

FILIPPE SILVEIRA DUARTE

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DA SUBSTÂNCIA P *FREE ACID*, DOS
INIBIDORES DE PEPTIDASES E DAS SEQÜÊNCIAS C- E N-TERMINAL DA
SUBSTÂNCIA P NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO EM RATOS**

**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: Prof.^a Dra. Thereza
Christina Monteiro de Lima Nogueira**

FLORIANÓPOLIS – SC

2003

DUARTE, Filipe Silveira. Avaliação dos efeitos centrais da substância P *free acid*, dos inibidores de peptidases e das seqüências C- e N-terminal da substância P no labirinto em cruz elevado. Florianópolis, 2003, 104 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

Defesa: 12/02/2003

O presente estudo investigou os efeitos da microinjeção i.c.v da SP *free acid* (SP*fa*), a influência do pré-tratamento com os inibidores de peptidases, tiorfan e/ou fosforamidon, no efeito da SP 1-11, bem como o efeito das seqüências peptídicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). Investigou-se também o envolvimento dos receptores NK₁ e NK₂ no efeito do tipo ansiogênico da SP 6-11. Nossos resultados mostraram que o uso de tiorfan ou fosforamidon promoveu um pequeno aumento no efeito do tipo ansiogênico da SP, enquanto o pré-tratamento com ambos os inibidores promoveu um efeito do tipo ansiolítico. A seqüência SP 6-11 10 pmol assim como a SP *fa* 1 pmol mostraram um perfil do tipo ansiogênico similar ao apresentado pelos animais tratados com a SP 1-11 10 pmol. Já a seqüência peptídica SP 1-7 não foi capaz de promover quaisquer alterações comportamentais no teste do LCE. Observamos ainda que o tratamento com os antagonistas NK₁ (FK 888) ou NK₂ (SR 48968) foi capaz de inibir as propriedades aversivas induzidas pela seqüência peptídica C-terminal. Nossos resultados mostram que os efeitos do tipo ansiogênico produzidos pelo tratamento central com o neuropeptídeo SP 1-11, em ratos submetidos ao teste do LCE, parecem ser codificados pela sua seqüência peptídica C-terminal, ação esta mediada por receptores NK₁ e NK₂. Este estudo também mostra que nestes efeitos comportamentais induzidos pela SP existe a participação, mas não necessariamente envolvem, a sua biotransformação em metabólitos ativos.

Palavras-chave: Substância P *free acid*, inibidores de peptidases, seqüências peptídicas C- e N-terminal, receptores NK₁ e NK₂, ansiedade, LCE.

**" Fatos e fatos somente são os alicerces da ciência ...
Quando alguém se devota à pesquisa experimental é com o fim de
aumentar a soma dos fatos conhecidos ou, então, de descobrir as suas
relações recíprocas ".**

**François Magendie - O primeiro Farmacologista
(1783 - 1855)**

Dedico esta dissertação ...

... Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, como exemplos de educação, caráter, honestidade e bondade.

... À Cristiana Ramos, companheira, incentivadora, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, compartilhando estes anos de trabalho, alegrias, angústias, pelo carinho, paciência e pela compreensão nos momentos de minha ausência nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

» À Professora Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira, minha orientadora, pelo voto de confiança e por ter acreditado no meu talento e potencial durante os meus primeiros passos na pesquisa na minha iniciação científica; pela excelente convivência durante todo esse tempo; pela amizade e sabedoria; pela transmissão de conhecimentos; pela contribuição e aprimoramento de minha educação e formação científica; pela dedicação prestada a minha orientação.

» A todos os professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, pela qualidade do curso e por terem contribuído pela minha formação: “Tenho uma verdadeira admiração pelo amor, dedicação e contribuição prestadas à ciência”.

» À direção e funcionários do Biotério Central e Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, especialmente ao Pedro, Paulo Luiz e Ademir, pela amizade, auxílio técnico e zelo pelos animais: “Vocês contribuíram muito para a realização deste trabalho; compartilho aqui toda minha gratidão”.

» Aos colegas da turma de mestrado 2001: Leandro Vendruscolo, Jarbas Motta, Emerson Motta, Rui Prediger, Lúcia Bastos, por compartilharem momentos de alegria, angústias e pelo companheirismo. A todos os colegas dos demais Laboratórios do Departamento de Farmacologia pela troca de informações e pela amizade.

» Aos companheiros do Laboratório de Neurofarmacologia, Raquel Testolin, Viviani, Patrícia Dias, Néia, Sandro, Rafaela, Luiz Rangel, Ricardo Viera (*in memoriam*; fique com Deus), Denise, Selma, Tulani, Clarissa, pela amizade e por tornarem o laboratório minha segunda casa e, especialmente, à Elaine, Ana Calixto, Raquel Teixeira, Fábio Rocha e Marco Antônio Lorenzo, por todos estes anos de convivência, e pela constante troca de conhecimento.

» Aos professores membros da banca examinadora do mestrado, Reinaldo Naoto Takahashi, Antônio de Pádua Carobrez, Moacir Serralvo Faria e Marcus Lira Brandão, pelas críticas, sugestões e reflexões adicionais que contribuíram muito, dando maior consistência e qualidade à dissertação para sua versão final.

» À Sanofi Recherche (França) e ao professor Dr. João Batista Calixto e sua aluna Mariem El Sayah, pela doação do SR 48968.

» À minha família, em especial aos meus pais Elbe e Vera, meus irmãos Alexandre e Rodrigo, e suas esposas, pelo carinho, amizade, educação e apoio em todas as fases de minha vida. Ao meu lindo e inteligente sobrinho Rodrigo Jr., que me deu alegria, força e perseverança para prosseguir meu caminho nos momentos mais difíceis.

» Aos animais que involuntariamente cederam suas vidas para o progresso da ciência.

» À CAPES, pela bolsa de mestrado e pelos recursos financeiros concedidos ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

» À todas as pessoas não mencionadas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
<i>ABSTRACT</i>	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
<u>INTRODUÇÃO</u>	1
Histórico	1
Síntese e metabolismo das neurocininas	2
Receptores neurocinérgicos	6
<u>SUBSTÂNCIA P E SISTEMA NERVOSO CENTRAL</u>	9
Localização no Sistema Nervoso Central	9
<u>SUBSTÂNCIA P E ANSIEDADE</u>	10
Ansiedade – Aspectos Gerais	10
Modelos animais de ansiedade	12
Substância P e ansiedade	13
<u>OBJETIVOS</u>	17
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	18
Considerações éticas	18
Animais	18
Drogas e soluções	19
<i>PROCEDIMENTOS GERAIS</i>	21
Cirurgias estereotáxicas	21
Cânulas, estiletos e parafusos	22

Agulhas injetoras	23
<i>ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE DROGAS</i>	23
<i>EQUIPAMENTOS</i>	23
Labirinto em cruz elevado	23
Arena	25
<i>PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</i>	26
<i>HISTOLOGIA</i>	28
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	28
RESULTADOS	29
LCE	
- Efeito comportamental da administração intracerebroventricular da substância P <i>free acid</i> em ratos avaliados no LCE.	29
- Efeito comportamental da administração intracerebroventricular de inibidores de peptidases na ação ansiogênica da substância P em ratos avaliados no LCE.	33
- Efeito comportamental da administração intracerebroventricular das seqüências específicas 6-11 (C-terminal) e 1-7 (N-terminal) da substância P em ratos avaliados no LCE.	37
- Avaliação da participação dos receptores NK ₁ e NK ₂ no efeito ansiogênico da seqüência SP 6-11 (C-terminal) em ratos avaliados no LCE.	42
ARENA	
- Efeito comportamental da administração intracerebroventricular da substância P <i>free acid</i> em ratos avaliados na arena.	46
- Influência do pré-tratamento intracerebroventricular com os inibidores de peptidases no efeito da substância P em ratos avaliados na arena.	48

- Efeito comportamental da administração intracerebroventricular das seqüências específicas 6-11 (C-terminal) e 1-7 (N-terminal) da substância P em ratos avaliados na arena.	49
- Avaliação da participação dos receptores NK ₁ e NK ₂ no efeito da seqüência SP 6-11 (C-terminal) em ratos avaliados na arena.	52
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

A substância P (SP) e os receptores neurocinérgicos são amplamente expressos em diferentes estruturas cerebrais que compõem o sistema cerebral de defesa e estão envolvidos na mediação do comportamento aversivo. O possível envolvimento da SP na modulação da ansiedade experimental já foi demonstrado em diferentes espécies e modelos animais. Há várias evidências mostrando que as neurocininas, como a SP, são clivadas por enzimas (peptidases) em fragmentos carboxi- e amino-terminal, alguns dos quais retêm a atividade do neuropeptídeo original e outros que se tornam inativos ou apresentam um efeito biológico oposto ao do peptídeo íntegro.

O presente estudo investigou os efeitos da microinjeção i.c.v da SP *free acid* (SPfa) que apresenta a mesma seqüência de aminoácidos da SP íntegra (SP 1-11), porém é resistente à degradação enzimática, a influência do pré-tratamento com os inibidores de peptidases, tiorfan e/ou fosforamidon, no efeito da SP 1-11, bem como o efeito das seqüências peptídicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), em ratos avaliados no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, investigou-se o envolvimento dos receptores NK₁ e NK₂ no efeito do tipo ansiogênico da seqüência peptídica SP 6-11 (C-terminal).

Ratos Wistar adultos (3 meses) machos foram anestesiados com tiopental sódico e hidrato de cloral (i.p.) e uma cânula foi implantada no ventrículo lateral (i.c.v.). Cinco dias após as cirurgias, os animais controles receberam 2 µl do veículo e os grupos experimentais foram tratados com soluções de 10 pmol de SP 1-11, SP 6-11 ou SP 1-7, ou SPfa 1 ou 10 pmol. Outros grupos experimentais receberam tiorfan 10⁻⁷ M, fosforamidon 10⁻⁶ M ou ambos os inibidores, 30 min antes da injeção i.c.v. de SP 1-11 10 pmol. Na última etapa experimental, grupos de animais receberam por via i.c.v. 2 µl do veículo ou dos antagonistas seletivos NK₁ (FK 888) ou NK₂ (SR 48968), 5 min depois, injetou-se 2 µl

do veículo ou SP 6-11 (10 pmol). Cinco minutos após o último tratamento, os animais foram avaliados no LCE onde registrou-se a porcentagem do tempo despendido e do número de entradas nos braços abertos, além de parâmetros etológicos como imersões de cabeça, estiramentos corporais, número de comportamentos de levantar e de auto-limpeza. Imediatamente após o teste do LCE, os animais foram colocados no centro da arena para avaliação da sua atividade locomotora, onde registrou-se a movimentação espontânea, o número de comportamentos de levantar, de auto-limpeza e a defecação. Nossos resultados mostraram que o uso dos inibidores de peptidases, tiorfan ou fosforamidon, promoveu um pequeno aumento no efeito do tipo ansiogênico induzido pela SP, caracterizado por uma diminuição na porcentagem do tempo despendido e do número de entradas nos braços abertos, assim como pela redução significativa do número de imersões de cabeça e aumento do número de estiramentos corporais. No entanto, o pré-tratamento com ambos os inibidores, promoveu um efeito do tipo ansiolítico, evidenciado pelo aumento da porcentagem do tempo despendido nos braços abertos e do número de imersões de cabeça, característico de uma maior disponibilidade de SP, que poderia atuar em diferentes tipos de receptores NK. Observamos que a seqüência peptídica C-terminal (SP 6-11 10 pmol) ou SP *fa* 1 pmol reduziram a porcentagem do tempo despendido e do número de entradas nos braços abertos do LCE, um perfil comportamental do tipo ansiogênico similar ao apresentado pelos animais tratados com a SP 1-11 10 pmol. Já a seqüência peptídica N-terminal (SP 1-7) não foi capaz de promover quaisquer alterações comportamentais de forma significativa no teste do LCE. Além disso, observamos que o tratamento i.c.v. com os antagonistas NK₁ (FK 888) ou NK₂ (SR 48968) foi capaz de inibir as propriedades aversivas induzidas pela seqüência peptídica C-terminal.

Nossos resultados mostram que os efeitos do tipo ansiogênicos do tratamento central com o neuropeptídeo SP 1-11, em ratos submetidos ao teste do LCE, podem ser

codificados pela sua seqüência peptídica C-terminal (SP 6-11), ação esta mediada não somente por receptores NK₁, como também pelos receptores NK₂. Este estudo também demonstra que para esses efeitos induzidos pela SP existe a participação mas não envolve, necessariamente, a sua biotransformação em metabólitos ativos.

ABSTRACT

Substance P (SP) and its preferred NK₁ receptor are widely expressed throughout the fear-processing pathways of the brain. The possible involvement of the substance P in the modulation of the experimental anxiety has already been demonstrated. Nevertheless, SP, like other peptides, are cleaved by peptidases in two fragments: C-terminal (SP 6-11) and N-terminal (SP 1-7) that could be responsible for the anxiogenic-like peptide's response. In this study we verified the effects of i.c.v. microinjections of SP free acid (SPfa) which is resistant to enzymatic cleavage, the influence of the pretreatment with peptidase inhibitors (PIs), tiorphan and/or phosphoramidon, or the treatment with the peptidic sequences SP 6-11 and SP 1-7 in animals evaluated in the elevated plus maze (EPM) test. Adult male Wistar rats were implanted with a cannula into the lateral ventricle and 5 days following surgery, control animals received 2 µl of vehicle and the experimental groups were treated with 10 pmol solutions of SP 6-11, SP 1-7 or 1 and 10 pmol of SPfa. Other experimental groups received tiorphan 10⁻⁷ M, phosphoramidon 10⁻⁶ M or both PIs 30 min prior SP 1-11 10 pmol i.c.v. Animals were evaluated in the elevated plus-maze test and pretreatment with the C-terminal fragment (SP 6-11) and SPfa 1 pmol promoted an anxiogenic-like profile of action similar to SP 1-11, i.e., a decrease of entries and time spent on the open arms, whereas the N-terminal fragment (SP 1-7) was inactive at the EPM. Both PIs enhanced the SP effect when used alone, but their combination produced reverse effect probably due a higher SP concentration that could act on other NK receptor types. Moreover, pretreatment with NK₁ (FK 888) and NK₂ (SR 48968) antagonists showed that C-terminal sequence effects are mediated by both NK₁ and NK₂ receptors. Altogether the present results give further support to the SP role in the modulation of experimental anxiety in rats.

LISTA DE FIGURAS**Página**

- Figura 1** – Esquema da origem dos peptídeos neurocinérgicos e seus precursores em mamíferos. 3
- Figura 2** - Sítios de degradação da SP *in vitro*. 6
- Figura 3** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos. 30
- Figura 4** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos. 31
- Figura 5** – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M no efeito da SP 10 pmol na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos. 34
- Figura 6** – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M no efeito da SP 10 pmol no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos. 35
- Figura 7** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos. 39
- Figura 8** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos. 40
- Figura 9** – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou SR 48968, antagonista seletivo NK₂, na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos. 44
- Figura 10** – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou

SR 48968, antagonista seletivo NK₂, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos. 45

Figura 11 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos. 47

Figura 12 - Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10⁻⁷ M e/ou fosforamidon 10⁻⁶ M sobre o efeito da SP 10 pmol na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos. 48

Figura 13 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos. 50

Figura 14 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou SR 48968, antagonista seletivo NK₂, na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos. 52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado. 32
- Tabela 2** – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M sobre o efeito da SP 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado. 36
- Tabela 3** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado. 41
- Tabela 4** – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol) ou SR 48968 (100 pmol), em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado. 46
- Tabela 5** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados na arena. 47
- Tabela 6** – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M sobre o efeito da SP 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados na arena. 49
- Tabela 7** – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, em outros parâmetros comportamentais registrados na arena. 51
- Tabela 8** – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol) ou SR 48968 (100 pmol), em outros parâmetros comportamentais registrados na arena. 53

LISTA DE ABREVIACOES

AMPC – Monofosfato de adenosina cíclico

CD – Catepsina D

DAG – Diacilglicerol

DAP IV – Dipeptidil-aminopeptidase IV

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EDSP – Enzima de degradação da SP

EPN – Endopeptidase neutra

EPPP – Endopeptidase ps-prolina

Fos – Fosforamidon

HK-1 – Hemocinina 1

IP₃ – Trifosfato de inositol

LCE – Labirinto em cruz elevado

LTE – Labirinto em T elevado

NKA – Neurocinina A

NKB – Neurocinina B

NKg - Neurocinina γ

NKs – Neurocininas

PBS – *Phosphate-buffered solution*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PIP₂ – Fosfatidilinositol-bifosfato

PPT-A – Pr-prtaquicinina A

PPT-B – Pr-prtaquicinina B

PPT-C – Pr-prtaquicinina C

PKC – Proteína quinase C

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Substância P

SPfa - Substância P *free acid*

Tio – Tiorfan

INTRODUÇÃO

Histórico

Nos últimos 20 anos vêm se acumulando evidências de que um grande número de peptídeos está presente em neurônios do sistema nervoso central (SNC). Desde então, seu provável papel como neurotransmissor tem sido extensamente discutido. Snyder, já em 1980, antecipou que o número de neuropeptídeos ativos no SNC excederia a 200. Os inúmeros trabalhos subseqüentes parecem confirmar não só essa previsão, mas também a importância desses peptídeos em diversas outras funções fisiológicas e patológicas (Hökfelt *et al.*, 1984; Myers, 1994; Nussdorfer e Malendowicz, 1998; Griebel, 1999; Hökfelt *et al.*, 2000; McLay *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2002; Mereggi, 2002).

