Central e aos funcionários do Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, **Pedro, João e Zeri**, que foram de importância fundamental para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos amigos da "Turma 97" : **Elke, Adriana, Alessandra, José Eduardo e Nelson**, por serem quem são, amigos para toda uma vida.

Aos **amigos da Pós-graduação**, pelos exemplos de conquistas e amor à ciência.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neurofarmacologia, em especial **Sandro e Irinéia**, por todo o companheirismo e por tudo que me ensinaram com muito carinho e dedicação.

E também à **Elaine, Marco, Fábio, Raquel, Filipe, Patrícia e Viviane**, por tornarem o nosso ambiente de trabalho um lugar agradável e produtivo e por serem essas pessoas maravilhosas, queridas e amigas que são.

À **Sanofi Recherche** (França) e ao **Dr. J. B. Calixto** (UFSC), pela doação do SR 48968 e FK 888, e senktide, respectivamente, e à **Rosana Ostrowski**, pela sua especial assistência técnica.

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

E, finalmente, às pessoas que eu mais amo no mundo e que fazem minha vida ser mais gratificante de ser vivida:

meus pais, José Alberto e Rejane, pelo incentivo e apoio para que eu pudesse realizar mais esta etapa da minha vida;

meus irmãos, Georgia e Leonardo, por serem exemplos maravilhosos de pessoas que estão vencendo na vida;

minha avó, Maria Helena, por ser a pessoa que mais acredita no meu potencial,

minha amiga – irmã, Ana Paula, por ser amiga para toda uma vida,

Enfim, a todos que estiveram sempre perto de mim no cumprimento de mais este objetivo na minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
I. INTRODUÇÃO	
<u>Sistema GABAérgico</u>	
Histórico	1
Receptores GABAérgicos	3
- GABA _A	4
- GABA _B	8
- GABA _C	9
<u>Ansiedade e Benzodiazepinas</u>	
Ansiedade e seu tratamento	11
Benzodiazepinas	12
Receptores Benzodiazepínicos	14
Benzodiazepinas Endógenas	15
<u>Neurocininas</u>	
Histórico	18
Receptores Neurocinérgicos	20
Neurocininas no sistema nervoso central	21
II. OBJETIVOS	24
III. MATERIAIS E MÉTODOS	
Animais	25
Drogas e Soluções	25
Procedimentos Gerais	27
Equipamentos	30
Análise Estatística	32

IV. RESULTADOS

- A) Caracterização dos efeitos ansiolíticos do diazepam, dos antagonistas NK₁ e NK₂ e do agonista NK₃ no labirinto em cruz elevado. 33
- B) Caracterização dos efeitos ansiogênicos do pentilenotetrazol, dos agonistas NK₁ e NK₂ e do antagonista NK₃ no labirinto em cruz elevado. 40
- C) Influência do tratamento central com agonistas e antagonista neurocinérgicos no efeito ansiolítico do diazepam. 47
- D) Influência do tratamento central com agonista e antagonistas neurocinérgicos no efeito ansiogênico do pentilenotetrazol. 51
- E) Caracterização do efeito ansiolítico do tratamento agudo sistêmico e central com diazepam após a retirada abrupta do tratamento repetido com benzodiazepínico. 55
- F) Efeito ansiolítico do tratamento agudo central com agonista e antagonistas neurocinérgicos após a retirada abrupta do tratamento repetido com benzodiazepínico. 63
- G) Influência dos diversos tratamentos na atividade e performance motora e na temperatura retal. 73

V. DISCUSSÃO 74

VI. CONCLUSÕES 85

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

RESUMO

RESUMO

A participação das neurocininas na modulação da ansiedade experimental e clínica têm sido investigada nos últimos anos em alguns laboratórios. Em nosso laboratório, observamos que, no teste do labirinto em cruz elevado, a ativação de receptores NK₁ e NK₂ promove efeitos do tipo ansiogênicos, enquanto seu bloqueio produz efeitos do tipo ansiolíticos. O receptor NK₃ mostra um perfil diametralmente oposto, isto é, sua ativação promove ação do tipo ansiolítica e seu bloqueio efeitos do tipo ansiogênicos no mesmo paradigma experimental. O sistema GABAérgico, por outro lado, está inequivocamente envolvido na modulação da ansiedade (Graeff, 1994).

O presente estudo investigou se há uma inter-relação entre esses dois sistemas, ou seja, o neurocinérgico e o GABAérgico, na modulação da ansiedade experimental em camundongos, avaliada no labirinto em cruz elevado.

Camundongos adultos fêmeas (30 g) foram divididos em dois grupos: o primeiro tratado agudamente i.p. com NaCl 0,9% (controle), diazepam 0,5 mg/kg (DZP) ou pentilenotetrazol 20 mg/kg (PTZ). Quinze minutos após, o grupo tratado sistemicamente com DZP, droga ansiolítica padrão, foi injetado, por via intracerebroventricular (i.c.v.), com solução controle (PBS), substância P (SP), neurocinina A (NKA), agonistas naturais preferenciais dos receptores NK₁ e NK₂, respectivamente, ou Trp⁷β-Ala⁸]neurocinina A₍₄₋₁₀₎, antagonista peptídico seletivo para o receptor neurocinérgico NK₃ (Trp-7). Ao grupo pré-tratado com PTZ, droga ansiogênica padrão, administrou-se i.c.v. PBS, FK 888, SR 48968, antagonistas seletivos dos receptores NK₁ e NK₂, respectivamente, ou senktide, agonista seletivo dos receptores NK₃. O segundo grupo foi tratado com DZP i.p. 0,5 mg/kg (1 semana), 0,75 mg/kg (3 dias) e 1,0 mg/kg (18 dias), ou NaCl 0,9%, num total de 28 dias de tratamento. Ao final do tratamento repetido (dia teste) os animais receberam DZP, i.p ou i.c.v, suas respectivas soluções controles (NaCl 0,9% ou PBS), ou as drogas neurocinérgicas com perfil ansiolítico, como o FK 888, o SR 48968 ou o senktide i.c.v., imediatamente antes de serem observados no labirinto em cruz elevado (LCE). No LCE foram registrados a frequência de entradas (A e

F) e tempo despendido nos braços abertos e fechados (TA e TF), além dos parâmetros etológicos "head-dipping" (HD), "stretch attend postures" (SAP), tempo na plataforma central (TC), entre outras medidas comportamentais, por 5 min. Logo após o término do LCE, os animais foram observados num campo aberto (5 min) e no rota-rod (1 min) e tiveram sua temperatura retal registrada.

Nossos dados mostram que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com DZP foi revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK₂ e antagonista NK₃, respectivamente, mas não pela substância P, agonista NK₁. Por outro lado, a administração central dos antagonistas NK₁ e NK₂, mas não do agonista NK₃, reverteu a ação ansiogênica do tratamento agudo sistêmico com PTZ, observada no labirinto em cruz elevado.

A administração central de antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂, FK 888 e SR 48968, respectivamente, produziu efeitos ansiolíticos tanto nos animais controle como naqueles aonde o diazepam, administrado repetidamente, foi retirado abruptamente. No entanto, o agonista de receptores NK₃, senktide, só apresentou seu efeito ansiolítico nos animais do grupo controle.

Nossos resultados sugerem que existe uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico na modulação da ansiedade experimental, envolvendo especialmente os receptores dos tipos NK₁ e NK₂, mas o papel dos receptores NK₃ parece não ter a mesma relevância, a não ser, no efeito ansiolítico agudo do diazepam.

ABSTRACT

ABSTRACT**PARTICIPATION OF GABA_A RECEPTORS IN THE MODULATION OF EXPERIMENTAL ANXIETY BY NEUROKININ AGONISTS AND ANTAGONISTS.**

The participation of neurokinin receptors in the modulation of experimental and clinical anxiety have been investigated in the last years. We have demonstrated that activation of NK₁ and NK₂ receptors promote anxiogenic-like effects whereas the inhibition of these receptors promote anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze test. On the other hand, the NK₃ receptor shows a reverse profile. Moreover, GABAergic system is undoubtedly involved in the modulation of anxiety. The aim of this study was to evaluate the interrelationship between neurokinergic and GABAergic systems in the modulation of experimental anxiety. Adult female mice were divided in two groups: the first was acutely treated with NaCl (0.9% i.p.), DZP (0.5 mg/kg, i.p.) or PTZ (20 mg/kg, i.p.) and, 15 min later, they received PBS, substance P (SP), neurokinin A (NKA), NK₁ and NK₂ natural preferential agonists, or Trp-7, a NK₃ antagonist, respectively (DZP group) or PBS, FK 888, SR 48968, NK₁ and NK₂ antagonists or senktide (SENK), NK₃ agonist, respectively (PTZ group), by i.c.v. route. The other group was repeatedly treated with DZP (0.5, 0.75 and 1.0 mg/kg for 28 days) or NaCl 0.9% i.p. (control group). At the end of the repeated treatment (test day), the animals received PBS, FK 888, SR 48968, NK₁ and NK₂ antagonists or senktide (SENK), NK₃ agonist, respectively (PTZ group), by i.c.v. route, or DZP i.p or i.c.v. immediately before they were submitted to the elevated plus-maze. Our results show that the anxiolytic profile of the acute treatment with DZP was reverted by the central administration of the neurokinergic compounds NKA and Trp-7, NK₂ agonist and NK₃ antagonist, respectively, but not by substance P, NK₁ agonist. On the other hand, the i.c.v. injection of NK₁ and NK₂ antagonists, but not the NK₃ agonist, reversed the anxiogenic action of the acute treatment with PTZ, as evaluated in the plus-maze test.

Central administration of selective antagonists of NK₁ e NK₂ neurokinergic receptors, FK 888 e SR 48968, respectively, produced anxiolytic effects in both control and DZP-withdrawn animals. However, the NK₃ receptor antagonist senktide just promoted its anxiolytic action on the control group.

Our results suggest that there is an unequivocal interrelationship between the GABAergic and the neurokinergic systems in the modulation of the experimental anxiety in mice involving the NK₁ and NK₂ receptors, but the NK₃ subtype receptor involvement seems less likely, at least for the acute anxiolytic action of diazepam.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Distribuição de GABA no SNC.	1
Figura 2 – Transmissão GABAérgica.	3
Figura 3 – Receptor de GABA.	6
Figura 4 – Família de receptores GABA _A /BZD.	7
Figura 5 – Ligantes no receptor benzodiazepínico.	14
Figura 6 – Distribuição dos receptores benzodiazepínicos no SNC.	17
Figura 7 – Esquema de origem das neurocininas e seus precursores e receptores em mamíferos.	20
Figura 8 – Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou DZP (0.5 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	34
Figura 9 – Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou DZP (0.5 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	35
Figura 10 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	37
Figura 11 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	38
Figura 12 – Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou PTZ (20 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	41
Figura 13 – Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou PTZ (20 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	42
Figura 14 – Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, na frequência de entradas (A) e no tempo de	

permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	44
Figura 15 – Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	45
Figura 16 – Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de DZP (0.5 mg/kg), na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	48
Figura 17 – Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de DZP (0.5 mg/kg), no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	49
Figura 18 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 minutos após a injeção i.p. de PTZ (20 mg/kg), na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	52
Figura 19 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 minutos após a injeção i.p. de PTZ, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	53
Figura 20 – Efeito da administração sistêmica aguda de DZP (0.5 mg/kg), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	56
Figura 21 – Efeito da administração sistêmica aguda de DZP (0.5 mg/kg), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	57
Figura 22 – Efeito da administração central aguda de DZP i.c.v. (7 nmol), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	60
Figura 23 – Efeito da administração central aguda de DZP i.c.v. (7 nmol), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., no número de entradas nos braços	

fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	61
Figura 24 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	64
Figura 25 – Efeito da injeção i.c.v. de SR 48968, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	65
Figura 26 – Efeito da injeção i.c.v. de SENK em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos.	66
Figura 27 – Efeito da injeção i.c.v. de FK 888, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	67
Figura 28 – Efeito da injeção i.c.v. de SR 48968, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	68
Figura 29 – Efeito da injeção i.c.v. de SENK em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B) no LCE, em camundongos.	69

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 - Classificação dos receptores GABA.	10
Quadro 2 - Receptores neurocinérgicos e drogas agonistas e antagonistas seletivas nesses receptores.	21
Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiolítica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	39
Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiogênica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	46
Tabela 3 - Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	50
Tabela 4 - Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o pentilenotetrazol nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	54
Tabela 5 - Efeito do diazepam i.p. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	58
Tabela 6 - Efeito do diazepam i.c.v. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	62
Tabela 7 - Influência do tratamento com o antagonista NK ₁ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	70
Tabela 8 - Influência do tratamento com o antagonista NK ₂ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	71
Tabela 9 - Influência do tratamento com o agonista NK ₃ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 - Classificação dos receptores GABA.	10
Quadro 2 - Receptores neurocinérgicos e drogas agonistas e antagonistas seletivas nesses receptores.	21
Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiolítica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	39
Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiogênica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	46
Tabela 3 - Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	50
Tabela 4 - Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o pentilenotetrazol nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	54
Tabela 5 - Efeito do diazepam i.p. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	58
Tabela 6 - Efeito do diazepam i.c.v. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado.	62
Tabela 7 - Influência do tratamento com o antagonista NK ₁ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	70
Tabela 8 - Influência do tratamento com o antagonista NK ₂ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	71
Tabela 9 - Influência do tratamento com o agonista NK ₃ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.	72

LISTA DE ABREVIACOES

BZDs – Benzodiazepinas

Domínio TM – Domínio transmembranal

dPAG – Substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral

DZP – Diazepam

GABA – cido gama-aminobutírico

GABA T – GABA- transaminase

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.p. – Intrapertoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

Ligantes BZDs – Ligantes benzodiazepínicos

NKA – Neurocinina A

PBS - *Phosphate-buffered solution*

PTZ – Pentilenotetrazol

R-BZD – Receptor Benzodiazepínico

SAL – NaCl 0,9%

SENK – Senktide

SNC – Sistema nervoso central

SP – Substância P

Trp-7 - [Trp⁷β-Ala⁸]neurocinina A₍₄₋₁₀₎

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

SISTEMA GABAÉRGICO

Histórico

No Sistema Nervoso Central (S.N.C.) dos vertebrados existe uma infinidade de receptores para os mais diferentes tipos de neurotransmissores, sendo que os mais amplamente distribuídos em todas as regiões do S.N.C. são os receptores para o neurotransmissor inibitório GABA (ácido gama-aminobutírico; Figura 1) e os receptores para aminoácidos excitatórios.

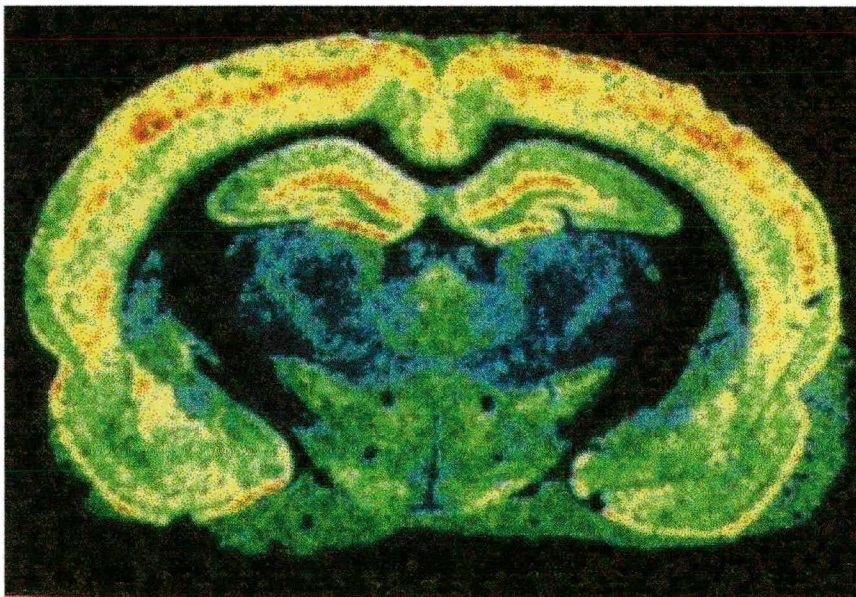


Figura 1 – Visualização autoradiográfica dos receptores de benzodiazepínicos, pertencentes ao complexo receptor GABA_A, no prosencéfalo de rato, usando ³H-flumazenil. Retirado de Snyder (1986).

Em 1950, o GABA foi identificado como um neurotransmissor central, mas seu papel fisiopatológico no SNC não foi imediatamente estabelecido. E. Roberts e Frankel (1950) relataram a presença do GABA nos tecidos cerebrais, tendo feito esta descoberta quando trabalhavam com a então nova técnica de cromatografia em papel. Em outra linha de investigação, Florey (1953) descobriu que extratos de

cérebros de mamíferos tinham uma ação inibitória nos receptores de estiramento em neurônios de adaptação lenta, em crustáceos. Assim, descobriu-se que o GABA simulava os efeitos da estimulação dos nervos inibitórios e a picrotoxina antagonizava tanto os efeitos do GABA aplicado, quanto a estimulação do nervo inibitório. Kravitz *et al.* (1963) demonstraram que o GABA era o único aminoácido inibidor encontrado exclusivamente nos nervos inibitórios dos crustáceos e a potência inibitória dos extratos desses nervos estava correlacionada ao seu teor de GABA. A liberação de GABA foi então relacionada à frequência da estimulação nervosa. Registros intracelulares do músculo indicaram que a estimulação do nervo inibitório e a administração de GABA produziam aumentos idênticos na condutância de Cl^- no músculo. Assim, essas observações satisfizeram completamente os critérios para identificação do GABA como um neurotransmissor (Otsuka, 1973).

Alguns dados suportam a idéia de que o GABA medeia as ações inibitórias dos interneurônios locais no cérebro, e que o GABA também medeia a inibição pré-sináptica na medula espinhal: sinapses inibitórias GABAérgicas têm sido demonstradas mais nitidamente entre os neurônios de Purkinje cerebelares e seus alvos no núcleo de Deiter; entre os pequenos interneurônios e as células aferentes principais do córtex cerebelar, do bulbo olfatório, do núcleo cuneiforme, do hipocampo, do núcleo septal lateral e entre o núcleo vestibular e os motoneurônios trocleares. O GABA também medeia a inibição no córtex cerebral e entre o núcleo caudado e a substância negra (Bloom, 1996).

O GABA é formado a partir do glutamato (Figura 2) pela ação da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD, *glutamic acid descarboxilase*), uma enzima que tem sido utilizada como marcador imuno-histoquímico para mapear a distribuição dos neurônios sintetizadores de GABA no cérebro. O GABA é destruído por uma reação de transaminação, na qual o grupo amino é transferido para o ácido α -oxoglutárico produzindo glutamato e semi-aldeído succínico, sendo que este pode advir também do ácido succínico proveniente do GABA recaptado. Estas reações são catalisadas pela GABA-transaminase (GABA-T), uma enzima amplamente distribuída no SNC que parece estar localizada na mitocôndria. Os

neurônios GABAérgicos apresentam um sistema de captação de GABA ativo, e é este sistema, e não a GABA-T, que remove o GABA da fenda sináptica após sua liberação (Rang *et al.*, 1997).

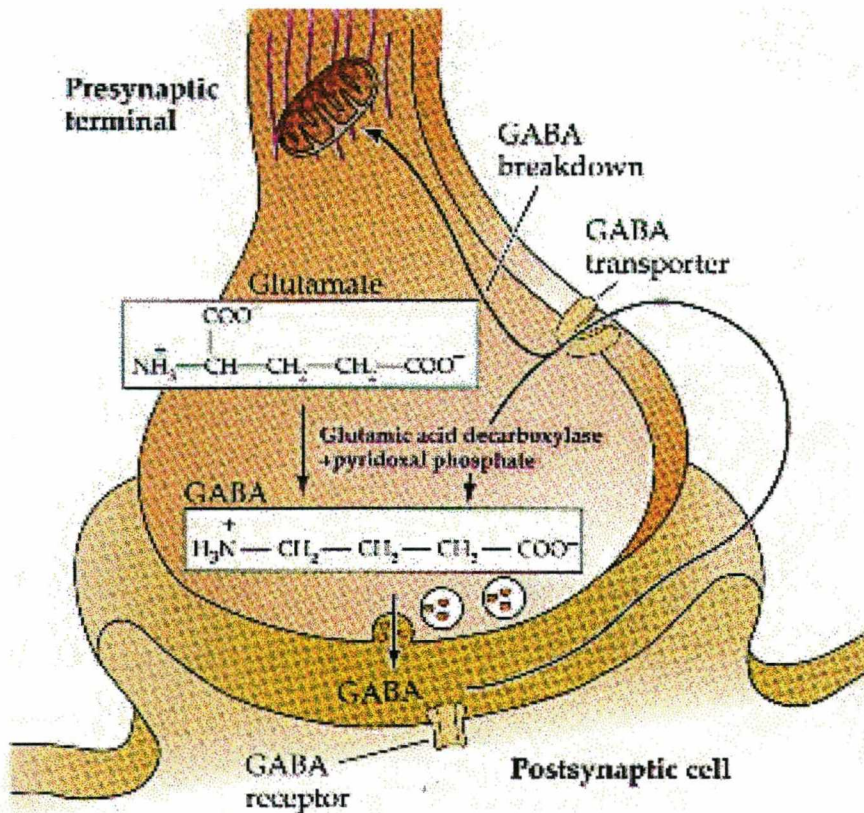


Figura 2 – Estágios da síntese, metabolização e recaptção do ácido gama-aminobutírico (GABA) no terminal nervoso. Retirado de Purves *et al.* (1997).

Receptores GABAérgicos

Em 1981, Hill e Bowery introduziram a noção de dois subtipos de receptores GABA: GABA_A e GABA_B. Esses diferem por suas propriedades fisiológicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e bioquímicas (DeLorey e Olsen, 1994).

Estudos farmacológicos e comportamentais sugeriram também a existência de receptores GABA diferentes dos sítios de ligação dos receptores GABA_A e GABA_B. Estes receptores têm sido descritos como receptores GABA_C e , apesar de algumas semelhanças com o receptor GABA_A, é considerado um receptor distinto com características próprias, como veremos adiante.

GABA_A

O complexo do receptor ionóforo GABA_A é uma glicoproteína heteropentamérica de aproximadamente 275 kDa composto de combinações de subunidades α , β , γ , δ e ρ , com uma a seis variantes cada (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ e ρ 1-2). Duas subunidades adicionais foram identificadas em cérebro de pintainhos (β 4 e γ 4) (Bateson *et al.*, 1991; Harvey *et al.*, 1993). Os genes das subunidades aparecem sob um controle regulatório independente, aumentando às possibilidades de várias combinações de subunidades em diferentes populações neuronais (Mohler *et al.*, 1992). A combinação das subunidades α 1, β 2 ou β 3 e γ 2, parece ser a mais comum e pode representar uma unidade à qual várias outras subunidades podem ser co-reunidas para gerar a variedade dos subtipos de receptores (Benke *et al.*, 1991). Cada subunidade é composta de um domínio extracelular N-terminal longo, responsável pelas interações entre os ligantes e o canal e possivelmente quatro domínios transmembranais (TM) helicoidais, de caráter hidrofóbico, que formam no seu interior um canal iônico com especificidade para íons Cl⁻ (Figura 3). Estes domínios transmembranais apresentam uma longa alça intracelular contendo sítios de regulação de fosforilação entre o domínio TM3 e o domínio TM4 (Smith e Olsen, 1995).

A identidade dos aminoácidos entre as quatro classes de subunidades do receptor GABA_A refletem similaridades funcionais, onde, por exemplo, α 2 ou α 3 podem ser substituídas por α 5 em muitos aspectos. Quando a subunidade γ 2 é co-expressa com uma variante α e uma β , os receptores GABA_A consistentemente tornam-se responsivos aos ligantes BZDs, isto é, tornam-se os receptores GABA_A/BZD (Pritchett *et al.*, 1989).

O complexo protéico que forma o receptor GABA_A possui um sítio de ligação para o GABA que, uma vez ligado, promove a abertura do canal e, conseqüentemente, o influxo de íons Cl⁻. O canal de Cl⁻ é parte integrante do complexo, sendo a ligação do GABA a um sítio específico no receptor a responsável pela abertura desse canal. Quando os receptores GABA_A são ativados por agonistas, ocorre um aumento da condutância aos íons Cl⁻ e uma conseqüente hiperpolarização da membrana pós-sináptica. Dessa forma, há um favorecimento do influxo de Cl⁻ para o interior da célula, tornando a membrana pós-sináptica hiperpolarizada, ou seja, mais negativa no seu interior. Isso diminui a probabilidade de que o limiar para um potencial de ação seja atingido no neurônio pós-sináptico (DeLorey e Olsen, 1994).

Uma variedade de agonistas pode se ligar aos receptores GABA_A, produzindo respostas semelhantes. Entre esses estão o muscimol, THIP (isoguvacina, 4,5,6,7, tetrahidroisoxazol [5,4-c] piridina-3-ol), APS (ácido sulfônico 3-aminopropano), ácido imidazoleacético e o ácido β-hidroxi-α-amino-n-butírico. O antagonista clássico dos receptores GABA_A é o convulsivante bicuculina. Entre os bloqueadores do canal de Cl⁻ do complexo receptor GABA_A estão os convulsivantes TBPS (butil-bi-ciclo-fosforotionato) e a picrotoxina (Sieghart, 1992).

O receptor GABA_A possui também sítios para a ligação de moduladores tais como as benzodiazepinas (BZDs), barbitúricos e anestésicos esteróides, que modulam a resposta para a ligação do GABA e influenciam a abertura dos canais de Cl⁻. Há indícios que outras drogas como o etanol e a penicilina também possuem sítios de ligação moduladores nesse receptor (DeLorey e Olsen, 1994).

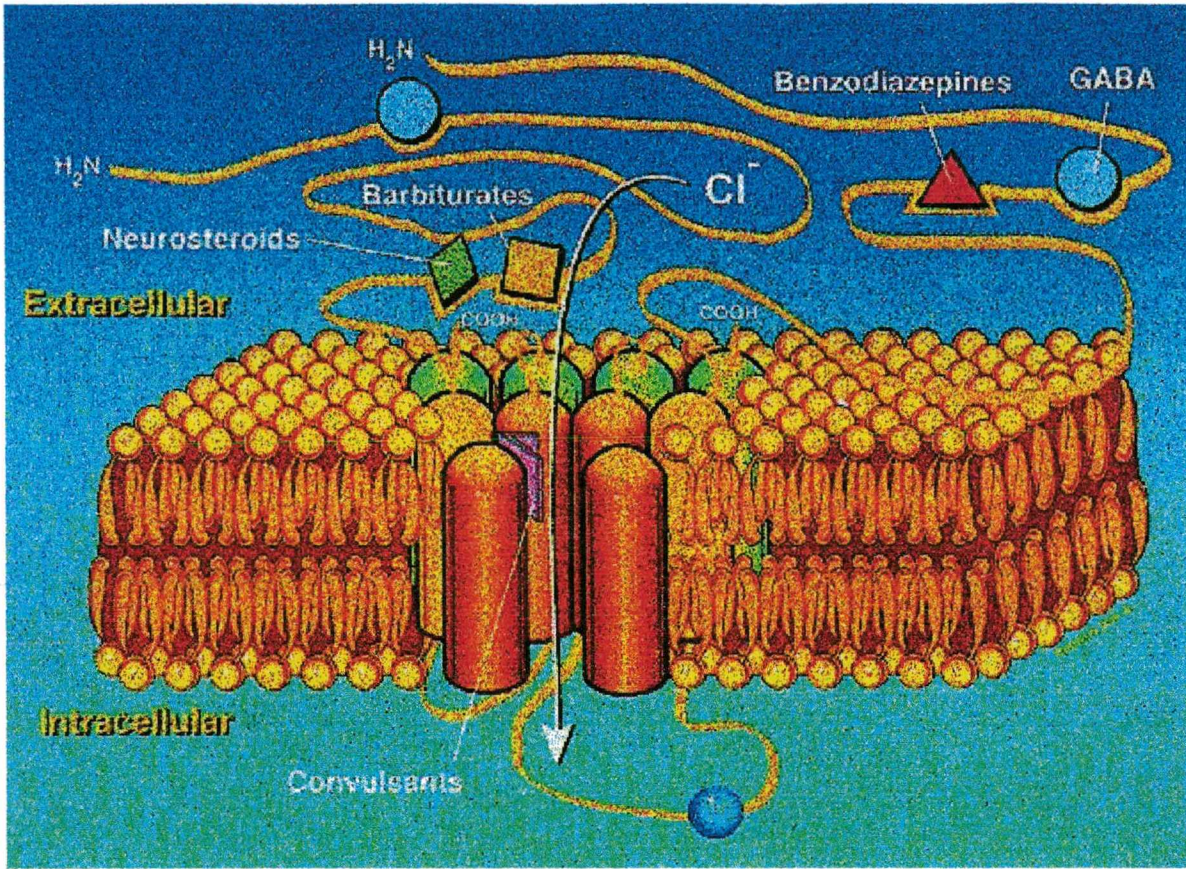


Figura 3 – Representação diagramática do complexo receptor GABA-benzodiazepina-ionóforo de Cl⁻. Retirado de Grant (1994).

Os efeitos dos ligantes no receptor benzodiazepínico (R-BZD) sobre o comportamento animal variam de efeitos agonistas (p.e., ansiólise, sedação e hipnose) até efeitos de agonistas inversos (p.e., ansiedade, alerta e convulsões). Esta diversidade dos efeitos reflete a expressão ampla dos receptores GABA_A/BZD no cérebro. Dados recentes trazem mais informações acerca dos mecanismos de ação dos ligantes do R-BZD, mas não é possível fazer correlações de um ligante simples com um efeito comportamental único. Isto pode resultar do fato de que as eficácias intrínsecas dos ligantes diferem entre os subtipos de receptores GABA_A e, assim, a diversidade dos receptores é combinada aos modos de ação dos ligantes que afetam os diferentes subtipos de receptores GABA_A (Lüddens *et al.*, 1995).