A substância P (SP) foi o primeiro neuropeptídeo a ser conhecido e a ser proposto como neurotransmissor (Von Euler e Pernow, 1977). Os efeitos farmacológicos da SP foram inicialmente demonstrados em 1930, quando observou-se seus poderosos efeitos hipotensores que não eram bloqueados por antagonistas colinérgicos (Von Euler e Gaddum, 1931; Gaddum e Schild, 1934; Von Euler, 1936). A origem dessa denominação, substância P, vem das palavras “preparação” ou “pó”, pois Von Euler havia relatado ter utilizado uma preparação padrão na forma de pó seco (“powder”), convenientemente abreviada por “P” (Otsuka e Yoshioka, 1993).

Em 1970, Chang e Leeman identificaram a estrutura primária da SP como sendo um undecapeptídeo, representado pela seqüência de aminoácidos H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂. A caracterização desse neuropeptídeo, a partir do hipotálamo de bovinos, evidenciou que a SP pertence à família de peptídeos denominada de taquicininas (TKs), que estão presentes tanto em tecidos de mamíferos, por exemplo, SP, neurocinina A e neurocinina B, como também em tecidos de outras espécies, tais como moluscos (eledoisina) e anfíbios (fisalaemina, kassinina, uperoleina e filomedusina)

(Henry *et al.*, 1987; Maggio, 1988). O nome taquicininas resultou da similaridade farmacológica desses peptídeos com a bradicinina, que agia como mediador inflamatório endógeno induzindo uma contração lenta do íleo de cobaias, distintamente do que ocorria com as taquicininas ao qual tinham perfil farmacológico semelhante, induzindo, porém, uma contração rápida nesse mesmo tecido (Bertaccini, 1976). A característica comum entre as taquicininas é a similaridade na sua seqüência de aminoácidos da fração C-terminal: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde X representa um resíduo aromático (fenilalanina-Phe e treonina-Try) ou um resíduo alifático hidrofóbico (valina-Val e isoleucina-Ile; Erspamer, 1981).

A nomenclatura utilizada atualmente para estes peptídeos foi sugerida no encontro de Maidstone e aprovada num simpósio realizado em Montreal/Canadá, em 1986. Assim, o termo *taquicininas* é utilizado quando se refere aos peptídeos de espécies não-mamíferas, enquanto que *neurocininas* (NKs) é a designação genérica utilizada para os peptídeos presentes em mamíferos. Por essa razão, deste momento em diante sempre empregaremos a última terminologia, NKs, quando nos referirmos a esses peptídeos.

Síntese e metabolismo das neurocininas

As NKs são sintetizadas a partir de proteínas precursoras denominadas pré-protaquicininas, as quais são codificadas por dois genes distintos: o gene codificador da pré-protaquicinina-I (PPT-I) ou pré-protaquicinina-A (PPT-A) e o gene codificador da pré-protaquicinina-II (PPT-II) ou pré-protaquicinina-B (PPT-B). A transcrição do gene da PPT-A origina 3 RNAs mensageiros de NKs distintos: RNAm PPT-I α que dá origem a SP, RNAm PPT-I β que origina SP, neurocinina A (NKA) e neurocinina K (NPK, neuropeptídeo K), e RNAm PPT-I γ que origina SP, NKA e neurocinina γ (NK γ ,

neuropeptídeo γ) (Maggio *et al.*, 1983; Nawa *et al.*, 1983, 1984; Kotani *et al.*, 1986; Bonner *et al.*, 1987; Krause *et al.*, 1987; Guard e Watson, 1991). O gene da PPT-B, por sua vez, origina o RNAm PPT-II β que codifica apenas a NKB (Nakanishi, 1987) (Ver Figura 1). Um novo membro da família das pré-protaquicininas, a pré-protaquicininina C (PPT-C), foi recentemente identificada em linfócitos-B de camundongos e é responsável por codificar a hemocinina-1 (HK-1), cuja cadeia peptídica é também composta de 11 aminoácidos (Zhang *et al.*, 2000). Comparando a seqüência de aminoácidos de sua estrutura com a da SP, a HK-1 revela alto grau de homologia e sugere-se que possa agir como um ligante endógeno dos receptores NK₁. A HK-1 desempenha importante função na sobrevivência e proliferação dos linfócitos-B agindo como um fator autócrino do crescimento destas células hematopoiéticas (Kurtz *et al.*, 2002).

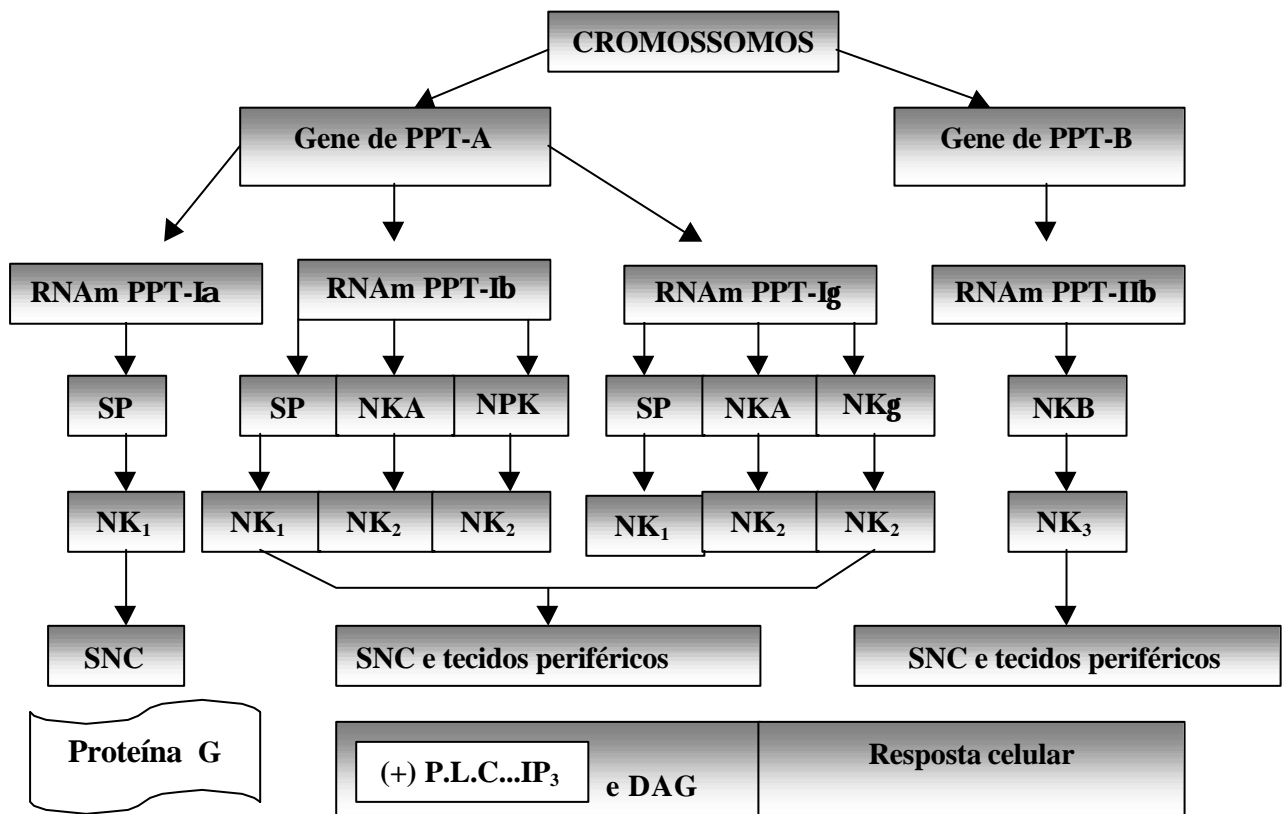


Figura 1 – Esquema da origem dos peptídeos neurocinérgicos e seus precursores em mamíferos. Adaptado de Regoli *et al.* (1994).

A importância biológica do processo de “splicing” alternativo da PPT-A é desconhecido. A proporção relativa de RNAm de PPT- α , β e γ é notavelmente dependente da espécie. Assim, a PPT- β é a forma expressa predominantemente nos gânglios basais em humanos (Bannon *et al.*, 1992), enquanto que a PPT- α prevalece no cérebro de bovinos (Nawa *et al.*, 1984). O RNAm PPT- α é abundante no cérebro, enquanto que o RNAm PPT- β e o RNAm PPT- γ são conhecidos principalmente em tecidos periféricos (Nakanishi, 1987). O RNAm PPT- β está presente no cérebro (hipotálamo) e intestino (Kotani *et al.*, 1986). A expressão da PPT-C foi detectada pela análise da PCR em diferentes tecidos de camundongos, ratos e humanos, e incluem, pele, estômago, coração, pulmões, músculo esquelético e cérebro (Kurtz *et al.*, 2002).

A SP é sintetizada a partir de seus precursores pela ação de proteases denominadas convertases. Os pontos de clivagem pelas convertases no gene PPT apresentam duplos resíduos catiônicos. Essa clivagem é seguida pela amidação C-terminal, obtida pela ação da enzima peptidilglicina- α -amidase (monoxigenase) que utiliza o aminoácido glicina como doador dos grupamentos aminas após a clivagem do sítio Arg¹-Lys³ (Harmar e Keen, 1982).

O processo de síntese das NKs ocorre nos ribossomos do corpo celular e, uma vez sintetizadas, as NKs são armazenadas em vesículas sinápticas (Merighi *et al.*, 1988; Plenderleith *et al.*, 1990) e transportadas axonalmente para o terminal nervoso (Brimijoin *et al.*, 1980), onde aguardam o estímulo apropriado para sua liberação. A liberação do conteúdo dessas vesículas para a fenda sináptica ocorre por (1) estímulos externos, como capsaicina, potássio ou outros agentes capazes de induzir despolarização neuronal ou (2) condições fisiopatológicas, podendo ocorrer durante o peristaltismo intestinal, após estímulos térmicos na pele, por aplicação de estímulos dolorosos e não dolorosos na medula, ou ainda, podem ser liberadas durante o processo inflamatório. Em ambos os

processos, a liberação das NKs é cálcio-dependente (Otsuka e Yoshioka, 1993).

As NKs, particularmente a SP, são substratos para várias enzimas proteolíticas, presentes no fluido extracelular e/ou acopladas a membranas (Iversen *et al.*, 1985). O peptídeo mais vulnerável à degradação pelas peptidases parece ser a SP, enquanto que peptídeos contendo um resíduo de pGlu em sua posição N-terminal apresentam maior resistência à clivagem enzimática (Regoli *et al.*, 1994). A endopeptidase EDSP (enzima de degradação da SP) foi a primeira enzima identificada e isolada do fluido cérebro-espinhal de humanos (Nyberg *et al.*, 1984). Esta enzima hidrolisa especificamente ligações peptídicas internas nas posições 7-8 e 8-9, liberando os fragmentos SP 1-7 e SP 1-8 da SP. No fluido cérebro-espinhal de ratos, a EDSP foi caracterizada como uma das enzimas capazes de liberar o fragmento SP 1-7 (Persson *et al.*, 1992). A EPPP (endopeptidase pós-prolina) também cliva a SP e libera os fragmentos SP 3-11 e SP 5-11. A EPN (endopeptidase neutra), encontrada em neurônios, células gliais e membranas cerebrais de ratos, cliva a SP nas posições 6-7, 7-8 e 9-10 (Horsthemke *et al.*, 1984; Matsas *et al.*, 1984). A ECA (enzima conversora de angiotensina), por sua vez, está amplamente distribuída no corpo, estando presente no endotélio vascular, miocárdio, cérebro, testículos, rins e trato gastrointestinal (Jackson *et al.*, 1991). No SNC, a ECA tem sido encontrada no fluido cérebro-espinhal (Lantz *et al.*, 1991) e já foram identificadas algumas isoformas neuronais em diferentes espécies (Yokosawa *et al.*, 1983; Hooper e Turner, 1987; Williams *et al.*, 1991). Assim, tanto na periferia quanto no SNC, a ECA também participa da hidrólise da SP. Tanto a EPN como a ECA promovem a liberação do fragmento SP 1-7, com maior ação no SNC. Já a DAP IV (dipeptidil-aminopeptidase IV) é a principal enzima que degrada a SP na periferia, mas também está presente no SNC participando do metabolismo cerebral da SP. Assim, o uso de inibidores dessas enzimas, portanto, aumentam, de uma maneira geral, a disponibilidade e, algumas vezes, as ações da SP no

SNC (para revisão ver Regoli *et al.*, 1994). Os sítios de clivagem e as enzimas envolvidas no metabolismo das NKs estão mostrados abaixo.

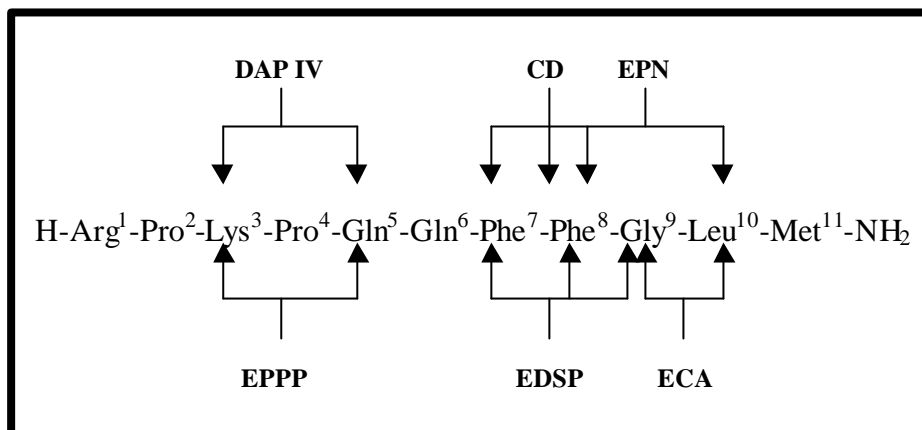


Figura 2 - Sítios de degradação da SP *in vitro*. DAP IV (dipeptidil-aminopeptidase IV), EPPP (endopeptidase pós-prolina), CD (catepsina D), EDSP (enzima de degradação da SP), EPN (endopeptidase neutra) e ECA (enzima conversora de angiotensina). Adaptado e modificado de Regoli *et al.* (1994).

Receptores neurocinérgicos

A atividade biológica das NKs dependem de sua interação com três diferentes tipos de receptores neurocinérgicos, que já foram clonados com a ajuda de técnicas de bioensaio e estudos de “binding”. São eles os receptores NK₁, NK₂ e NK₃. Do ponto de vista farmacológico e bioquímico, a caracterização desses receptores foi facilitada pelo surgimento de agonistas e antagonistas peptídicos e não-peptídicos seletivos (Regoli *et al.*, 1987; Nakanishi, 1991; Joobs *et al.*, 1995; Patacchini e Maggi, 1995). Vários estudos indicam a presença de duas isoformas para os receptores NK₁ e NK₂, diferentemente expressas em vários tecidos e órgãos (Watling *et al.*, 1993; Mantyh *et al.*, 1995; Khawaja e

Rogers, 1996; Lecci *et al.*, 2000; Bensaid *et al.*, 2001; Patacchini *et al.*, 2001; Candenas *et al.*, 2002).

O terceiro receptor neurocinérgico a ser reconhecido foi inicialmente denominado de NK₃ (Maggi e Schwartz, 1997) e, em 1996, Donaldson e colaboradores propuseram um quarto tipo de receptor NK, designado de NK₄, encontrado no músculo esquelético, pulmões e fígado. Posteriormente, em 1997, Krause e colaboradores denominaram este mesmo receptor de NK_{3B} devido ao alto grau de homologia estrutural e perfil de ligação similar ao receptor NK₃, que seria então denominado NK_{3A}. Na verdade, a classificação do receptor como NK₄ é ainda prematura, já que novos estudos sejam necessários para avaliar a importância biológica desta entidade molecular.

Em ratos, os genes que codificam os receptores NK₁, NK₂ e NK₃ estão localizados nos cromossomos 4, 20 e 2, respectivamente (Mori *et al.*, 1992), enquanto em humanos os genes que codificam os receptores NK₁ e NK₂ estão localizados nos cromossomos 2 e 10, respectivamente (Gerard *et al.*, 1990; Gerard *et al.*, 1991; Kris *et al.*, 1991).

Os receptores neurocinérgicos foram inicialmente caracterizados pelas suas afinidades preferenciais em se ligar com as NKs endógenas, segundo o critério da ordem de potência de seus agonistas. Assim, as NKs endógenas, SP, NKA e NKB, ligam-se preferencialmente, mas não exclusivamente, aos receptores NK₁, NK₂ e NK₃, respectivamente (Regoli *et al.*, 1988; Helke *et al.*, 1990; Iversen *et al.*, 1990). Com isso, todas estas NKs podem agir em quaisquer dos três tipos de receptores sob determinadas condições, tais como disponibilidade do receptor ou em altas concentrações do peptídeo.

Os três tipos de receptores neurocinérgicos são constituídos de pequenas proteínas com 350 a 500 aminoácidos e pertencem à superfamília de receptores semelhantes aos da rodopsina. Eles compartilham uma estrutura global similar, consistindo de uma alça amino-terminal extracelular e uma alça carboxi-terminal intracelular, que nos mamíferos

estão conectadas por sete domínios hidrofóbicos transmembrana. Esses receptores mostram forte semelhança com os receptores adrenérgicos e muscarínicos, além de numerosos outros receptores acoplados às proteínas G (Regoli *et al.*, 1994).

Os receptores NK₁, NK₂ e NK₃ possuem aproximadamente 40% de seqüências idênticas entre si (Gerard *et al.*, 1993). Existe grande identidade, em torno de 75%, entre as seqüências citoplasmáticas e, aproximadamente, 70% entre os domínios transmembrânicos. Seqüências homólogas entre diferentes espécies, em geral, maiores para o receptor NK₁, tendo o receptor do rato e do homem por volta de 95 % de homologia, diferindo apenas em 22 dos 407 aminoácidos que os constituem (Fong *et al.*, 1992). Já a homologia dos receptores NK₂ e NK₃ entre ratos e humanos também é alta, aproximadamente 85 e 88%, respectivamente.

Os receptores neurocinérgicos pertencem a superfamília de receptores acoplados à proteína G, especificamente proteínas da família das Gq, que promovem a ativação de fosfolipase C. Esta enzima, por sua vez, hidrolisa lipídeos de membrana (PIP₂) à diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃). O IP₃, via receptores específicos da membrana do retículo endoplasmático, estimula a liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, enquanto o DAG, através da ativação da proteína quinase C (PKC), promove a abertura de canais de Ca²⁺ do tipo - L na membrana plasmática. O conseqüente aumento nas concentrações de Ca²⁺ intracelular induz as respostas celulares (para revisão ver Ju *et al.*, 1991; Maggi *et al.*, 1993; Otsuka e Yoshioka, 1993; Regoli *et al.*, 1994). Pode haver também a mobilização de ácido aracdônico, via fosfolipase A₂, e o acúmulo de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), via adenilato-ciclase (Nakajima *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1994; Mitsuhashi *et al.*, 1994; Seabrook e Fong, 1993).

SUBSTÂNCIA P E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Localização no sistema nervoso central (SNC)

As NKs estão presentes no SNC em grande quantidade, particularmente em áreas envolvidas no controle central de várias funções autonômicas periféricas como a pressão sanguínea, respiração, micção, motilidade gastrointestinal; funções essenciais como a regulação da ingestão de líquidos; funções afetivas e emocionais como a ansiedade, agressão e comportamento estereotipado; na transmissão da dor e outras funções cerebrais como o aprendizado e memória (Severini *et al.*, 2002).

O tecido nervoso representa até o momento a mais importante localização das NKs em invertebrados e vertebrados. Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência combinadas ao radioimunoensaio e/ou imunohistoquímica permitiu detectá-las em diferentes áreas cerebrais. A distribuição neuronal da SP é bastante difusa no SNC de ratos e humanos (Ljungdahl *et al.*, 1978; Cooper *et al.*, 1981; Del Fiacco *et al.*, 1987; Marksteiner *et al.*, 1993). Uma região cerebral que apresenta uma grande quantidade de SP dentro do SNC é o hipotálamo, sendo sua distribuição nesta região variável entre espécies distintas de mamíferos (Kanazawa *et al.*, 1976; Cuello e Kanazawa, 1978; Hökfelt *et al.*, 1978; Stoeckel *et al.*, 1982; Buck *et al.*, 1986; Mai *et al.*, 1986; Jessop *et al.*, 1991; Debeljuk *et al.*, 1992). Outras áreas límbicas em que a SP foi identificada incluem amígdala, *locus coeruleus*, hipocampo, substância cinzenta periaquedutal e septo lateral (Hökfelt *et al.*, 1977; Shults *et al.*, 1984; O'Donohue *et al.*, 1987; Harlan *et al.*, 1989; Shaik e Siegel, 1994), onde está co-localizada com outras NKs e/ou neurotransmissores clássicos, tais como 5-HT, GABA, glutamato, acetilcolina, dopamina e opióides, que freqüentemente participam influenciando a sua liberação sináptica (para revisão ver Otsuka e Yoshioka, 1993). Assim, neurônios contendo SP em ratos podem fazer sinapse com

neurônios dopaminérgicos da substância negra (Mahalilik, 1988), neurônios colinérgicos nos núcleos basais (Beach *et al.*, 1987), neurônios noradrenérgicos no *locus coeruleus* (Guyenet e Aghajanian, 1977), neurônios opioidérgicos na substância cinzenta periaquedutal (Smith *et al.*, 1994), neurônios GABAérgicos no hipotálamo (Penny *et al.*, 1986; Nitsch e Leranth, 1994) e neurônios serotoninérgicos e glutamatérgicos nos núcleos da rafe (Ljungdahl *et al.*, 1978; Arvidsson *et al.*, 1990; Henry e Manaker, 1998; Commons e Valentino, 2002; Liu *et al.*, 2002). Diversos trabalhos relataram que o maior conteúdo de SP está presente na região nigro-estriatal da substância negra, seguido das regiões do septo, amígdala e hipocampo, embora se saiba que a variação de seu conteúdo em função das diferentes regiões cerebrais é dependente do método utilizado no estudo (Hong *et al.*, 1978; Hanson *et al.*, 1981; Bannon *et al.*, 1987; Mitsushio *et al.*, 1988).

A distribuição das NKs em áreas específicas do cérebro e da medula espinhal e o papel destes neuropeptídeos, particularmente da SP, como neuromoduladores sugerem seu envolvimento na etiologia de doenças neurodegenerativas, incluindo a Esclerose Amiotrófica Lateral, o mal de Alzheimer, a coreia de Huntington e a Doença de Parkinson, nos distúrbios psicóticos como a esquizofrenia, nos distúrbios afetivos como a ansiedade e depressão (para revisão ver Raffa, 1998), nos distúrbios do sono como a narcolepsia (Strittmatter *et al.*, 1996) e na gênese da epilepsia (Liu *et al.*, 1999a; Liu *et al.*, 1999b).

SUBSTÂNCIA P E ANSIEDADE

Ansiedade – Aspectos gerais

Etimologicamente a palavra ansiedade provém do grego *Anshein*, que significa estrangular, sufocar, oprimir. A ansiedade é um fenômeno emocional comum em humanos e vem sendo relatada há milênios, já que se descobriu inscrições que remontam à era de

Cristo (Hetem e Graeff, 1997). A ansiedade normal pode ser definida como um estado emocional que ocorre em respostas adaptativas a vários estressores, sejam eles fisiológicos, psicológicos e/ou sociais. Trata-se de um estado emocional necessário ao ser humano, posto que têm valor adaptativo frente às alterações do meio que nos cerca (Graeff, 1993), favorecendo o desempenho das tarefas motoras e cognitivas. Quando inapropriada, a ansiedade pode-se tornar patológica expressando angústia, desconforto e sofrimento nos pacientes, interferindo no funcionamento e desempenho global do indivíduo de maneira significativa (Graeff e Brandão, 1993; Clemente e Chapoutier, 1998; Clément *et al.*, 2002). Pode ser resultante não somente das várias situações estressantes do dia-a-dia, como também proveniente de enfermidades, durante o uso de medicamentos ou drogas, nas síndromes de abstinência de substâncias depressoras do SNC (Gentil, 1994). Além disso, como em outros tipos de distúrbios psiquiátricos, a ansiedade patológica parece depender de uma interação entre predisposição genética e fatores ambientais precipitantes.

Classicamente, duas formas de ansiedade são distingüidas: o “estado de ansiedade” e o “traço de ansiedade”. O “estado de ansiedade” é aquela que surge em determinados momentos e situações particulares, sendo influenciada por experiências anteriores negativas e intensificada diante da presença de estímulos ansiogênicos. Em contraste, o “traço de ansiedade” não varia com a situação e é considerada uma característica do indivíduo (Spielber *et al.*, 1970; Beuzen e Belzung, 1995). Em estudos pré-clínicos realizados em animais de laboratório para investigação da ansiedade, o que geralmente se analisa é o “estado de ansiedade”.

A ansiedade difere conceitualmente do medo; o medo refere-se às respostas comportamentais e neurovegetativas decorrentes de uma ameaça física ou à própria sobrevivência do organismo, se manifestando em situações onde o perigo é iminente pela presença imediata do objeto ou da situação temida, enquanto que a ansiedade é um estado

de apreensão diante de circunstâncias onde o perigo não é tão evidente, porém vago e persistente, estando ligada a uma expectativa futura desproporcional, ou quando os sinais de advertência que provocam o medo não são conscientemente percebidos (Sanger, 1991; Graeff, 1993; Gentil, 1994; Gentil Filho, 1994).

Modelos animais de ansiedade

Como medo e ansiedade apresentam os mesmos substratos neuroanatômicos e neuroquímicos e sabendo-se que os mecanismos neurais das respostas às circunstâncias que induzem medo provavelmente são similares entre humanos e animais, modelos animais de ansiedade apresentam um bom valor preditivo das respostas nos transtornos de ansiedade (Handley, 1994). Atualmente, existem diversos modelos animais utilizados na pesquisa dos mecanismos básicos envolvidos na gênese e modulação da ansiedade. Esses modelos apresentam como objetivo o “screening” de novas potencialidades terapêuticas no seu tratamento e servem para melhor compreensão dos mecanismos neurais básicos envolvidos na gênese da ansiedade (Porsolt *et al.*, 1993; Rodgers e Cole, 1994). Na verdade, a ansiedade patológica é difícil de modelar em paradigmas experimentais animais, embora um grande número de modelos estejam em uso e muito do conhecimento sobre a ansiedade humana tenha sido obtido a partir de resultados de experimentação animal. Através do emprego de modelos animais, procura-se reproduzir em laboratório determinados aspectos da sintomatologia, da etiologia ou do tratamento da ansiedade (Zangrossi Jr., 1995). Até a década de 70 os paradigmas experimentais mais empregados no estudo da ansiedade, como o teste de Geller-Seifter, os testes de esquiva ativa e passiva, o sobressalto acústico potenciado, entre outros, envolviam situações em que era necessário o condicionamento dos animais, empregando-se para tal estímulos aversivos (Rodgers *et al.*, 1997). A partir da década de 80, uma maior atenção passou a ser dada aos modelos

animais de ansiedade etologicamente fundamentados, que utilizam comportamentos adaptados ao nicho ecológico de cada espécie através de mecanismos evolutivos. Esses modelos se baseiam nas respostas inatas de medo de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas como lugares novos, confronto com um intruso e iluminação intensa (Pellow *et al.*, 1985; Lister, 1987). Entre os modelos de ansiedade etologicamente fundamentados e de grande aceitação atualmente, encontra-se o labirinto em cruz elevado (LCE), mas outros modelos como a caixa claro-escuro, vocalização ultra-sônica, hipertermia induzida por estresse, testes de exploração como o “open-field” e o “hole-board” e o teste de imobilidade tônica são também empregados. No entanto, para nenhum dos testes empregados há uma clara validade analógica e/ou preditiva com as categorias clínicas dessa patologia e todos os modelos provavelmente refletem processos de ansiedade/medo e não necessariamente processos patológicos (Olivier *et al.*, 1994).

Substância P e Ansiedade

Cada vez mais vem sendo sugerido o envolvimento da SP na gênese e/ou modulação da ansiedade através de vários estudos pré-clínicos e clínicos. A abundante distribuição dos receptores NK₁ no cérebro é refletida por uma variedade de alterações comportamentais após a administração central de SP ou de agonistas seletivos dos receptores NK₁. Assim, comportamentos como auto-limpeza, sacudir de cachorro molhado (“wet-dog shakes”), “sapatear” da pata posterior (“hind paw tapping”) e a locomoção, que em alguns casos demonstraram ser espécie-específicos, foram relatados após a administração central de agonistas de receptores NK₁, provavelmente relacionados com a liberação de outros neurotransmissores tais como dopamina, serotonina ou acetilcolina (Elliot e Iversen, 1986; Elliot *et al.*, 1992; Bristow e Young, 1994; Piot *et al.*, 1995; Stoessl *et al.*, 1995). Antagonistas de receptores NK₁ bloquearam efetivamente as vocalizações

induzidas por estresse em filhotes de cobaias após a separação maternal (Kramer *et al.*, 1998) e demonstraram atividades do tipo antidepressiva no modelo de estresse crônico (Papp *et al.*, 2000) e ansiolítica no teste de interação social (File, 2000) em ratos, além da atividade do tipo ansiolítica observada em gerbilos no teste de “sapatear” induzido por choque (Ballard *et al.*, 2001). Alguns trabalhos realizados com camundongos “knockout” para os receptores NK₁ demonstraram que a deleção desses receptores resultou em comportamento do tipo ansiolítico em vários modelos-animais, incluindo o LCE, a hipofagia emocional e vocalizações induzidas pela separação maternal (Rupniak *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2001). Outros dois trabalhos recentes realizados em camundongos “knockout” para esses receptores demonstraram que a modulação da ansiedade pela SP é, pelo menos em parte, mediada pelo sistema serotoninérgico (Froger *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2001). Bilkei-Gorzo e colaboradores, em 2002, demonstraram atividades do tipo antidepressiva e ansiolítica em camundongos “knockout” para receptores NK₁, avaliados nos testes de natação forçada (“forced-swimming test”), teste de suspensão pela cauda (“tail-suspension test) e nos testes do labirinto em “zero” e de interação social. Diferentes antagonistas de receptores NK₁ exibiram efeitos do tipo ansiolítico em espécies animais distintas no teste do LCE (Teixeira *et al.*, 1996; Nikolaus *et al.*, 1999; Varty *et al.*, 2002). Injeções sistêmicas ou no núcleo basal magnocelular de SP induziu efeitos do tipo ansiolítico nos testes do labirinto em T elevado (LTE) e LCE (Hasenöhrl *et al.*, 1998; Nikolaus *et al.*, 1999; Nikolaus *et al.*, 2000; Echeverry *et al.*, 2001) e o efeito oposto (do tipo ansiogênico) foi observado após a injeção de SP nas regiões da substância cinzenta periaquedutal dorsal, septo lateral e ventrículo lateral (Aguiar e Brandão, 1996; Teixeira *et al.*, 1996; De Araújo *et al.*, 1999; Gavioli *et al.*, 1999).

Estudos clínicos realizados em paraquedistas e civis, durante a guerra, demonstraram que os pacientes que apresentavam altos níveis de ansiedade, exibiam níveis

elevados de SP no plasma sanguíneo (Schedlowski *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1996). No primeiro estudo em humanos utilizando um antagonista de receptores NK₁ no tratamento da depressão, o MK 869, demonstrou uma potente atividade antidepressiva e ansiolítica (Kramer *et al.*, 1998). Esses achados reforçam a hipótese de que a substância P, via receptores NK₁, desempenha papel modulatório nos estados de ansiedade experimental.

Por outro lado, embora a maior parte dos estudos venha empregando ferramentas farmacológicas tendo como alvo os receptores NK₁, sugere-se também a participação dos receptores NK₂ e NK₃ na modulação da ansiedade experimental. Em relação aos receptores NK₂, apesar da sua localização ocorrer principalmente no músculo liso dos tratos gastrointestinal, respiratório e urinário, esses receptores estão também presentes em regiões discretas do SNC de roedores, incluindo o sistema límbico, área conhecida estar envolvida na modulação de processos emocionais (Otsuka e Yoshioka, 1993; Maggi, 1995; Steinberg *et al.*, 1998; Zerari *et al.*, 1998; Preston *et al.*, 2000). A distribuição neuroanatômica desses receptores sugere a sua participação na modulação de processos emocionais e têm levado a vários estudos investigando a influência desses receptores no comportamento de animais em diversos modelos experimentais de ansiedade. Assim, a administração sistêmica ou central de antagonistas de receptores NK₂ (GR 100679, SR 48968, GR 159897, SR 144190) reduz comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos (teste de interação social, caixa claro-escuro, LCE, e teste de resposta a um intruso humano) e espécies animais (camundongos, ratos e primatas; Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995; De Lima *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 1995; Teixeira *et al.*, 1996; Griebel *et al.*, 2001). A administração central de agonistas (NKA e β -Ala⁸-NKA₍₄₋₁₀₎) e do antagonista SR 48968, seletivos para os receptores NK₂, resultou em efeitos do tipo ansiogênico e ansiolítico, respectivamente, no LCE, em camundongos e ratos (Teixeira *et al.*, 1996; Griebel, 1999). Mais recentemente, não somente antagonistas de receptores NK₁ mas

também antagonistas NK₂ demonstraram atividades do tipo ansiolítica no modelo de imobilidade tônica em cobaias (Lapiz e Hogg, 2002; Olsen *et al.*, 2002).

Os receptores neurocinérgicos NK₃ também estão presentes no SNC e existe uma especulação plausível quanto a sua participação na modulação da ansiedade experimental, já que esses receptores exibem uma densa distribuição em áreas tradicionalmente envolvidas no controle do medo/ansiedade, como amígdala, hipocampo, núcleo medial do septo, além de outras áreas que podem modular as regiões límbicas como o córtex frontal (Mussap *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1996). A participação desses receptores na modulação da ansiedade em camundongos avaliados no teste do LCE foi demonstrada com o uso do senktide, um agonista seletivo NK₃ (Wörmser *et al.*, 1986), que em estudos preliminares apresentou uma ação do tipo ansiolítica (Teixeira *et al.*, 1996), posteriormente confirmada por Ribeiro *et al.* (1999), que mostrou ainda haver uma interação entre os sistemas neurocinérgico e opioidérgico nesta modulação (Ribeiro e De Lima, 1998).