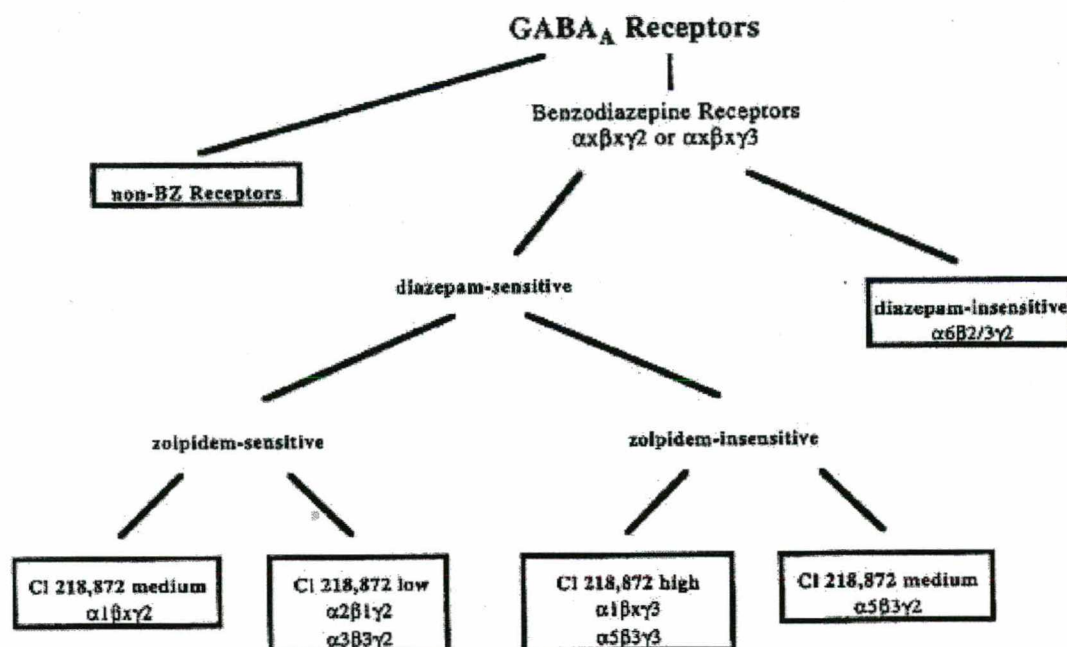


Figura 4 – Família de receptores GABA_A/BZD. Os R-GABA_A podem ser diferenciados de acordo com a especificidade de ligação aos BZD. Retirado de Lüddens *et al.* (1995).

As BZDs, como o flunitrazepam e o diazepam, sobrepondo-se parcialmente os limites das doses, produzem efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes, sedativos e mio-relaxantes. Chama atenção o fato de que nem todas as substâncias que agem no sítio para BZDs do receptor GABA_A/BZD pertencerem à mesma classe química ou produzirem todos os efeitos mencionados. Dois exemplos típicos de ligantes agonistas com perfis comportamentais distintos são a triazolopiridazina CI 218,872 e a imidazopiridina zolpidem. O composto CI 218,872 produz respostas ansiolíticas praticamente dissociadas da sedação, enquanto o zolpidem tem uma ação sedativa muito evidente, onde baixas doses mostram apenas efeitos ansiolíticos sutis.

Paralelamente à seletividade dos subtipos de receptores GABA_A, a correlação comportamental do tratamento com BZDs é determinada pela eficácia intrínseca do ligante. Teorias iniciais sobre agonismo parcial para vários

comportamentos foram baseadas nas diferentes reservas de receptores (Haefely, 1988; Haefely et al., 1992). Esta teoria defende que um agonista total produz todos os seus efeitos, mesmo com uma relativa baixa ocupação dos receptores. Em contraste, um agonista parcial, mesmo com seu perfil de ação limitado, necessita uma alta ocupação dos receptores e mesmo assim poderia ainda não produzir todos os efeitos comportamentais de um agonista total. Esta teoria explicaria simplisticamente as diferenças nos perfis comportamentais do diazepam, zolpidem e CI 218,872: o diazepam é um agonista total em muitos subtipos de receptores, o zolpidem é um agonista total em um número limitado de subtipos (Biggio et al., 1989; Lüddens et al., 1994; Wafford et al., 1993b) e o CI 218,872 é um agonista parcial em todos os subtipos de receptores estudados (Lüddens et al., 1994; Wafford et al., 1993b; Yakushiji et al., 1993). Esta explicação, entretanto, não é suficiente para correlacionar os vários comportamentos à ação dos agonistas em subtipos diferentes de receptores, uma vez que estudos recentes indicam que alguns compostos são agonistas parciais apenas em certos subtipos de receptores, mas podem ser agonistas totais em outros (Wafford et al., 1993b).

GABA_B

Os receptores GABA_B, em contraste aos GABA_A, estimulam a produção de segundos mensageiros, via ativação de proteína G. O sistema de segundos mensageiros ativado modula canais de Ca²⁺ e K⁺. Os receptores GABA_B ativados podem causar inibição pré- ou pós-sináptica. A inibição pré-sináptica pode ser devida a uma diminuição no influxo de Ca²⁺ e aumento do efluxo de K⁺ no terminal pré-sináptico, com conseqüente redução na liberação dos neurotransmissores.

Os receptores GABA_B são ativados pela ligação do baclofen e são insensíveis às drogas que modulam os receptores GABA_A. Na verdade, originalmente os receptores GABA_B foram identificados pela sua insensibilidade aos antagonistas GABA_A, como a bicuculina, e agonistas GABA_A, como a isoguvacina. Posteriormente, foram descobertos agonistas e antagonistas

específicos para esse receptor como o baclofen e o faclofen, respectivamente (Bowery, 1993). Os estudos recentes em relação aos receptores GABA_B foram muito facilitados pela introdução do CGP35348, um antagonista seletivo mais potente que o faclofen e também capaz de penetrar na barreira hemato-encefálica (Bonnano e Raiteri, 1993).

Evidências indicam que a maior função dos receptores GABA_B é mediar a inibição da liberação de neurotransmissores e que eles podem ainda exibir distintos perfis farmacológicos. Estes receptores possuem diferentes localizações neuronais com diferentes funções, levando à conclusão de que também existem subtipos de receptores GABA_B no SNC (Bonnano e Raiteri, 1993).

Bonnano e Raiteri (1993) mostraram que aumentando-se a neurotransmissão no receptor GABA_B, particularmente no córtex cerebral e no tálamo, pode-se favorecer o início da ausência de crises epiléticas. Interessantemente, o antagonista de receptores GABA_B, o CGP35348, tem sido descrito como reduzindo as crises em modelos genéticos de epilepsia em ratos e camundongos, assim como em modelos farmacológicos de crises de ausência.

GABA_C

Evidências farmacológicas e fisiológicas recentes indicam que o ácido cis-4-aminocrotônico (CACA) pode ativar seletivamente uma terceira classe de receptores GABA no SNC de mamíferos. Estes receptores, denominados GABA_C por Drew *et al.* (1984), são insensíveis tanto à bicuculina quanto ao baclofen. Apenas muito recentemente os receptores GABA_C têm sido estudados ao nível molecular e observou-se que estes se distribuem nas subpopulações de neurônios retiniais. Esses receptores GABA_C, além de não serem bloqueados pela bicuculina, que é o antagonista que define os receptores GABA_A, não são modulados por BZDs, barbitúricos e neuroesteróides, embora sejam ativados pelo agonista do receptor GABA_A, o muscimol. Ao que parece, esses receptores são homopentâmeros formados pelas subunidades ρ , pois a presença dessas subunidades nas células bipolares da retina de ratos coincide com a farmacologia

dos receptores GABA_C nessas células. Ambas as subunidades polipeptídicas $\rho 1$ e $\rho 2$ são freqüentemente referidas como as subunidades do receptor GABA_A, mas esta designação parece ser incorreta. De fato, as subunidades ρ não se polimerizam com as subunidades α ou β dos receptores GABA_A, mas formam canais de cloro homo-oligoméricos. A presença da subunidade $\rho 2$ fora da retina, indica que os efeitos mediados pelo receptor GABA_C, observados em várias estruturas do cérebro como a medula espinhal, teto óptico, cerebelo e o hipocampo, são compatíveis com a presença desses receptores nessas estruturas. A diversidade dos receptores GABA na retina dos vertebrados, sugere que a função fisiológica dos receptores GABA_C é diferente da dos receptores GABA_A. Por sua localização em células bipolares e horizontais, espera-se dos receptores GABA_C uma mediação na inibição lateral de respostas à luz na retina dos vertebrados. Além disso, os receptores GABA_C parecem inibir a transmissão realizada nos terminais das células bipolares (Bormann e Feigspan, 1995).

Quadro 1 – Classificação dos receptores GABA. Retirado de Rang *et al.* (1997).

	Tipo de receptor		
	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Efeitos	Inibição pós-sináptica ↑ da condutância ao Cl ⁻	Inibição pré-sináptica ↓ da condutância ao Ca ²⁺ ↑ da condutância ao K ⁺	Inibição pós-sináptica ↑ da condutância ao Cl ⁻
Agonistas			
GABA	+	+	-
Baclofen	-	+	-
Muscimol	+	-	+
CACA	-	-	+
Antagonistas			
Bicuculina	Competitivo	-	-
Picrotoxina	Não competitivo	-	-
Faclofen	-	+	-
Potenciadores			
Benzodiazepinas	+	-	-
Barbitúricos	+	-	-

ANSIEDADE E BENZODIAZEPINAS

Ansiedade e seu tratamento

A ansiedade não é apenas um sintoma importante de muitos distúrbios psiquiátricos, mas também um componente quase inevitável de muitas condições clínicas e cirúrgicas. Na verdade, é uma emoção humana universal, bastante correlacionada ao medo e, muitas vezes, servindo a propósitos de adaptação psicobiológica. Uma generalização clínica muito importante é que a ansiedade raramente é uma “doença” por si mesma. A ansiedade está tipicamente associada a distúrbios “psiconeuróticos”, não podendo ser facilmente explicada em termos biológicos ou psicológicos. Essa hipótese sugere uma hiperatividade dos sistemas adrenérgicos no SNC associada à ansiedade. Além disso, os sintomas de ansiedade estão geralmente associados à depressão e, sobretudo, a distúrbios distímicos (depressão “neurótica”), pânico, agorafobia e outras fobias específicas, distúrbio obsessivo-compulsivo e muitos distúrbios de personalidade (Harvey, 1987).

Uma grande dúvida relaciona-se à diferenciação entre dois conceitos fundamentais: medo e ansiedade. O primeiro refere-se às respostas comportamentais e neurovegetativas decorrente de uma ameaça à integridade física ou à própria sobrevivência do organismo. Sabemos que, ao menos no homem, essas respostas vêm acompanhadas de uma experiência extremamente desagradável. Em relação ao segundo conceito, a ansiedade, esse seria um estado de apreensão em circunstâncias onde o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente, ou os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos. A ansiedade acompanha também a dor, agravando o sofrimento psicológico determinado por ela (Graeff, 1989).

Denominam-se ansiolíticos o grupo de fármacos capazes de aliviar um estado emocional específico, a ansiedade. A droga mais popularmente utilizada como medicamento ansiolítico foi e continua sendo o álcool etílico ou etanol. Essa droga, porém, não é utilizada com fins terapêuticos devido a seus efeitos

colaterais e, principalmente, devido ao seu potencial de produzir dependência, sendo o etanol a principal droga de abuso em nossa sociedade. Os primeiros compostos empregados na terapêutica médica como ansiolíticos eram substâncias sintéticas. Entre eles, os brometos foram os mais utilizados, embora fossem pouco eficazes e pudessem provocar intoxicação. Já no século XX, um ansiolítico eficaz e de baixo custo foi utilizado, o fenobarbital, um derivado do ácido barbitúrico. Depois dele foram utilizados por algum tempo os chamados “tranquilizantes menores”, onde a droga mais empregada denominava-se meprobamato, derivada do propanodiol. Acreditava-se que esse medicamento possuísse vantagens em relação ao fenobarbital, mas estas vantagens eram ilusórias, pois além de ser menos eficaz como ansiolítico, apresentava tanto ou maior potencial para promover dependência ou causar intoxicações graves devido ao seu acúmulo nos tecidos. Essas drogas foram substituídas por uma classe de medicamentos ansiolíticos muito eficaz, a das benzodiazepinas (BZDs), que também foram inicialmente classificadas como “tranquilizantes menores”. As BZDs são as drogas ansiolíticas mais usadas comercialmente desde os anos 60.

Benzodiazepinas

Quando agonistas benzodiazepínicos se ligam aos seus sítios receptores (R-BZD) no receptor GABA_A, eles modificam alostericamente o sítio de ligação do GABA, facilitando a sua ligação ao receptor e, conseqüentemente, tornando mais efetiva a abertura dos canais de Cl⁻, causando uma hiperpolarização do neurônio.

As BDZs possuem algumas características peculiares que as definem: possuem grande eficácia, relativa seletividade de efeitos, baixa toxicidade e baixo risco de produzir dependência. A primeira droga conhecida com estas características denomina-se clordiazepóxido. Outros exemplos de benzodiazepínicos são o diazepam, que é considerado mais potente e de ação mais rápida e duradoura que o clordiazepóxido; o bromazepam; o lorazepam; o flunitrazepam; o clonazepam; o temazepam; o oxazepam; o triazolam; o alprazolam e o midazolam, entre outras. É necessário frisar que todos estes

compostos possuem as mesmas ações farmacológicas ou as mesmas características farmacodinâmicas, diferindo apenas na potência e em fatores farmacocinéticos. Os efeitos farmacológicos destas drogas vão desde a ação ansiolítica até a propriedade hipnótica, em caso de doses mais elevadas, para o tratamento da insônia, sendo essa uma de suas indicações terapêuticas primárias. Outros efeitos incluem o relaxamento parcial da musculatura esquelética, que destina-se ao tratamento de espasmos musculares, e a ação anticonvulsivante. E, como não poderia deixar de ser, existem os efeitos colaterais que incluem incoordenação motora e perturbação da marcha (ataxia). Doses mais elevadas podem causar amnésia anterógrada, onde o paciente esquece muitos fatos ocorridos após tomar a droga. Os benzodiazepínicos também acentuam os efeitos depressores do álcool e de outros depressores do SNC quando administrados concomitantemente com estes, facilitando assim acidentes de trânsito e aumentando consideravelmente o risco de intoxicação letal causada por estes agentes (Graeff, 1996).

A farmacologia das benzodiazepinas é bem conhecida (Figura 5). As drogas ansiolíticas citadas no parágrafo acima são todas agonistas do R-BZD. O antagonista competitivo do R-BZD mais conhecido é o flumazenil. Uma classe de drogas conhecidas como beta-carbolinas ansiogênicas, tais como FG 7142, DMCM (metil-6,7-dimetrixi-4-etil- β -carbolina-3-carboxilato) e β CCM (metil- β -carbolina-3-carboxilato) são agonistas inversos do R-BZD, isto é, elas se ligam ao sítio das benzodiazepinas, mas produzem efeitos inversos aos causados pelos agonistas benzodiazepínicos. Ou seja, elas diminuem a afinidade do GABA pelo sítio de ligação, promovendo ansiedade, aumento do alerta e do tônus muscular, e convulsões. Os barbitúricos, anestésicos esteróides (Lan e Gee, 1994) e, possivelmente o etanol, se ligam a sítios específicos no receptor $GABA_A$ produzindo efeitos finais semelhantes aos ligantes benzodiazepínicos (Bowery, 1993).

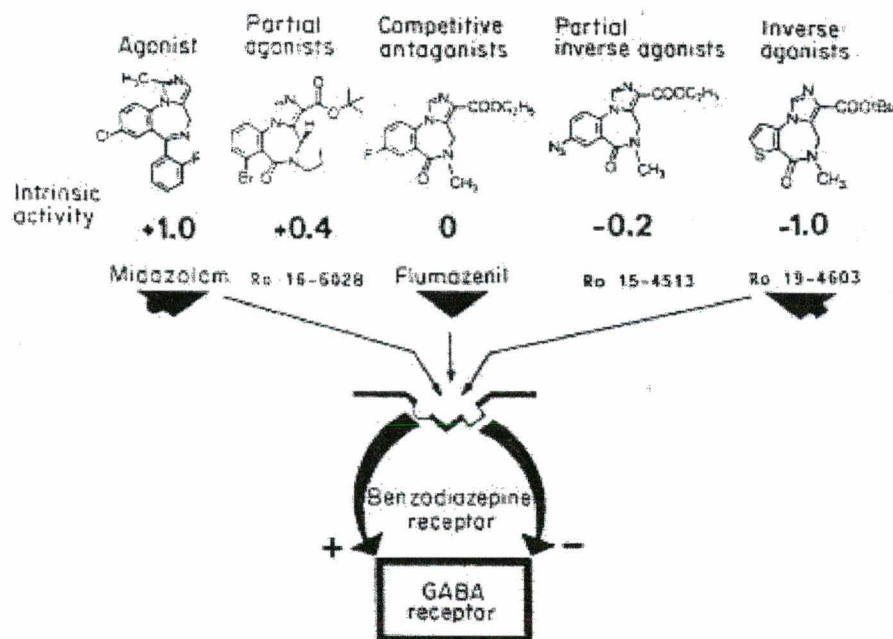


Figura 5 - Ligantes no receptor benzodiazepínico e suas respectivas eficácias. Retirado de Haefely (1990).

Receptores Benzodiazepínicos

Alguns subtipos de receptores benzodiazepínicos existem em diferentes áreas cerebrais, coordenando diferentes funções fisiológicas. Recentes avanços, tanto na biologia molecular (clones, hibridização "in situ", re-expressão, e mutação de receptores benzodiazepínicos) como na química farmacêutica (síntese de uma enorme variedade de novos agentes que interagem com os receptores benzodiazepínicos), permitiram desenvolver drogas seletivas para alterar comportamentos específicos através da criação de moléculas com seletividade por determinados subtipos de receptores.

Dois tipos de receptores benzodiazepínicos foram originalmente propostos com base em suas propriedades farmacológicas e distribuição (Figura 6). O subtipo BZ₁ é encontrado em todo o cérebro, sendo predominante no cerebelo, e o

subtipo BZ₂ é encontrado principalmente no córtex, hipocampo e medula espinhal. Algumas evidências sugerem que é a isoforma da subunidade α presente no receptor oligomérico que, em particular, define as características de reconhecimento do sítio de ligação benzodiazepínico (Doble e Martin, 1992).

A possibilidade de desenvolvimento de novas drogas específicas permite esperar-se a obtenção de novos medicamentos, talvez mais eficazes, isentos de efeitos colaterais indesejáveis, efeitos esses intimamente relacionados aos terapêuticos nos compostos benzodiazepínicos clássicos (Doble & Martin, 1992).

Benzodiazepinas Endógenas

Como mencionado anteriormente, as BZDs atuam se ligando a sítios específicos do receptor GABA_A. Sabe-se também que existem vários agentes ansiolíticos ou ansiógenos endógenos que se ligam ao R-BZD, podendo ser agonistas diretos ou inversos nesses receptores, respectivamente. Presume-se ainda que esses compostos endógenos desempenhem funções importantes na regulação da ansiedade normal e patológica. A atenuação da ansiedade poderia ser decorrente de uma interferência no funcionamento de sistemas neurais responsáveis pela integração de comportamentos de defesa provocados por ameaças ambientais. Estes sistemas podem ser o sistema serotoninérgico mesolímbico, que comanda a inibição comportamental, e o sistema cerebral aversivo, que integra comportamentos do tipo “fuga ou luta”, bem como elabora estados afetivo-motivacionais aversivos. A atuação das BZDs no complexo receptor GABA_A modula essas vias neurais (Graeff, 1989), sendo sua função principal a de intensificar as ações do(s) ligante(s) endógeno(s) no receptor GABA_A.

Assim, para potencializar a função inibitória do GABA, o cérebro provavelmente produz BZDs endógenas ou substâncias tipo-BZDs que se ligam, em condições fisiológicas normais, ao sítio para BZDs no receptor GABA_A. Na verdade, essas substâncias com propriedades agonistas nos R-BZDs têm sido extraídas e purificadas do cérebro de mamíferos, inclusive do ser humano (De

Blas, 1992). Entre as substâncias purificadas estão as purinas e os nucleosídeos purinérgicos. Mais recentemente, alguns neuroesteróides, foram propostos como ligantes endógenos dos receptores benzodiazepínicos. Entretanto, outros experimentos demonstraram que esses compostos não se ligam diretamente ao sítio de ligação para BZDs do receptor GABA_A.

Para a pesquisa de substâncias endógenas agonistas dos receptores benzodiazepínicos, têm sido utilizados anticorpos monoclonais para BZDs (De Blas *et al.*, 1985). O anticorpo reconhece tanto as BZDs livres como as conjugadas, como o diazepam (DZP) e o flunitrazepam (FNZ). O material endógeno retido liga-se especificamente ao receptor neuronal GABA_A/ BZDs com alta afinidade. A atividade das substâncias tipo-BZDs foi determinada pela medida da inibição das BZDs radiomarcadas em R-BZD em membranas animais e em anticorpos monoclonais e sua caracterização foi efetuada por espectrofotometria de ultravioleta, padrões e eluição em cromatografia líquida de alta performance e espectroscopia de massa. Surpreendentemente a substância purificada foi o agonista benzodiazepínico N-desmetildiazepam, um metabólito natural do DZP no homem (De Blas, 1993). Esse fato, entre outros, sugeriu que, em relação a origem das BZDs endógenas, uma das possibilidades poderia ser a contaminação dos indivíduos causada pelas BZDs industrializadas, que penetram na cadeia alimentar humana, acumulando-se no cérebro e em outros tecidos. Outra possibilidade seria a de que as BZDs podem ser biossintetizadas por microorganismos e/ou plantas que são componentes normais da dieta. Isso porque além do N-desmetildiazepam, diazepam e outras BZDs estarem presentes em cérebros de ratos, elas também são encontradas em batatas, cereais e outros vegetais, sendo detectadas no leite de mulheres que não estavam consumindo BZDs (Unsold *et al.*, 1990). Existe também uma terceira hipótese que diz que, pelo menos parte das BZDs são biossintetizadas por células neurais, neste caso indicando que as BZDs poderiam funcionar como neurotransmissores (De Blas, 1992). Neste contexto, alguns resultados foram demonstrados sugerindo que as BZDs endógenas seriam liberadas no hipocampo, septo e amígdala de ratos

submetidos a testes de aprendizagem e memória, sobretudo os de natureza aversiva (Izquierdo e Medina, 1991).

Mapeamentos quantitativos da imunoreatividade das substâncias tipo-BZDs em cérebros de ratos com o anticorpo monoclonal mostram uma distribuição ampla do antígeno, com os mais altos níveis concentrando-se na camada de células de Purkinje do cerebelo, córtex olfatório primário, extrato piramidal do hipocampo, e na camada de células mitrais do bulbo olfatório. Outras evidências mostram que as moléculas endógenas tipo-BZDs estão presentes tanto no citoplasma solúvel (hialoplasma) da célula como em associação com ambas as membranas da célula, externa e interna.

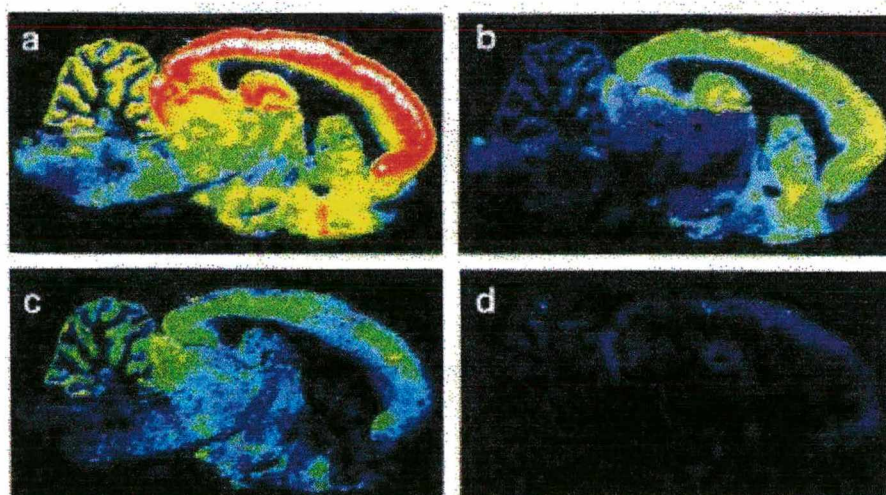


Figura 6 – Auto-radiografia dos receptores benzodiazepínicos totais (a) BZ₁ (b) e BZ₂ (c) num corte parasagital de cérebro de rato. Ligação não específica (d) . Retirado de Doble e Martin (1992).

A quantidade de BZDs endógenas em determinadas regiões do cérebro de mamíferos pode estar relacionada a vários processos fisiopatológicos. A maior concentração de BZDs endógenas em áreas como hipocampo e amígdala, no sistema límbico, aonde também existe uma grande concentração de receptores GABA_A, sugere que esses compostos estão diretamente envolvidos no processo

de consolidação da memória de eventos aversivos, bem como na fisiopatologia da ansiedade (Izquierdo *et al.*, 1991). A este respeito, parece que a quantidade de BZDs endógenas está relacionada com a vida emocional do indivíduo, pois estudos recentes mostraram que em situações de estresse ocorre um aumento na liberação de BZDs endógenas. Tal fato não ocorre em situações normais (Izquierdo & Medina, 1991; Ribeiro *et al.*, 1998).

NEUROKININAS E ANSIEDADE

Histórico

Nos últimos anos demonstrou-se a existência de uma quantidade significativa de neuropeptídeos nos neurônios do SNC. Os neuropeptídeos são encontrados em quantidades significativas nos terminais sinápticos do SNC e entre eles podemos citar a substância P (SP), a colicistocinina (CCK), a neurotensina, o neuropeptídeo Y (NPY) e a somatostatina (Stone, 1995). Muitos destes peptídeos coexistem com neurotransmissores clássicos como a acetilcolina, a serotonina, o GABA e a dopamina, em diferentes regiões do SNC (Pernow, 1983; Chang, 1988; Smith *et al.*, 1994).

A SP (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) foi o primeiro neuropeptídeo a ser descoberto, sendo identificado por von Euler e Gaddum (1931) no cérebro e intestino de cavalos. Nas décadas de 50 e 60 foram feitos alguns estudos com a SP, mas somente nos anos 70 -71 é que ela foi purificada, sua estrutura primária determinada (Chang e Leeman, 1970; Chang *et al.*, 1971), permitindo sua síntese (Tregear *et al.*, 1971). A caracterização da SP, a partir de hipotálamo de bovinos, evidenciou que esse peptídeo pertence à família das taquicininas, com uma mesma seqüência de aminoácidos no carbono (C) terminal: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde X = resíduo aromático (fenilalanina - Phe - e treonina - Try) ou resíduo alifático hidrofóbico (valina - Val - e isoleucina - Ile; Erspamer, 1981). As atividades agonísticas da SP e peptídeos relacionados estão

associadas ao domínio carboxi terminal, descrito anteriormente, que é comum entre esses peptídeos (Mussap *et al.*, 1993). O domínio amino terminal, por sua vez, confere seletividade aos diferentes tipos de receptores (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994; Otsuka e Yoshioka, 1993).

Devido às similaridades farmacológicas entre a SP e a bradicinina, estudos comparativos destes compostos levaram a descoberta de uma nova família de peptídeos, as taquicininas (Klavdieva, 1995). Atualmente, vários grupos de pesquisadores agrupam os neuropeptídeos presentes em mamíferos sob a designação genérica de neurocininas (NKs) (Regoli *et al.*, 1994). Em 1983, quatro grupos de pesquisadores independentes (Kanawaga *et al.*; Kimura *et al.*; Maggio *et al.* e Shimada *et al.*) relataram a existência de outras NKs no SNC: a neurocinina A (NKA, substância A, neuromedina α) e a neurocinina B (NKB, neuromedina K). Tatemoto *et al.* (1985) isolaram a neurocinina K (neuropeptídeo K) e, em 1988, Kage *et al.* identificaram a neurocinina γ (neuropeptídeo γ).

Estudos de biologia molecular e análise seqüencial de DNA, revelaram que as NKs são sintetizadas a partir de dois genes distintos: o gene da PPT-I ou PPT-A (pré-protaquicininina A) e o gene da PPT-II ou PPT-B (pré-protaquicininina B), no corpo celular. A transcrição do gene da PPT-A produz três RNAm de NKs distintas (α , β e γ -pré-protaquicinininas). A PPT-I- α origina a SP, enquanto a PPT-I- β origina a SP e a NKA, e ainda um análogo da NKA expandido na porção amino terminal, o NPK. A PPT-I- γ origina a SP, NKA, e ainda um análogo da NKA expandido na porção amino terminal, o NP γ (Nawa *et al.*, 1983, 1984; Kotani *et al.*, 1986; Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987; Maggio *et al.*, 1988; Guard e Watson, 1991). A PPT-II, por sua vez, codifica a informação para a síntese de uma proteína precursora da NKB (Dornan *et al.*, 1993), conforme mostrado na figura a seguir:

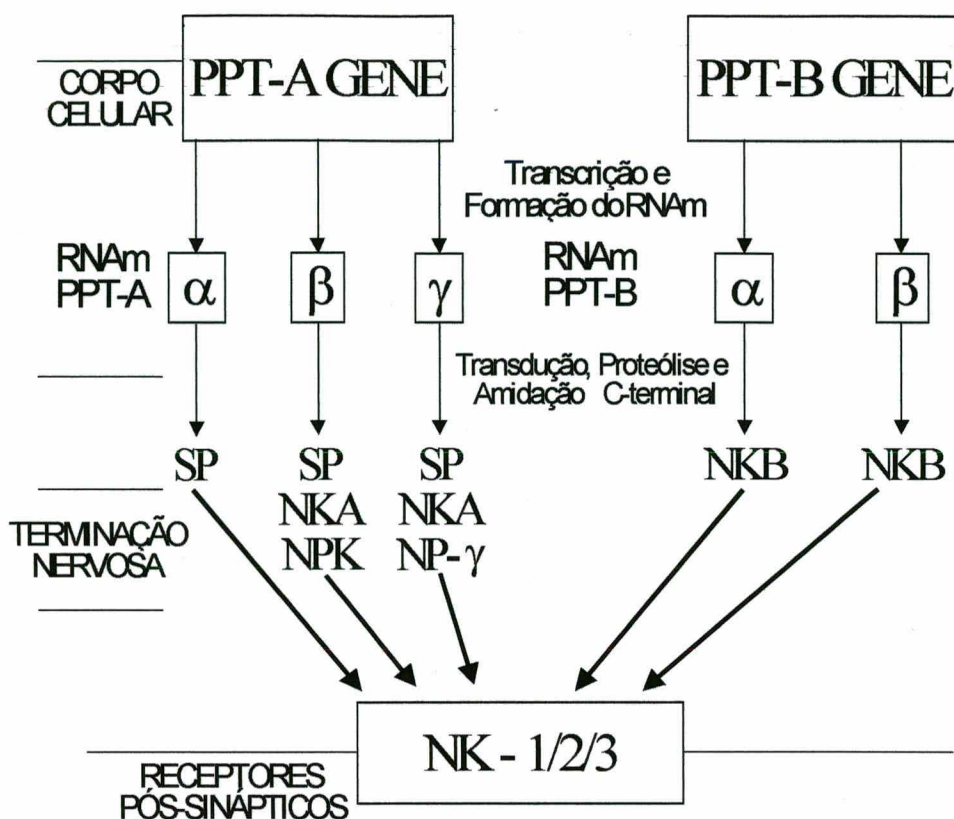


Figura 7 - Esquema de origem das neurocininas e seus precursores e receptores em mamíferos (adaptado de Guard e Watson, 1991).