OBJETIVOS

GERAL:

Considerando que a SP está presente em diferentes estruturas cerebrais que compõem o sistema cerebral de defesa e que se trata de um neuropeptídeo vulnerável à degradação por peptidases endógenas, o que pode alterar significativamente sua disponibilidade e seus efeitos, o presente estudo buscou responder as seguintes questões: (a) se existe influência dos processos de metabolização sináptica no efeito do tipo ansiogênico da SP em ratos avaliados no teste do LCE; (b) se o efeito do tipo ansiogênico da SP é necessariamente dependente de sua clivagem enzimática em um fragmento ativo e (c) se esse processo ocorre antes ou depois da ativação dos receptores neurocinérgicos pela SP. Para tal finalidade, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

ESPECÍFICOS:

- Verificar a atividade da SP *free acid*, resistente à clivagem enzimática, no comportamento de ratos avaliados no LCE.
- Investigar a influência dos inibidores de peptidases no efeito do tipo ansiogênico da SP em ratos avaliados no LCE.
- Avaliar o efeito das seqüências específicas 6-11 C-terminal e 1-7 N-terminal e determinar qual destas seqüências peptídicas são responsáveis pelo efeito do tipo ansiogênico da SP em ratos avaliados no LCE.
- Investigar a participação dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂ no efeito do tipo ansiogênico da seqüência 6-11 C-terminal da SP em ratos avaliados no LCE.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC) e pela *Society for Neuroscience* (SFN). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA 23080.001156/2001-50/UFSC) e delineados de maneira a minimizar o sofrimento dos animais utilizados. Além disso, procuramos utilizar um tamanho de amostra mínimo e adequado às análises estatísticas e extrair o máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando de 280 a 350 g (cerca de 3 meses de idade), provenientes do 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. Os animais foram alojados em número de 8 por caixa plástica, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto durante a realização dos experimentos. A temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e o ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luzes ligadas às 7:00 h) foram controlados automaticamente, tanto no Biotério Setorial como no Laboratório de Neurofarmacologia. Os animais foram re-alojados aos pares por caixa plástica e transferidos para o Laboratório de Neurofarmacologia, permanecendo aí por um período de, no mínimo, 7 dias para habituação antes dos testes farmacológicos. Os protocolos experimentais foram sempre

conduzidos entre às 13:00 e 17:00 h. Os grupos controles e experimentais foram escolhidos de maneira aleatória, com cada animal sendo utilizado somente um vez.

Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções:

- **PBS (“physiological buffer solution”)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,4.
- **Substância P (SP 1-11 =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).
- **Substância P *free acid* (SPfa =Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), neurocinina resistente a degradação enzimática.
- **SP 6-11 C-terminal ([p-Glu⁶]-SP 6-11; pGlu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), agonista sintético seletivo dos receptores NK₁.
- **SP 1-7 N-terminal (SP 1-7=Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA).
- **Tiorfan (Tio=DL-Tiorfan (DL-3-mercaptopropanoílglicina)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), inibidor específico da endopeptidase neutra.
- **Fosforamidon (Fos=N-[N-[(6-deoxi- α -L-manopiranosil)oxi]-hidroxifosfinil]-L-Leucil]-L-triptofan)**, Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA) inibidor específico da endopeptidase neutra.

- **FK 888** {(4R)-4-hidróxi-1-[1-metil-1H-indol-3-yl] carbonil-propil]-L-N-benzil-N-metil-3,2,2-(naftil)-L-alaninamida}, Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão), antagonista seletivo dos receptores NK₁ (Fuji *et al.*, 1992).
- **SR 48968** {(S)-N-metil-N-4 [4-acetilamino-4-fenilpiperidina-2-(3,4-ciclorofenil)butil] benzamida}, Sanofi Recherche (Montpellier, França), antagonista seletivo dos receptores NK₂ (Emonds-Alt *et al.*, 1992).

Os agonistas neurocinérgicos foram dissolvidos em PBS como solução estoque na concentração de 1 mM; os inibidores de peptidases foram preparados em PBS e estocados na concentração de 10⁻⁵ M e os antagonistas neurocinérgicos foram diluídos em etanol na concentração de 1 mM. Todas as drogas foram armazenadas a - 20 °C em tubos de Eppendorf siliconizados até o momento do uso. Imediatamente antes dos experimentos, as alíquotas foram diluídas em PBS nas concentrações pré-estabelecidas. Para os estudos utilizando os agonistas e inibidores de peptidases foi utilizado como solução controle PBS no mesmo volume e pela mesma via. A solução controle dos antagonistas foi preparada com 5 % de etanol, para evitar qualquer interferência do solvente na avaliação experimental.

As doses e os tempos de tratamento para as diferentes drogas utilizadas neste estudo foram selecionados através da literatura e/ou estudos preliminares (Sakurada *et al.*, 1990; Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999). Para substância P *free acid* foram utilizadas duas doses já que, inicialmente, a dose de 10 pmol não apresentou efeito, reduzindo-se, então, para 1 pmol, uma vez que a falta de resposta na dose maior poderia ser devido a um excesso de SP disponível, como já verificado em doses altas para a SP 1-11 (Teixeira *et al.*, 1996).

As drogas anestésicas foram diluídas em solução fisiológica de NaCl 0,9 %. O hidrato de cloral foi armazenado na geladeira (4 °C) e ao abrigo da luz, enquanto que o tiopental sódico foi mantido à temperatura ambiente.

PROCEDIMENTOS GERAIS

Cirurgias Estereotáxicas

Os procedimentos estereotáxicos para a implantação de cânulas no ventrículo lateral foram realizados sob anestesia geral. A anestesia foi realizada com tiopental sódico (20 mg/Kg, i.p.) e hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.). Após a perda do reflexo álgico (“pedal withdrawal reflex”), verificada pela compressão da pata do animal (Cassella *et al.*, 1997), procedeu-se a tricotomia a fim de expor a pele que recobre o crânio. Os ratos foram imobilizados individualmente no aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA), sendo fixados por duas barras auriculares colocadas nos meatos auditivos e uma presilha nasal, que se fixa nos incisivos e no osso nasal. Em seguida, injetou-se lidocaína (com 2 % de vasoconstrictor) na face rostral da cabeça, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sangüíneo no momento da incisão. Realizou-se a raspagem do perióstio, expondo-se bem a superfície óssea e limpando-se a calota craniana com algodão embebido em água oxigenada, a fim de se visualizarem nitidamente as suturas cranianas, que foram utilizadas como referências na cirurgia estereotáxica. O crânio foi posicionado no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lambda ficassem num mesmo plano horizontal. A calota craniana foi perfurada com uma broca odontológica para a fixação de dois parafusos (um em cada lado dos ossos parietais) e uma cânula-guia colocada em um dos ventrículos laterais. Os ventrículos foram identificados pelas suas coordenadas: antero-

posterior (AP = - 0,8 mm), medial-lateral (ML = \pm 1,5 mm) e dorso-ventral (DV = - 2,5 mm), segundo Paxinos & Watson (1986).

Uma vez introduzidos os parafusos e a cânula-guia, a área aberta foi preenchida com acrílico auto-polimerizável (JET Artigos Odontológicos Clássico Ltda., São Paulo, Brasil), que se solidifica rapidamente. Em seguida, foi introduzida na cânula-guia um estilete para evitar a oclusão da mesma, que só foi retirado no momento imediatamente anterior à infusão das drogas.

Após o término das cirurgias, cada animal foi aquecido embaixo de uma lâmpada de 40 W, a fim de amenizar a hipotermia induzida pela anestesia geral e, depois da recuperação total, foram reconduzidos aos pares às suas caixas recebendo água e ração à vontade, por 5 a 7 dias antes do teste experimental. Neste período de recuperação os animais foram manipulados somente durante a troca das caixas.

Cânulas, estiletos e parafusos

As cânulas-guias utilizadas para as injeções intracerebroventriculares foram confeccionadas manualmente no Laboratório de Neurofarmacologia a partir de agulhas descartáveis 25 x 7 mm (calibre 22 interno/28 externo). Com o auxílio de um paquímetro (General Hardware MFG. Inc., New York, EUA) e um disco de carburundum conectado a uma broca odontológica, as cânulas foram cortadas no comprimento de 16,5 mm.

Os estiletos foram confeccionados com fios de aço inoxidável (nº 26) cortados com alicate, adaptados ao interior das cânulas-guias e presos ao cimento dentário.

Os parafusos utilizados eram de aço inoxidável com 4,6 mm de comprimento total, 1,8 mm de diâmetro de cabeça e 1,4 mm de diâmetro de rosca.

Agulhas injetoras

As agulhas injetoras foram confeccionadas a partir de agulhas gengivais odontológicas, cortadas no comprimento de 17,5 mm, ou seja, 1 mm maiores que as cânulas-guias.

Administração central de drogas

Após a imobilização manual dos ratos, o mandril foi retirado com ajuda de um alicate. Em seguida, as drogas foram infundidas através de uma agulha injetora conectada por um tubo de polietileno (PE-10 STWL; Plastics One Inc., Virginia, USA), a uma micro-seringa com capacidade de 10 μ l (Hamilton 701 N). Cada solução foi infundida num volume de 2 μ l, num período de 30 s e a agulha injetora permaneceu dentro da cânula-guia por mais 30 s, permitindo que todo seu conteúdo se difundisse para os tecidos adjacentes.

EQUIPAMENTOS

Labirinto em Cruz Elevado

Cinco minutos após a infusão da droga, cada rato foi colocado individualmente no labirinto em cruz elevado (LCE). O LCE é um modelo de ansiedade animal desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e surgiu a partir da adaptação do labirinto em Y criado por Montgomery, em 1955. Este modelo foi validado inicialmente para ratos por Pellow *et al.* (1985) e, posteriormente, para camundongos por Lister *et al.* (1987).

O LCE de ratos consiste de dois braços abertos (50 \times 10 cm) e dois braços fechados (50 \times 10 \times 40 cm), opostos em forma de cruz grega e elevados a 50 cm do chão. Os braços

abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10 × 10 cm). Os braços abertos são circundados por barras laterais de 1 cm de altura para evitar a queda dos animais. O chão foi confeccionado de acrílico preto, enquanto que as paredes laterais dos braços fechados são de acrílico transparente.

Os animais foram colocados na plataforma central do LCE com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento foi avaliado durante 5 min. Os parâmetros comportamentais registrados neste equipamento foram: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considerou-se a entrada em um dos braços quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço), medidas etológicas de avaliação de risco tais como estiramentos corporais (“stretch attend postures”) e número de imersões de cabeça (“head-dipping”), e outros comportamentos como levantar (“rearing”) e auto-limpeza corporal (“grooming”) (Rodgers e Cole, 1994).

O LCE é um dos modelos etologicamente fundamentados, baseando-se nas respostas inatas de medo/ansiedade de diferentes espécies animais diante de situações naturalmente aversivas, enfatizando padrões relativamente estáveis de comportamento que são herdados para garantir a reprodução e a sobrevivência de cada espécie. Os comportamentos etológicos são definidos como movimentos ou posturas que sinalizam, para outros animais da mesma espécie ou de outras espécies, disposições comportamentais de agressão, de submissão, de afiliação e sexuais. Os parâmetros etológicos têm grande utilidade no estudo de drogas ansiolíticas/ansiógênicas e foram utilizados neste trabalho, associados aos parâmetros clássicos, para aumentar a sensibilidade do método como proposto por Rodgers e Cole (1994).

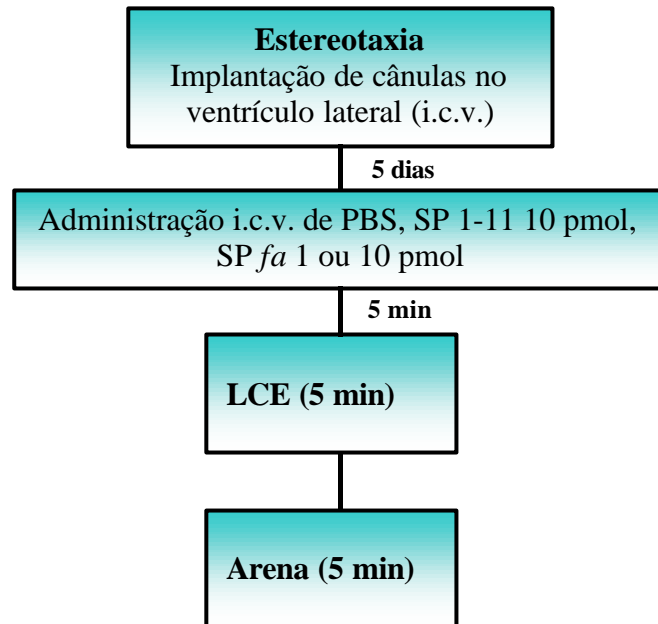
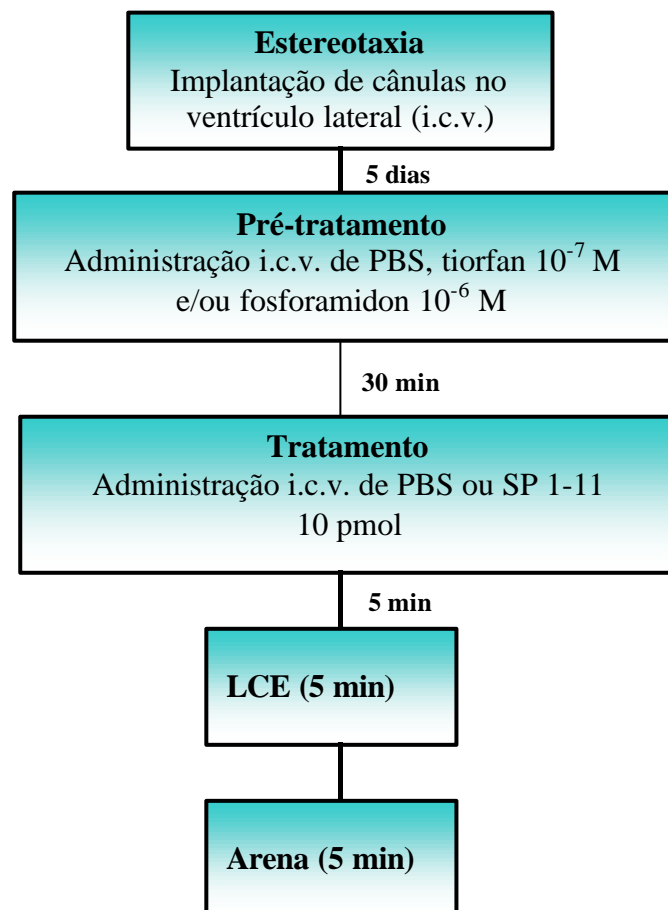
Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira

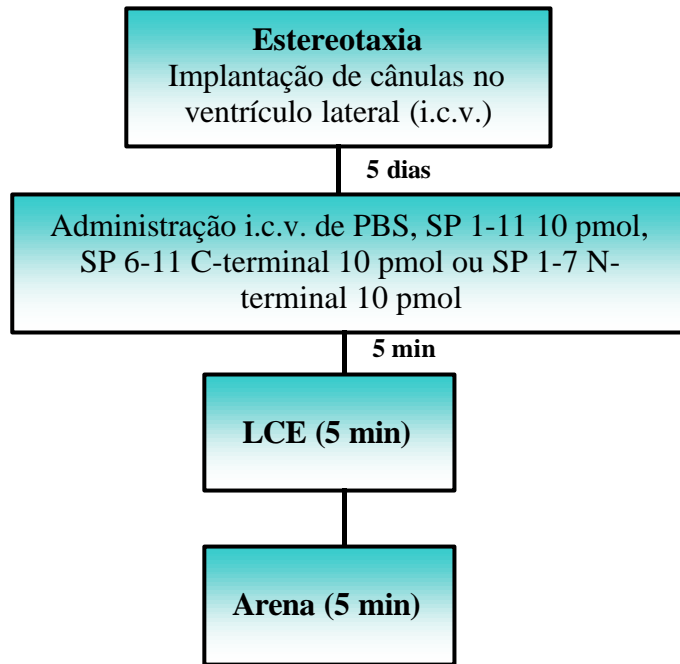
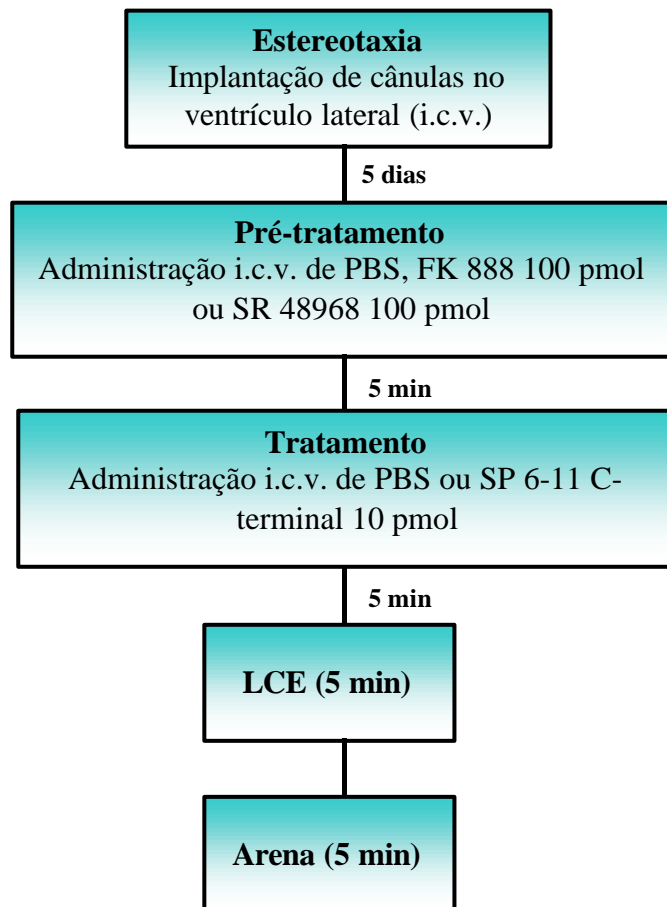
semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados fez-se a soma simples das frequências obtidas.