Receptores neurocinérgicos

As NKs podem interagir com os três tipos de receptores (Regoli *et al.*, 1989), porém sua afinidade por cada um dos tipos difere: a SP é o agonista natural preferencial do receptor neurocinérgico do tipo NK₁, a NKA do receptor NK₂ e a NKB do receptor do tipo NK₃ (Maggi *et al.*, 1993; Stables *et al.*, 1994; Culman e Unger, 1995; Patacchini e Maggi, 1995).

Quadro 2 – Receptores neurocinérgicos e drogas agonistas e antagonistas seletivas nesses receptores.

	Tipo de receptor		
	NK ₁	NK ₂	NK ₃
Agonistas			
Natural	SP	NKA	NKB
Sintético	SP-metiléster	[β-Ala ⁸]-NKA ₍₄₋₁₀₎	senktide
Antagonistas			
Peptídico	FK 888	MEN 10,207	Trp ⁷ [β-Ala ⁸]-NKA ₍₄₋₁₀₎
Não-peptídico	RP 67580	SR 48968	SR14288

Neurocininas no sistema nervoso central

Todas as NKs estão amplamente distribuídas no SNC (Cuello e Kanazawa, 1978; O'Donohue *et al.*, 1990; Shaikh *et al.*, 1993) e várias ações farmacológicas foram descritas para estes peptídeos (Itoi *et al.*, 1988, 1992; Unger *et al.*, 1988). Em animais, as NKs parecem modular diversas funções como os estímulos sensoriais ao nível da medula espinhal, além da regulação central do sistema cardiovascular (Regoli *et al.*, 1994), processos de aprendizagem e memória (Huston e Stäubli, 1981; Huston *et al.*, 1993; Hasenöhrl *et al.*, 1994; Kovács e De Wied, 1994) e secreções neuroendócrinas (Otsuka e Yoshioka, 1993). Em 1980, Oehme *et al.* observaram a influência modulatória dos neuropeptídeos na resposta fisiológica ao estresse. A administração central de SP ou de outros agonistas seletivos do receptor neurocinérgico do tipo NK₁ promove uma exacerbação na atividade locomotora, na atenção e nos comportamentos de auto-limpeza (Sakurada *et al.*, 1989; Brent *et al.*, 1994), além de um aumento na pressão arterial, na frequência e no débito cardíacos, atividades comportamentais e fisiológicas típicas da reação de defesa, em ratos conscientes (Unger *et al.*, 1988; Tschöpe *et al.*, 1992; Culman e Unger, 1995). Também em cobaias foi observada uma hiperatividade locomotora, além de comportamentos do tipo “wet-dog

shaking” (‘sacudir de cachorro molhado’), após a administração intracerebroventricular de agonistas seletivos NK₁ (Piot *et al.*, 1995). Zernig *et al.* (1992; 1993) observaram ainda que a administração periférica de CP-96345 e RP 67580, antagonistas seletivos NK₁, reduz a atividade locomotora, provavelmente devido à sedação e à alteração na performance motora de camundongos, no teste da caixa claro-escuro.

A SP, agonista natural e preferencial dos receptores NK₁, induz reações cardiovasculares de defesa em ratos (Unger *et al.*, 1988; Tschöpe *et al.*, 1992; Culman e Unger, 1995) e apresenta efeitos pró-aversivos quando microinjetada na dPAG (Aguiar e Brandão, 1996). Fehder *et al.* (1997), após verificarem um aumento dos níveis sanguíneos de SP em resposta à ansiedade psicológica em humanos, propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas pelo estresse. Outros estudos demonstraram que a SP está diretamente envolvida na modulação das reações de estresse e defesa no sistema límbico, em ratos (Brodin *et al.*, 1994) e gatos (Shaikh *et al.*, 1993).

Alguns estudos mostram que a ansiedade experimental pode ser modulada pela manipulação de mecanismos centrais que envolvem receptores neurocinérgicos NK₁, NK₂ e NK₃. A administração sistêmica do antagonista do receptor NK₁, CP 96345, em camundongos, promove um aumento tanto na latência para a entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro, como no tempo despendido no compartimento claro, sugerindo uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1992; 1993). Teixeira *et al.* (1996) demonstraram que a estimulação dos receptores NK₁ e NK₂ promove um efeito do tipo ansiogênico, em camundongos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). O bloqueio seletivo dos receptores NK₁ pelo FK 888, por outro lado, produz uma ação do tipo ansiolítica (Teixeira *et al.*, 1996) no LCE. O CGP 49823, outro antagonista de receptores NK₁, mostrou um efeito do tipo ansiolítico no teste de interação social em ratos (File, 1997), reforçando a hipótese de que a SP desempenha um papel modulatório nos estados de ansiedade experimental. Recentemente, foi determinado que a injeção de um agonista do receptor NK₁, GR 73632, em sub-regiões da matéria cinzenta periaquedutal (PAG), pode modular

aspectos incondicionados, mas não mnemônicos, de comportamentos de medo (Mongeau *et al.*, 1998). Outras evidências recentes sugerem que a substância P pode desempenhar um importante papel nos distúrbios psiquiátricos, pois seu antagonista MK 869 mostrou efeitos antidepressivos suprimindo vocalizações induzidas por isolamento (Kramer *et al.*, 1998).

A administração sistêmica ou central de antagonistas de receptores NK₂ (GR 100679, SR 48969, GR 159897) reduz os comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos animais (teste de interação social, caixa claro-escuro, LCE) e espécies animais (camundongos, ratos e primatas; Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995). A administração central de agonistas (NKA e β -Ala⁸-NKA) e do antagonista (SR 48968), seletivos para os receptores NK₂ resulta em efeitos do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no LCE em camundongos (Teixeira *et al.*, 1996). Em resumo, a estimulação de receptores NK₁ e NK₂ promove efeitos do tipo ansiogênico, enquanto que seu bloqueio produz efeito contrário, isto é, do tipo ansiolítico.

A participação de receptores neurocinérgicos do tipo NK₃ na modulação da ansiedade em camundongos avaliados no LCE foi demonstrada para o senktide, um agonista seletivo NK₃ (Wörmser *et al.*, 1986), que em estudos preliminares apresentou uma ação do tipo ansiolítica (Teixeira, 1995; Teixeira *et al.*, 1995), posteriormente confirmada por Ribeiro (1998) e Ribeiro *et al.* (1999), que mostrou ainda a interação entre os sistemas neurocinérgico e opióide nesta modulação (Ribeiro e De Lima, 1998).

Assim, o objetivo principal do presente trabalho foi investigar uma possível inter-relação entre os sistemas neurocinérgico e GABAérgico na modulação da ansiedade experimental, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

GERAL:

Investigar uma possível inter-relação entre os sistemas neurocinérgico e GABAérgico na modulação da ansiedade experimental, utilizando o teste do labirinto em cruz elevado em camundongos.

ESPECÍFICOS:

→ Estabelecer o efeito do tipo ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado, em camundongos, para fim de comparações posteriores, utilizando esse benzodiazepínico como droga ansiolítica padrão. Confirmar as ações dos antagonistas NK₁ e NK₂ e do agonista NK₃ no mesmo modelo experimental.

→ Estabelecer o efeito do tipo ansiogênico do pentilenotetrazol no labirinto em cruz elevado, em camundongos, para fim de comparações posteriores, utilizando essa droga como ansiogênico padrão. Confirmar as ações dos agonistas NK₁ e NK₂ e do antagonista NK₃ no mesmo modelo experimental.

→ Verificar a influência dos compostos neurocinérgicos ansiogênicos (agonistas NK₁ e NK₂ e antagonista NK₃) no efeito ansiolítico agudo do diazepam.

→ Investigar a influência dos compostos neurocinérgicos com atividade ansiolítica (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃) no efeito ansiogênico agudo do pentilenotetrazol.

→ Estabelecer o efeito ansiolítico do diazepam administrado agudamente por 2 vias, uma sistêmica e outra central (i.p. e i.c.v., respectivamente) após a retirada abrupta do tratamento repetido por 28 dias com diazepam.

→ Verificar o efeito ansiolítico dos compostos neurocinérgicos (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃), administrados agudamente por via i.c.v., após a retirada abrupta do tratamento repetido por 28 dias com diazepam.

MATERIAIS E MÉTODOS

III - MATERIAIS e MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 288 camundongos albinos Suíços fêmeas pesando entre 30-40 g (cerca de 3,5 meses de idade) nos experimentos com tratamento agudo. No experimento com tratamento repetido (28 dias), iniciou-se o tratamento com animais de 2,5 meses de idade. Os animais foram criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, após o desmame, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. A temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e o ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz das 7:00 às 19:00 h), foram controlados automaticamente, tanto no Biotério como no Laboratório de Neurofarmacologia, onde os animais permaneceram por uma semana antes de qualquer manipulação experimental. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais ($n= 9-10/\text{grupo}$) foram escolhidos aleatoriamente, sendo que cada animal foi utilizado somente uma vez.

Drogas e Soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

- **Diazepam (DZP)**, Lab. Sanofi-Winthrop Farmacêutica Ltda, Brasil, benzodiazepina ansiolítica (*Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 9th Ed., p. 306, 1996);
- **FK 888** (**{(4R) - 4 - hidroxil- 1 -[1-metil-1H-indol-3-i] carbonil-propil]-L-N-benzil-N-metil-3-2-(2-naftil)-L-alaninamida}** (NK_1), Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan, antagonista seletivo dos receptores NK_1 (Fujii *et al.*, 1992);
- **Neurocinina A (NKA = H-His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Ala-Leu-Met-NH₂)**, Peninsula Labs., Belmont, EUA, neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK_2 (Lindfors *et al.*, 1985);

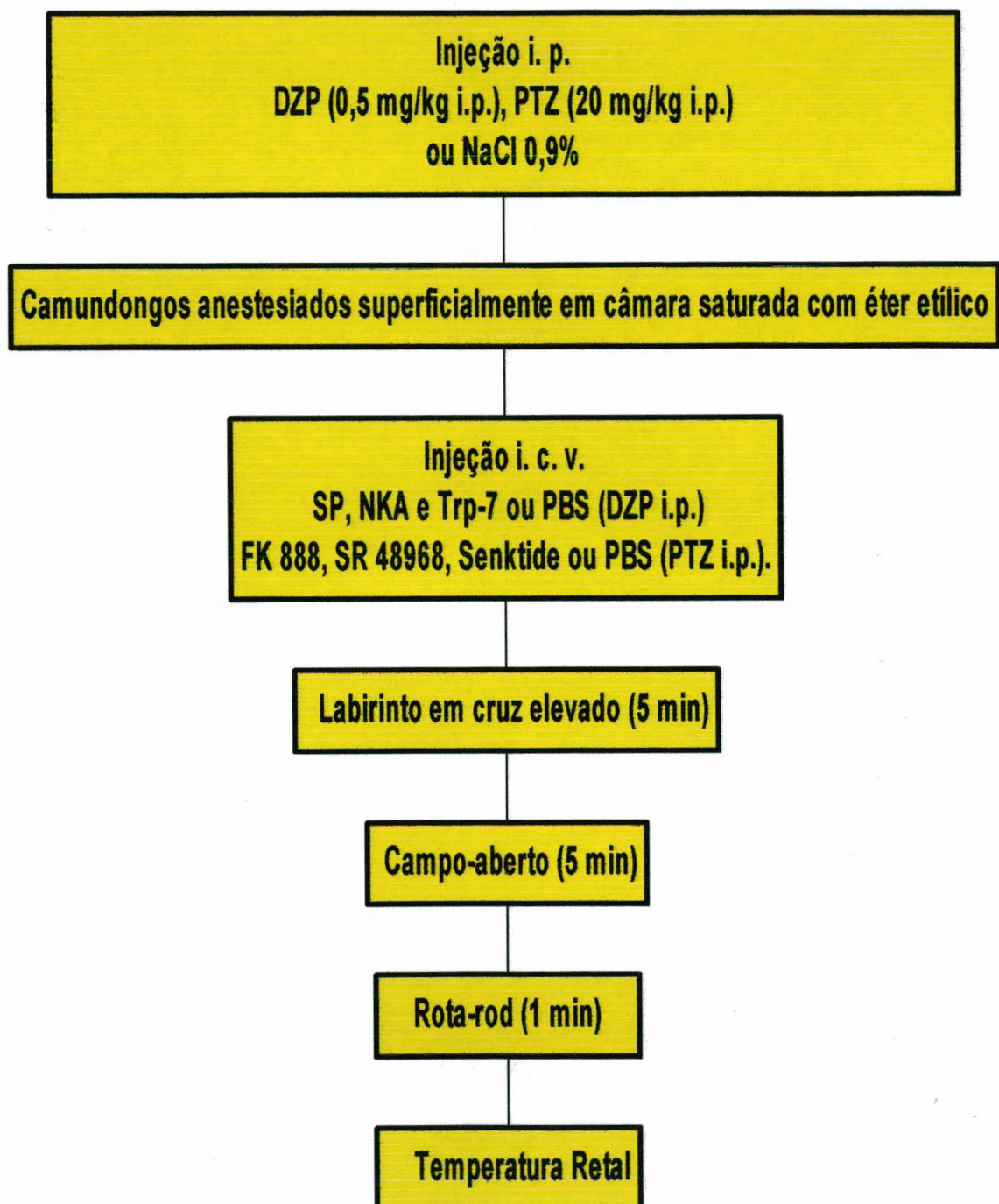
- **Pentilenotetrazol (PTZ)**, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA, antagonista GABAérgico (Olsen, 1981), dissolvido em NaCl 0,9%, pH 7,4;
- **Senktide ([succinil-Asp⁶,MePhe⁸] substância P₍₆₋₁₁₎)**, Peninsula Labs., Belmont, EUA), agonista seletivo sintético do receptor neurocinérgico NK₃ (Wörmser *et al.*, 1986);
- **SR 48968 ((S) - N - metil - N - 4 [4 - acetilamino -4-fenilpiperidina-2- (3,4-diclorofenil)butil] benzamida**, Sanofi Recherche, Montpellier, França), antagonista seletivo do receptor neurocinérgico NK₂ (Emonds-Alt *et al.*, 1992);
- **Substância P (SP = H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)**, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), neurocinina endógena com ação preferencial nos receptores NK₁ (Chang *et al.*, 1971);
- **[Trp⁷β-Ala⁸]neurocinina A₍₄₋₁₀₎, (Trp⁷)**, Peninsula Lab., Belmont, EUA), antagonista peptídico seletivo para o receptor neurocinérgico NK₃ (Drapeau *et al.*, 1990).

Os agonistas e antagonistas neurocinérgicos foram preparados como solução estoque (1 mM), em solução fosfato tamponada (PBS = "phosphate-buffered solution"): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Co.), estocados a -20 °C em tubos de Eppendorf siliconizados. Essas drogas foram, posteriormente, diluídas em PBS (pH=7,4), nas concentrações adequadas, na hora do uso. O DZP foi diluído em PBS ou NaCl 0,9%, com 10% de propilenoglicol, e o PTZ, em NaCl 0,9%, pH 7,4. O PBS e a salina (NaCl 0,9%) foram usados como soluções controle nos tratamentos i.c.v. e i.p., respectivamente.

Procedimentos Gerais

A administração intracerebroventricular (i.c.v.) das diversas drogas foi realizada empregando-se a técnica "free hand", desenvolvida por Haley e McCormick (1957) e modificada por Laursen e Belknap (1986). Cada animal foi levemente anestesiado com éter e a seringa foi posicionada em plano inclinado (45°) em relação ao crânio, com o bisel da agulha voltado para a cauda do animal. Uma linha imaginária foi traçada rostralmente às orelhas do animal e a agulha foi introduzida 3,5 mm no sentido dorso-ventral e, aproximadamente, 2 mm lateralmente à linha mediana. A injeção foi realizada com o auxílio de uma micro-seringa de Hamilton 701 N (10 µl), conectada a um tubo de polietileno (PE 20 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA) de aproximadamente 12 cm de comprimento. Na extremidade final do polietileno foi conectada uma agulha de insulina (13 x 4; 80/100; Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Curitiba, Paraná).

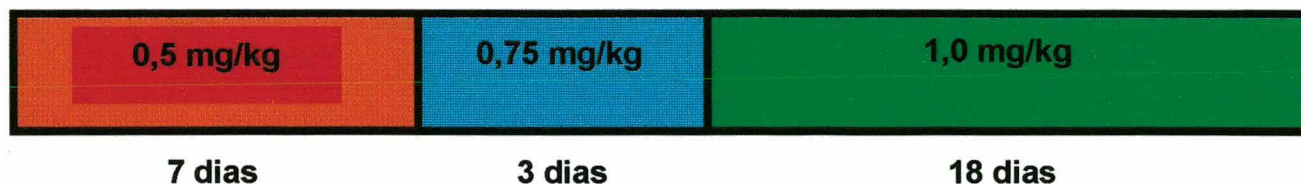
Os Esquemas 1 e 2 ilustram resumidamente os procedimentos experimentais agudo e repetido (protocolo de acordo com Andreatini e Leite, 1984), respectivamente.

ESQUEMA 1**Procedimento experimental – Tratamento agudo**

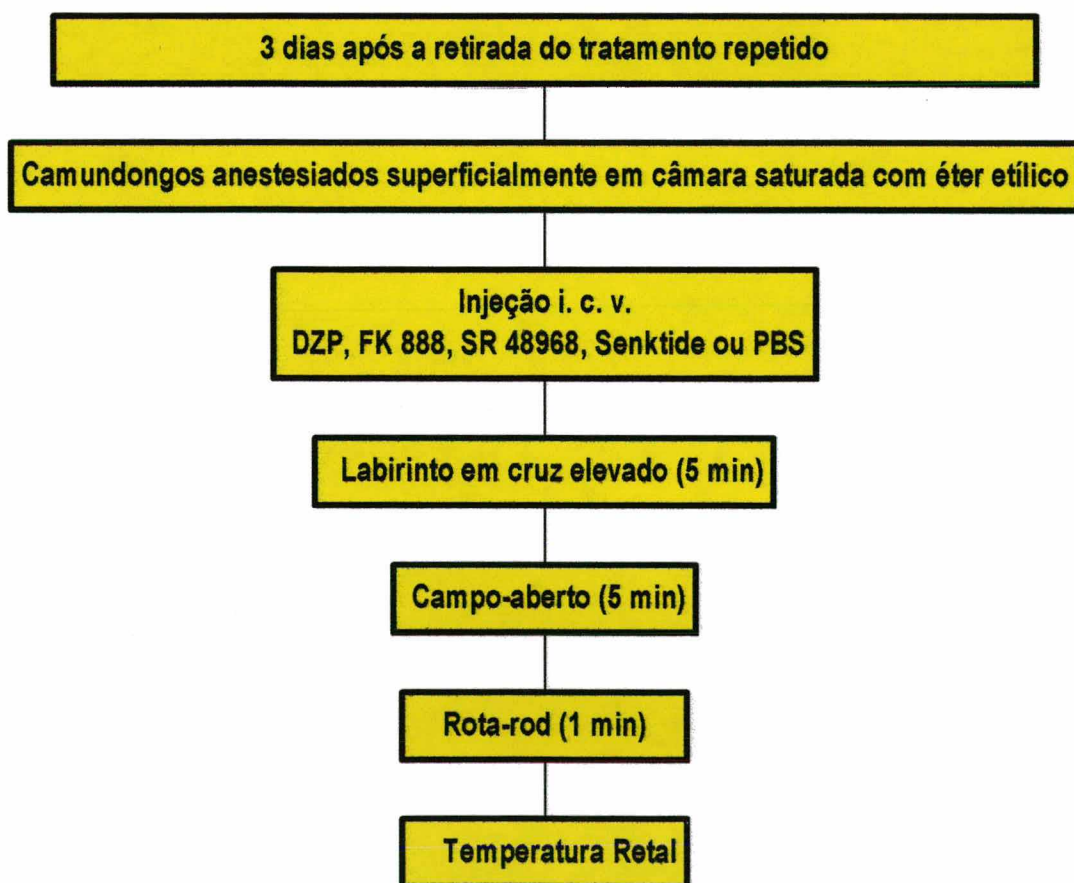
ESQUEMA 2

Procedimento experimental – Tratamento repetido (28 dias)

DZP i.p.



ou NaCl 0,9% i.p.



Após a injeção i.c.v. e a recuperação do reflexo postural, os animais foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE), seguido pelo campo-aberto e rota-rod. Imediatamente após o término das observações comportamentais, a temperatura corporal foi medida e, como usamos camundongos fêmeas, foi feita a coleta da secreção vaginal em solução salina (NaCl 0,9%) e a leitura do material foi realizada em microscopia óptica comum para determinação da fase do ciclo estral (Hoar, 1975). Os animais cuja fase do ciclo estral diferenciou do estágio de Diestro (D1 e D2) foram desconsiderados na análise dos resultados finais. A seguir, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a localização correta da injeção i.c.v. foi verificada visualmente *a fresco* em cada animal. Os animais que apresentaram sinais de hemorragia e/ou localização duvidosa/incorrecta da injeção foram descartados das análises posteriores.

Equipamentos

Labirinto em cruz elevado (“plus-maze”)

O LCE foi baseado no modelo proposto, em ratos, por Pellow *et al.* (1985) e validado por Lister (1990) para camundongos. O equipamento consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) opostos, em forma de cruz grega, elevados a 45 cm do nível do chão. Os braços abertos apresentam uma parede lateral de 0,25 cm como proteção, evitando a queda dos animais. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais foram confeccionadas em acrílico transparente e o assoalho em acrílico preto. O LCE encontra-se numa sala iluminada por uma luz vermelha de 15 w, e a temperatura mantida em 22 ± 2 °C.

Imediatamente após a recuperação do reflexo postural, cada animal foi colocado, individualmente, no LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento avaliado durante 5 min. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do equipamento, sendo que o

número de entradas nos braços fechados foi usado como medida da atividade locomotora. Segundo Rodgers *et al.* (1995), a entrada em um dos braços deve ser considerada quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço. O número total de entradas foi obtido pela soma do número de entradas nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a frequência de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se o número de entradas nos braços abertos pelo número total de entradas e este índice multiplicado por 100 ($[A/A + F] \times 100$). O percentual de tempo foi calculado de maneira semelhante: o tempo gasto nos braços abertos ou fechados foi dividido pela somatória do tempo de permanência em ambos os braços e o quociente obtido foi multiplicado por 100 ($[TA/TA + TF] \times 100$ ou $[TF/TA + TF]$; Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987; Treit *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1994). Foram também registrados no labirinto em cruz, medidas etológicas de avaliação como o número de imersões de cabeça (“head-dippings”) e estiramentos (“stretch attend postures”), que são medidas do comportamento de avaliação de risco (“risk assessment”; Rodgers e Cole, 1994) e o número de bolos fecais, como índice de emocionalidade (Archer, 1973), associado ou não à locomoção (Ader, 1967).

Os experimentos foram todos realizados entre 8:00 e 13:00 h. Antecedendo aos experimentos, os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma ante-sala do laboratório por um período de, no mínimo, 1h antes do início dos mesmos.

Campo-aberto (“open-field”)

Após a exposição ao LCE, cada animal foi colocado, individualmente, no centro de um campo aberto confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto, 30 x 30 x 15 cm) para avaliar a atividade exploratória dos animais: movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza

("grooming"), de levantar ("rearing") e a sua defecação, parâmetros esses registrados durante um período de 5 min.

Rota-rod

A coordenação 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. Os animais, após a avaliação no campo-aberto foram colocados na barra por 1 min e registrou-se o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas do aparelho.

Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Graphpad INSTAT versão 2.05a (1990-1994). Quando realizadas às caracterizações dos efeitos ansiolíticos do diazepam e dos efeitos ansiogênicos do pentilenotetrazol o teste estatístico utilizado foi o teste *t* de Student não pareado. As outras comparações estatísticas foram realizadas pela análise de variância univariada (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls (comparações entre diferentes tratamentos) conforme indicado na legenda das figuras, tendo como variável independente o fator tratamento. O nível de significância estatística considerado foi $p \leq 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 9 - 10 animais por grupo, nos diversos testes realizados.

RESULTADOS

IV- RESULTADOS

A) Caracterização dos efeitos ansiolíticos do diazepam, dos antagonistas NK₁ e NK₂ e do agonista NK₃ no labirinto em cruz elevado

Objetivos:

Estabelecer o efeito do tipo ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado, em camundongos, para fim de comparações posteriores, utilizando esse benzodiazepínico como droga ansiolítica padrão. Confirmar as ações dos antagonistas NK₁ e NK₂ e do agonista NK₃ no mesmo modelo experimental.

Resultados:

A figura 8 mostra a frequência de entradas nos braços abertos (A) e o tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B). A injeção i.p. de diazepam (DZP, 0.5 mg/kg), um benzodiazepínico clássico, seguida quinze minutos após pela administração i.c.v. de PBS, alterou alguns parâmetros observados no LCE, como esperado para drogas ansiolíticas, sendo que apenas o tempo de permanência nos braços abertos foi aumentado significativamente ($t = 2,02$; $P \leq 0,05$) por esse tratamento, quando comparado ao valor apresentado pelo grupo controle (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.). Na figura 9 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A) e número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados, que não foram alterados de maneira significativa pelo tratamento. Os demais parâmetros comportamentais são apresentados na Tabela 1 e também não foram significativamente modificados pelo tratamento com DZP.

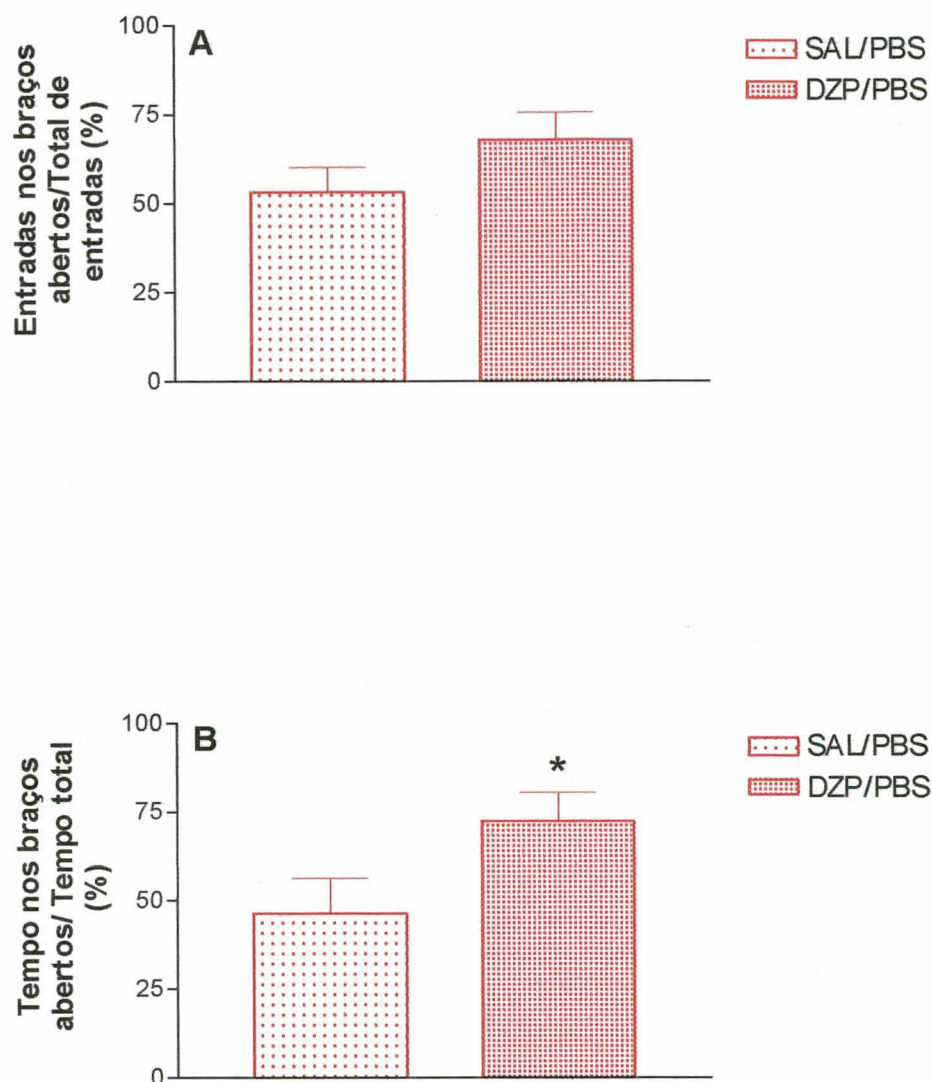


Figura 8 - Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou DZP (0.5 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10 (teste *t* de Student não pareado, * $P \leq 0,05$).

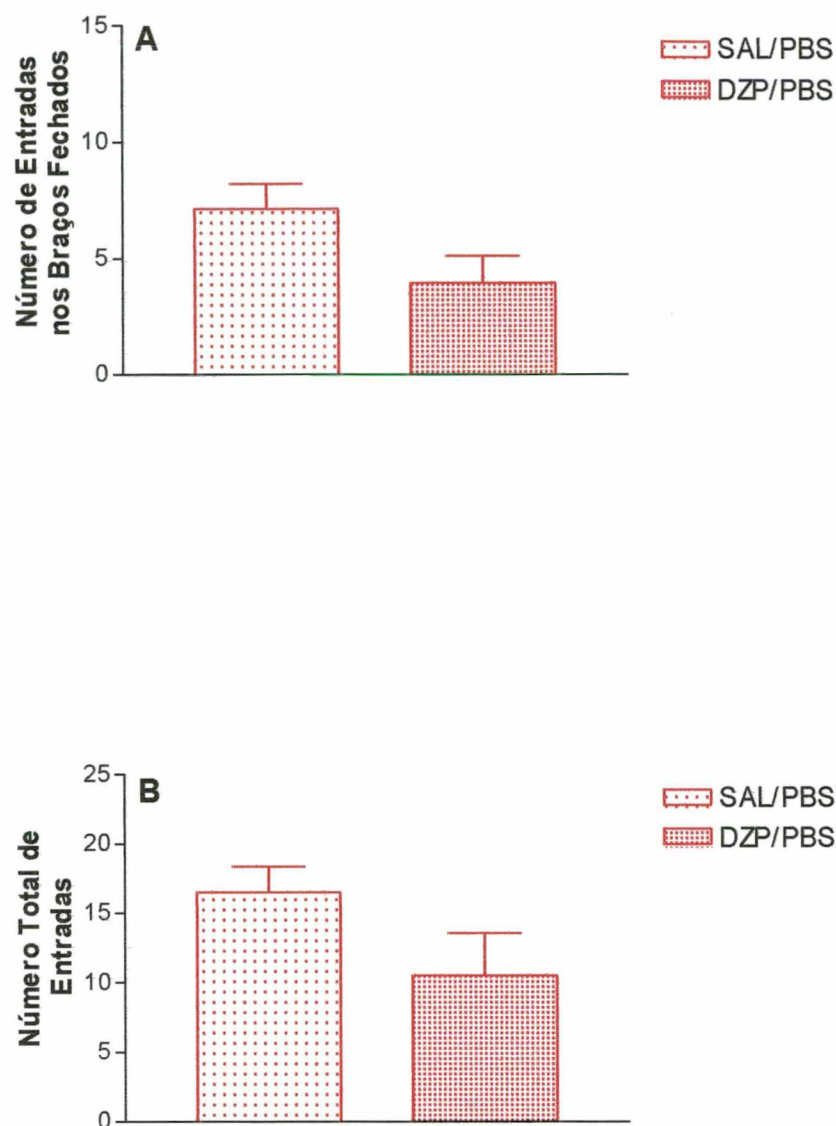


Figura 9 - Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou DZP (0.5 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10 (teste *t* de Student não pareado, $P > 0,05$).

A administração i.c.v. de FK 888, uma droga antagonista seletiva dos receptores NK_1 , assim como a de senktide (SENK), um agonista seletivo dos receptores neurocinérgicos NK_3 , após a injeção i.p. de NaCl 0,9% não alteraram significativamente quaisquer parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado (Figuras 10 e 11; Tabela 1), em comparação aos valores do grupo controle (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.).

O SR 48968, um antagonista seletivo de receptores NK_2 , embora não tenha modificado significativamente a frequência de entradas nos braços abertos (Figura 10A; $F_{(3,36)} = 2,47$, $P > 0,05$), aumentou de forma estatisticamente significativa o tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (Figura 10B; $F_{(3,36)} = 3,74$, $P < 0,05$).

As demais medidas comportamentais registradas no labirinto em cruz elevado não foram influenciadas pelo tratamento com os antagonistas neurocinérgicos NK_1 e NK_2 , ou com o agonista NK_3 e estão apresentadas na Figura 11 (número de entradas nos braços fechados – A – e entradas totais em ambos os braços – B) e na Tabela 1 (demais parâmetros da análise etológica do comportamento).

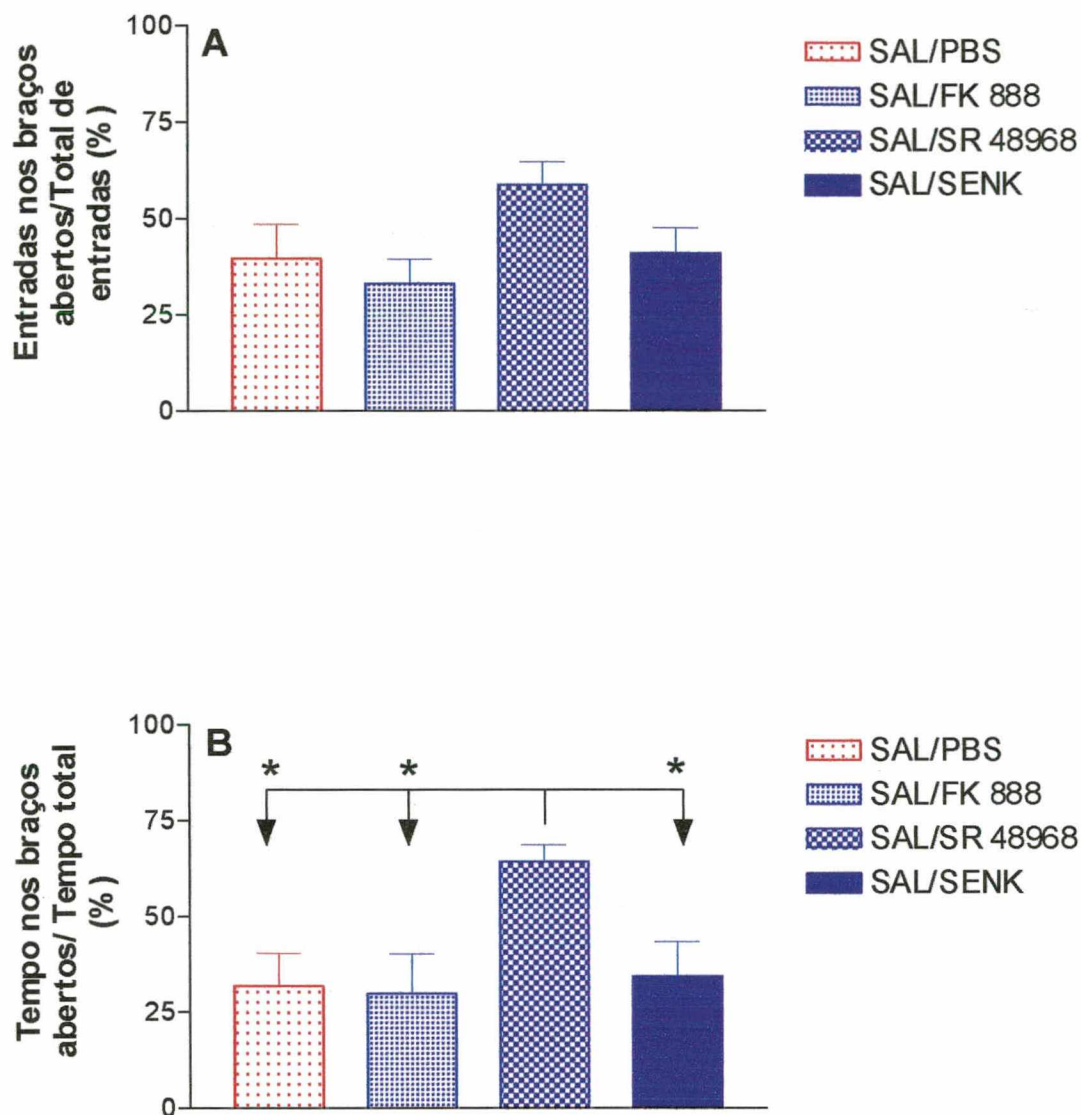


Figura 10 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

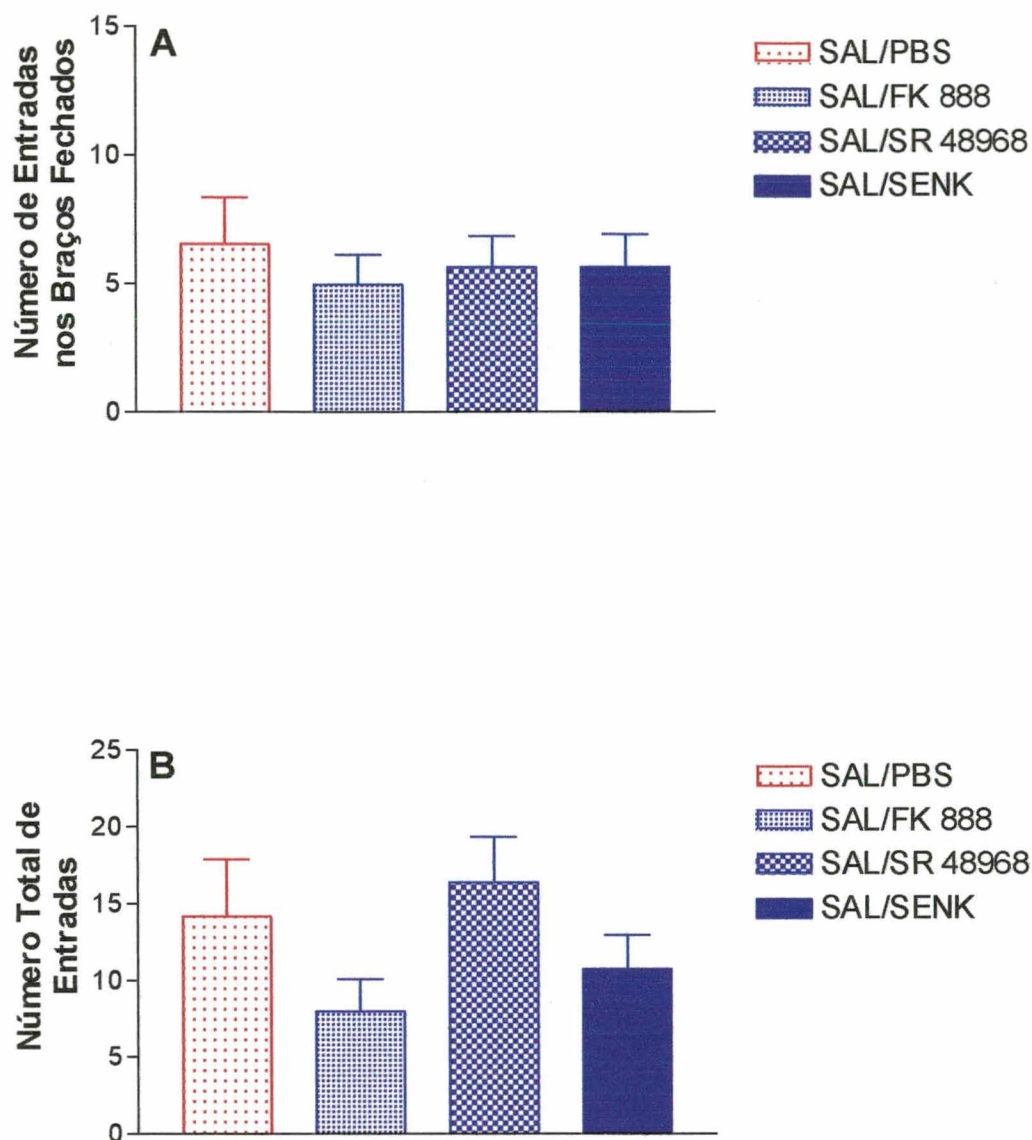


Figura 11 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

Tabela 1: Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiolítica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	3.2 \pm 0.8	12.3 \pm 3.7	43.8 \pm 8.9	6.0 \pm 1.8	0.8 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1
SAL/FK 888	2.8 \pm 0.9	5.2 \pm 1.6	48.9 \pm 15.0	3.3 \pm 0.8	1.6 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0
SAL/SR 48968	2.7 \pm 0.6	17.7 \pm 3.8	45.2 \pm 11.2	2.5 \pm 0.7	1.2 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
SAL/SENK	4.6 \pm 1.1	7.1 \pm 1.6	46.9 \pm 10.4	3.8 \pm 1.1	1.1 \pm 0.6	0.2 \pm 0.2

B) Caracterização dos efeitos ansiogênicos do pentilenotetrazol, dos agonistas NK₁ e NK₂ e do antagonista NK₃ no labirinto em cruz elevado

Objetivos:

Estabelecer o efeito do tipo ansiogênico do pentilenotetrazol no labirinto em cruz elevado, em camundongos, para fim de comparações posteriores, utilizando essa droga como ansiogênica padrão. Confirmar as ações dos agonistas NK₁ e NK₂ e do antagonista NK₃ no mesmo modelo experimental.

Resultados:

A injeção i.p. de pentilenotetrazol (PTZ , 20 mg/kg), seguida quinze minutos após pela injeção i.c.v. de PBS, promoveu uma redução significativa de alguns parâmetros observados no LCE, como esperado para drogas ansiogênicas, quando comparados com os dados obtidos no grupo controle (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.). Estes resultados estão mostrados na figura 12 e são referentes, respectivamente, à frequência de entradas nos braços abertos (A, $t = 2,28$, $P < 0,05$) e ao tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B, $t = 2,59$ $P < 0,05$).

O número de entradas nos braços fechados (Figura 13A), assim como o número de entradas totais (braços abertos + braços fechados; Figura 13B) e os parâmetros etológicos observados no labirinto em cruz elevado, “stretch attend postures” (SAP), “head-dippings” (HD), tempo na plataforma central, “rearing” (levantar) e “grooming” (auto-limpeza) (Tabela 2), não foram alterados pelo tratamento sistêmico com o PTZ.

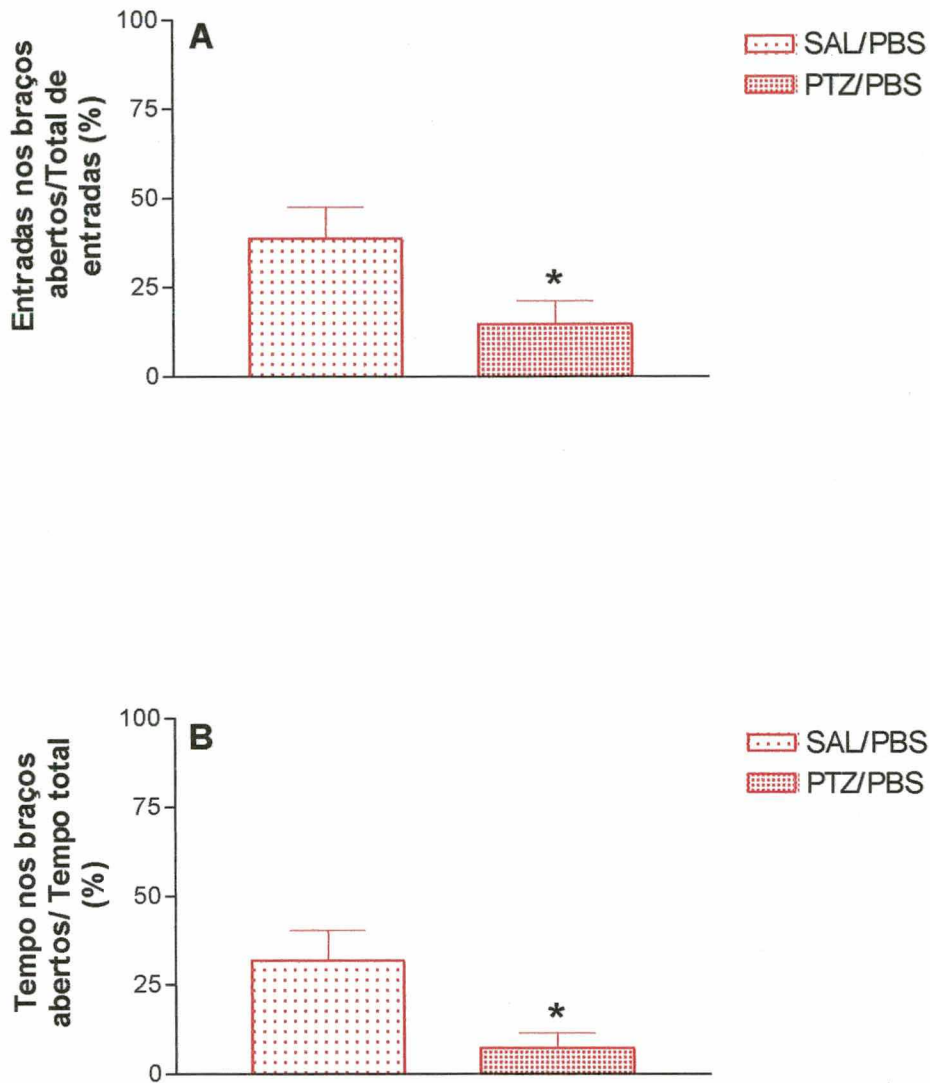


Figura 12 - Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou PTZ (20 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (teste *t* de Student não pareado, * $P \leq 0,05$).

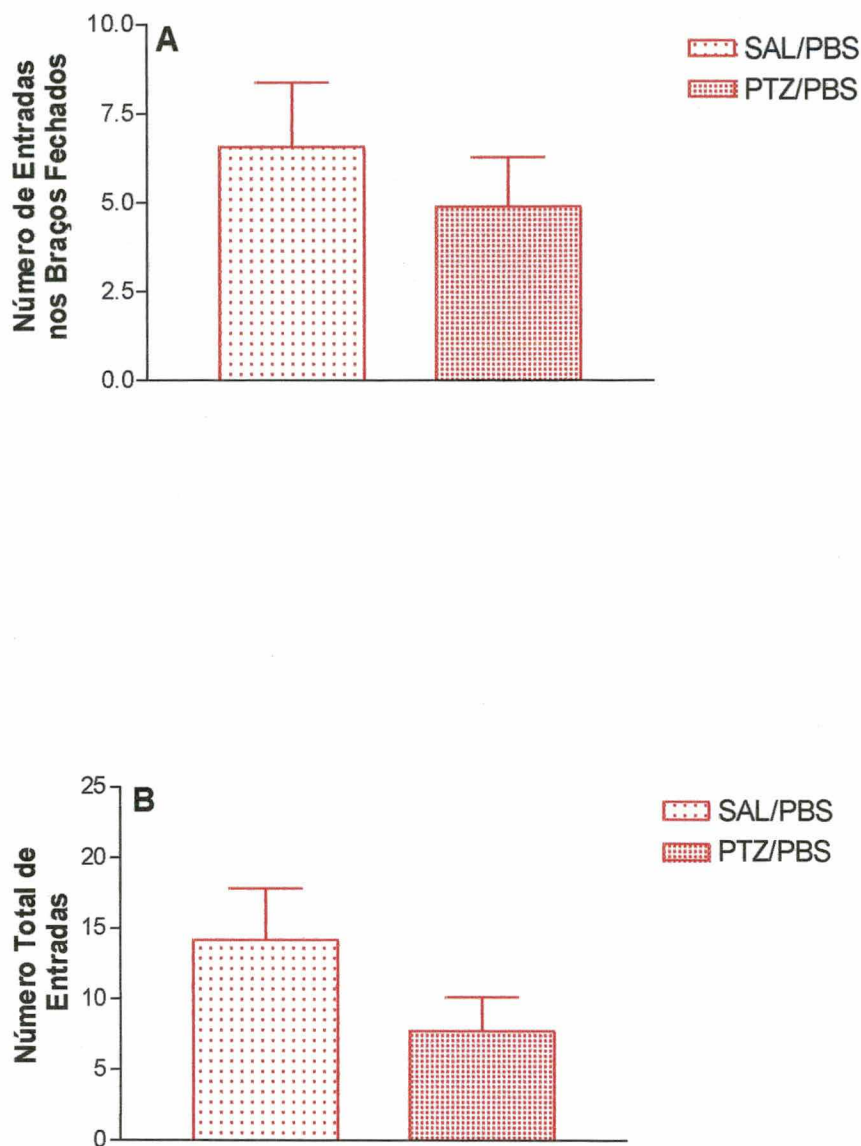


Figura 13 - Efeito da injeção i.p. de NaCl 0,9% ou PTZ (20 mg/kg), seguida da injeção i.c.v. de PBS, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (teste *t* de Student não pareado, $P > 0,05$).

A administração i.c.v. de substância P (SP), o agonista natural preferencial dos receptores neurocinérgicos do tipo NK₁, após a injeção i.p. de NaCl 0,9% reduziu o tempo de permanência nos braços abertos do LCE de maneira significativa (Figura 14B; $F_{(3,36)} = 2,93$, $P < 0,05$), mostrando uma atividade do tipo ansiogênica para esta droga. A frequência de entradas nos braços abertos (Figura 14A; $F_{(3,36)} = 1,66$, $P > 0,05$), assim como os outros parâmetros registrados no LCE (Figura 15; Tabela 2), não foram modificados pela administração central da SP.

A injeção i.c.v. de NKA, uma droga agonista seletiva para os receptores NK₂ e do Trp-7, um antagonista seletivo de receptores NK₃, apesar de também reduzirem alguns parâmetros observados no LCE na mesma direção que drogas ansiogênicas como o PTZ, não promoveram diferenças estatisticamente significantes em quaisquer parâmetros registrados, clássicos (Figura 14 A e B e Figura 15 A e B) ou etológicos (Tabela 2).

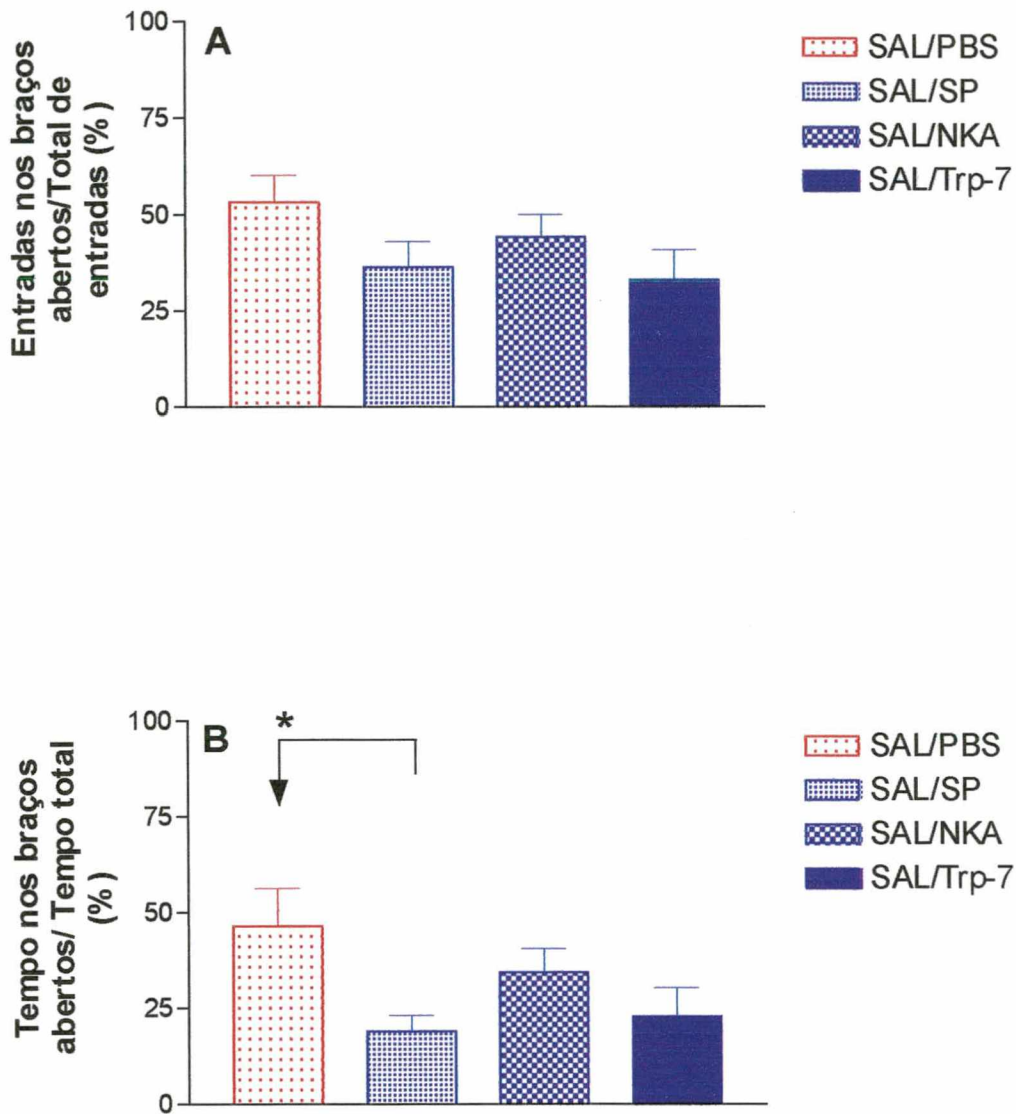


Figura 14 - Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

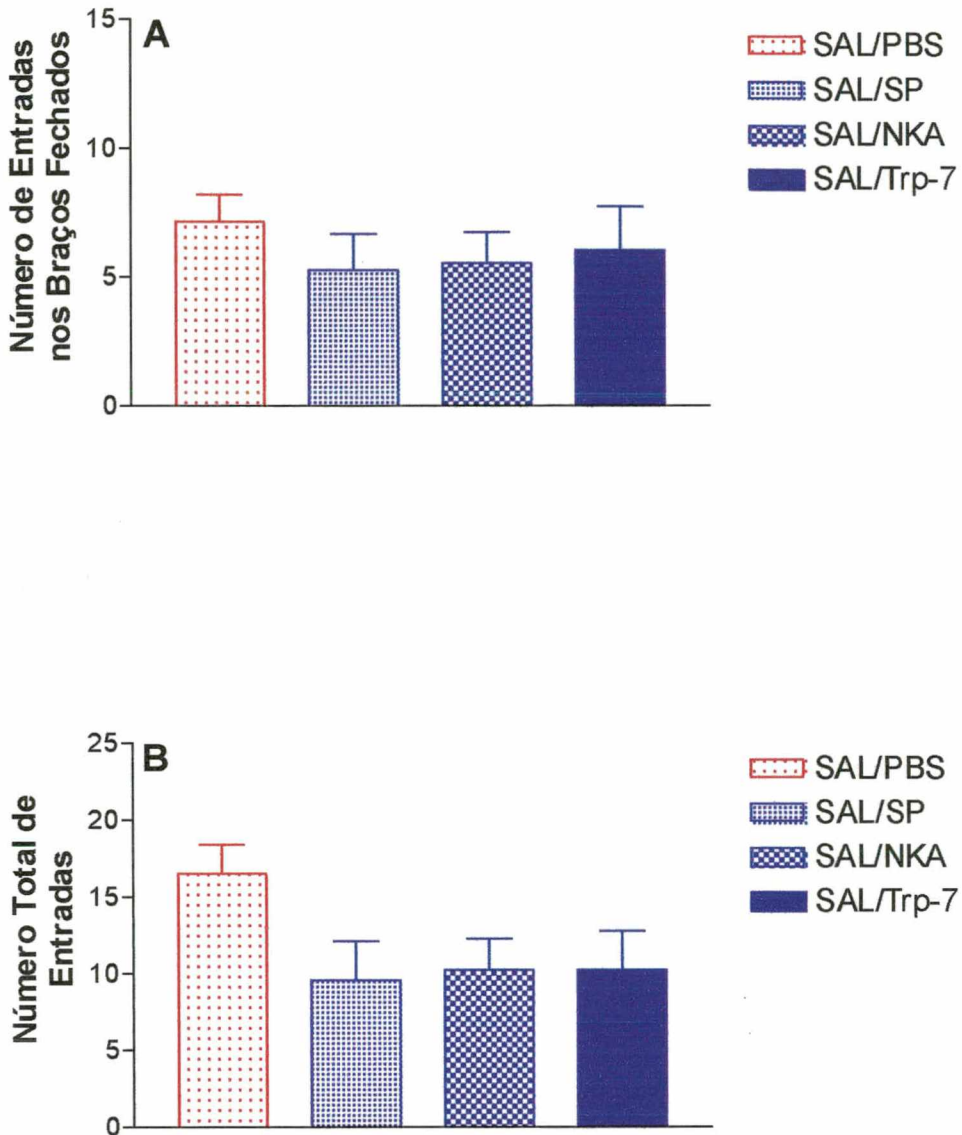


Figura 15 - Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de NaCl 0,9%, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

Tabela 2: Efeito dos diferentes tratamentos com drogas do tipo ansiogênica nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	4.0 \pm 0.7	13.4 \pm 2.9	51.4 \pm 10.4	2.2 \pm 0.4	2.2 \pm 0.4	0.8 \pm 0.5
SAL/SP	4.0 \pm 1.8	7.8 \pm 1.2	52.2 \pm 10.8	3.7 \pm 1.1	1.3 \pm 0.4	0.3 \pm 0.1
SAL/NKA	3.3 \pm 0.6	8.3 \pm 1.9	55.6 \pm 13.7	4.9 \pm 1.5	1.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.1
SAL/Trp-7	6.0 \pm 1.7	6.2 \pm 2.3	42.1 \pm 7.9	4.5 \pm 1.4	1.0 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1

C) Influência do tratamento central com agonistas e antagonista neurocinérgicos no efeito ansiolítico do diazepam

Objetivos:

Verificar a influência dos compostos neurocinérgicos ansiogênicos (agonistas NK₁ e NK₂ e antagonista NK₃) no efeito ansiolítico agudo do diazepam.