Arena

Após a exposição ao LCE, cada animal foi colocado, individualmente, no centro de uma arena para avaliação da atividade exploratória. A arena com dimensões de 60 x 60 x 35 cm foi confeccionada em acrílico (paredes transparentes e chão preto) e dividida em 9 quadrados de 10 x 10 cm. A atividade exploratória teve como parâmetro a movimentação espontânea dos animais, aferida a partir da contagem do número de cruzamentos transpassados com as quatro patas, o número de comportamentos de levantar (“rearing”) e de auto-limpeza (“grooming”). A taxa de defecação também foi avaliada e obtida através da contagem do número de bolos fecais eliminados durante a sessão teste (Archer, 1973).

As sessões experimentais foram realizadas entre 13:00 e 17:00 h. Os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma ante-sala do laboratório por um período de 1 h antes dos experimentos. Os equipamentos utilizados para a avaliação comportamental estavam localizados em uma sala com luz infravermelha (15 W), com temperatura mantida em 22 ± 2 °C e, após o teste com cada animal, foram limpos com solução de etanol a 10% (v/v). O experimentador estava sempre presente na sala experimental. As medidas temporais foram registradas por meio de cronômetros manuais simples, enquanto que os demais parâmetros foram quantificados manualmente pelo experimentador.

Protocolo experimental 1**Protocolo experimental 2**

Protocolo experimental 3**Protocolo experimental 4**

Histologia

Para a confirmação da localização das cânulas, após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 40% e perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formaldeído 10%. Em seguida, os animais foram decapitados e receberam uma microinjeção de solução de Azul de Evans 0,5% (2 μ l). Os cérebros foram retirados e checados quanto à localização das cânulas. Os animais que não apresentaram a localização correta das cânulas intraventricularmente foram descartados da análise estatística dos dados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas Graphpad INSTAT versão 2.05 e *Statistic* versão 5.0. No caso de 3 ou mais amostras, as comparações estatísticas foram inicialmente realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma (para os protocolos experimentais 1 e 2) ou duas vias (para o protocolo experimental 4). Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste de Newman-Keuls. No protocolo experimental 3 com a utilização das seqüências específicas 6-11 (C-terminal) e 1-7 (N-terminal) (Figuras 7, 8 e 13), como para cada grupo experimental foi realizado um grupo controle, utilizamos uma linha tracejada representando a média dos valores dos respectivos grupos de animais controles como 100%, que não diferiram entre si ($P > 0,05$), sendo as comparações estatísticas mostradas realizadas apenas entre as duas amostras (grupo experimental x controle), utilizando-se o teste “*t*” de Student não pareado bicaudal. Todos os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 a 15 animais por grupo, com níveis de probabilidade inferiores a 5% sendo considerados indicativos de significância ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

1. Efeito comportamental da administração intracerebroventricular da substância P *free acid* em ratos

Objetivos específicos: Verificar a atividade da SP *free acid*, resistente à clivagem enzimática, no comportamento de ratos avaliados no LCE.

Os efeitos da administração i.c.v. da substância P *free acid* em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 3A, 3B, 4A e 4B e Tabela 1.

A administração central da substância P *free acid* na dose de 1 pmol, mas não na dose de 10 pmol, reduziu significativamente a porcentagem do tempo despendido (Figura 3A; $F_{(3,34)}=38,32$; $P<0,05$) e a porcentagem do número de entradas (Figura 3B; $F_{(3,34)}=3,97$; $P<0,05$) nos braços abertos do LCE, quando comparado ao grupo controle, um perfil característico de drogas do tipo ansiogênicas e similar ao efeito observado pela SP 1-11 (10 pmol), o agonista endógeno preferencial dos receptores NK₁. O número de entradas nos braços fechados (Figura 4A; $F_{(3,34)}=1,08$; $P=0,37$), assim como vários parâmetros etológicos avaliados no LCE, não foram alterados por quaisquer dos tratamentos (Figura 4B e Tabela 1). Os animais tratados com a SP *free acid* 1 pmol apresentaram ainda uma tendência em reduzir o número de imersões de cabeça (Figura 4B; $F_{(3,34)}=2,27$; $0,05<P<0,10$), um perfil similar ao apresentado pela SP 1-11. A SP 1-11 também aumentou o número de estiramentos corporais, embora sem significância estatística (Tabela 1; $F_{(3,34)}=2,08$; $0,05<P<0,10$).

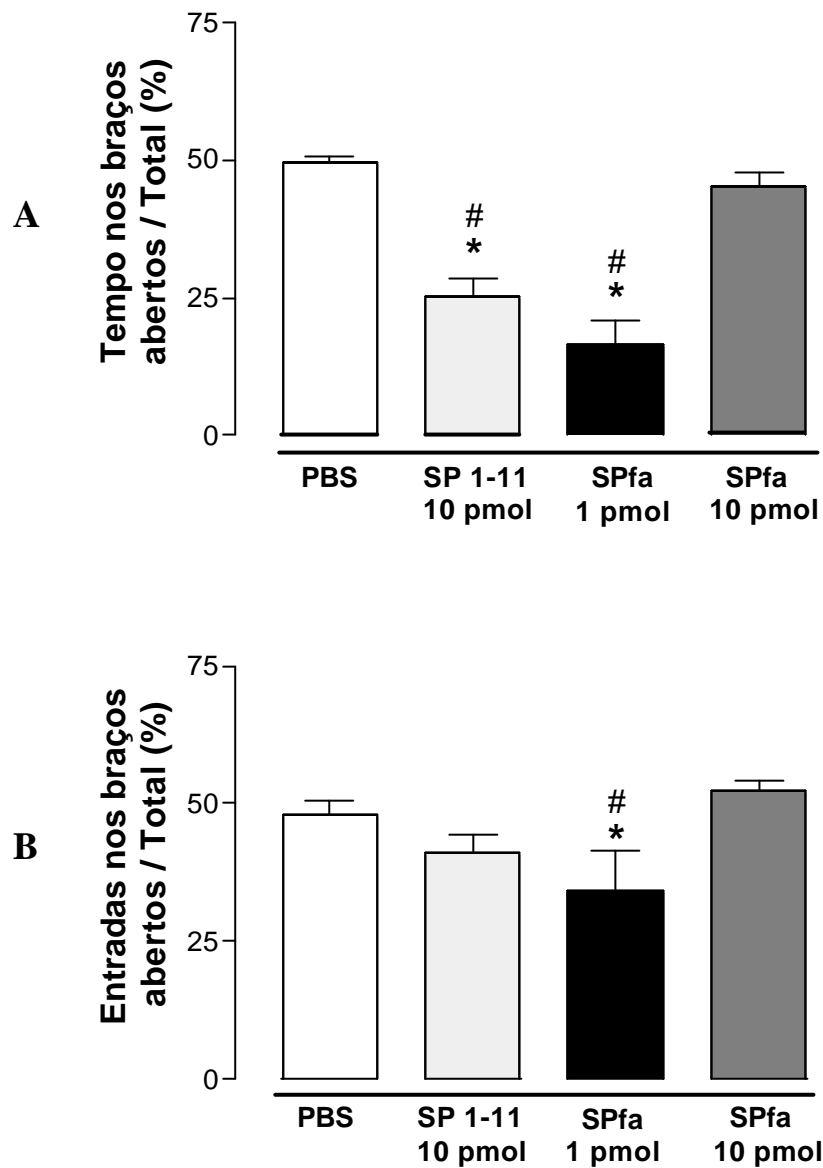


Figura 3 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 7-15. * = diferença estatística em relação ao grupo controle e # = diferença estatística em relação a SP *fa* 10 pmol.

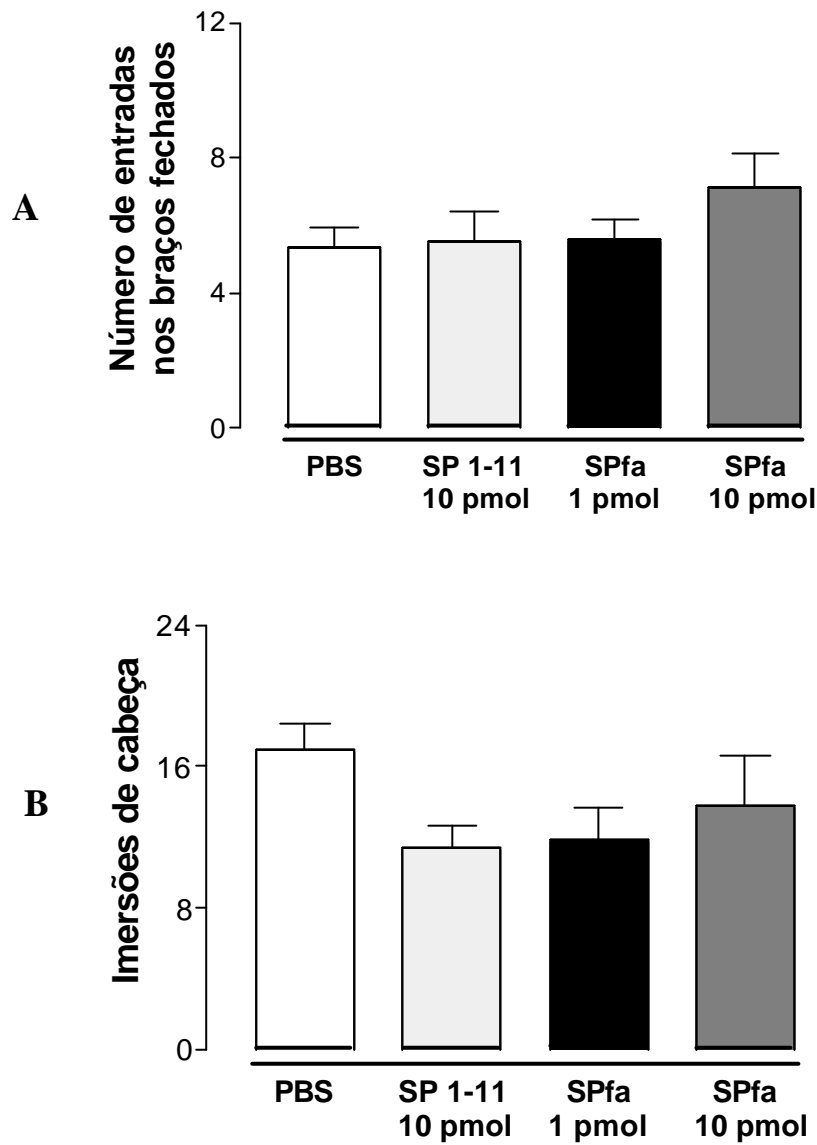


Figura 4 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 7-15.

Tabela 1 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamento	Estiramentos corporais	Levantar	Auto-limpeza
PBS	0,47 ± 0,29	14,60 ± 1,01	2,33 ± 0,33
SP 1-11 10 pmol	1,38 ± 0,56	16,12 ± 1,76	1,38 ± 0,32
SP <i>fa</i> 1 pmol	0,57 ± 0,43	16,00 ± 1,46	2,14 ± 0,46
SP <i>fa</i> 10 pmol	0,00 ± 0,00	12,38 ± 1,85	1,50 ± 0,53

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 7-15 animais por tratamento.

2. Efeito comportamental da administração intracerebroventricular de inibidores de peptidases na ação ansiogênica da substância P em ratos

Objetivos específicos: Investigar a influência dos inibidores de peptidases no efeito do tipo ansiogênico da SP, em ratos avaliados no LCE.

Os efeitos da administração i.c.v. dos inibidores de peptidases, tiorfan e fosforamidon, no efeito ansiogênico da substância P em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 5A, 5B, 6A e 6B e Tabela 2.

O pré-tratamento com os inibidores de peptidases, tiorfan ou fosforamidon, individualmente não alterou significativamente o efeito do tipo ansiogênico da SP 1-11, caracterizado por uma diminuição na porcentagem do tempo despendido nos braços abertos (Figura 5A; $F_{(4,43)}=17,27$; $P<0,05$) e aumento do número de estiramentos corporais (Tabela 2; $F_{(4,43)}=9,95$; $P<0,05$), embora haja uma tendência a tornar mais evidente este efeito da SP, o que realmente pode ser notado para o parâmetro número de imersões de cabeça (Figura 6B; $F_{(4,43)}=19,53$; $P<0,05$). Em contraste, o uso combinado de tiorfan e fosforamidon promoveu um efeito diametralmente oposto aos efeitos induzidos pelos inibidores de peptidases utilizados isoladamente, aumentando a porcentagem do tempo despendido (Figura 5A; $F_{(4,43)}=17,27$; $P<0,05$) e a porcentagem do número de entradas nos braços abertos (Figura 5B; $F_{(4,43)}=7,65$; $P<0,05$), além de aumentar o número de imersões de cabeça no LCE (Figura 6B; $F_{(4,43)}=19,53$; $P<0,05$). Não houve redução do número de entradas nos braços fechados do LCE em relação ao grupo controle, ilustrado no painel A da Figura 6 ($F_{(4,43)}=0,64$; $P=0,64$) para quaisquer tratamentos. Os outros parâmetros comportamentais avaliados no LCE não foram modificados de forma significativa nos animais pré-tratados com os inibidores de peptidases e SP1-11 (Tabela 2).

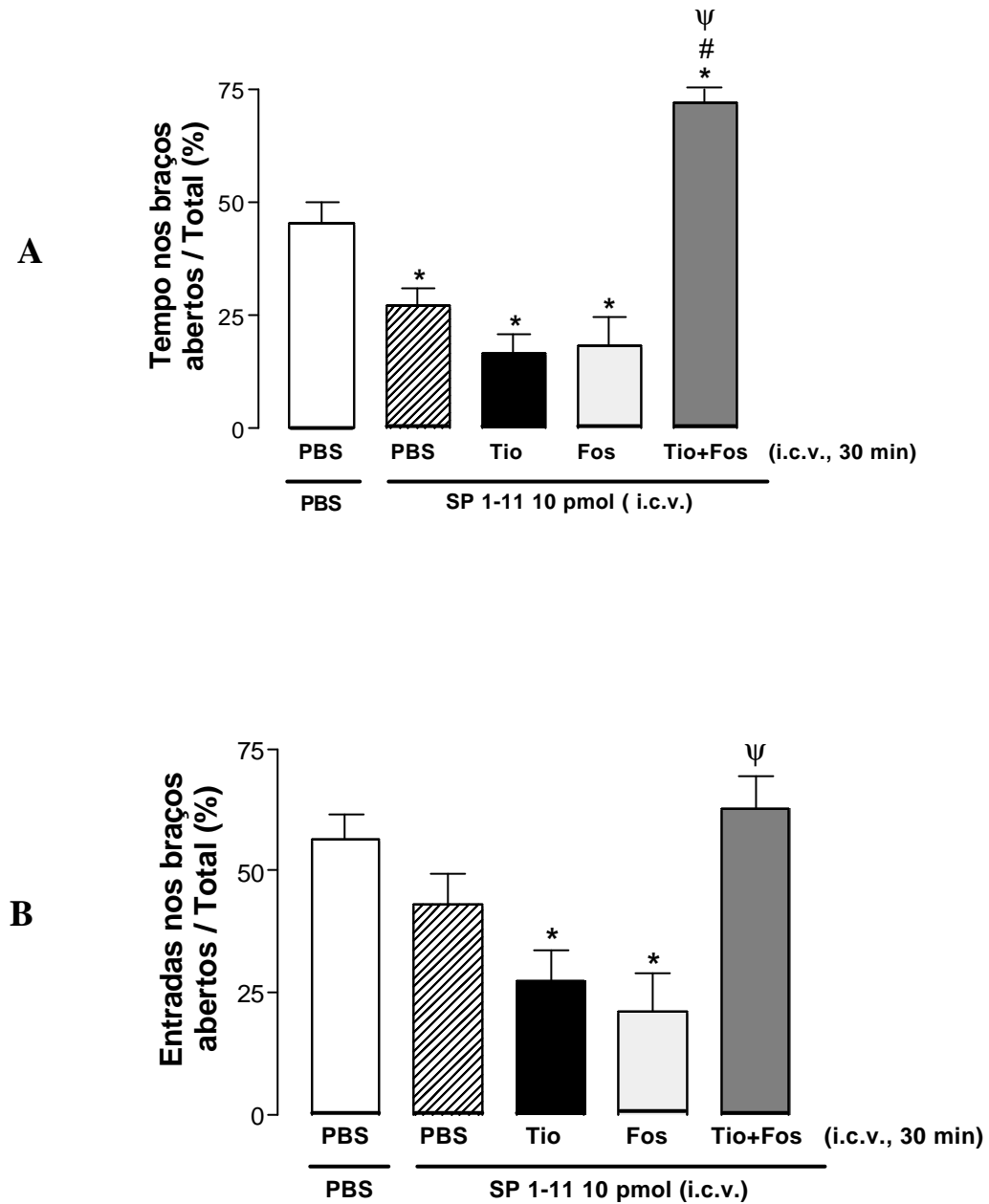


Figura 5 – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M no efeito da SP 10 pmol na frequência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 9-10. * = diferença estatística em relação ao grupo controle, # = diferença estatística em relação a PBS/SP 1-11 e Ψ = diferença estatística em relação a Tio/SP1-11 e Fos/SP1-11.

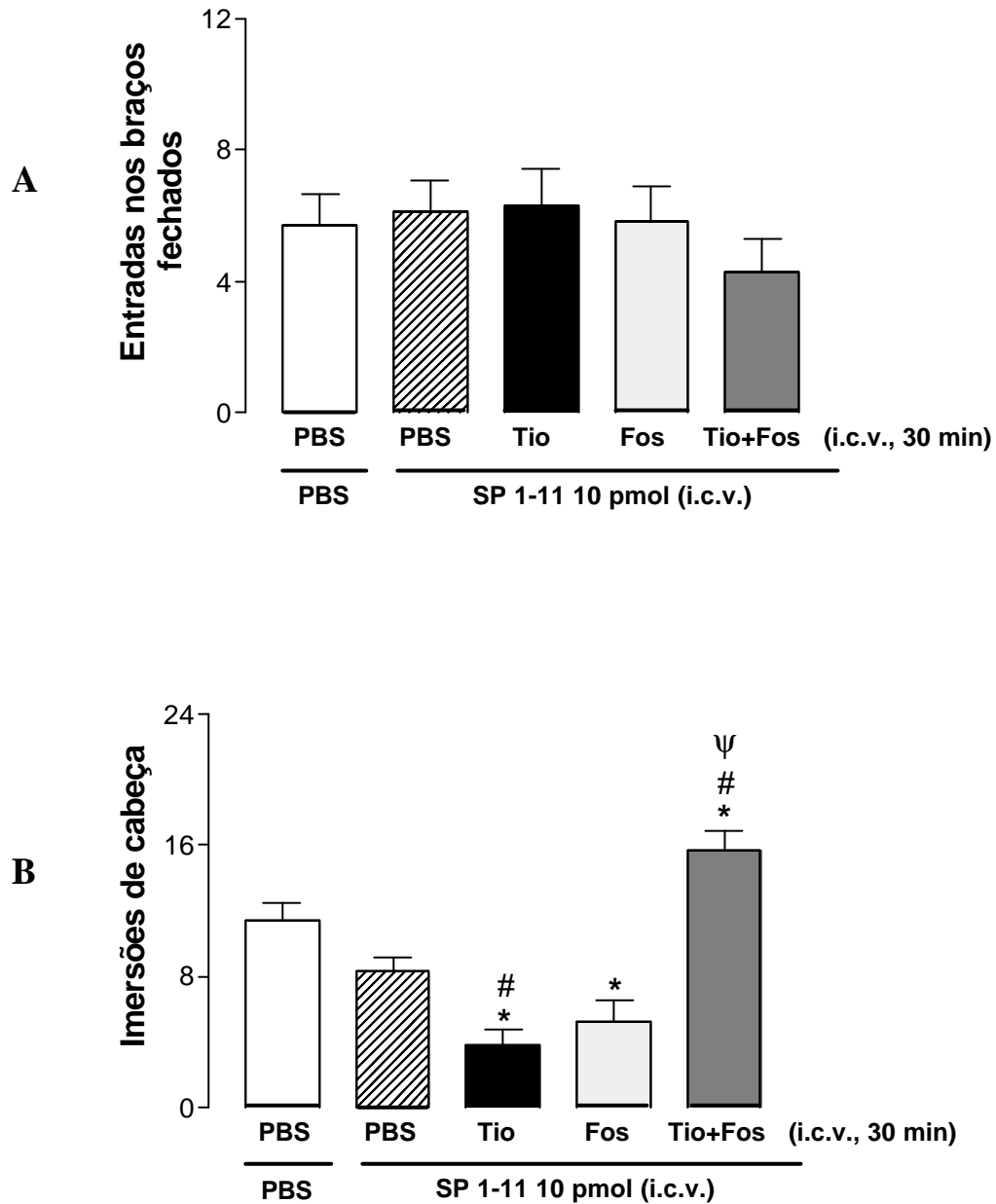


Figura 6 – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M no efeito da SP 10 pmol no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 9-10. * = diferença estatística em relação ao grupo controle, # = diferença estatística em relação a PBS/SP 1-11 e Ψ = diferença estatística em relação a Tio/SP1-11 e Fos/SP1-11.

Tabela 2 – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M sobre o efeito da SP 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamento	Estiramentos corporais	Levantar	Auto-limpeza
PBS / PBS	2,00 ± 0,84	10,80 ± 0,94	2,40 ± 0,62
PBS / SP 1-11	5,78 ± 0,80 *	12,00 ± 1,92	7,11 ± 0,70 *
Tio / SP 1-11	7,00 ± 0,94 *	14,44 ± 1,92	3,22 ± 1,01
Fos / SP 1-11	6,20 ± 0,59 *	9,11 ± 0,99	2,70 ± 0,52
Tio + Fos / SP 1-11	2,30 ± 0,50	9,90 ± 1,98	3,00 ± 0,54

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 9-10 animais por tratamento. * = diferença estatística em relação ao grupo controle.

3. Efeito comportamental da administração intracerebroventricular das seqüências específicas 6-11 (C-terminal) e 1-7 (N-terminal) da substância P em ratos

Objetivos específicos: Avaliar o efeito das seqüências específicas 6-11 (C-terminal) e 1-7 (N-terminal) e determinar qual(is) destas seqüências peptídicas é(são) responsável(is) pelo efeito do tipo ansiogênico da SP em ratos avaliados no LCE.

Os efeitos da administração i.c.v. dos fragmentos específicos SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal) da substância P em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 7A, 7B, 8A e 8B e Tabela 3.

O tratamento i.c.v. com o fragmento 6-11 (C-terminal) reduziu significativamente a porcentagem do tempo despendido (Figura 7A; $t_{14}=7,30$; $P<0,05$) e frequência do número de entradas (Figura 7B; $t_{14}=3,23$; $P<0,05$) nos braços abertos do LCE, além de uma redução significativa do número de imersões de cabeça (Figura 8B; $t_{14}=9,32$; $P<0,05$) e uma tendência em aumentar o número de estiramentos corporais (Tabela 3; $t_{14}=2,01$; $0,05<P<0,10$), um efeito do tipo ansiogênico para esta seqüência específica da SP semelhante ao efeito da SP 1-11. Os demais parâmetros comportamentais não foram modificados por este tratamento (Tabela 3).

Já o fragmento 1-7 (N-terminal) não foi capaz de induzir quaisquer modificações comportamentais tanto nos parâmetros clássicos (% tempo nos braços abertos: Figura 7A; $t_{14}=1,69$; $P=0,11$; % entradas nos braços abertos: Figura 7B; $t_{14}=0,50$; $P=0,62$), bem como nos parâmetros etológicos (Figura 8B e Tabela 3) avaliados no LCE.

A Figura 8A mostra o número de entradas dos animais nos braços fechados do LCE após os diferentes tratamentos. A administração i.c.v. do fragmento C-terminal reduziu significativamente o número de entradas nos braços fechados ($t_{14}=2,39$; $P<0,05$), enquanto

os animais tratados com o fragmento N-terminal apresentaram uma tendência em reduzir este parâmetro nos mesmos braços, mas não diferiram significativamente do grupo controle ($t_{14}=2,105$; $0,05 < P < 0,10$).

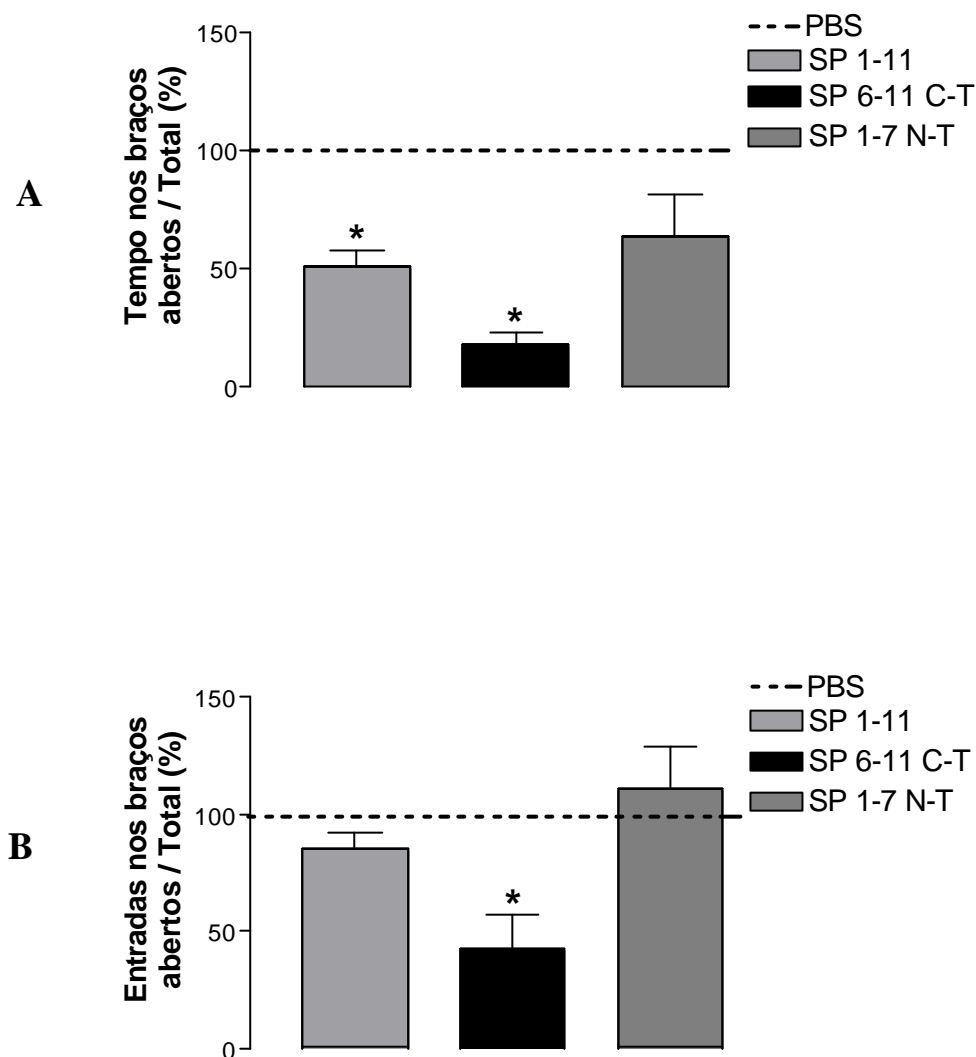


Figura 7 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, na freqüência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 8-15. * = diferença estatística em relação ao seu respectivo grupo controle. A linha tracejada representa a média dos valores dos respectivos grupos de animais controles, que não diferiram entre si ($P > 0,05$).

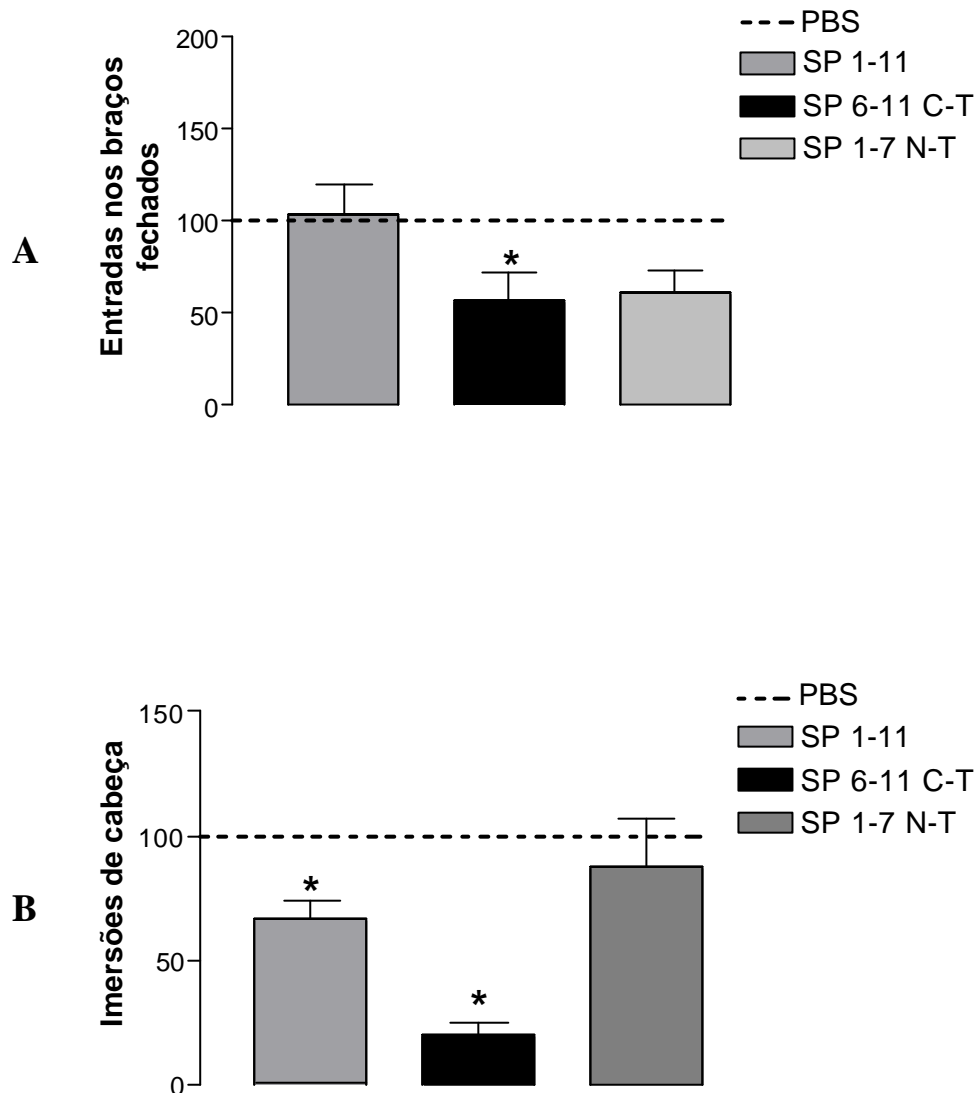


Figura 8 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 8-15. * = diferença estatística em relação ao seu respectivo grupo controle. A linha tracejada representa a média dos valores dos respectivos grupos de animais controles, que não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamento	Estiramentos corporais	Levantar	Auto-limpeza
PBS	0,47 ± 0,29	14,60 ± 1,01	2,33 ± 0,33
SP 1-11	1,38 ± 0,56	16,12 ± 1,76	1,38 ± 0,32
PBS	0,14 ± 0,14	13,00 ± 1,57	1,43 ± 0,20
SP 6-11	1,44 ± 0,53	9,33 ± 1,36	2,67 ± 0,73
PBS	0,14 ± 0,14	9,57 ± 0,68	2,14 ± 0,60
SP 1-7	0,11 ± 0,11	7,44 ± 1,19	1,67 ± 0,58

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 8-15 animais por tratamento.

4. Avaliação da participação dos receptores NK₁ e NK₂ no efeito ansiogênico da seqüência SP 6-11 (C-terminal)

Objetivos específicos: Investigar a participação dos receptores neurocinérgicos NK₁ e NK₂ no efeito do tipo ansiogênico da seqüência 6-11 (C-terminal) da SP em ratos avaliados no LCE.

Os efeitos da administração i.c.v. dos antagonistas NK₁ (FK 888) ou NK₂ (SR 48968) no efeito do tipo ansiogênico da SP 6-11 (C-terminal) em ratos avaliados no teste do labirinto em cruz elevado estão representados nas Figuras 9A, 9B, 10A e 10B e Tabela 4.

A ANOVA de duas vias revelou diferença estatística entre os grupos nos parâmetros porcentagem do tempo despendido nos braços abertos [Figura 9A; pré-tratamento: $F_{(2,35)}=3,98$; $P<0,05$; tratamento: $F_{(2,35)}=10,65$; $P<0,05$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=4,78$; $P<0,05$], no número de imersões de cabeça [Figura 10B; pré-tratamento: $F_{(2,35)}=1,01$; $P=0,37$; tratamento: $F_{(2,35)}=6,11$; $P<0,05$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=7,41$; $P<0,05$], no número de estiramentos corporais [Tabela 4; pré-tratamento: $F_{(2,35)}=6,78$; $P<0,05$; tratamento: $F_{(2,35)}=1,79$; $P=0,19$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=3,48$; $P<0,05$] e no número de comportamentos de auto-limpeza [Tabela 4; pré-tratamento: $F_{(2,35)}=4,82$; $P<0,05$; tratamento: $F_{(2,35)}=2,88$; $P=0,10$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=3,20$; $P<0,05$].

A análise *post-hoc* mostrou um efeito do tipo ansiogênico da SP 6-11 (C-Terminal) caracterizado pela redução da porcentagem do tempo despendido nos braços abertos e do número de imersões de cabeça, bem como pelo aumento do número de estiramentos corporais e de auto-limpeza, efeito este que foi bloqueado pelo pré-tratamento i.c.v. com os

antagonistas FK 888 100 pmol ou SR 48968 100 pmol (Newman-Keuls; $P < 0,05$). Embora a ANOVA não tenha revelado diferença estatística entre os grupos no parâmetro frequência de entradas nos braços abertos, a análise *post-hoc* mostrou que o pré-tratamento com FK 888 ou SR 48968 bloqueou significativamente o efeito do tipo ansiogênico da SP 6-11 (C-terminal) (Figura 9B; $P < 0,05$). Os demais parâmetros como número de entradas nos braços fechados e o número de comportamentos de levantar não foram alterados de forma significativa pelos tratamentos. Deve-se enfatizar que o pré-tratamento com os antagonistas neurocinérgicos (FK 888 ou SR 48968) *per se* não promoveram alteração em nenhum dos parâmetros comportamentais registrados no LCE.