Resultados:

O efeito ansiolítico do tratamento agudo com DZP foi revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK₂ e antagonista NK₃, mas não pela substância P, agonista NK₁. A SP, em animais pré-tratados com DZP, não diminuiu nem a frequência de entradas nos braços abertos, nem o tempo de permanência nestes braços (Figura 16A e B, respectivamente), quando comparamos com os animais controle tratados agudamente com o ansiolítico padrão (DZP i.p. + PBS i.c.v.). Por outro lado, o tratamento central com o agonista de receptores NK₂, NKA, reverteu o efeito ansiolítico do DZP, como pode ser depreendido da redução significativa tanto da frequência de entradas nos braços abertos, como do tempo de permanência nestes braços (Figura 16A e B, respectivamente). Finalmente, o Trp-7, o antagonista de receptores do tipo NK₃, também reverteu a ação do tipo ansiolítica do tratamento agudo com o DZP, denotado pela redução significante tanto na frequência de entradas nos braços abertos (Figura 16A; $F_{(3,36)} = 2,84$, $P < 0,05$) como no tempo de permanência nestes braços (Figura 16B; $F_{(3,36)} = 18,81$, $P < 0,05$). Os demais parâmetros observados no LCE, como o número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas (Figura 17A e B), e as outras medidas etológicas (Tabela 3), exceto o número de imersões de cabeça (HD), que foi reduzido significativamente pelo NKA administrado i.c.v., não foram afetados pelos diferentes tratamentos centrais em animais pré-tratados com DZP.

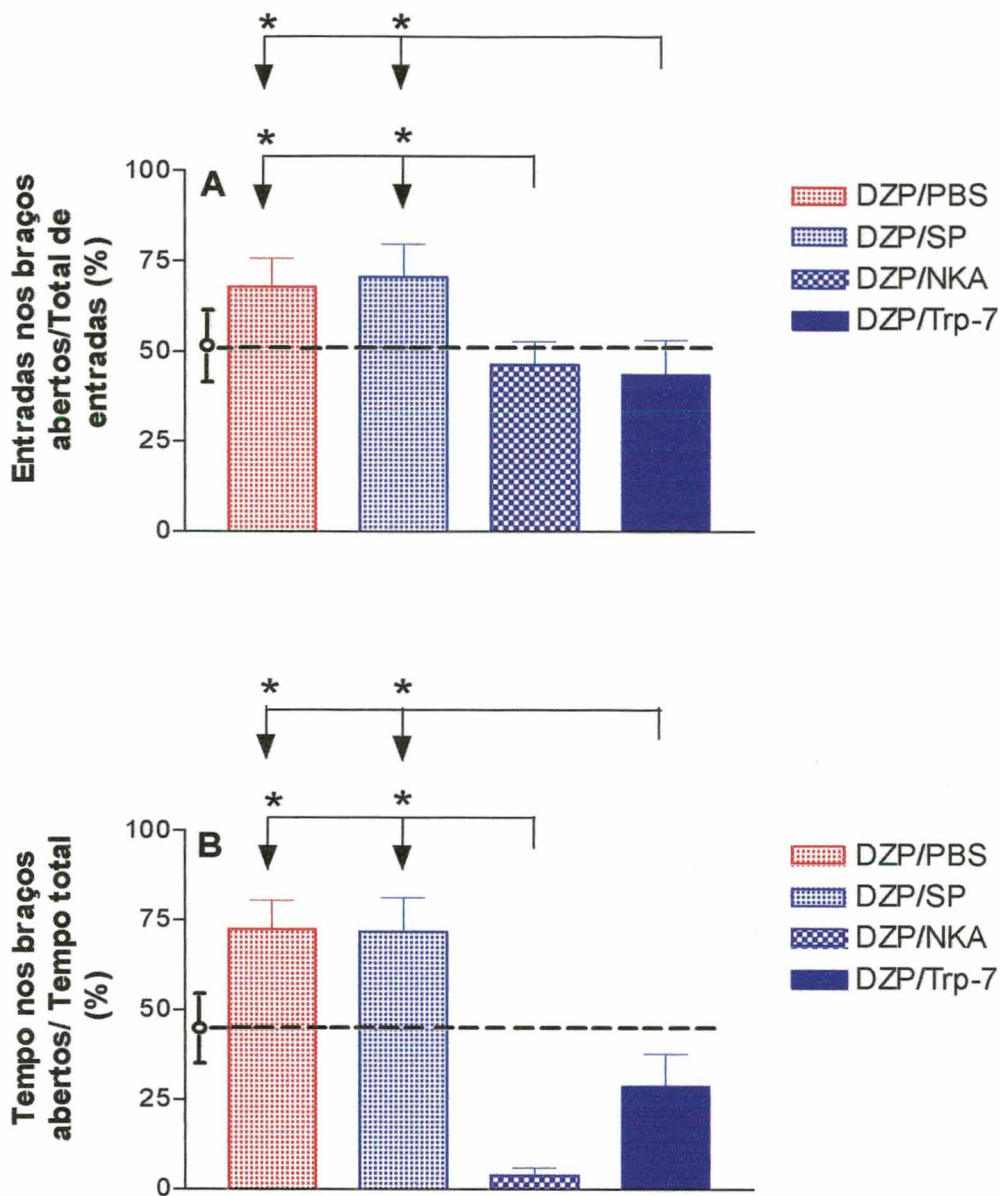


Figura 16 - Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de DZP (0.5 mg/kg), na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (A) e (B) ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$. A linha tracejada representa a média dos valores dos animais controles (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.) transpostas das Figs. 8 e 14.

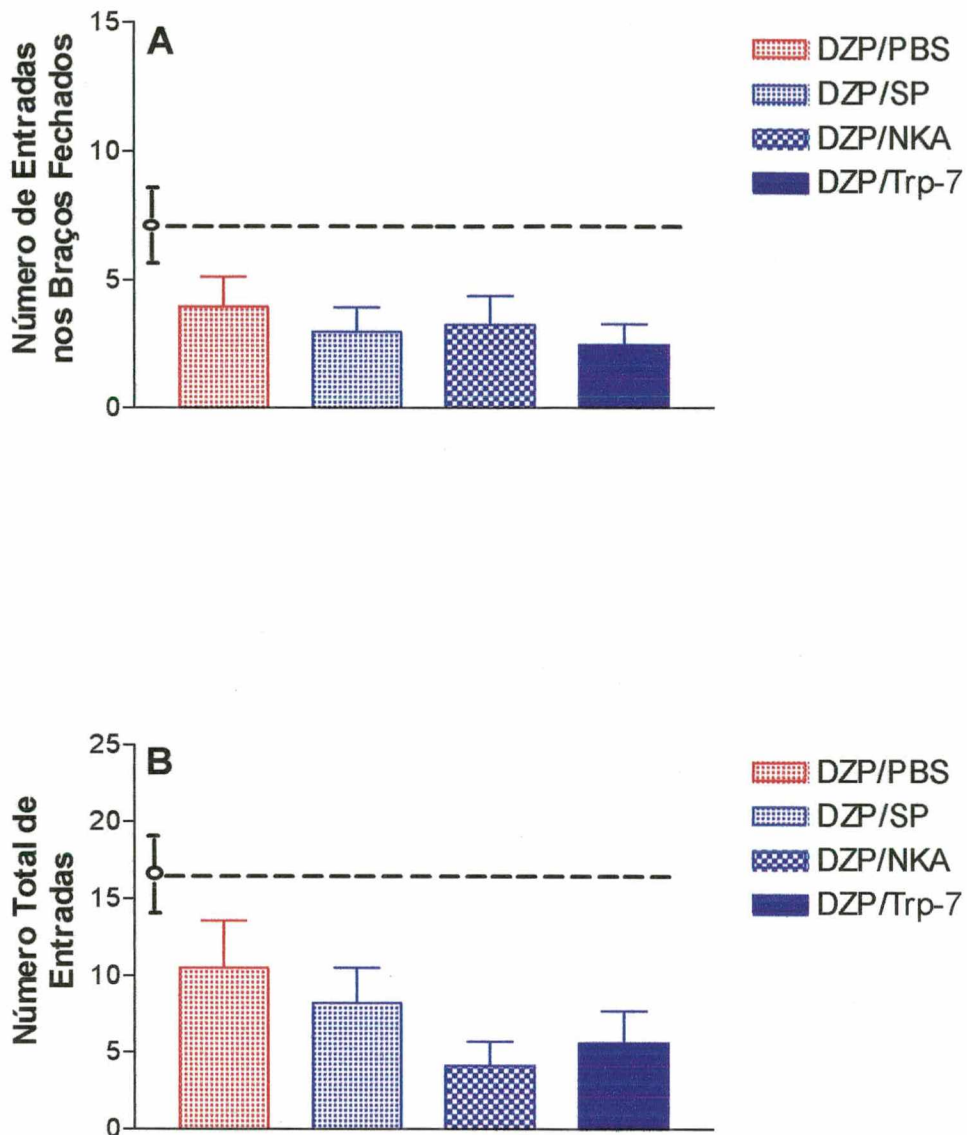


Figura 17 - Efeito da injeção i.c.v. de SP, NKA, Trp-7 e PBS, 15 min após a injeção i.p. de DZP (0.5 mg/kg), no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (A) e (B) ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$. A linha tracejada representa a média dos valores dos animais controles (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.) transpostas das Figs. 9 e 15.

Tabela 3: Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais. * $P \leq 0,05$.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
DZP/PBS	2.3 \pm 1.0	14.4 \pm 4.0	67.0 \pm 26.2	3.7 \pm 1.2	1.7 \pm 0.7	1.1 \pm 0.4
DZP/SP	0.7 \pm 0.2	9.4 \pm 3.1	52.9 \pm 16.8	3.6 \pm 1.8	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4
DZP/NKA	1.2 \pm 0.7	1.7 \pm 0.8 *	74.0 \pm 26.7	1.7 \pm 1.0	0.6 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1
DZP/Trp-7	2.0 \pm 1.0	5.0 \pm 1.5	49.9 \pm 22.8	2.2 \pm 0.7	1.1 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4

D) Influência do tratamento central com agonista e antagonistas neurocinérgicos no efeito ansiogênico do pentilenotetrazol

Objetivos:

Investigar a influência dos compostos neurocinérgicos com atividade ansiolítica (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃) no efeito ansiogênico agudo do pentilenotetrazol.

Resultados:

A administração central dos antagonistas NK₁ e NK₂, mas não do agonista NK₃, reverteu a ação ansiogênica do tratamento agudo sistêmico com PTZ, observada no labirinto em cruz elevado. A injeção i.c.v. tanto do FK 888 como do SR 48968, antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos do tipo NK₁ e NK₂, respectivamente, reverteu o efeito ansiogênico do PTZ, como pode ser observado pelo aumento significativo na frequência de entradas nos braços abertos (Figura 18A; $F_{(3,36)} = 5,93$, $P < 0,05$) e no tempo de permanência nesses mesmos braços (Figura 18B; $F_{(3,36)} = 7,51$, $P < 0,05$), comparando-se com o respectivo grupo controle (PTZ i.p. + PBS i.c.v.). As outras medidas registradas no LCE, como o número de entradas nos braços fechados e o número total de entradas (Figura 19A e B), e as demais medidas etológicas (Tabela 4), não foram afetados pela administração central de FK 888 ou SR 48968, nos animais pré-tratados sistemicamente com PTZ.

Por outro lado, o SENK, agonista seletivo dos receptores NK₃, não alterou o perfil ansiogênico do PTZ em nenhum dos parâmetros registrados no LCE (Figura 18A e B, Figura 19A e B, Tabela 4).

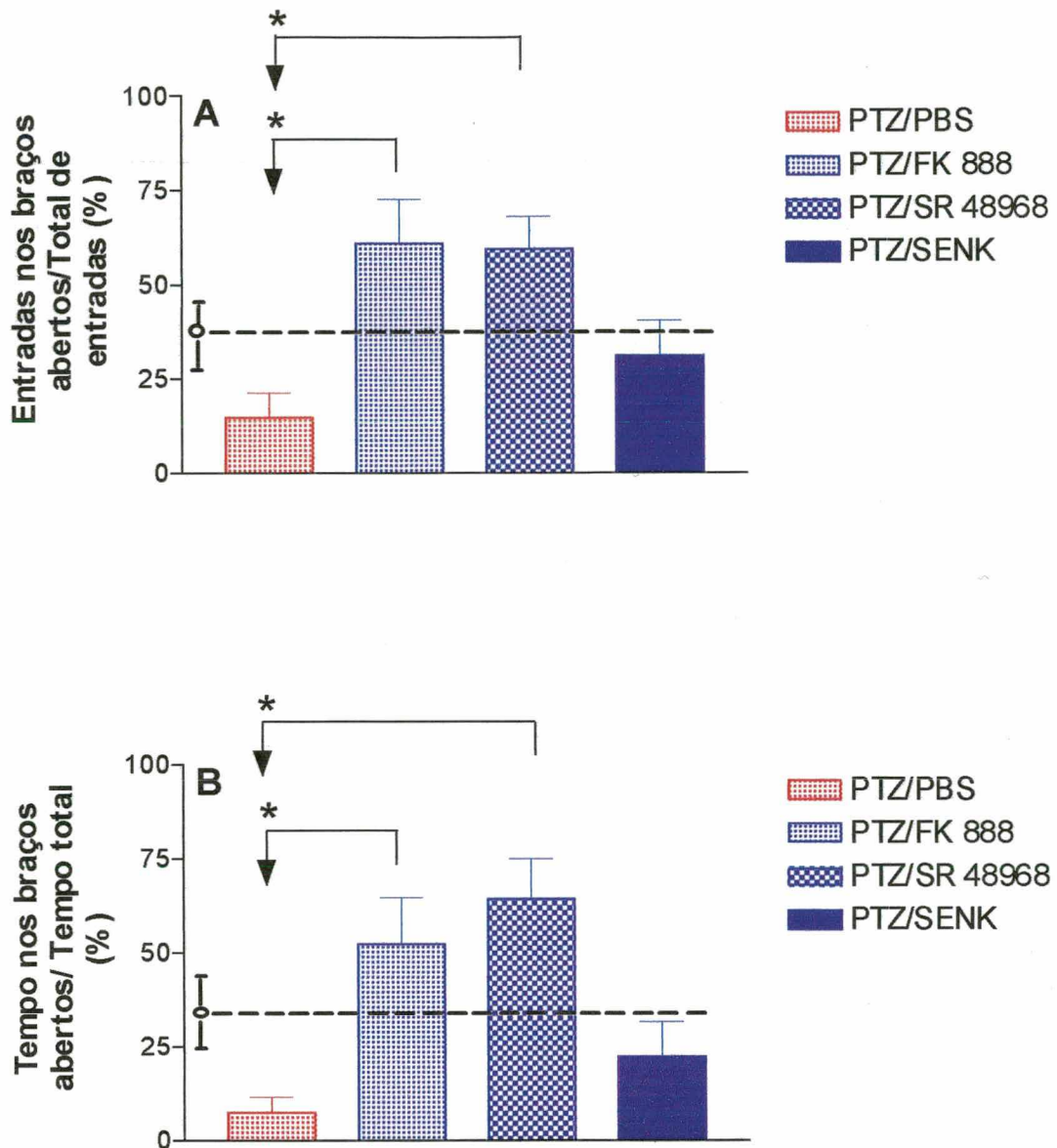


Figura 18 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 minutos após a injeção i.p. de PTZ (20 mg/kg), na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (A) e (B) ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $*P \leq 0,05$. A linha tracejada representa a média dos valores dos animais controles (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.) transpostas das Figs. 10 e 12.

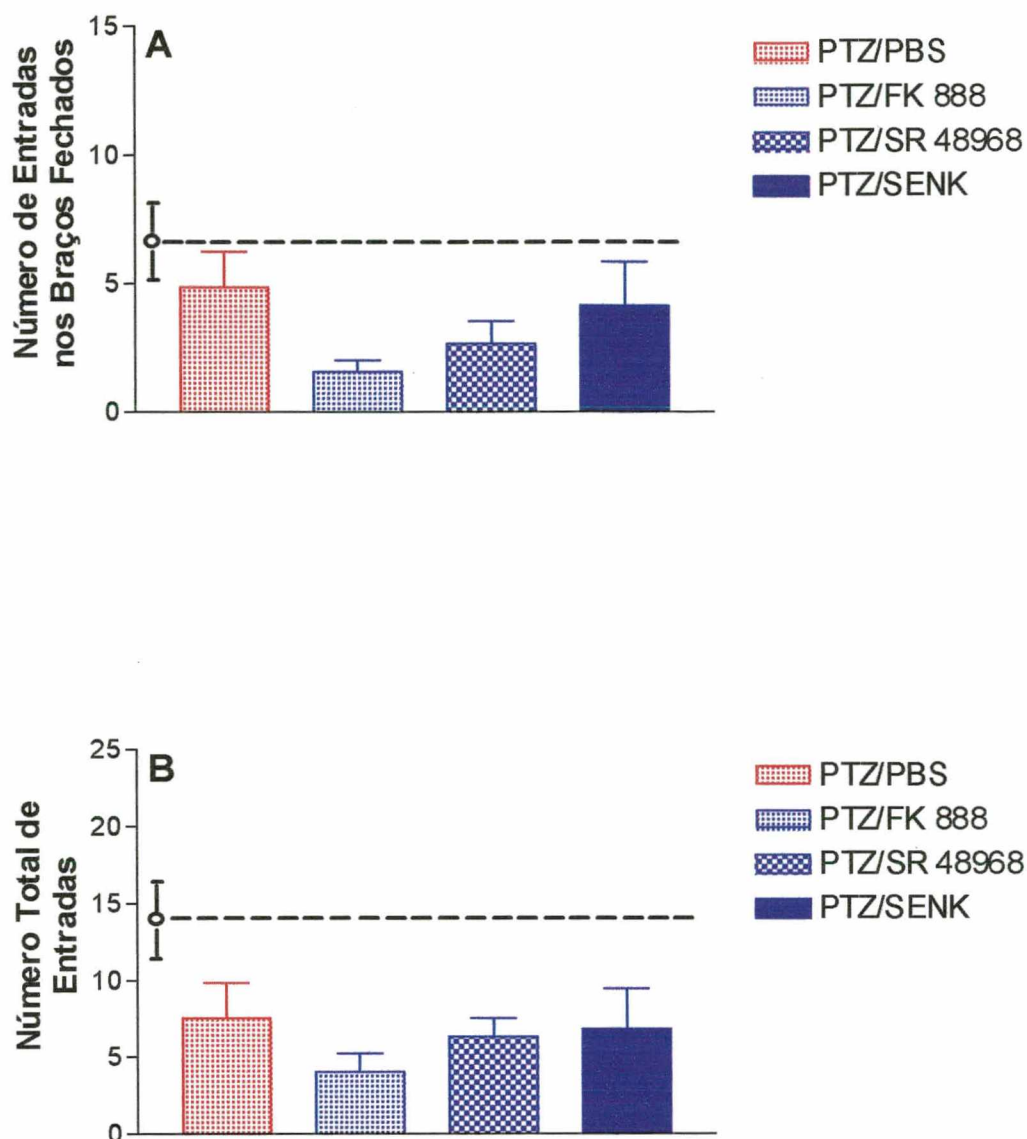


Figura 19 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888 (100 pmol), SR 48968 (100 pmol), SENK (10 pmol), e PBS, 15 minutos após a injeção i.p. de PTZ, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 10. (A) e (B) ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$. A linha tracejada representa a média dos valores dos animais controles (NaCl 0,9% i.p. + PBS i.c.v.) transpostas das Figs. 11 e 13.

Tabela 4: Influência dos diferentes tratamentos no efeito do tratamento agudo com o pentilenotetrazol nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
PTZ/PBS	4.4 \pm 1.0	4.2 \pm 1.5	72.6 \pm 16.5	5.7 \pm 1.6	1.2 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
PTZ/FK 888	1.9 \pm 0.6	7.0 \pm 2.3	99.6 \pm 29.2	3.1 \pm 1.2	0.8 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2
PTZ/SR 48968	2.9 \pm 1.2	9.8 \pm 2.2	81.3 \pm 23.9	1.9 \pm 0.9	0.9 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
PTZ/SENK	3.3 \pm 0.8	5.3 \pm 1.6	77.6 \pm 19.1	3.8 \pm 1.4	0.8 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0

E) Caracterização do efeito ansiolítico do tratamento agudo sistêmico e central com diazepam após a retirada abrupta do tratamento repetido com benzodiazepínico

Objetivos:

Estabelecer o efeito ansiolítico do diazepam administrado agudamente por 2 vias, i.p. e i.c.v., após a retirada abrupta do tratamento repetido por 28 dias com diazepam.

Resultados:

A Figura 20 mostra que a retirada do DZP ao final do tratamento repetido por 28 dias, promoveu uma redução não estatisticamente significativa tanto na frequência de entradas nos braços abertos, como no tempo de permanência nestes braços, em relação aos valores dos animais controle (NaCl 0,9% i.p.). A injeção i.p. de DZP, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com doses crescentes de DZP, promoveu um aumento significativo na frequência de entradas nos braços abertos e no tempo de permanência nestes braços. Estes resultados estão apresentados na Figura 20 e referem-se à frequência de entradas nos braços abertos em relação ao total de entradas (A; $F = 2,854$, $P < 0,05$) e ao tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B; $F = 8,599$, $P < 0,05$).

Os demais parâmetros comportamentais registrados no LCE, como o número de entradas nos braços fechados e o número de entradas totais (braços abertos + braços fechados) estão apresentados nas Figura 21A e B, e mostram também que ocorreu um aumento dos mesmos após a injeção i.p. de DZP, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com doses crescentes de DZP. As outras medidas etológicas (Tabela 5), não foram alteradas pela administração sistêmica de DZP, nos animais com retirada abrupta de DZP.

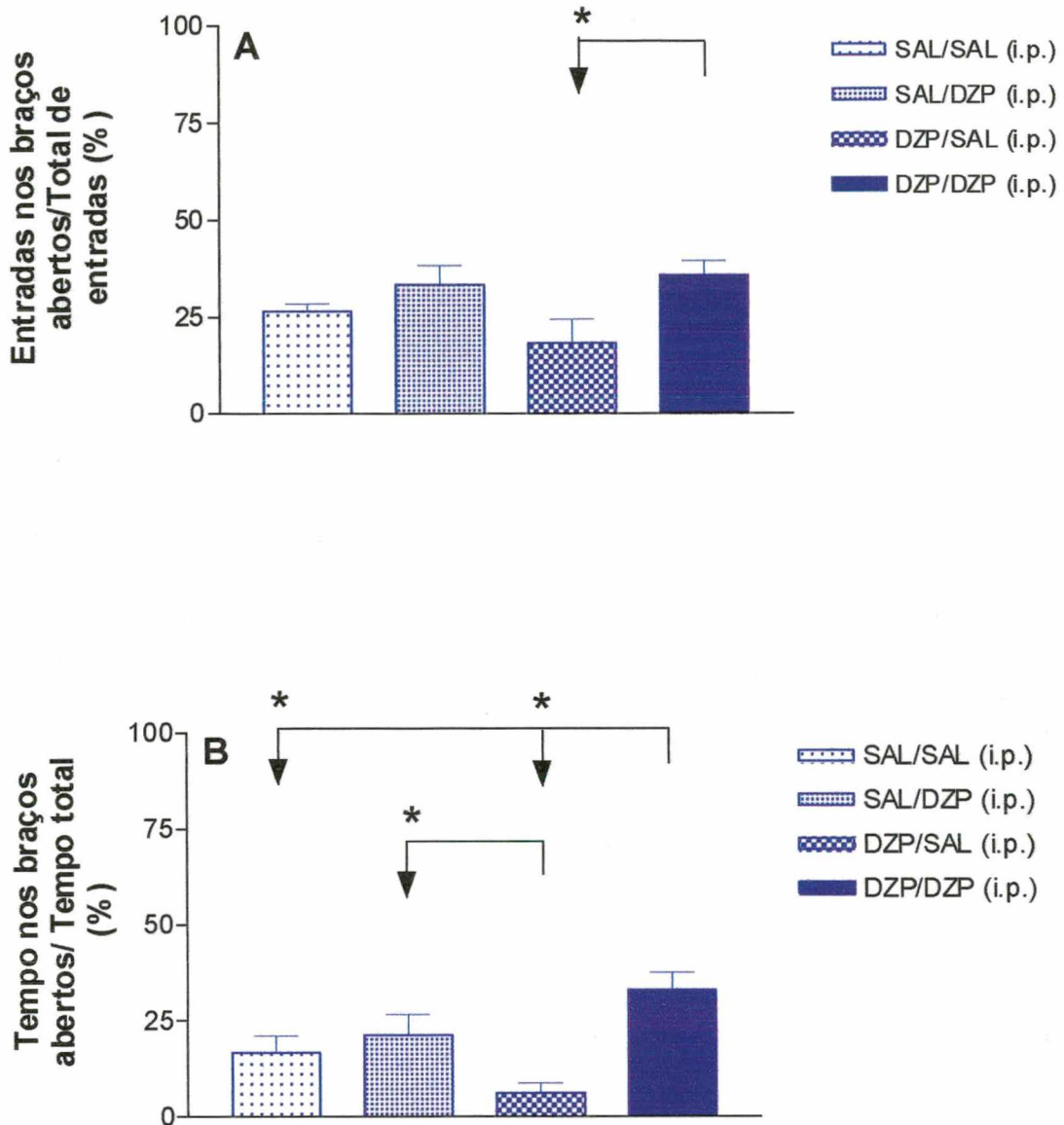


Figura 20 - Efeito da administração sistêmica aguda de DZP i.p. (0.5 mg/kg), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 9 (ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

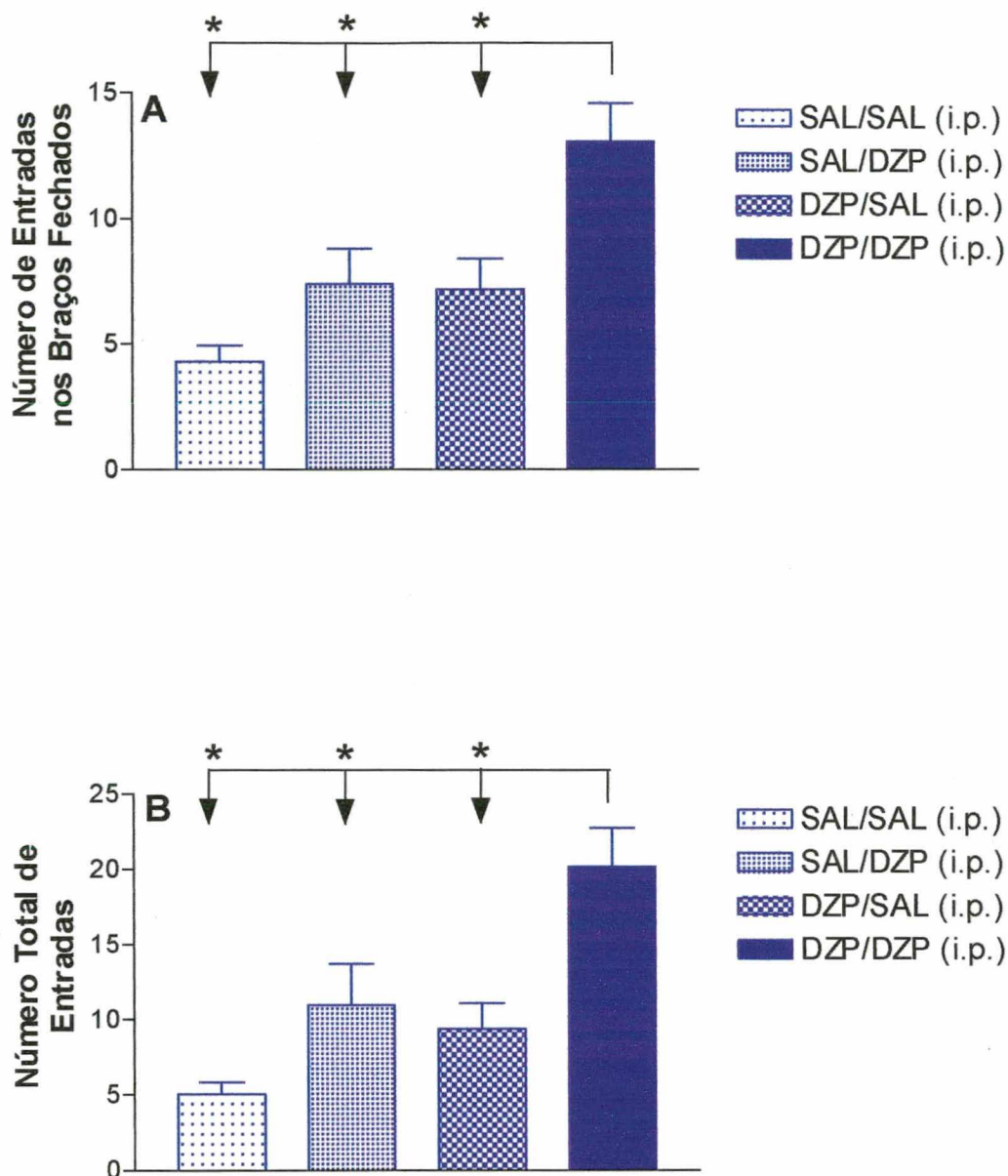


Figura 21 - Efeito da administração sistêmica aguda de DZP i.p. (0.5 mg/kg), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 9 (ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

Tabela 5: Efeito do diazepam i.p. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/SAL	6.7 \pm 0.7	1.5 \pm 0.4	90.0 \pm 34.6	7.4 \pm 1.8	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.6
SAL/DZP	5.7 \pm 1.0	5.8 \pm 1.5	59.6 \pm 10.9	9.5 \pm 2.6	1.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.4
DZP/SAL	8.2 \pm 1.1	6.2 \pm 1.8	68.6 \pm 17.7	7.8 \pm 1.3	1.3 \pm 0.4	1.5 \pm 0.5
DZP/DZP	5.3 \pm 2.1	10.0 \pm 1.1	69.7 \pm 14.0	8.0 \pm 1.3	1.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.4

Na Figura 22A e B estão apresentados os resultados obtidos na retirada abrupta do tratamento repetido (28 dias) com DZP, onde nota-se uma redução não estatisticamente significativa na freqüência de entradas nos braços abertos e no tempo de permanência nestes braços, respectivamente. A injeção i.c.v. de DZP nesses animais, de maneira similar ao tratamento sistêmico descrito anteriormente, promoveu o aumento significativo na freqüência de entradas nos braços abertos (Fig. 22A; $F = 7,03$, $P < 0,05$) e no tempo de permanência nestes braços (Fig. 22B; $F = 11,39$, $P < 0,05$), comparando-se esses valores aos dos animais tratados repetidamente com NaCl 0,9%.