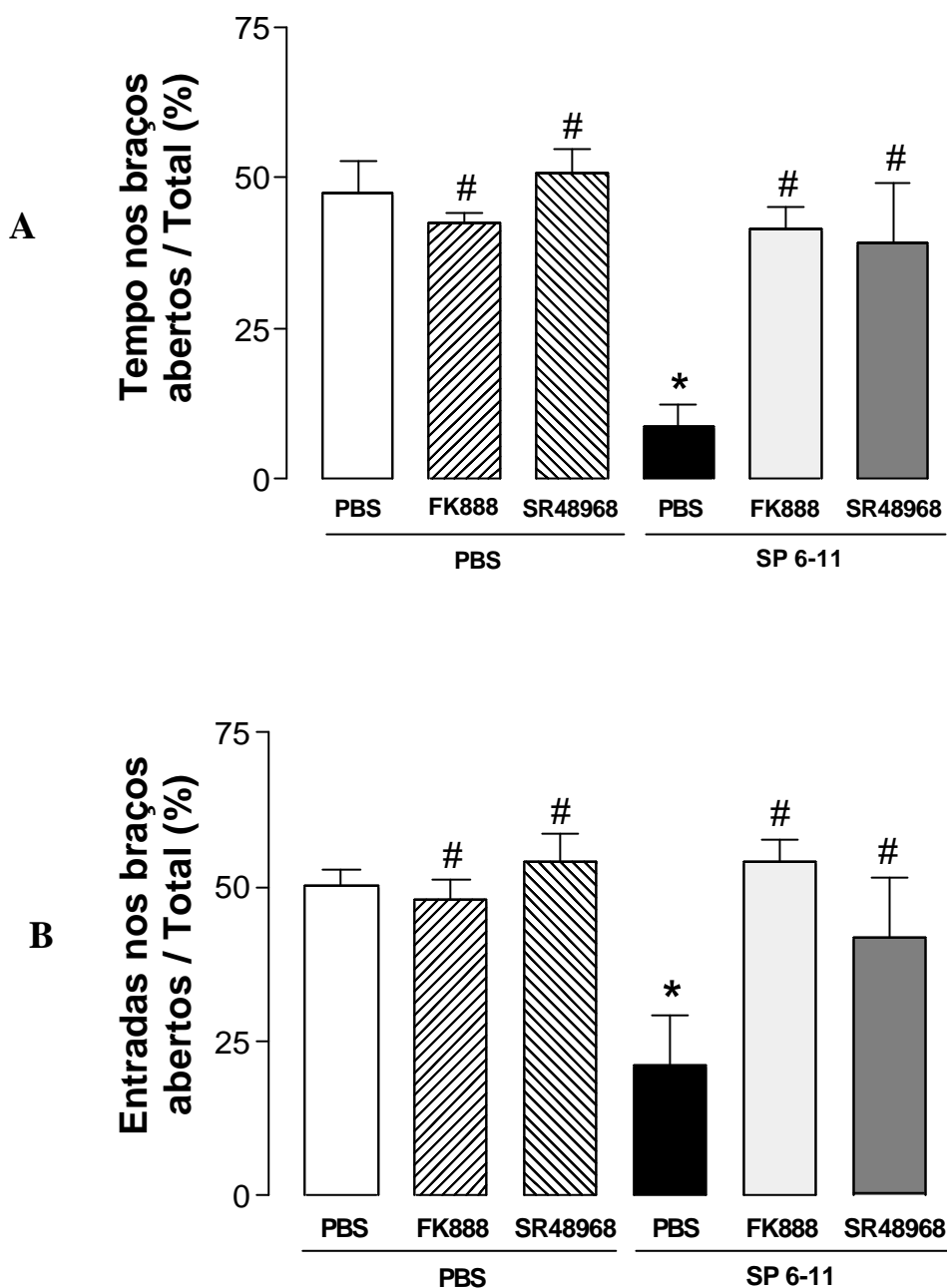


Figura 9 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou SR 48968, antagonista seletivo NK₂, na freqüência do tempo de permanência (A) e do número de entradas (B) nos braços abertos do LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 6-9. * = diferença estatística em relação ao grupo controle e # = diferença estatística em relação ao grupo SP 6-11.

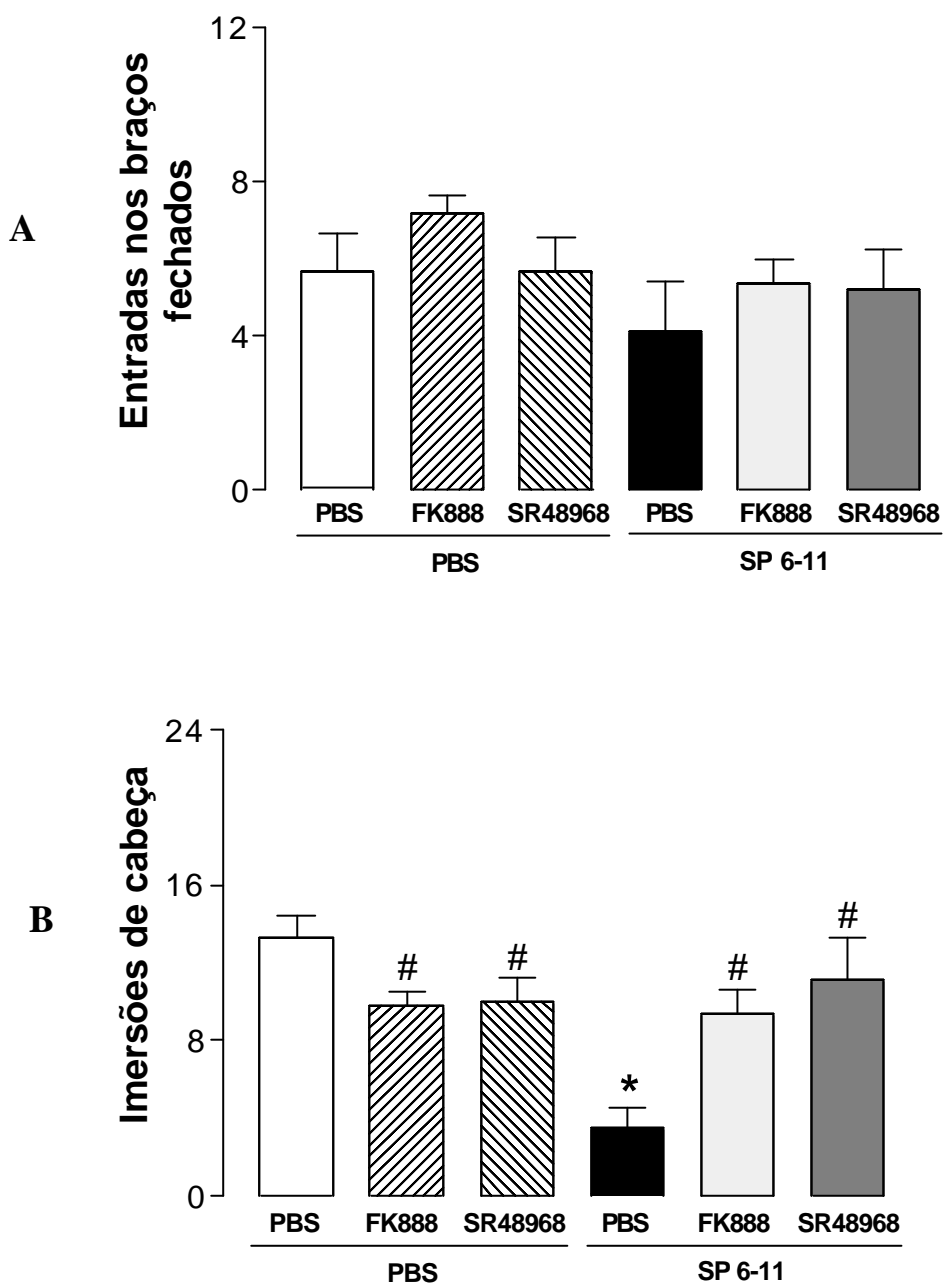


Figura 10 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou SR 48968, antagonista seletivo NK₂, no número de entradas nos braços fechados (A) e no número de imersões de cabeça (B) no LCE, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 6-9. * = diferença estatística em relação ao grupo controle e # = diferença estatística em relação ao grupo SP 6-11.

Tabela 4 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol) ou SR 48968 (100 pmol), em outros parâmetros comportamentais registrados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamento	Estiramentos corporais	Levantar	Auto-limpeza
PBS / PBS	1,33 ± 0,61	12,33 ± 2,01	1,50 ± 0,22
FK 888 / PBS	1,00 ± 0,52 #	10,00 ± 1,24	2,00 ± 0,36 #
SR 48968 / PBS	0,83 ± 0,40 #	12,33 ± 1,63	0,83 ± 0,31 #
PBS / SP 6-11	3,25 ± 0,37 *	9,38 ± 1,48	4,00 ± 1,07 *
FK 888 / SP 6-11	0,67 ± 0,33 #	9,67 ± 1,94	1,67 ± 0,42 #
SR 48968 / SP6-11	0,78 ± 0,46 #	10,00 ± 1,54	1,11 ± 0,20 #

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 6-9 animais por tratamento. * = diferença estatística em relação ao grupo controle e # = diferença estatística em relação ao grupo SP 6-11.

ARENA

Objetivos específicos: Verificar se os diferentes tratamentos centrais produziam alteração da atividade locomotora dos animais que pudesse influenciar as medidas registradas no teste do LCE.

1. SP *fa*

A injeção i.c.v. de SP 1-11 (10 pmol) e de SP *free acid* (1 e 10 pmol) não alterou de forma significativa a movimentação espontânea dos animais registrada no teste da arena em relação ao grupo controle, embora se tenha observado uma tendência em reduzir este parâmetro nos animais tratados com a SP *free acid* na dose de 1 pmol (Figura 11; ($F_{(3,34)}=2,42$; $0,05 < P < 0,10$)). Os demais parâmetros, como o número de comportamentos de levantar ($F_{(3,34)}=1,23$; $P=0,31$), de auto-limpeza ($F_{(3,34)}=1,08$; $P=0,37$) e o número de bolos

fecais ($F_{(3,34)}=1,22$; $P=0,32$), também não foram modificados significativamente quando comparados ao dados do grupo controle (Tabela 5).

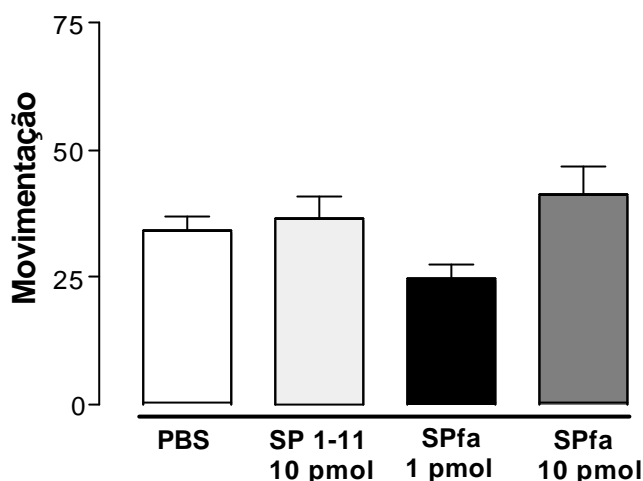


Figura 11 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 7-15.

Tabela 5 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol, SP *free acid* 1 ou 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados na arena.

Tratamento	Levantar	Auto-limpeza	Bolos fecais
PBS	20,13 ± 2,24	1,47 ± 0,35	0,47 ± 0,19
SP 1-11 10 pmol	16,38 ± 2,81	2,12 ± 0,74	0,50 ± 0,27
SP <i>fa</i> 1 pmol	15,57 ± 2,09	2,28 ± 0,61	0,43 ± 0,20
SP <i>fa</i> 10 pmol	14,25 ± 2,57	1,12 ± 0,30	0,50 ± 0,27

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 7-15 animais por tratamento.

2. Inibidores de peptidases

A injeção i.c.v. de tiorfan e/ou fosforamidon não alterou de forma significativa quaisquer parâmetros registrados na arena em relação ao grupo controle, como a movimentação espontânea (Figura 12; $F_{(4,43)}=1,81$; $P=0,14$), o número de comportamentos de levantar ($F_{(4,43)}=2,53$; $P=0,06$) e de auto-limpeza ($F_{(4,43)}=0,98$; $P=0,43$), e o número de bolos fecais ($F_{(4,43)}=0,20$; $P=0,94$) (Tabela 6).

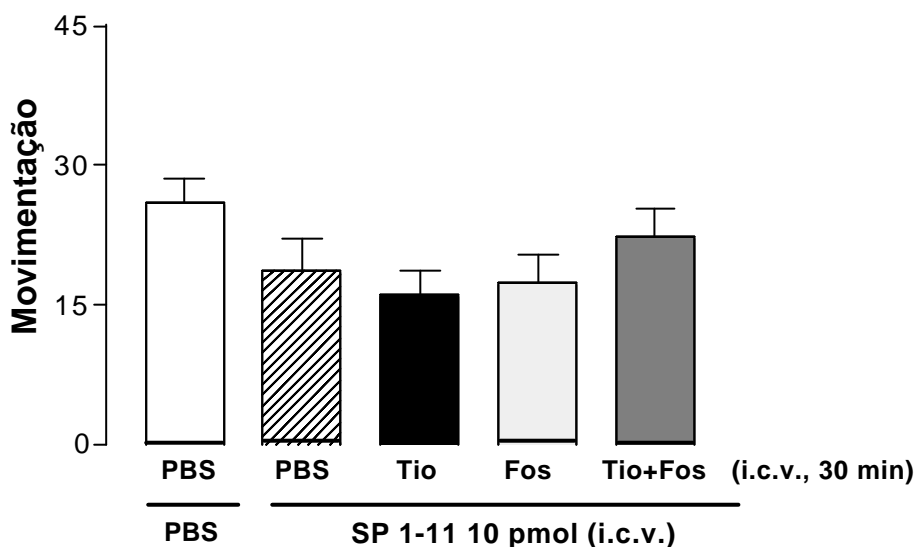


Figura 12 - Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M sobre o efeito da SP 10 pmol na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 9-10.

Tabela 6 – Influência do pré-tratamento i.c.v. com os inibidores de peptidases, tiorfan 10^{-7} M e/ou fosforamidon 10^{-6} M sobre o efeito da SP 10 pmol em outros parâmetros comportamentais registrados na arena.

Tratamento	Levantar	Auto-limpeza	Bolos fecais
PBS / PBS	12,10 ± 1,48	1,10 ± 0,38	0,60 ± 0,30
PBS / SP 1-11	9,56 ± 1,44	1,67 ± 0,62	0,33 ± 0,17
Tio / SP 1-11	13,67 ± 2,84	0,89 ± 0,56	0,44 ± 0,24
Fos / SP 1-11	19,80 ± 3,57	0,50 ± 0,22	0,60 ± 0,34
Tio + Fos / SP 1-11	19,20 ± 3,67	0,80 ± 0,33	0,40 ± 0,22

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 9-10 animais por tratamento.

3. SP 6-11 C-terminal / SP 1-7 N-terminal

A injeção i.c.v. da seqüência peptídica SP 6-11 (C-terminal) apresentou uma tendência a reduzir a movimentação espontânea dos animais (Figura 13; $t_{14}=2,01$; $0,05 < P < 0,06$) na arena. Esse efeito, entretanto, não alcançou significância estatística. O número de comportamentos de levantar ($t_{14}=1,77$; $P=0,20$), de auto-limpeza ($t_{14}=0,64$; $P=0,53$) e o número de bolos fecais ($t_{14}=0,18$; $P=0,86$) não foram modificados significativamente em relação ao grupo controle (Tabela 7).

A injeção i.c.v. da seqüência peptídica SP 1-7 (N-terminal) não alterou de maneira significativa nenhum dos parâmetros registrados na arena quando comparados ao grupo controle, tais como, atividade locomotora (Figura 13; $t_{14}=1,74$; $P=0,11$), número de comportamentos de auto-limpeza ($t_{14}=0,03$; $P=0,98$) e o número de bolos fecais ($t_{14}=0,64$; $P=0,53$), embora observe-se uma tendência a reduzir o número de comportamentos de levantar ($t_{14}=2,14$; $0,05 < P < 0,10$) (Tabela 7).

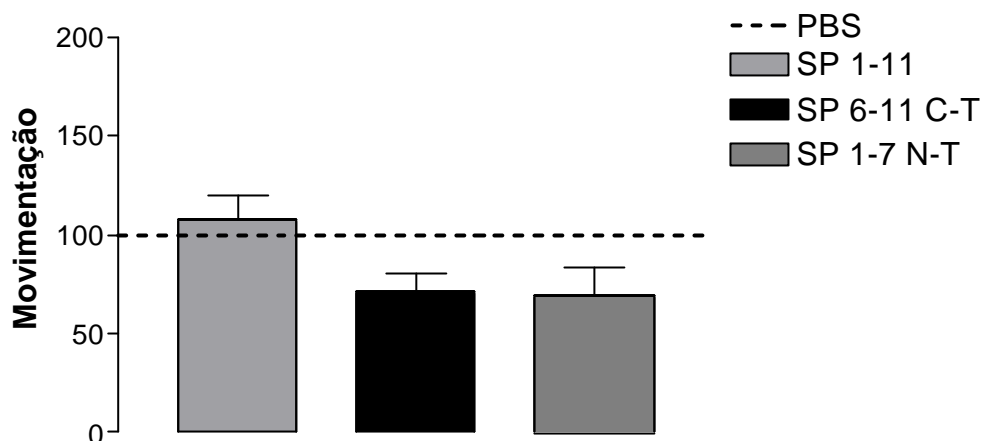


Figura 13 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 8-15.

Tabela 7 – Efeito da administração i.c.v. de SP 1-11 10 pmol e das seqüências específicas SP 6-11 (C-terminal) e SP 1-7 (N-terminal), 10 pmol, em outros parâmetros comportamentais registrados na arena.