Os parâmetros número de entradas nos braços fechados e número de entradas totais (braços abertos + braços fechados) não foram modificados pela retirada abrupta do tratamento repetido com DZP, nem pela administração central aguda desse composto (Fig. 23A e B, respectivamente). Os outros parâmetros, ditos etológicos, como tempo na plataforma central, SAP, HD, comportamentos de levantar e de auto-limpeza tampouco foram alterados pela retirada do DZP ou por sua administração i.c.v. nos animais privados de DZP (Tabela 6).

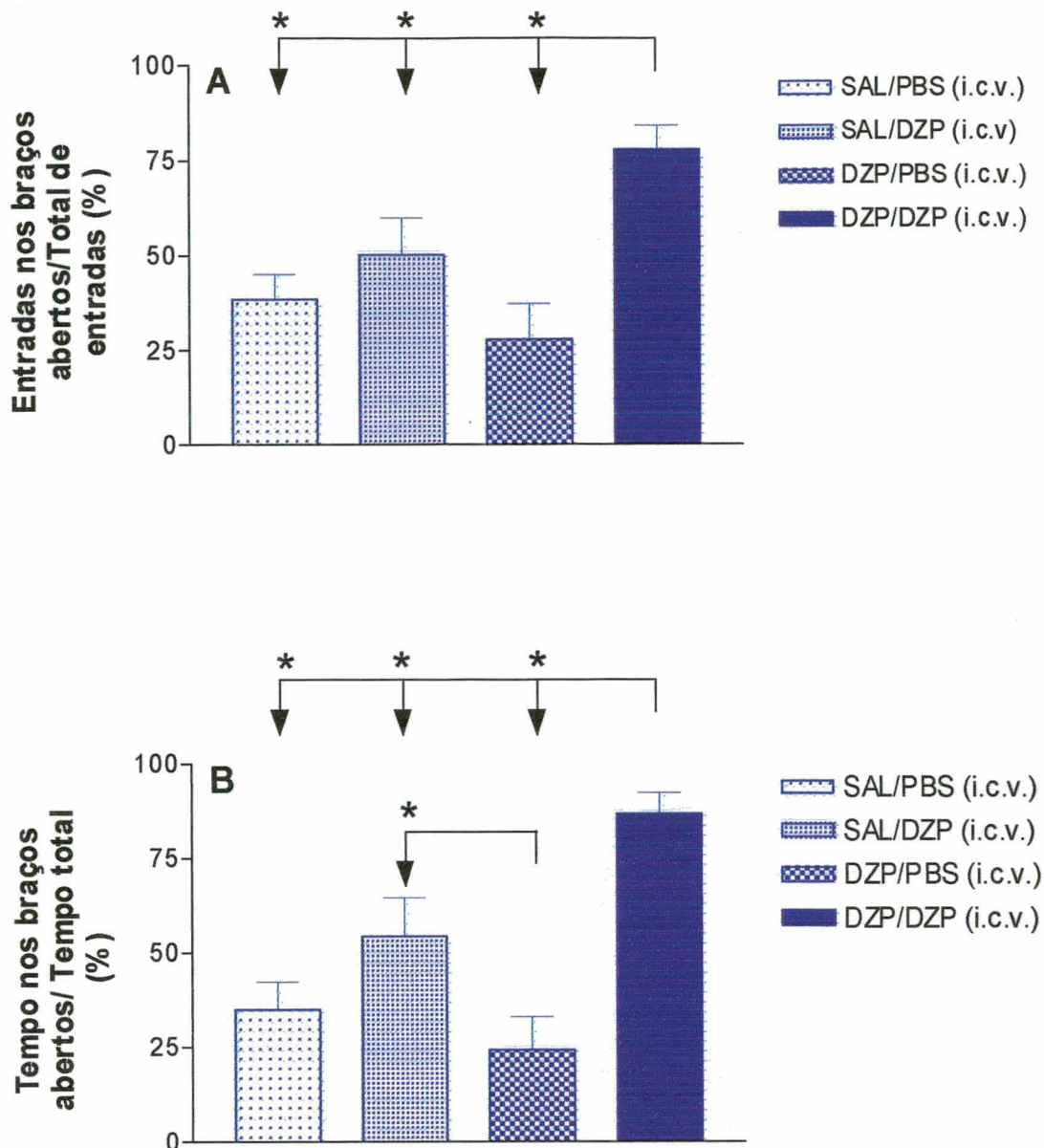


Figura 22 - Efeito da administração central aguda de DZP i.c.v. (7 nmol), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 9 (ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

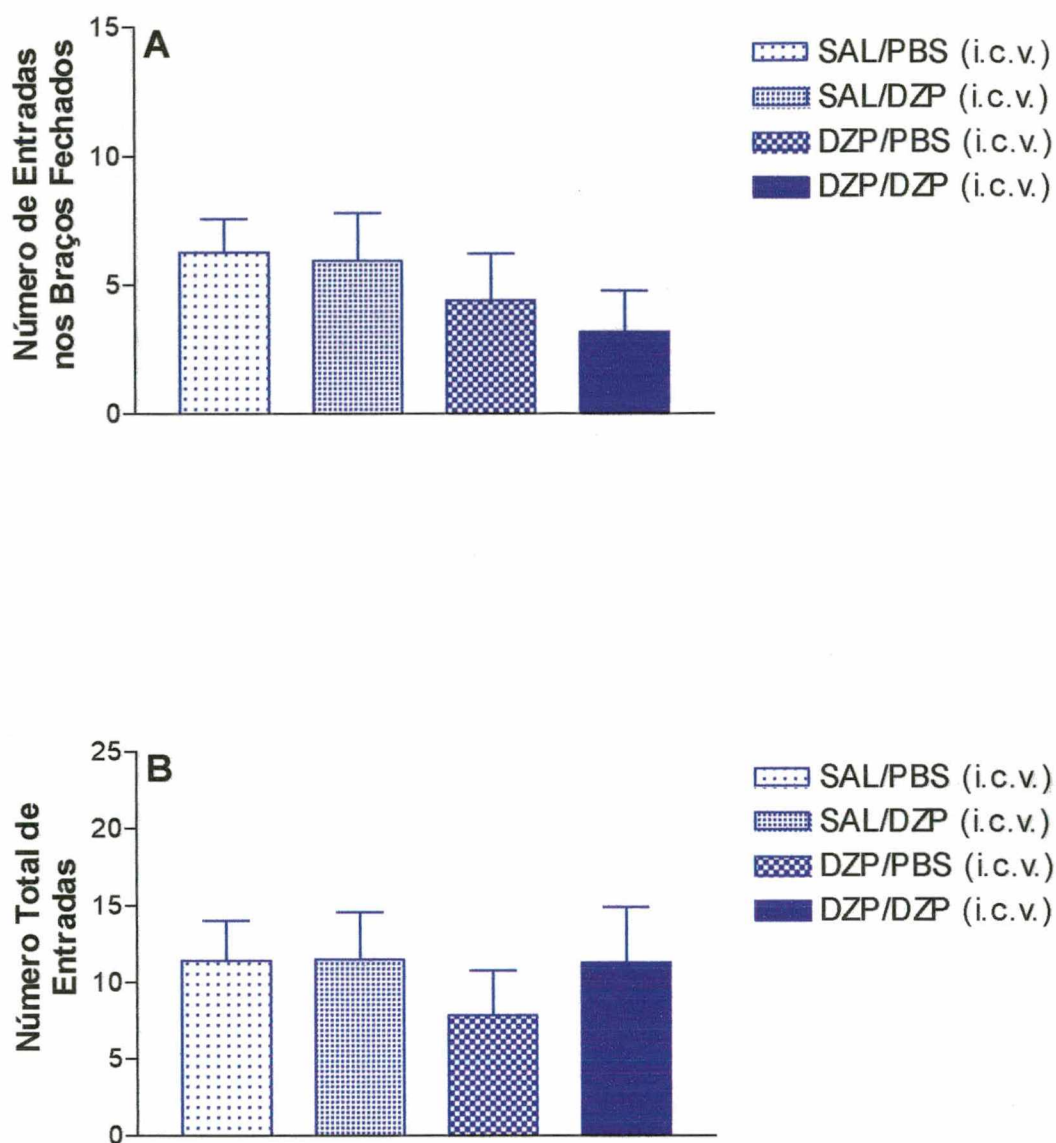


Figura 23 - Efeito da administração central aguda de DZP i.c.v. (7 nmol), após a retirada abrupta de um tratamento repetido (28 dias) com DZP (0.5, 0.75 e 1.0 mg/kg) ou NaCl 0,9% i.p., no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 9 (ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

Tabela 6: Efeito do diazepam i.c.v. após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	2.5 \pm 0.9	6.8 \pm 1.9	57.0 \pm 14.3	5.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
SAL/DZP	4.0 \pm 0.9	11.0 \pm 3.4	38.6 \pm 9.4	4.4 \pm 1.4	1.2 \pm 0.3	0.6 \pm 0.5
DZP/PBS	1.6 \pm 0.5	6.6 \pm 1.9	69.3 \pm 24.5	2.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
DZP/DZP	5.3 \pm 2.1	9.4 \pm 3.5	70.4 \pm 21.6	3.1 \pm 1.0	1.4 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2

F) Efeito ansiolítico do tratamento agudo central com agonista e antagonistas neurocinérgicos após a retirada abrupta do tratamento repetido com benzodiazepínico

Objetivos:

Verificar o efeito ansiolítico dos compostos neurocinérgicos (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃), administrados agudamente por via i.c.v., após a retirada abrupta do tratamento repetido por 28 dias com diazepam.

Resultados:

A administração central dos antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂, FK 888 (Fig. 24) e SR 48968 (Fig. 25), respectivamente, promoveu um aumento significativo tanto na frequência de entradas nos braços abertos (A; $F_{(3,36)} = 4,12, P < 0,05$; $F_{(3,36)} = 9,09, P < 0,05$, respectivamente) como no tempo de permanência nesses mesmos braços (B; $F_{(3,36)} = 10,98, P < 0,05$; $F_{(3,36)} = 4,33, P < 0,05$) do LCE, tanto nos animais controle (SAL i.p. + FK 888 i.c.v.), como no grupo tratado repetidamente com DZP e retirado abruptamente. Por outro lado, o agonista de receptores NK₃, senktide, aumentou de forma significativa o parâmetro da frequência de entradas nos braços abertos apenas nos animais do grupo controle (Figura 26A; $F_{(3,36)} = 12,95, P < 0,05$) e reduziu significativamente o tempo de permanência nesses mesmos braços ($F_{(3,36)} = 11,02, P < 0,05$) nos animais do grupo tratado repetidamente com DZP e retirado abruptamente (Figura 26B).

Os outros parâmetros clássicos número de entradas nos braços fechados e número de entradas totais (braços abertos + braços fechados) não foram alterados pelo tratamento central com FK 888, SR 48968 e senktide na retirada abrupta do tratamento repetido com DZP (Figs. 27, 28 e 29, A e B, respectivamente). Os parâmetros etológicos, como SAP, HD, comportamentos de levantar e de auto-limpeza e tempo na plataforma central, também não foram alterados na retirada do DZP ou por sua administração i.c.v. nos animais privados de DZP (Tabelas 7, 8 e 9).

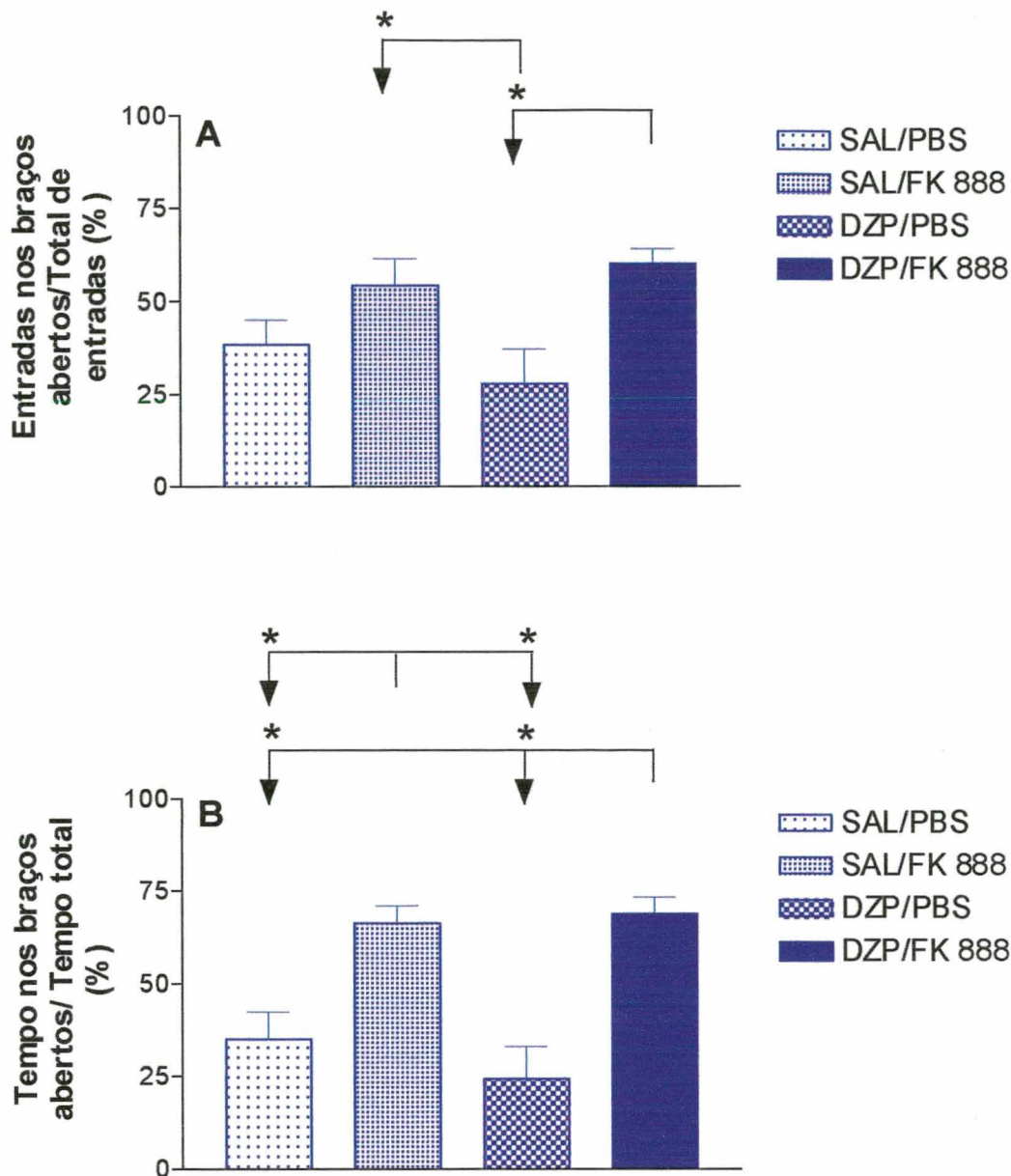


Figura 24 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

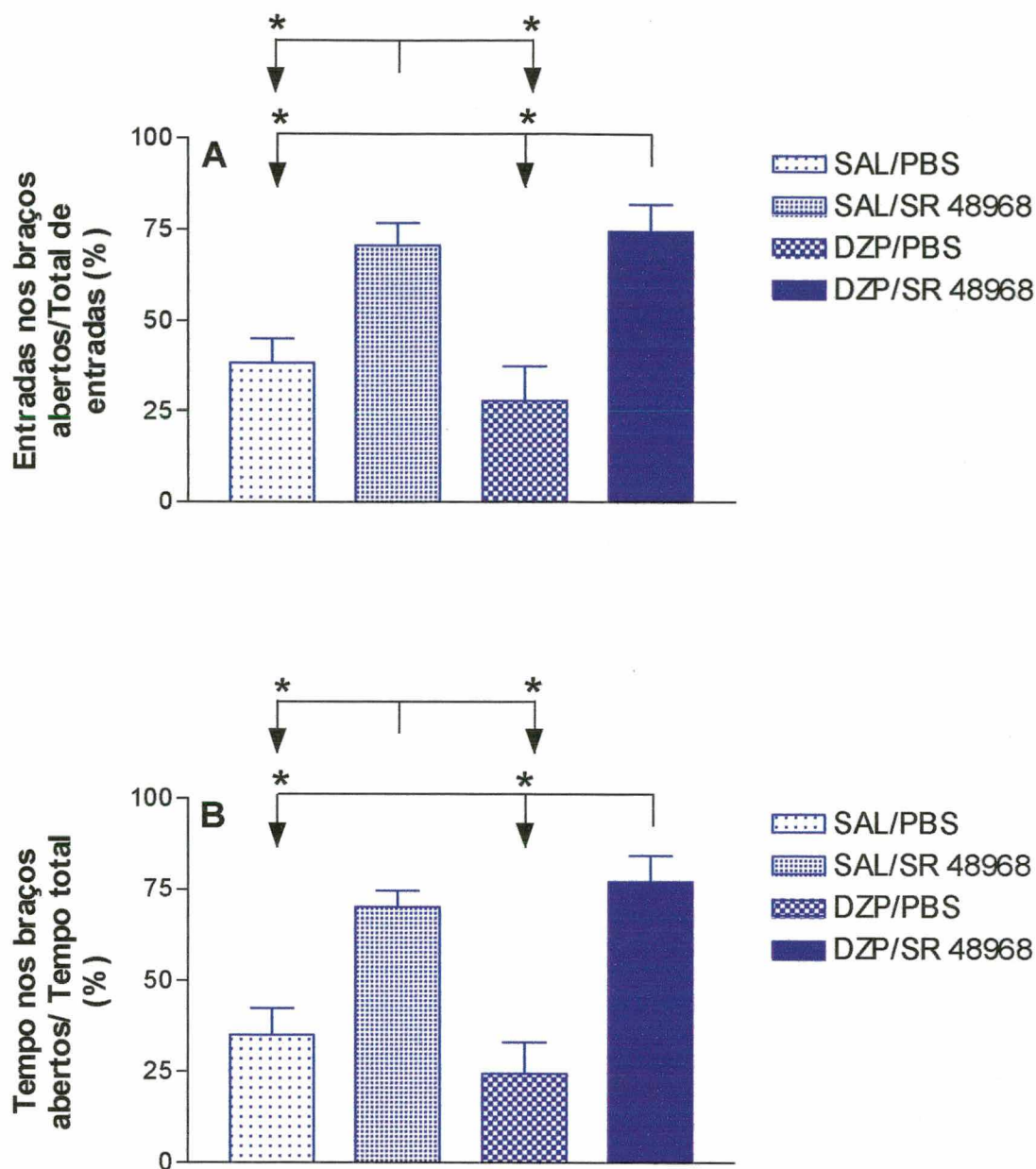


Figura 25 - Efeito da injeção i.c.v. de SR 48968, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

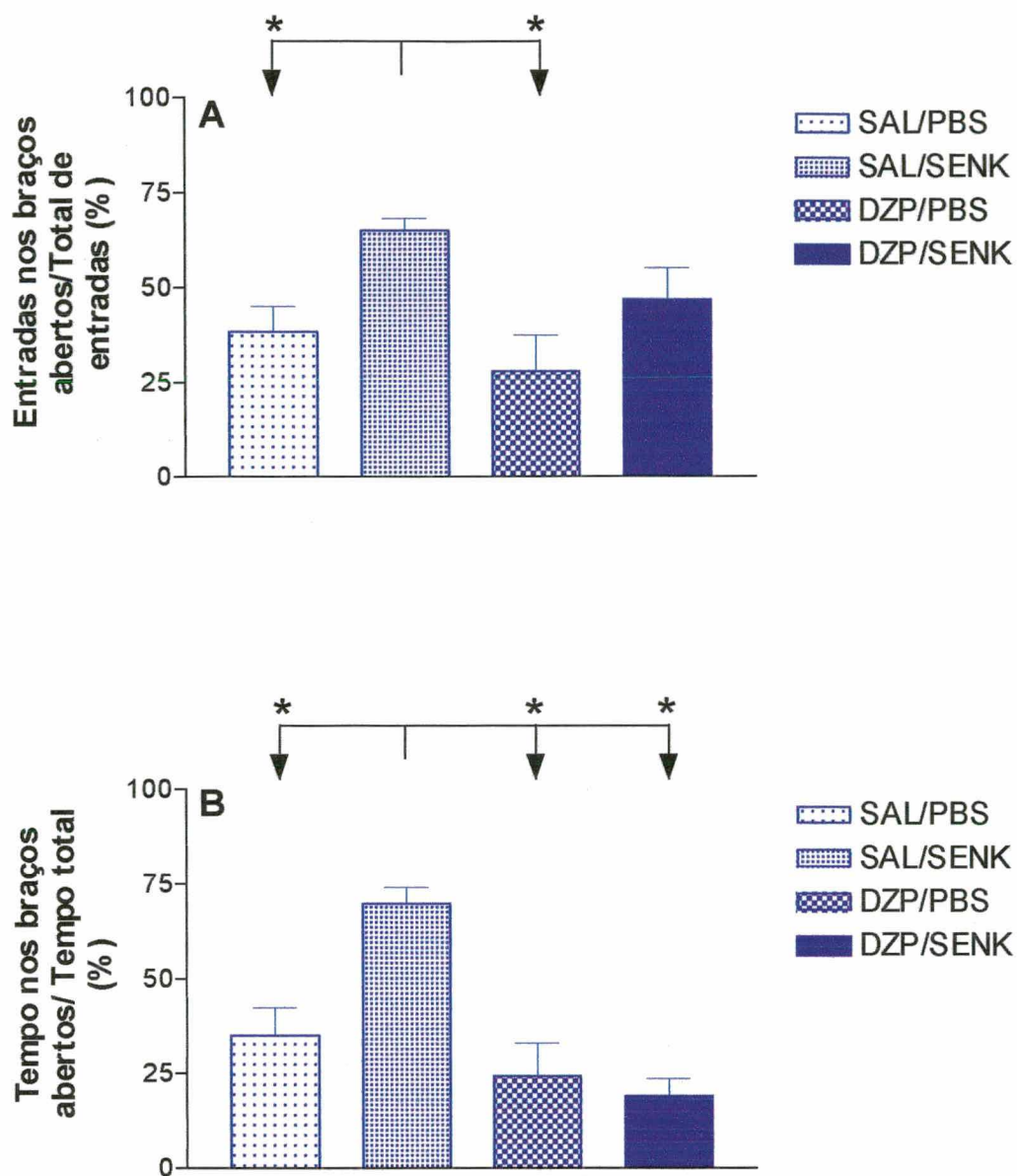


Figura 26 - Efeito da injeção i.c.v. de SENK em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, * $P \leq 0,05$).

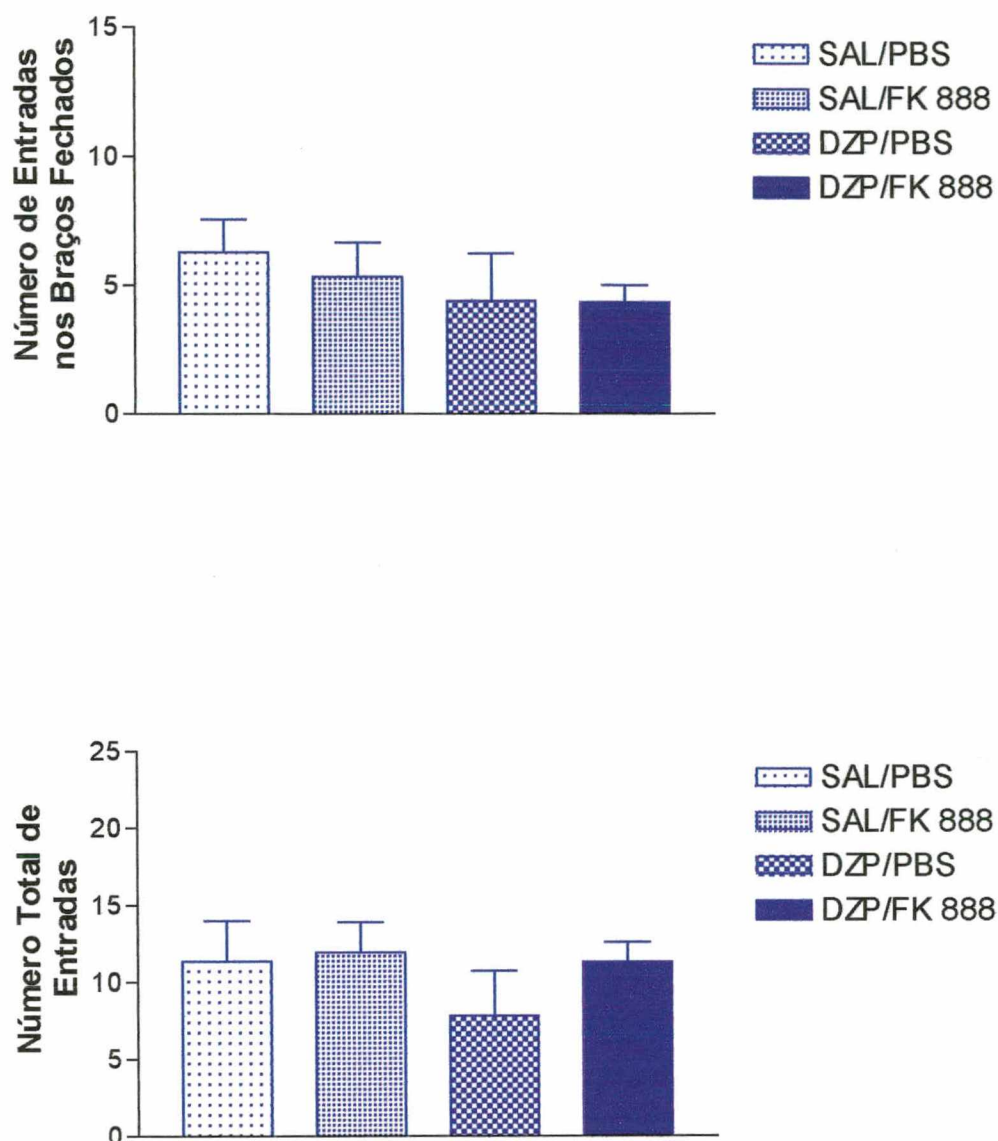


Figura 27 - Efeito da injeção i.c.v. de FK 888, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

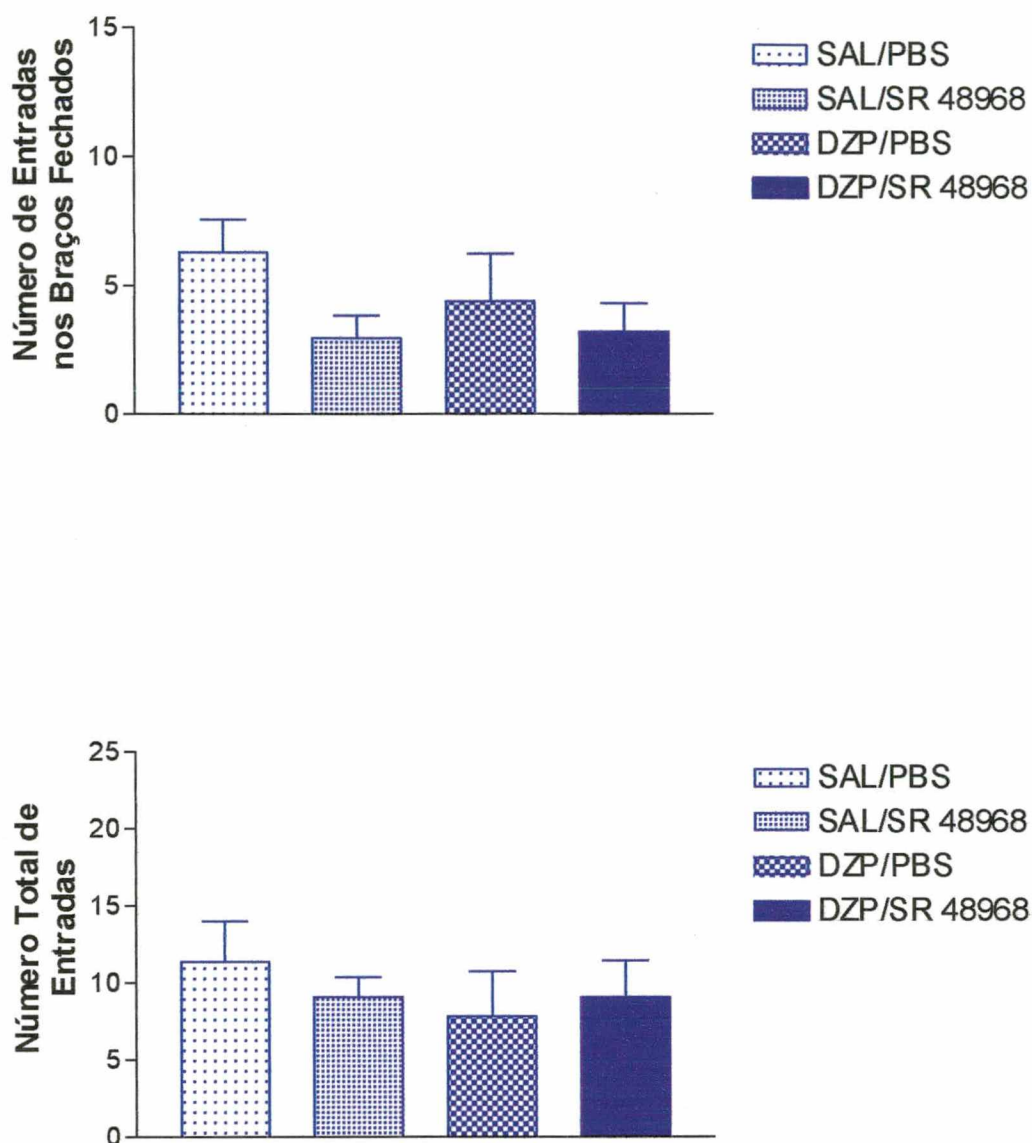


Figura 28 - Efeito da injeção i.c.v. de SR 48968, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

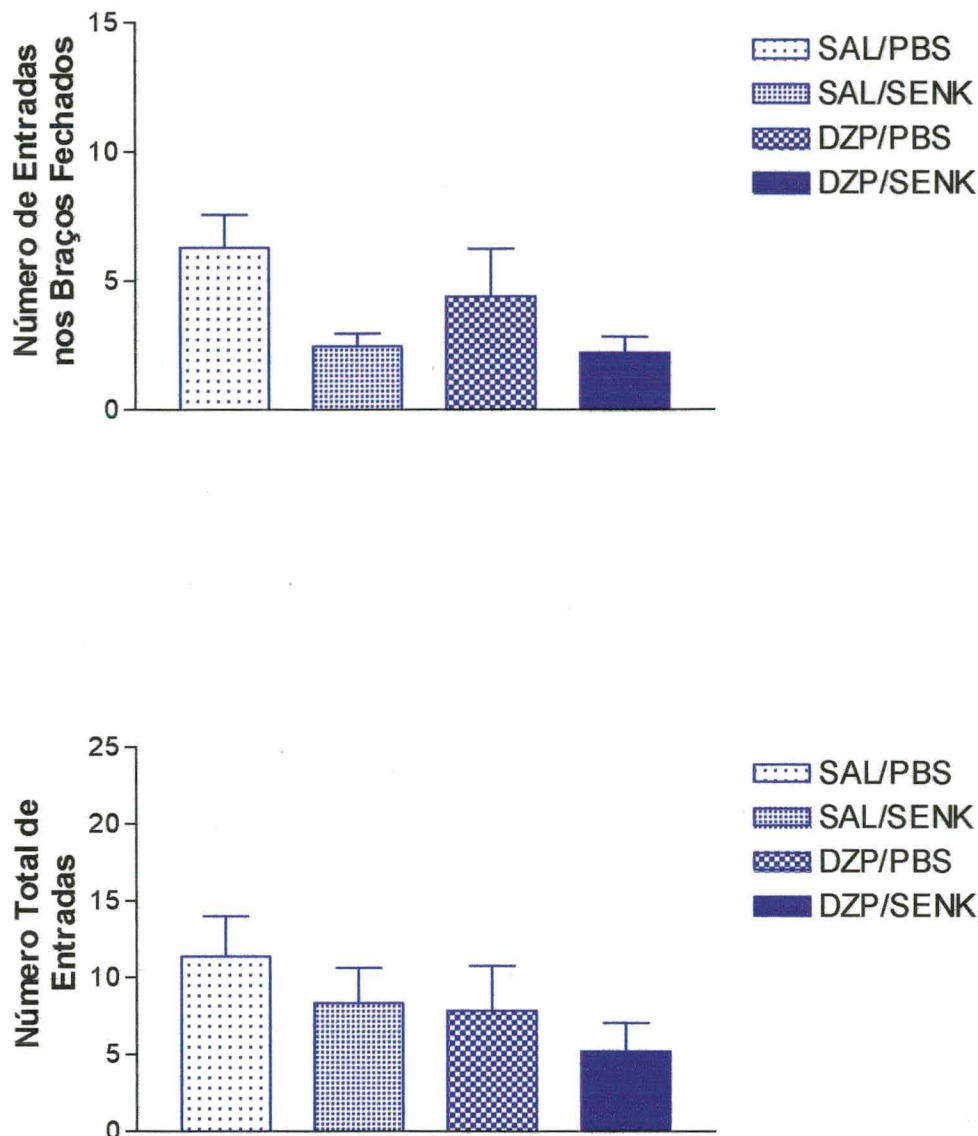


Figura 29 - Efeito da injeção i.c.v. de SENK em animais tratados repetidamente durante 28 dias com NaCl 0,9% ou DZP, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número total de entradas (B), isto é, entradas nos braços abertos e fechados do LCE, em camundongos, por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais empregados por tratamento foi de 8-10 (ANOVA univariada seguida do teste de Student-Newman-Keuls, $P > 0,05$).

Tabela 7: Influência do tratamento com o antagonista NK₁ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	2.5 \pm 0.9	6.8 \pm 1.9	57.0 \pm 14.3	5.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
SAL/FK 888	4.6 \pm 1.4	8.2 \pm 1.7	35.3 \pm 11.5	5.5 \pm 1.3	1.0 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1
DZP/PBS	1.6 \pm 0.5	6.6 \pm 1.9	69.3 \pm 24.5	2.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
DZP/FK 888	3.1 \pm 0.9	13.6 \pm 3.3	44.6 \pm 9.2	3.2 \pm 1.1	1.1 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4

Tabela 8: Influência do tratamento com o antagonista NK₂ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	2.5 \pm 0.9	6.8 \pm 1.9	57.0 \pm 14.3	5.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
SAL/SR 48968	2.8 \pm 0.9	11.0 \pm 1.3	38.7 \pm 14.8	4.0 \pm 1.2	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
DZP/PBS	1.6 \pm 0.5	6.6 \pm 1.9	69.3 \pm 24.5	2.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
DZP/SR 48968	2.0 \pm 0.7	9.2 \pm 2.1	39.1 \pm 12.2	2.1 \pm 1.0	0.7 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3

Tabela 9: Influência do tratamento com o agonista NK₃ nos parâmetros etológicos registrados no teste do labirinto em cruz elevado, após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 10 animais.

Tratamento	SAP	HD	Tempo na Plataforma Central	Levantar	Auto- Limpeza	Bolos Fecais
SAL/PBS	2.5 \pm 0.9	6.8 \pm 1.9	57.0 \pm 14.3	5.2 \pm 1.0	0.6 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
SAL/SENK	2.7 \pm 0.8	13.1 \pm 4.4	35.2 \pm 15.8	2.2 \pm 0.6	0.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1
DZP/PBS	1.6 \pm 0.5	6.6 \pm 1.9	69.3 \pm 24.5	2.2 \pm 0.4	0.7 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
DZP/SENK	4.0 \pm 1.3	4.3 \pm 1.9	100.1 \pm 26.2	3.3 \pm 0.9	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1

G) Influência dos diversos tratamentos na atividade e performance motora e na temperatura retal

Objetivos:

Verificar se os diversos tratamentos com agonistas e antagonistas neurocinérgicos, além das drogas ansiolítica (diazepam) e ansiogênica (pentilenotetrazol) padrão, produziam alterações na atividade e performance motora dos animais, ou hipotermia, alterações essas que poderiam influenciar os registros comportamentais obtidos no labirinto em cruz elevado.

Resultados:

A administração sistêmica aguda de diazepam 0,5 mg/kg (DZP) ou pentilenotetrazol 20 mg/kg (PTZ), ou central de substância P (SP), neurocinina A (NKA) ou senktide, agonistas naturais preferenciais dos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente; FK 888, SR 48968, Trp⁷β-Ala⁸] neurocinina A₍₄₋₁₀₎ (Trp-7), antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂ e NK₃, respectivamente, não promoveram quaisquer modificações na atividade e performance motora dos animais, ou na temperatura retal dos mesmos. O grupo tratado repetidamente com DZP e que ao final recebeu DZP, i.p ou i.c.v, ou as drogas neurocinérgicas com perfil ansiolítico, FK 888, SR 48968 ou senktide i.c.v., também não apresentou quaisquer alterações na atividade e performance motora dos animais, ou na sua temperatura retal dos mesmos (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

Na primeira parte dos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, a qual denominamos de etapa aguda, caracterizamos inicialmente o efeito do tipo ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado, em camundongos, para fim de comparações posteriores, utilizando esse benzodiazepínico como droga ansiolítica padrão. A injeção i.p. de DZP aumentou significativamente o tempo de permanência nos braços abertos do LCE, alteração esta condizente com uma ação ansiolítica, como a descrita na literatura. A este respeito, Rodgers & Dalvi (1996) examinaram detalhadamente os perfis comportamentais do DZP e de outros compostos relacionados ao GABA, obtendo resultados que comprovaram que as mudanças comportamentais observadas no labirinto em cruz elevado com esses compostos são mudanças tipicamente encontradas com ansiolíticos benzodiazepínicos, incluindo redução da ansiedade, conflito e avaliação de risco, concomitante com uma estimulação do comportamento exploratório.

Ainda nesta primeira etapa, nossos experimentos objetivaram confirmar resultados anteriores do nosso laboratório mostrando os efeitos ansiolíticos dos antagonistas NK_1 e NK_2 e do agonista NK_3 no mesmo paradigma experimental. A participação das neurocininas na modulação da ansiedade experimental e clínica tem sido investigada nos últimos anos. A manipulação farmacológica dos receptores neurocinérgicos NK_1 ou NK_2 parece modular os níveis de ansiedade experimental. O antagonista do receptor NK_1 , CP 96345, administrado sistemicamente em camundongos, aumenta tanto a latência para entrada dos animais no compartimento escuro da caixa claro-escuro, como o tempo despendido no compartimento claro, indicando uma ação do tipo ansiolítica para esse composto (Zernig *et al.*, 1993). O CP 96345, entretanto, também reduz a atividade motora e o comportamento de levantar dos animais nas mesmas doses, o que torna difícil de distinguir entre a influência do efeito depressor motor e a possível ação ansiolítica desse composto. Recentemente, outro antagonista NK_1 , 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. A administração subcutânea ou no núcleo dorsal da rafe dos antagonistas NK₂ (GR 100679, SR 48969, GR 159897) diminuiu a frequência de comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos experimentais (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; Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995; Walsh *et al.*, 1995). No teste do labirinto em cruz elevado, Teixeira *et al.* (1996) mostraram que a ativação de receptores NK₁ e NK₂ promove efeitos do tipo ansiogênico, enquanto seu bloqueio produz efeitos do tipo ansiolítico. Adicionalmente, Ribeiro (1998), Ribeiro e De Lima (1998) e Ribeiro *et al.* (1999) mostraram que o receptor NK₃ apresenta um perfil diametralmente oposto, isto é, a sua ativação promove uma ação do tipo ansiolítica e seu bloqueio, efeitos do tipo ansiogênico no mesmo paradigma experimental, o LCE. No presente estudo, a administração i.c.v. de SR 48968, um antagonista seletivo de receptores NK₂ produziu um aumento significativo no tempo de permanência nos braços abertos, característico de um efeito do tipo ansiolítico, como observado anteriormente por Teixeira (1995) e Teixeira *et al.* (1996). No entanto, a injeção central de FK 888, uma droga antagonista seletiva dos receptores NK₁, assim como a de senktide, um agonista seletivo dos receptores neurocinérgicos NK₃, não chegou a alterar significativamente quaisquer parâmetros analisados no labirinto em cruz elevado, nos camundongos fêmeas usados nesse estudo.

Complementando essa caracterização de drogas no LCE, verificamos que a injeção sistêmica de pentilenotetrazol levou a um efeito do tipo ansiogênico, com uma redução significativa do número de entradas e tempo despendido nos braços abertos. Esse achado está de acordo com os dados da literatura mostrando que o PTZ é um quimioconvulsivante que age provavelmente via sítio de picrotoxina no complexo receptor GABA_A / BZD, reduzindo o influxo de Cl⁻ (Pellow e File, 1984). Têm sido relatado que esse composto induz ansiedade em humanos (Rodin e Calhoun, 1970) e exerce efeitos do tipo ansiogênico em uma variedade de modelos experimentais que vai desde testes de conflito em condicionamento operante tradicional a testes de comportamento espontâneo como a interação

social, vocalização ultrasônica induzida por separação, caixa claro-escuro, competição social, tigmotaxia induzida por novidade e labirinto em cruz elevado (para revisão ver Rodgers *et al.*, 1995).

Dando continuidade à caracterização e confirmação de resultados anteriores com compostos neurocinérgicos, ainda na etapa aguda, estabeleceu-se o efeito do tipo ansiogênico dos agonistas NK₁ e NK₂ e do antagonista NK₃ no mesmo modelo experimental. Nossos resultados revelaram que a administração i.c.v. de substância P (SP), o agonista natural preferencial dos receptores neurocinérgicos do tipo NK₁, reduziu o tempo de permanência nos braços abertos do LCE de maneira significativa, mostrando uma atividade do tipo ansiogênica para esta droga, como descrito por Teixeira (1995) e Teixeira *et al.* (1996), para camundongos machos. O agonista NK₂ e o antagonista peptídico NK₃, entretanto, não foram capazes de modificar de maneira significativa o comportamento dos animais no LCE, embora tenham apresentado uma tendência a diminuir os parâmetros de exploração dos braços abertos, alterações estas que estão de acordo com um efeito do tipo ansiogênico.

Os resultados de Hasenöhrl *et al.* (1998) demonstraram que a substância P, injetada periféricamente, possui um efeito dose-resposta bifásico, isto é, na dose de 50 µg/kg, aumentou não só o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto, como também aumentou os parâmetros de incursões até o final dos braços abertos e o parâmetro de rastreamento nos braços abertos. Estes efeitos indicam a redução do medo, ou melhor, um efeito do tipo ansiolítico para essa neurocinina nesta dose. Por outro lado, nas doses de 5 e 250 µg/kg, a substância P não influenciou o comportamento de ratos observados no labirinto em cruz elevado, ao passo que, na dose de 500 µg/kg, a substância P reduziu o tempo gasto nos braços abertos do labirinto, indicando efeitos ansiogênicos desta neurocinina, em doses mais elevadas. Ainda neste estudo, Hasenöhrl *et al.* (1998) demonstraram que após a microinjeção unilateral dentro da região do núcleo basal magnocelular, a substância P (1 ng) pode exercer efeitos ansiolíticos, denotados pelo aumento do tempo gasto nos braços abertos do LCE e aumento do tempo gasto no teste de interação social. Kramer *et al.* (1998) observaram que

antagonistas da SP diminuem as vocalizações induzidas por isolamento em cobaias, entre outros achados, e propõem que a SP deve estar envolvida na integração das respostas emocionais ao estresse em estruturas cerebrais como a amígdala. Estas observações levam à hipótese de que a ativação de vias de SP centrais sejam aversivas. Nossos resultados, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico para a SP, estão de acordo com os achados de Walsh *et al.* (1995) e foram confirmados por File (1997), que mostram que os antagonistas NK₁ e NK₂ reduzem comportamentos relacionados à ansiedade, enquanto que os agonistas NK₁ e NK₂ aumentam estes comportamentos (Aguilar e Brandão, 1996; Teixeira *et al.*, 1996; De Lima *et al.*, 1997). A injeção i.c.v. de NKA, uma droga agonista seletiva para os receptores NK₂ e do Trp-7, um antagonista seletivo de receptores NK₃, apesar de também reduzirem alguns parâmetros observados no LCE na mesma direção que drogas ansiogênicas, como o PTZ o faz, não promoveu diferenças estatisticamente significantes em quaisquer parâmetros registrados, clássicos ou etológicos.

Outros estudos têm investigado a neurocinina no contexto que envolve processos emocionais, com resultados contraditórios. Oehme e Krivoy (1983) demonstraram que a substância P, particularmente sua seqüência N terminal, exerce uma influência modulatória em respostas fisiológicas ao estresse e Starr *et al.* (1978) também considerou que a substância P age como um “tranqüilizante” fisiológico. Há ainda relatos de que certos antagonistas NK₁ produzem efeitos ansiogênicos em roedores (Saria *et al.*, 1993; Zerning *et al.*, 1992, 1993), como citado anteriormente. Neste mesmo sentido, foi relatada uma relação inversa entre os níveis de substância P no fluido cerebro-espinhal e a intensidade de ansiedade em humanos (Almay *et al.*, 1988). A maioria desses pacientes, no entanto, apresentavam um quadro de dor crônica, aonde 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). As razões pelas quais os resultados discrepantes foram encontrados requer um melhor entendimento. O uso de diferentes modelos experimentais de ansiedade, espécies e protocolos de administração de drogas podem explicar os achados conflitantes. Mais do que

isso, permanece ainda por ser elucidado em que local do cérebro e com qual (is) neurotransmissor(es) a SP interage para modular a ansiedade.

Tendo em vista que o sistema GABAérgico está inequivocamente envolvido na modulação da ansiedade (Graeff, 1994), o presente estudo investigou se há uma inter-relação entre esses dois sistemas, ou seja, o GABAérgico e o neurocinérgico, na modulação da ansiedade experimental em camundongos, avaliada no labirinto em cruz elevado.

Hendry *et al.* (1985) descobriram que todos, ou quase todos, os neurônios que contêm neuropeptídeos dentro do córtex cerebral também contêm uma enzima sintetizadora do GABA, a descarboxilase do glutamato (GAD), fazendo com que estes neurônios além de serem denominados peptidérgicos sejam considerados GABAérgicos. Além disso, alguns neuropeptídeos estão localizados no mesmo terminal que a enzima sintetizadora do GABA, sugerindo que os neuropeptídeos, e entre eles a SP, podem ser liberados em alguns dos mesmos sítios que o GABA (Wise, 1985).

Assim, no tratamento agudo, verificamos a influência dos compostos neurocinérgicos ansiogênicos (agonistas NK₁ e NK₂ e antagonista NK₃) no efeito ansiolítico agudo do diazepam. O efeito ansiolítico do tratamento agudo com DZP foi revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK₂ e antagonista NK₃ respectivamente, mas não pela substância P, agonista NK₁. Esses resultados indicam que os efeitos ansiolíticos agudos do DZP podem ser modulados pela manipulação farmacológica dos receptores neurocinérgicos NK₂ e NK₃.

Investigamos também a influência dos compostos neurocinérgicos com atividade ansiolítica (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃) no efeito ansiogênico agudo do pentilenotetrazol. A administração central dos antagonistas seletivos NK₁ e NK₂, FK 888 e SR 48968, respectivamente, reverteu a ação ansiogênica do tratamento agudo sistêmico com PTZ, observada no labirinto em cruz elevado. Por outro lado, o SENK, agonista seletivo dos receptores NK₃, não alterou significativamente o perfil ansiogênico do PTZ em nenhum dos parâmetros registrados no LCE, embora tenha mostrado uma tendência em reverter o efeito

do PTZ. Desta maneira, o efeito ansiogênico do PTZ, que é atribuído a uma ação antagonista no complexo receptor GABA_A (Rodgers *et al.*, 1995), parece ser também modulado pela manipulação farmacológica dos receptores neurocinérgicos NK₁, NK₂ e, possivelmente, NK₃.

Na segunda etapa dos experimentos, a qual denominamos etapa de tratamento repetido, procuramos empregar um modelo de ansiedade estritamente relacionado ao sistema GABA, usando animais após a retirada abrupta de um tratamento repetido com diazepam, de acordo com o protocolo proposto por Andreatini e Leite (1994).

A retirada do DZP ao final do tratamento repetido por 28 dias, promoveu uma redução, não estatisticamente significativa, tanto na frequência de entradas nos braços abertos, como no tempo de permanência nestes braços, indicando uma tendência de aumento nos parâmetros associados à ansiedade. Neste tratamento repetido, tanto a administração aguda de DZP i.p. como i.c.v., ao final do tratamento, reverteu o comportamento do tipo ansiogênico causado pela retirada da droga. A injeção i.p. de DZP, em animais tratados repetidamente durante 28 dias com doses crescentes de DZP, promoveu um aumento significativo tanto na frequência de entradas nos braços abertos como no tempo de permanência nestes braços. A injeção i.c.v. de DZP nesses animais, de maneira similar ao tratamento sistêmico, produziu um aumento significativo na frequência de entradas nos braços abertos e no tempo de permanência nestes braços. Esses são resultados esperados, uma vez que a re-administração, sistêmica ou central, do benzodiazepínico no período após sua retirada, assim como sua administração aguda, leva ao re-estabelecimento do efeito inicial, isto é, ansiolítico.

Finalmente, verificamos o efeito ansiolítico dos compostos neurocinérgicos (antagonistas NK₁ e NK₂ e agonista NK₃), administrados agudamente por via i.c.v., na retirada abrupta do tratamento repetido por 28 dias com diazepam.

A administração central de antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂, FK 888 e SR 48968, respectivamente, promoveu um aumento significativo tanto na frequência de entradas nos braços abertos como no tempo de permanência nesses mesmos braços do LCE em animais controle, e

também no grupo tratado repetidamente com DZP e retirado abruptamente. Por outro lado, o agonista de receptores NK_3 , senktide, aumentou de forma significativa o parâmetro frequência de entradas nos braços abertos apenas nos animais do grupo controle e não alterando o comportamento dos animais do grupo tratado repetidamente com DZP e retirado abruptamente.

Resumindo, nossos dados mostram que o efeito ansiolítico do tratamento agudo com DZP foi revertido pela administração i.c.v. dos compostos ansiogênicos neurocinérgicos NKA e Trp-7, agonista NK_2 e antagonista NK_3 , respectivamente, mas não pela substância P, agonista NK_1 . Por outro lado, a administração central dos antagonistas NK_1 e NK_2 , mas não do agonista NK_3 , reverteu a ação ansiogênica do tratamento agudo sistêmico com PTZ, observada no labirinto em cruz elevado. A administração central de antagonistas seletivos dos receptores neurocinérgicos NK_1 e NK_2 , FK 888 e SR 48968, respectivamente, produziu efeitos do tipo ansiolítico tanto nos animais controle como naqueles aonde o diazepam, administrado repetidamente, foi retirado abruptamente. No entanto, o agonista de receptores NK_3 , senktide, só apresentou seu efeito do tipo ansiolítico nos animais do grupo controle, mas não nos animais após a retirada abrupta do tratamento repetido com diazepam.

De uma maneira global nossos resultados sugerem que existe uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico na modulação da ansiedade experimental, envolvendo especialmente os receptores dos tipos NK_1 e NK_2 . O papel dos receptores NK_3 , por outro lado, parece não ser relevante, exceto influenciando o efeito ansiolítico agudo do diazepam.

Uma possibilidade para explicar esses achados seria a de que as neurocininas, interagindo com seus receptores (NK_1 , NK_2 e NK_3), modulariam a ansiedade experimental em áreas específicas do SNC, enquanto os compostos que atuam no complexo receptor $GABA_A$ atuariam independentemente dessa modulação e nossos resultados nada mais seriam que o resultado da somatória dessas modulações específicas, sem qualquer inter-relação entre os dois sistemas de neurotransmissores, o neurocinérgico e o GABAérgico.

No entanto, é bem conhecido que diversas drogas, interagindo com diferentes sítios de ligação no complexo receptor GABA_A, modificam alostericamente o influxo de Cl⁻ induzido por GABA (Sieghart, 1992). Os dados indicam que a afinidade, assim como a eficácia das drogas modulatórias mudam com a composição dos receptores, isto é, com a combinação dos diferentes tipos de subunidades, uma vez que pelo menos 15 tipos de subunidades foram identificados (6 α ; 4 β ; 3 γ ; 1 δ ; 1 ϵ). Também se sabe que há uma distribuição ímpar de subunidades α e β do receptor GABA_A. Tal heterogeneidade na estrutura do receptor, e na modulação alostérica, sugere uma diversidade correspondente nas propriedades farmacológicas dos ligantes nos sítios BZD em termos de afinidade, grau e direção da modulação (Glusti e Arban, 1993). A este respeito, sabe-se que o DBI (*diazepam binding inhibitor*) é um peptídeo que parece desempenhar um papel regulador endógeno das funções metabólicas intracelulares via receptor BZD mitocondrial, além de modular o receptor GABA_A/BZD produzindo efeitos anti-conflito (Alho *et al.*, 1991). As neurocininas endógenas, interagindo com seus diferentes tipos de receptores, poderiam também ter um papel regulador em um dos sítios de ligação do receptor pentamérico GABA_A. Nesse sentido, alguns estudos preliminares foram feitos em nosso laboratório empregando-se o flumazenil, antagonista do receptor BZD (Lee e Rodgers, 1991), como pré-tratamento (1 mg/Kg, i.p., 15 min) dos compostos neurocinérgicos ansiolíticos FK 888 e SR 48968, antagonistas NK₁ e NK₂, respectivamente, e senktide, agonista NK₃, no labirinto em cruz elevado. Esse pré-tratamento não impediu apenas o aparecimento do efeito do tipo ansiolítico produzido pelo antagonista NK₂ (dados não apresentados), resultado este de acordo com os dados aqui apresentados, onde a manipulação farmacológica do receptor NK₂ foi sempre consistente em influenciar a modulação GABAérgica da ansiedade experimental (PTZ agudo e DZP repetido). Esse fato nos indica a possibilidade de uma interação do composto neurocinérgico NK₂ em algum sítio de ligação, ou a presença de um sítio de ligação para esse composto, em uma das subunidades do pentâmero que forma o receptor GABA_A, uma vez que a subunidade α é a responsável pela ligação das benzodiazepinas e a γ é essencial

para as respostas benzodiazepínicas. Estudos com cDNA recombinante mostraram que há, pelo menos, dois tipos principais de sítios modulatórios alostéricos para as BZDs no domínio extracelular do receptor. Um tipo requer a presença de subunidades α e γ específicas. Este tipo é aonde atuam os ligantes BZD ansiolíticos (diazepam, zolpidem, alpidem), os ésteres carboxilados β – carbolinas (BCCM, FG 7142) e o antagonista BZD flumazenil. A direção (positiva ou negativa) da resposta modulatória a este tipo de sítio depende da subunidade γ . A BCCM, por exemplo, age como modulador negativo quando a subunidade γ_2 está presente e positivo quando a γ_1 é a subunidade presente, mas ambas as respostas são bloqueadas pelo flumazenil. O segundo tipo é aquele aonde se liga o 4'-clorodiazepam, um convulsivante que atua só na subunidade γ do receptor e cuja ação é resistente ao flumazenil (para revisão ver Giusti e Arban, 1993).

A influência dos receptores NK_1 e NK_3 na modulação GABAérgica, por sua vez, nos parece mais ser resultado de uma somatória de efeitos em sistemas diversos, uma vez que, dependendo do “estímulo” ansiolítico ou ansiogênico empregado, a modulação é diferencial para cada caso.

Esses resultados registrados no LCE não parecem ser decorrentes de ações inespecíficas dos compostos em estudo, como alterações na performance motora ou uma inibição ou estimulação inespecífica na atividade locomotora exploratória dos animais, como observado em outros estudos (Dawson *et al.*, 1995). Essa possibilidade nos parece improvável porque todas as drogas usadas no presente estudo não produziram alterações significantes na coordenação motora dos animais avaliada no teste do rota-rod nem na sua atividade motora, avaliada no teste do campo-aberto e também pelo parâmetro “frequência de entradas nos braços fechados” do LCE (Rodgers *et al.*, 1997).

A relação neurotransmissores centrais e efeitos ansiolíticos mais predizíveis estão ligados à ativação do sistema GABAérgico, associado aos receptores BZD (Rodgers e Dalvi, 1996). Estudos mais recentes têm indicado que subtipos específicos de receptores benzodiazepínicos podem estar associados às ações ansiolíticas desses compostos (Sanger *et al.*, 1994; Zhang e Cook, 1993). Alguns estudos animais sugerem que algumas formas de ansiedade são

mediadas pelo sistema noradrenérgico, mas alguns estudos confirmaram apenas parcialmente essa hipótese (Höehn-Saric, 1982). Outros dados implicam o sistema serotoninérgico em pelo menos alguns tipos de ansiedade (Graeff, 1993; Handley e McBlane, 1993; Handley *et al.*, 1993; Handley, 1995). Atualmente o papel de outros neurotransmissores, como a dopamina, histamina, acetilcolina, adenosina e peptídeos está sendo investigado, não só para um melhor entendimento da ansiedade como psicopatologia prevalente e relevante, mas também na tentativa de encontrar alternativas terapêuticas mais seletivas, ou seja, drogas ansiolíticas seletivas (Cutler, 1993; Rodgers e Johnson, 1995).

Na verdade, os quinze anos que se seguiram à descoberta dos receptores benzodiazepínicos no SNC de mamíferos foram de extrema importância no progresso de nosso entendimento sobre os mecanismos moleculares relacionados com a interação destes compostos e a transmissão mediada pelo GABA, assim como no desenvolvimento de novas drogas não-benzodiazepínicas que agem via sistema GABAérgico. Paradoxalmente, estes avanços fundamentais têm sido acompanhados por um progressivo declínio do uso dos benzodiazepínicos como agentes terapêuticos de primeira escolha no tratamento da ansiedade, devido a não aceitação crescente de seus efeitos colaterais, que incluem sedação, ataxia, interações com o álcool e, particularmente, o risco de dependência com o uso prolongado. Naturalmente, estes dois processos têm fortalecido um ao outro e dado esperança para que as pesquisas cheguem a alguns novos compostos não-benzodiazepínicos destituídos dos efeitos colaterais indesejáveis associados aos benzodiazepínicos clássicos.

Nessa busca de novos compostos, muitos esforços têm sido empreendidos no sentido de encontrar agentes ansiolíticos mais seguros e, se possível, mais potentes. Entre os últimos estudos nesta direção estão aqueles envolvendo os receptores de colecistocinina (CCK), pois foi observado que os antagonistas CCK_B, como o L365260, o CI988 e o PD135158, mostraram propriedades anticonflito (Hughes *et al.*, 1990) e ansiolíticas (Harro *et al.*, 1993) em roedores. Fortalecendo essas observações experimentais, foram descritas ações ansiogênicas após administração central ou periférica de peptídeos relacionados

ao CCK, tanto em roedores como em humanos (Harro *et al.*, 1993). Neste contexto, os receptores das neurocininas parecem estar envolvidos em mecanismos relacionados com a ansiedade, podendo-se num futuro próximo chegar-se à síntese de compostos seletivos ansiolíticos com vantagens sobre os benzodiazepínicos. Como o principal problema do uso de benzodiazepínicos como agentes ansiolíticos reside no fato destes compostos produzirem amnésia, sedação e potenciarem os efeitos do álcool, é possível que as drogas que atuam no sistema neurocinérgico e sejam dotadas de atividade ansiolítica possam vir a ser de importância terapêutica, pois parecem promover ansiólise sem produzir efeitos depressores do SNC. Por outro lado, os efeitos desses compostos em estudo sobre a memória e aprendizagem devem ser melhor investigados, uma vez que já existem vários estudos mostrando o envolvimento da SP com esses processos (para revisão ver Huston e Hasenöhrl, 1995). De qualquer maneira, a perspectiva do uso de drogas seletivas neurocinérgicas no tratamento da ansiedade parece um campo interessante e que deve ser melhor explorado.

CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

Nossos resultados acerca da participação do GABA na modulação da ansiedade experimental pelas neurocininas, avaliada no LCE em camundongos, sugerem que existe uma inter-relação entre o sistema GABAérgico e o neurocinérgico neste paradigma experimental, envolvendo especialmente os receptores dos tipos NK_1 e NK_2 , mas o papel dos receptores NK_3 parece não ter a mesma relevância, exceto na influência do efeito ansiolítico agudo do diazepam.

Os resultados do presente trabalho indicam que a ativação ou o bloqueio dos receptores neurocinérgicos interferem diferencialmente com a modulação GABAérgica da ansiedade experimental. Na manipulação aguda desse paradigma experimental os três tipos de receptores parecem estar envolvidos, influenciando tanto a redução dos comportamentos aversivos produzida pelo diazepam (NK_2 e NK_3), quanto a ação do tipo ansiogênica promovida pelo pentilenotetrazol (NK_1 e NK_2). Quanto ao modelo de ansiedade por retirada de um tratamento repetido com benzodiazepínico, nossos dados sugerem que há o envolvimento dos receptores NK_1 e NK_2 , mas não do NK_3 , congruente com os dados do modelo ansiogênico do PTZ agudo. Nossas observações experimentais nos levam a especular a possibilidade de que as neurocininas possam desempenhar um papel modulatório em alguns dos múltiplos sítios de ligação do complexo receptor $GABA_A$. Na verdade, outros estudos complementares são necessários para um completo entendimento dessa interação neurocininas-GABA na modulação da ansiedade experimental, empregando-se outras abordagens metodológicas, ou mesmo manipulações farmacológicas com drogas que atuem modulando outros sítios de ligação do complexo receptor $GABA_A$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R.; FRIEDMAN, S.B. e GROTA, L.J. "Emotionality" and adrenal cortical function: effects of strain, test, and the 24-hour corticosterone rhythm. **Anim. Behav.**, **15**: 37-44, 1967.
- AGUIAR, M.S. e BRANDÃO, M.L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behavior of the rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.**, **60**: 1183-1186, 1996.
- ALHO, H.; HARJUNTAUSTA, T.; SCHULTZ, R.; PELTO-HUIKKO, M. e BOVOLIN, P. Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. **Neuropharmacology**, **30**, N° 12B, pp. 1381-1386, 1991.
- ALMAY, B.G.L.; JOHANSSON, F.; VON KNORRING, L.; LE GREVES, P. e TERENIUS, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndromes. **Pain**, **33**: 3-9, 1988.
- ANDREATINI, R. e LEITE, J.R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **Eur. J. Pharmacol**, **260** (2-3): 233-235, 1994.
- ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, **21**: 205-235, 1973.
- BATESON, A.N.; LASHAM, A. e DARLISON, M.G. γ -Aminobutyric acid_A receptor heterogeneity is increased by alternative splicing of a novel β -subunit gene transcript. **J. Neurochem.**, **56**: 1437-1440, 1991.

- BENKE, D.; MERTENS, S.; TRZECIAK, A.; GILLESSEN, D. e MOHLER, H. GABA_A receptors display association of γ 2-subunit with α 1- and β 2/3-subunits. **J.Biol.Chem.**, **266**: 4478-4483, 1991.
- BERNATZKY, G. e SARIA, A. Behavior 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.
- BIGGIO, G.; CONCAS, A.; CORDA, M.G.; GIORGI, O.; SANNA, E. e SERRA, M. Enhancement of GABAergic transmission by zolpidem, an imidazopyridine with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. **Eur. J. Pharmac.**, **161**: 173-180, 1989.
- BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o sistema nervoso central., In: Goodman & Gilman (Editors), **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9^a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 207, 1996.
- BONANNO, G. e RAITERI, M. Multiple GABA_B receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, **14**, N^o7: 259-261, 1993.
- BONNER, T.; AFFOLTER, M. U.; YOUNG, A. C. e YONG, W. S. A. cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide neurokinin B. **Mol. Brain. Res.**, **2**: 243-249, 1987.
- BORMANN, J. e FEIGENSPAN, A. GABA_C Receptors. **TINS**, **18** (12): 515-519, 1995.
- BOWERY, N. G. GABA_B Receptor Pharmacology. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol**, **33** : 109-147, 1993.

- BRENT, P.; CHAHL, J.; LORIS, A. e CANTARELLA, P.A. Effect of intracerebroventricular injection of substance P on biogenic amine concentrations in guinea-pig brain. **Biogenic. Amines**, **10**: 319-327, 1994.
- BRODIN, E.; ROSÉN, A.; SCHÖTT, E. e BRODIN, K. Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. **Neuropeptides**, **26**: 253-260, 1994.
- CARLINI, E. A.; CONTAR, J. DE D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G. DA; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F.A. Pharmacology of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, **17**: 37-64, 1986.
- CHANG, M. e LEEMAN, S. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and this characterization as substance P. **J. Biol. Chem.**, **245**: 4787-4790, 1970.
- CHANG, M.; LEEMAN, S. e NIALI, M. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, **232**: 86-87, 1971.
- CHANG, M. T. Substance P-dopamine relationship in the rat substantia nigra: a light and electron microscopy study of double immunocytochemically labelled materials. **Brain Res.**, **448**: 391-396, 1988.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F. e GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **49**: 171-176, 1994.

- CUELLO, A. C. e KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibres in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **178**: 129-155, 1978.
- CULMAN, J. e UNGER, T. Central tachykinins: mediators of defense and stress reactions. **J. Physiol. Pharmacology**, **73**: 885-891, 1995.
- CUTLER, S.J. Advances in anxiolytic research. **American Journal of Pharmaceutical Education**, **57**: 172-174, 1993.
- DALVI, A. e RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, **128**: 380-397, 1996.
- DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; COLLINSON, N.; IVERSEN, S.D. e TRICKLEBANK, M.D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus-maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology**, **118**: 316-323, 1995.
- DE BLAS, A. L.; SANGAMESWARAN, L.; HANEY, S.A.; ABRAHAN, C. J. Jr. e RAYNER, C.A. Monoclonal antibodies to benzodiazepines. **J. Neurochem**, **45**: 1748-1753, 1985.
- DE BLAS, A. L. Benzodiazepines and benzodiazepines-like molecules in brain. In: BARNARD, E. e COSTA, E. (Eds.) **Transmitter aminoacid receptors: structures, transduction and molecules for drug development**. Thieme Med. Publish., New York, **Fidia Res. Found. Symposium Series, Vol. VI**: 293-304, 1992.
- DE BLAS, A. Benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules are present in brain. In: IZQUIERDO, I. e MEDINA, J. H. (Eds.), **Naturally occurring benzodiazepines: structure, distribution and function**. Ellis Horwood, London, pp. 81-88, 1993.

- DE LIMA, T.C.M.; BARETTA, I.P. e ASSREUY, J. Nitric oxide involvement in the angiogenic effect of substance P in mice in the elevated plus-maze. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **23**: 1859, 1997.
- DE LORY, T. M. e OLSEN, R. W. GABA and glycine. In: G.J.SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P. B. (Eds.) **Basic Neurochemistry**, 1ST ed, Raven Press, New York, pp. 389-399, 1994.
- DOBLE, A. e MARTIN, I. L., Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. **TIPS**, **13**: 76-81, 1992.
- DORNAN, W. A.; WINK, K. L.; MOLEN, P.; SHORT, K.; STRUTHERS, W. e BARRET, C. Site-specific effects in intracerebral injections of three neurokinins (neurokinin A, neurokinin B and neurokinin) on the expression of male rat sexual behavior. **Physiol. Behav.**, **54**: 249-258, 1993.
- DRAPEAU, G.; ROUISSI, N.; NANTEL, F.; RHALEB, N.E.; TOUSIGNANT, C. e REGOLI, D. Antagonists for the neurokinin NK₃ receptor evaluated in selective receptor systems. **Regul. Pept.**, **31 (2)**: 125-135, 1990.
- DUNHAM, N.W. e MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, **46**, N°3: 208-210, 1957.
- EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; BROECK, D.V.; ADVENIER, C.; NALINE, E.; NELIAT, G.; LE FUR, G. e BRELIÈRE, J.C. A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK₂) receptor. **Life. Sci.**, **50**:101-106, 1992.
- ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **TINS**, **4**: 267-269, 1981.

- FEHDER, W.P.; SACHS, J.; UVAYDOVA, M. e DOUGLAS, S.D. Substance P as an immune modulator of anxiety. **Neuroimmunomodulation**, **4**: 42-48, 1997.
- FILE, S.E. Anxiolytic action of a neurokinin-1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **58**: 747-752, 1997.
- FUJII, T.; MURAI, M.; MORIMOTO, H.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIWARA, D.; MIYAKE, H.; IKARI, N. e MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK₁-receptor antagonist, FK 888. **Br. J. Pharmacol.**, **107**:785-789, 1992.
- GIUSTI, P. e ARBAN, R. Physiological and pharmacological bases for the diverse properties of benzodiazepines and their congeners. **Pharmacological Research**, **27**, N° 3, pp. 201-215, 1993.
- GRAEFF, F. G., Ansiolíticos. In: GRAEFF, F. G. (Ed.), **Drogas Psicotrópicas e seu modo de ação**. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, pp. 61-83, 1989.
- GRAEFF, F. G. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. **Reviews in the Neuroscience**, **4**: 181-211, 1993.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **27**: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: GRAEFF, F. G. e BRANDÃO, M. L. (Eds.) **Neurobiologia das doenças mentais**, Lemos Ed., São Paulo, pp. 109-144, 1996.

- GRANT, K. A. Emerging neurochemical concepts in the action of ethanol at ligand-gated ion channels. **Biochemical Pharmacology**, **5**: 383-404, 1994.
- GUARD, S. e WATSON, S. P. Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. *Neurochem. Int.*, **18**: 149-165, 1991.
- HAEFELY, W. Partial agonists of the benzodiazepine receptor: from animal data to results in patients. **Adv. Biochem. Psychopharmac.**, **45**: 275-292, 1988.
- HAEFELY, W. Benzodiazepine receptor and ligands: structural and functional differences. In: I. HINDMARCH, G. BEAUMONT, S. BRANDON e B. E. LEONARD (Eds.) **Benzodiazepines: Current Concepts**, John Wiley & Sons Ltd, pp 1-18, 1990.
- HAEFELY, W.; FACKLAM, M.; SCHOCH, P.; MARTIN, J.R.; BONETTI, E.P.; MOREAU, J.L.; JENCK, F. e RICHARDS, J.G. Partial agonists of benzodiazepine receptors for the treatment of epilepsy, sleep, and anxiety disorders. **Adv. Biochem. Psychopharmac.**, **47**: 379-394, 1992.
- HALEY, T. J. e McCORMICK, W. G. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. **British J. Pharmacol.**, **12**: 12-15, 1957.
- HANDLEY, S. e MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **327**: 1-5, 1984.
- HANDLEY, S.L. e MC BLANE, J. W. Serotonin mechanisms in animal models of anxiety. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **26**: 1-13. 1993.
- HANDLEY, S.L.; MC BLANE, J. W.; CRITCHLEY, M. A. E. e NJUNG'E, K. Multiple

- serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. **Behavioural Brain Res.**, **58**: 203-210, 1993.
- HANDLEY, S.L. 5-hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. **Pharmac. Ther.**, **66**:103-148, 1995.
- HARRO, J.; VASAR, E.; BRADWEIN, J. CCK in animal and human research. **TIPS**, **14**: 244-249, 1993.
- HARVEY, S.C., Hipnóticos y Sedantes. In: GILMAN, A. G., GOODMAN, L. S. e RALL, T.R., F.(Eds.) **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**, 7^a ed., Ed. Medica Panamericana S.A., Buenos Aires, pp. 334 - 336, 1987.
- HARVEY, R.J.; KIM, H.C. e DARLISON, M.G. Molecular cloning reveals the existence of a fourth γ subunit of the vertebrate brain GABA_A receptor. **FEBS Lett.**, **331**: 211-216, 1993.
- HASENÖHRL, R. U.; FRISCH, C.; NIKOLAUS, S. e HUSTON, J. P. Chronic administration of neurokinin SP improves maze performance in aged *Rattus norvegicus*. **Beh. Neural Biology**, **62**: 110-120, 1994.
- HASENÖHRL, R. U.; JENTJENS, O.; DE SOUZA SILVA, M. A.; TOMAZ, C. e HUSTON, J. P. Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **European J. Pharmacol.**, **354**: 123-133, 1998.
- HENDRY, S.; JONES, E.G.; De FILIPE, J.; SCHMECHEL, D.; BRANDON, C. e EMSON, P.C. *apud* WISE, S.P. Co-localization of GABA and neuropeptides in the cerebral cortex. **TINS**, **março** :92-95, 1985.

- HOAR, W.S. e HICKMAN, C.P. "General and comparative physiology " 2ª ed., Prentice-Hall inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA, pp. 260-265, 1975.
- HÖEHN-SARIC, R. Neurotransmitters in Anxiety. **Arch. Gen. Psychiatry**, **39**: 735-742, 1982.
- HUGHES, J.; BODEN, P.; COSTALL, B.; DOMENEY, A.; KELLY, E.; HORWELL, D. C.; HUNTER, J. C.; PINNOCK, R. D. e WOODRUFF, G. N. Development of a class of selective cholecystokinin Type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **87**: 6728-6732, 1990.
- HUSTON, J. P. e STÄUBLI, S. Substance P and its effects on learning and memory. In: MARTINEZ, J. L.; JENSEN, R. A.; MESSING, R. N.; RIGTER, M. e McGAUGH, J. L. (Eds.) **Endogenous peptides and learning and memory processes**, Academic Press, New York, pp. 521-540, 1981.
- HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R.U.; BOIX, F.; GEHARD, P. e SCHWARTING, R. K. W. Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement and brain dopamine activity. **Psychopharmacology**, **112**: 147-162, 1993.
- HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R.U. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P. **Behav. Brain Res.**, **66**: 117-127, 1995.
- ITOI, K.; BADOER, E.; FATIMUNISSA, Q. e UNGER, T. Further localization of cardiovascular and behavioral actions of substance P in the rat brain. **Brain Res.**, **668**: 100-106, 1988.
- ITOI, K.; TSCHOPE, C.; JOST, N.; CULMAN, J.; LEBRUN, C.; STAUSS, B.; UNGER, T. Identification of the central tachykinin receptor subclass involved in

- substance P-induced cardiovascular and behavioral responses in conscious rats. **European J. Pharmacol.**, **219**: 435-444, 1992.
- IZQUIERDO, I. e MEDINA, J. H. GABA-A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. **TIPS**, **12**: 260-265, 1991.
- IZQUIERDO, I.; PEREIRA, M. E.; Da CUNHA, C.; WOLFMAN, C. e MEDINA, J. H. Benzodiazepine receptor ligand influences on learning: an endogenous modulatory mechanism mediated by benzodiazepines possibly of alimentary origin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86 (Suppl 2)**: 169-171, 1991.
- IZQUIERDO, I.; Da CUNHA, C.; WOLFMAN, C. e MEDINA, J. H., Modulation of memory storage by endogenous benzodiazepine / GABA-A systems in the amygdala, septum and hippocampus, In: MATTHIIES, H. J. e KAMMERER, J. (Eds.), **Cellular mechanisms of memory formation and synaptic long-term potentiation**, Springer-Verlag, Berlin, 1991.
- KAGE, R.; MCGREGOR, G.P.; THIM, L. e CONLON, J.M. Neuropeptide γ , a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from preprotachykinin mRNA in the female rat brain. **J. Neurochem.**, **50**: 1412-1427, 1988.
- KANAWAGA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A. e MATUSO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. **J. Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **114**: 533-540, 1983.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I. e MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin α and β , isolated from porcine spinal cord. **Proc. Jpn. Acad. Series B**, **59**: 101-104, 1983.
- KLAVDIEVA, M. M. The history of neuropeptides I. **Front. Neuroendocrinol.**, **16**: 293-321, 1995.

- KOTANI, M.; MOSHIMARU, M.; NAWA, M. e NAKANISHI, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **83**: 7074-7078, 1986.
- KOVÁCS, G.L. e DE WIED, D. Peptidergic modulation of learning and memory process. **Pharmacological Reviews**, **46**: 269-290, 1994.
- KRAMER, M. S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J.; SRAMEK, J. J.; REINES, S. A.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT-KNOWLES, E.; HALE, J. J.; MILLS, S.G.; MACCOSS, M.; SWAIN, C.J., HARRISON, T.; HILL, R.G.; HEFTI, F.; SCOLNICK, E. M. ; CASCIERI, M. A.; CHICCHI, G.G.; SADOWSKI, S.; WILLIAMS, A. R.; HEWSON, L.; SMITH, D.; CARLSON, E.J., HARGREAVES, R. J. e RUPNIAK, N. M. J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, **281**: 1640-1645, 1998.
- KRAUSE, J. E.; CHIRGWIN, J. M.; CARTER, M. S.; XU, Z. S. e HERSHEY, A. D. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **84**: 881-885, 1987.
- LAN, N.C. e GEE, K.W. Neuroactive steroid actions at the GABA_A receptor. **Horm. Behav.**, **28**: 537-544, 1994.
- LAURSEN, S. E. e BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. **J. Pharmacol. Met.**, **16**: 155-157, 1986.
- LE BARS, D.; BOURGOIN, S.; CLOT, A. M.; HAMON, M. e CESSÉLIN, F. Noxious mechanical stimuli increase the release of Met-enkephalin-like material heterosegmentally in the rat spinal cord. **Brain Res.**, **402**: 188-192, 1987.

- LEE, C. e RODGERS, R.J. Effects of benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Neuropharmacology**, **30**, N° 12A, pp.1263-1267, 1991.
- LINDEFORS, N.; BRODIN, E.; THEODORSSON-NORHEIM, E. e UNGERSTEDT, U. Calcium-dependent potassium-stimulated release of neurokinin A and neurokinin B from rat brain regions in vitro. **Neuropeptides**, **6** (5): 453-461, 1985.
- 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.
- LÜDDENS, H.; SEEBURG, P.H.S. e KORPI, E.R. Impact of β and γ variants on ligand binding properties of γ -aminobutyric acid type A receptors. **Molec.Pharmac.**, **45**: 810-814, 1994.
- LÜDDENS, H.; KORPI, E.R. e SEEBURG, P.H.S. GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: neurophysiological implications. **Neuropharmacology**, **34**: n°3, pp.245-254, 1995.
- MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P. e GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin antagonists. **J. Auton. Pharmacol.**, **13**: 23-93, 1993.
- MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B. E. B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L. L. e SANTIKAN, S. Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: SKRABANEK, P. (Ed.) **Substance P**, Boole, Dublin, pp. 20-21, 1983.
- MAGGIO, J. E. Tachykinins. **Ann. Rev. Neurosci.**, **11**: 13-28, 1988.

- MÖHLER, H., GABAergic synaptic transmission. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, **42 (I)**, 2a, 211-214, 1992.
- MONGEAU, R.; DE OCA, B.M.; FANSELOW, M.S. e MARSDEN, C.A. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in subregions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. **Behavioral Neuroscience**, **112**: nº5, 1125-1135, 1998.
- MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P. e BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J. Neurochem.**, **60**: 1987-2009, 1993.
- NAWA, M.; MIROSE, T.; TAKASHIMA, M.; INOYAMA, S. e NAKANISHI, S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine substance P precursor. **Nature**, **306**: 32-36, 1983.
- NAWA, M.; KATANI, M. e NAKANISHI, S. Tissue specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. **Nature**, **312**: 729-734, 1984.
- O'DONOHUE, T.L.; HELKE, C.J.; SHULTS, C.W.; BUCK, S.H. e BURCHER, E. Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol.9: Neuropeptides in the CNS, Part II. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. e KUHAR, M.J. (Ed.), **Tachykinin receptors**. Elsevier Science publishers B.V., 395-442, 1990.
- OEHME, P.; HECTH, K.; PRIESCHE, L.; MILSEM, M. E. e POPPEI, M. Substance P as a modulator of physiological processes. In: MORSAN, C. A. e TRACZYK, W. Z. (Eds.) **Neuropeptides and neuronal transmission**. Raven Press, New York, pp. 73-84, 1980.
- OEHME, P. e KRIVOY, W. A. Substance P: a peptide with unusual features. **Trends Pharmacol. Sci.**, **4**: 521-523, 1983.

OLSEN, R.W. The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. **Mol. Cell. Biochem.**, **39**: 261-279, 1981.

OTSUKA, 1973 *apud* BLOOM, F.E. Neurotransmissão e o sistema nervoso central., In: Goodman & Gilman (Editors), **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 9ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 207, 1996.

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

PATACCHINI, R. e MAGGI, C. A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, **329**: 161-184, 1995.

PELLOW, S. e FILE, S. E. Multiple sites of action for anxiogenic drugs: Behavioural, electrophysiological and biochemical correlations. **Psychopharmacology (Berlin)**, **83**: 304-315, 1984.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. e BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, **14**:149-167, 1985.

PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol. Rev.**, **35**: 85-141, 1983.

PIOT, O.; BETSCHART, J.; GRALL, I.; RAVARD, S.; GARRET, C. e BLANCHARD, J.C. Comparative behavioral profile of centrally administered tachykinin NK₁, NK₂, NK₃ receptor agonists in the guinea-pig. **British J. Pharmacol.**, **116**: 2496-2502, 1995.

- PRITCHETT, D.B.; LÜDDENS, H. e SEEBURG, P.H. Type I and type II GABA_A – benzodiazepine receptors produced in transfected cells. **Science**, **245**: 1389-1392, 1989.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A. S. e McNAMARA, J.O. Neurotransmitters. In: **Neuroscience**, Sinauer Associates, Inc, 1997.
- RANG, H.P.; DALE, M.M. and RITTER, J.M. **Farmacologia**, 3º edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 692 p.p., 1997.
- REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S. e D'ORLÉANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related tachykinins. **Pharmacology**, **38**: 1-15, 1989.
- REGOLI, D.; BOUDON, A. e FAUCHERE, J. C., Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Rev.**, **46**: 551-589, 1994.
- RIBEIRO, S. J. **Envolvimento do receptor neurocinérgico NK₃ na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- RIBEIRO, R.L.; ANDREATINI, R.; WOLFMAN, C.; VIOLA, H.; MEDINA, J.H.; Da CUNHA, C., The "anxiety state" and its relation with rat models of memory and habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, 1998, in press.
- RIBEIRO, S.J.; TEIXEIRA, R.M.; CALIXTO, J.B. e DE LIMA, T.C.M. Tachykinin NK₃ receptor involvement in the modulation of experimental anxiety in mice. **Neuropeptides**, 1999. (submetido à publicação).

- RIBEIRO, S.J. e DE LIMA, T.C.M. Naloxone-induced changes in tachykinin NK₃ receptor modulation of experimental anxiety in mice. **Neuroscience Letters**, **258**: 1-4, 1998.
- RODGERS, R. J. e COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J. e HENDRIE, C. A. (Eds.), **Ethology and psychopharmacology**. John & Sons, pp. 9-44, 1994.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C.; ABOUALFA, K. e STEPHENSON, L. H. Ethopharmacological analysis of the effects of putative "anxiogenic" agents in the mouse elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** **52**: 805-813, 1995.
- RODGERS, R. J e JOHNSON, N.J.T. Cholecystokinin and Anxiety: Promises and Pitfalls. **Critical Reviews in Neurobiology**, **9(4)**: 345-369, 1995.
- RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A. e HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **30**: 289-304, 1997.
- RODIN, E. A. e CALHOUN, H.D. Metrazol tolerance in a "normal" volunteer population. **J. Nerv. Ment. Dis.**, **150**: 438-450, 1970.
- SAKURADA, T.; YAMADA, T.; SAKURADA, S.; KISARA, K. e OHBA, M. Substance p analogues containing D-histidine antagonize the behavioral effects of intrathecally co-administered SP in mice. **European J. Pharmacol.**, **174**: 153-160, 1989.
- SANGER, D.J.; BENAVIDES, J.; PERRAULT, G.; MOREL, E.; COHEN, C.; JOLY, D. e ZIVKOVIC, B. Recent developments in the behavioral pharmacology of benzodiazepine (ω)receptors: evidence for the functional significance of

- receptor subtypes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, **18**, N°3, pp 355-372, 1994.
- SARIA, A.; TROGER, J. e ZERNING, G. Different behavioral profiles of the non-peptide substance P (NK₁) antagonists CP-96,345 and RP 67580. **Regul. Pept.**, **46**: 346-348, 1993.
- SCHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y. e TOHYAMA, M. Co-existence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**, **425**: 256-262, 1983.
- SHAIKH, M.B.; STEINBERG, A. e 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.
- SIEGHART, W. GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. **TIPS**, **13**: 446-450, December, 1992.
- SMITH, G. T. S.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; COSTA, J. J. L.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J. V. e 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.
- SMITH, G.B. e OLSEN, R.W. Functional domains of GABA_A receptors. **TIPS**, **16**: 162-167, 1995.
- SNYDER, S.H. Easing Anxiety. In: Scientific American Books, Inc. **Drugs and the Brain**, New York, 1986.

- STABLE, J.M.; BERESFORD, I.J.M.; ARKINSTALL, S.; IRELAND, S.J.; WALSH, D.M.; SEALE, P.W.; WARD, P. e HAGAN, R.M. GR 138676, a novel peptidic tachykinin antagonist which is potent at NK₃ receptors. **Neuropeptides**, **27**: 333-341, 1994.
- STARR, M.S.; JAMES, T.A. e GAYTTON, D. Behavioural depressant and antinociceptive properties of substance P in the mouse: possible implication of brain monoamines. **Eur. J. Pharmacol.**, **48**: 203-212, 1978.
- STONE, T.W. CNS neurotransmitters. In: **Neuropharmacology**. New York; W.H. Freeman/Spektrum, 1995.
- STRATTON, S.C.; BERESFORD, I.J.M.; HARVEY, F.J.; TURPIN, M.P.; HAGAN, R.M. e 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. e HAGAN, R.M. GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonist, release suppressed behaviors in a novel aversive environment. **British J. Pharmacol.**, **112**: 49P, 1994.
- TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J. M.; JORNVALL, M. e MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **128**: 947-953, 1985.
- TEIXEIRA, R. M. **Influência da Injeção intracerebral de agonistas e antagonistas de receptores de neurocininas no comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. e 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**, Florença, Itália, p. 35, 1995.
- TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. e 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.
- TREGGAR, G.; NIOLL, M. D.; POTTS, J. T.; LEEMAN, S. E. e CHANG, M. Synthesis of substance P. **Nature**, **232**: 87-89, 1971.
- TREIT, D.; PESOLD, C. e ROTZINGER, S. Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. **Behav. Neurosci.**, **107**: 770-785, 1993.
- TSCHÖPE, C.; PICARD, P.; CULMAN, N.J.; PRAT, A.; ITOI, K.; REGOLI, D.; UNGER, T. e COUTURE, R. Use of selective antagonists to dissociate the central cardiovascular and behavioral effects of tachykinins on NK₁ and NK₂ receptors in the rat. **British J. Pharmacol.**, **107**: 750-755, 1992.
- UNGER, T. H.; CAROLUS, S.; DEMMERT, G.; GATEN, D.; LANG, R. E.; MASER-GLUTH, C.; STEINBERG, H. e VEELKEN, R. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. **Circ. Res.**, **63**: 812-820, 1988.
- UNSELD, E.; FISCHER, C.; ROTHEMUD, E. e KLOTZ, U. Occurrence of "natural" diazepam in human brain. **Biochem. Pharmacol.**, **39**: 210-212, 1990.
- VON EULER, V. e GADDUM, J. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **J. Physiol.**, **72**: 74-87, 1931.

- WAFFORD, K.A.; WHITING, P.J. e KEMP, J.A. Differences in affinity and efficacy of benzodiazepine receptor ligands at recombinant γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes. **Molec. Pharmac.**, **43**: 240-244, 1993b.
- WALSH, D.M.; STRATTON, S.C.; HARVEY, F.J.; BERESFORD, I.J.M. e HAGAN, R.M. The anxiolytic-like activity of GR 159897, a non-peptide NK₂ receptor antagonist, in rodent and primate models of anxiety. **Psychopharmacology**, **121**: 186-191, 1995.
- WISE, S.P. Co-localization of GABA and neuropeptides in the cerebral cortex. **TINS**, março :92-95, 1985.
- WÖRMSE, V.; LAUFER, R.; MART, Y.; CHOREV, M.; GILON, C. e SELINGER, Z. Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. **EMBO J.**, **5**: 2805-2808, 1986.
- YAKSH, T. L.; JESSEL, T. M.; GAMSE, R.; MUDGE, A. W. e LEEMAN, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord *in vivo*. **Nature**, **286**: 155-157, 1980.
- YAKUSHIJI, T.; SHIRASAKI, T.; MUNAKATA, M.; HIRATA, A. e AKAIKE, N. Differential properties of type I and type II benzodiazepine receptors in mammalian CNS neurones. **Br. J. Pharmac.**, **109**: 819-825, 1993.
- ZERNIG, G.; DIETRICH, M.; MAGGI, C. A. e SARIA, A. The substance P (NK₁) receptor antagonists (\pm)-CP-96,345 causes sedation and motor impairment of Swiss albino mice in the black-and-white box behavioral paradigm. **Neurosci. Lett.**, **143**: 169-172, 1992.
- ZERNIG, G.; TROGER, J. e SARIA, A. Different behavioral profile 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.

ZHANG, W. e COOK, J.M. Novel organic reactions in the search for anxiolytics at the benzodiazepine receptor. In: Alan P. Kozikowski (Ed), **Drug Design for Neuroscience**, Raven Press, Ltd., New York, pp 87-117, 1993.