Tratamento	Levantar	Auto-limpeza	Bolos fecais
PBS	20,13 ± 2,24	1,47 ± 0,35	0,47 ± 0,19
SP 1-11	16,38 ± 2,81	2,12 ± 0,74	0,50 ± 0,27
PBS	17,28 ± 2,47	1,43 ± 0,48	0,14 ± 0,14
SP 6-11	12,78 ± 2,27	2,11 ± 0,86	0,11 ± 0,11
PBS	11,57 ± 0,87	2,14 ± 0,74	0,14 ± 0,14
SP 1-7	8,67 ± 0,99	2,11 ± 0,68	0,33 ± 0,24

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 8-15 animais por tratamento.

4. Antagonistas NK₁ e NK₂

As injeções i.c.v. de FK 888 + SP 6-11 C-terminal ou SR 48968 + SP 6-11 C-terminal não alteraram de forma significativa quaisquer parâmetros registrados na arena em relação ao grupo controle, como a movimentação espontânea (Figura 14; pré-tratamento: $F_{(2,35)}=0,48$; $P=0,62$; tratamento: $F_{(2,35)}=1,12$; $P=0,30$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=0,41$; $P=0,67$), o número de comportamentos de levantar (pré-tratamento: $F_{(2,35)}=0,02$; $P=0,98$; tratamento: $F_{(2,35)}=0,02$; $P=0,90$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=0,26$; $P=0,78$), de auto-limpeza (pré-tratamento: $F_{(2,35)}=1,54$; $P=0,23$; tratamento: $F_{(2,35)}=2,76$; $P=0,11$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=0,16$; $P=0,85$) e o número de bolos fecais (pré-tratamento: $F_{(2,35)}=0,07$; $P=0,93$; tratamento: $F_{(2,35)}=0,91$; $P=0,35$; interação pré-tratamento x tratamento: $F_{(2,35)}=0,28$; $P=0,76$) (Tabela 8). Além disso, a injeção i.c.v. de FK 888 ou SR 48968, não promoveu qualquer alteração “per se” em nenhum dos parâmetros registrados na arena.

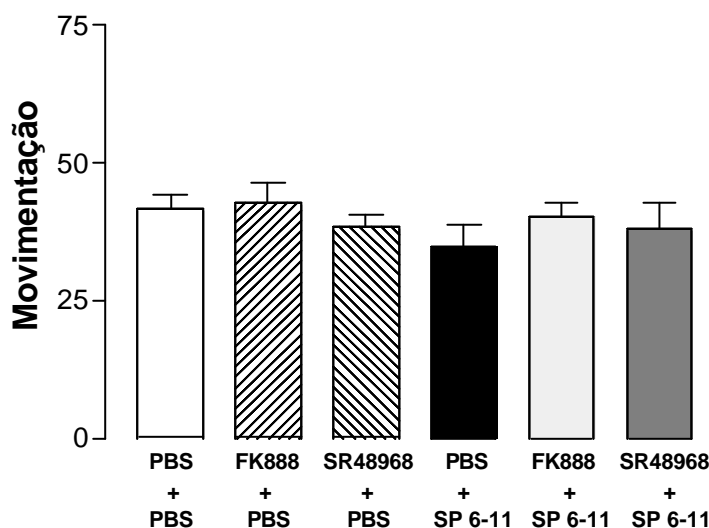


Figura 14 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol), antagonista seletivo NK₁ ou SR 48968, antagonista seletivo NK₂, na movimentação espontânea registrada na arena, em ratos, em um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os EPM. O número de animais utilizados por tratamento foi de 6-9.

Tabela 8 – Efeito da administração i.c.v. da seqüência específica SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol, 5 min após o pré-tratamento com FK 888 (100 pmol) ou SR 48968 (100 pmol), em outros parâmetros comportamentais registrados na arena.

Tratamento	Levantar	Auto-limpeza	Bolos fecais
PBS / PBS	16,00 ± 2,13	1,83 ± 0,70	0,50 ± 0,50
FK 888 / PBS	15,33 ± 1,87	1,83 ± 0,70	0,33 ± 0,21
SR 48968 / PBS	14,33 ± 1,96	0,83 ± 0,48	0,67 ± 0,33
PBS / SP 6-11	13,88 ± 1,22	3,38 ± 1,18	0,25 ± 0,25
FK 888 / SP 6-11	15,50 ± 2,38	2,50 ± 0,56	0,33 ± 0,33
SR 48968 / SP6-11	15,56 ± 3,30	1,78 ± 0,46	0,22 ± 0,15

Os dados estão expressos como média ± e.p.m de 6-9 animais por tratamento.

DISCUSSÃO

Este trabalho relatou os efeitos do tipo ansiogênicos do neuropeptídeo SP 1-11 e de seus fragmentos C e N-terminal administrados por via i.c.v. em ratos submetidos ao teste do LCE e ao teste da arena. Para avaliar a seletividade dos efeitos obtidos, estes tratamentos foram combinados a antagonistas de receptores NK₁ ou NK₂ e a inibidores de peptidases. Os resultados obtidos mostraram que os efeitos do tipo ansiogênicos da SP são codificados pela sua seqüência peptídica C-terminal (SP 6-11) e parecem ser devidos a uma ação combinada em receptores NK₁ e NK₂.

A SP está diretamente envolvida na modulação de reações de estresse e comportamento defensivo no sistema límbico de ratos (Unger *et al.*, 1988; Brodin *et al.*, 1994; Culman e Unger, 1995) e gatos (Shaikh *et al.*, 1993). Ela é liberada em resposta a estímulos aversivos (Rosen *et al.*, 1992) e existem evidências diretas para a função deste peptídeo no controle de comportamentos relacionados ao medo, já que a injeção de agonistas NK₁ dentro do ventrículo lateral, amígdala, substância cinzenta periaquedutal ou septo lateral demonstrou efeito do tipo ansiogênico no LCE (Aguiar e Brandão, 1996; De Lima & Ribeiro, 1996; Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999), enquanto que a injeção de antagonistas NK₁ produziu efeito do tipo ansiolítico em diferentes modelos de ansiedade (Cutler, 1994; Teixeira *et al.*, 1996; File, 1997; Nikolaus *et al.*, 1999; File, 2000; Vassout *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2001; Cheeta *et al.*, 2001; Gavioli *et al.*, 2002). A ansiedade parece ser, então, aumentada por uma atividade excessiva da SP e diminuída pela redução de sua atividade. Entretanto, os efeitos da SP sobre a ansiedade dependem tanto da dose quanto das regiões cerebrais específicas em que é administrada (Huston *et al.*, 1993; Shaikh *et al.*, 1993; Gavioli *et al.*, 1999). A SP demonstra um efeito dose-resposta bifásico sobre comportamentos relacionados com a ansiedade, exibindo uma curva dose-resposta em forma de U, onde doses baixas e intermediárias induzem respostas

aversivas, enquanto que altas doses são inefetivas no teste do LCE (Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999). Esta característica particular também ocorre em estudos de reforçamento e memória, onde os efeitos da substância P ocorrem numa faixa estreita de doses (Huston *et al.*, 1993).

Estudos clínicos, por sua vez, mostraram uma relação inversa entre os níveis de SP no líquido cefalo-raquidiano e a intensidade de “tensão interna” e “ansiedade psíquica” dos pacientes (Almay *et al.*, 1988). A maioria desses pacientes, entretanto, apresentavam um quadro de dor crônica e, é bem conhecido que 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). Além disso, Fehder *et al.*, em 1997, propuseram que a SP serviria como um mediador nas reações imunológicas produzidas por estresse após verificar níveis aumentados de SP em resposta a ansiedade psicológica humana.

Estudos neuroquímicos demonstraram mudanças no conteúdo de SP em diferentes estruturas cerebrais em resposta a vários estímulos estressantes e tanto o aumento quanto a diminuição de seu conteúdo foram relatados. A este respeito, ratos removidos de suas caixas e mantidos em isolamento social apresentaram um aumento na imunorreatividade à SP na região da substância cinzenta periaquedutal dorsal (Rosen *et al.*, 1992; Brodin *et al.*, 1994). Aumentos na concentração de SP foram também observados nas regiões do septo e hipocampo após a exposição de ratos a choques nas patas (Siegel *et al.*, 1984). Em contrapartida, uma diminuição no seu conteúdo foi relatada no septo, estriado e hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização (Takamaya *et al.*, 1986) e na área tegmental ventral após ao estresse de choques nas patas (Bannon *et al.*, 1986). Neste mesmo sentido, no tratamento sub-crônico (14 dias) com antidepressivos bloqueadores da recaptação de serotonina observou-se uma alteração dos níveis de neurocininas no cérebro e medula espinhal de ratos (Fuxe, 1981). Drogas ansiolíticas e antidepressivas diminuem a

biossíntese de SP em várias regiões cerebrais como no estriado, substância negra, amígdala (Shirayama *et al.*, 1996) e substância cinzenta periaquedutal de ratos (Brodin *et al.*, 1987, 1994), o que levanta a possibilidade de que alterações no sistema neurocinérgico possam contribuir para a eficácia destas drogas. Em outras espécies, como cobaias, camundongos (Molewijk *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1998; Rupniak *et al.*, 2000; Boyce *et al.*, 2001) e primatas (Porsolt *et al.*, 1984; Kalin e Shelton, 1989; Newman *et al.*, 1991), as vocalizações neonatais induzidas por isolamento são inibidas tanto com drogas ansiolíticas como antidepressivas, um efeito do tipo ansiolítico similar ao apresentado em outras espécies e modelos animais após o tratamento com antagonistas NK₁, já referidos anteriormente. Kramer e colaboradores, em 1998, demonstraram que a separação maternal de filhotes de cobaias causa a internalização dos receptores NK₁ no núcleo basolateral da amígdala, sugerindo que a SP seja liberada nesta região cerebral como resultado de um estresse psicológico. Tal interpretação foi também observada no modelo do estresse de imobilização, e cujo efeito foi bloqueado pelo antagonista dos receptores NK₁ L-760735 (Smith *et al.*, 1999). Em pacientes com depressão maior, o tratamento com MK-869, um potente antagonista seletivo de receptores NK₁ biodisponível oralmente, alivia sintomas de ansiedade e depressão com efetividade similar à paroxetina (Kramer *et al.*, 1998; Maubach *et al.*, 1999; Rupniak e Kramer, 1999; Kramer *et al.*, 2000).

Assim, embora o interesse maior neste peptídeo tenha sido primariamente focalizado para suas funções na dor e inflamação, várias linhas de pesquisa pré-clínica e clínica têm buscado entender a participação das taucinininas e, particularmente da SP, como moduladores da atividade neuronal em áreas cerebrais envolvidas na fisiopatologia da ansiedade e depressão.

Estudos pré-clínicos realizados em difentes espécies e paradigmas experimentais sugerem que os níveis de ansiedade podem ser modulados via manipulação farmacológica

dos mecanismos taquicinérgicos centrais (Stratton *et al.*, 1993; Zernig *et al.*, 1993; Krase *et al.*, 1994; Stratton *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1995; File, 1997; Gavioli *et al.*, 1999). Em estudos prévios, demonstramos que a estimulação dos receptores NK₁ induz respostas do tipo ansiogênicas em camundongos avaliados no teste do LCE (Teixeira *et al.*, 1996). No entanto, quando administrada dentro do núcleo basal magnocelular do palido-ventral de ratos, a SP parece reduzir parâmetros de medo (Hasenhörl *et al.*, 1998; Nikolaus *et al.*, 1999; Hasenhörl, 2000; Nikolaus *et al.*, 2000).

Nossos resultados com a utilização da SP *free acid*, um peptídeo com uma cadeia de aminoácidos similar a da SP 1-11, porém resistente à degradação enzimática, fortalecem os achados do envolvimento da SP na indução de respostas aversivas em ratos. O tratamento com a SP *free acid*, na dose de 1 pmol, foi capaz de reduzir não somente os parâmetros clássicos de exploração nos braços abertos, como também o número de imersões de cabeça realizados no LCE, sem alterar, porém, o número de estiramentos corporais. Este padrão de comportamento ansiogênico parece ser um efeito específico deste peptídeo já que não vem acompanhado de prejuízo motor, avaliado através do número de entradas nos braços fechados do LCE e da atividade locomotora no teste da arena. O número de imersões de cabeça e de estiramentos corporais são elementos posturais considerados indicativos do comportamento de avaliação de risco e têm mostrado serem indicadores sensíveis de drogas efetivas no LCE (Rodgers e Cole, 1994). O comportamento de imersões de cabeça trata-se de um movimento exploratório com a cabeça sobre os lados abertos do labirinto, abaixando-se em direção ao chão. Drogas ansiolíticas aumentam, enquanto drogas ansiogênicas reduzem o número de imersões de cabeça (Pellow e File, 1986; Lister, 1987; Cruz *et al.*, 1994; Cole *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 1995; Griebel *et al.*, 1997; Dalvi e Rodgers, 1999; Silva e Brandão, 2000). O comportamento de estiramento (“stretched attend postures”) faz parte do repertório natural

dos roedores e é designado por Blanchard *et al.* (1989) como parte do repertório da avaliação de risco (“risk assessment”), caracterizado por exploração cautelosa, com dorso estirado e ventre rente ao solo. Trata-se de uma estratégia de defesa em que o animal se estica totalmente com as patas anteriores e dorso seguido de sua retração à posição original. Este comportamento ocorre com grande frequência quando o animal está saindo dos braços fechados do labirinto em direção à plataforma central, ou quando está no centro posicionado em direção aos lados abertos (Rodgers e Cole, 1992). Algumas evidências dão suporte à idéia de que uma diminuição do número de estiramentos seria consistente com uma redução da ansiedade e o inverso é verdadeiro para uma atividade ansiogênica (Blanchard *et al.*, 1990; Cruz *et al.*, 1994; Shepherd *et al.*, 1994). Nesse sentido, outros estudos demonstraram haver uma correlação entre o número de estiramentos corporais e a elevação dos níveis de corticosterona plasmática no teste do LCE (Rodgers *et al.*, 1999). Ambos os resultados são interessantes, pois correlacionam este comportamento de avaliação de risco com a exposição do animal a uma situação aversiva. Nossos resultados mostraram que o número de imersões de cabeça foi reduzido pelo tratamento i.c.v. com a SP 1-11 (10 pmol) ou SP *free acid* (1 pmol), enquanto que o número de estiramentos corporais foi aumentado somente pela SP 1-11 (10 pmol). Estes dados demonstram que estes peptídeos são capazes de alterar estes parâmetros comportamentais, que embora sem alcançarem significância estatística, quando analisados junto aos parâmetros clássicos confirmam o perfil ansiogênico destas drogas no LCE.

Esta primeira etapa do protocolo experimental mostrou que o uso da SP *free acid*, numa dose 10 vezes menor (1 pmol) que a dose ansiogênica máxima de SP (Gavioli *et al.*, 1999) induz respostas do tipo ansiogênicas de forma similar à SP 1-11, o que se deve provavelmente ao fato de que a SP *free acid* sendo resistente à degradação enzimática estaria em uma quantidade local equivalente à de SP 1-11 (10 pmol), quantidade esta capaz

de alterar o comportamento de ratos no LCE. A ausência do grupo básico NH₂ na porção C-terminal da SP *free acid*, que está presente na molécula da SP íntegra (SP 1-11), pode ser uma característica-chave responsável pela maior resistência à degradação enzimática e, conseqüentemente, conferindo maior potência na indução do comportamento do tipo ansiogênico em ratos avaliados no LCE. Já quando os animais foram tratados com a SP *free acid* 10 pmol, não houve modificação comportamental em relação ao grupo controle, provavelmente devido à maior concentração desta neurocinina no local de ação. Este padrão comportamental foi similar ao apresentado em estudos prévios quando do uso de concentrações maiores de SP1-11 (40, 100 pmol; Gavioli *et al.*, 1999), o que também reforça dados anteriormente obtidos em camundongos (Teixeira *et al.*, 1996). Em doses baixas a SP seria ansiogênica atuando em receptores NK₁ e, ao aumentarmos sua disponibilidade, sua ação se faz por interação com outros receptores, alguns com efeitos antagonicos, que são evidenciados como ansiólise somente em doses elevadas de SP.

O metabolismo da SP tem sido investigado em diferentes tipos de tecidos (Wang *et al.*, 1994), no plasma (Conlon e Goke, 1984), no SNC (Sakurada *et al.*, 1985; Kostel e Lunte, 1997; Whelpton *et al.*, 1998; Sakurada *et al.*, 1999). Estudos “*in vitro*” demonstraram que a SP é clivada em certas seqüências de aminoácidos dentro de 10 min (Blumberg *et al.*, 1980; Edvinson *et al.*, 1983) e não é mais detectável no plasma após 15 min (Lembeck *et al.*, 1978; Couture e Regoli, 1981). Isto está de acordo com nossos estudos comportamentais mostrando que 15 min após a administração i.c.v. de SP 1-11 não havia mais qualquer diferença entre o grupo controle e o tratado (Teixeira *et al.*, 1996). Um grande número de peptidases são capazes de hidrolisar a SP em vários sítios formando metabólitos que podem exibir ou não uma variedade de ações biológicas e farmacológicas, mas pouco se sabe sobre quais destas enzimas participam da degradação da SP *in vivo*. A este respeito, estudos de microdiálise têm sido bastante úteis na investigação do

metabolismo local da SP em diversas áreas cerebrais e têm permitido caracterizar as enzimas chaves responsáveis pela sua degradação nestas áreas (Andrén e Caprioli, 1995; Freed *et al.*, 2001). A presença da EPN no SNC tem sido demonstrado, pelo uso de inibidores destas enzimas, incluindo o fosforamidon e o tiorfan (Matsas *et al.*, 1985). Na presença do fosforamidon, um inibidor específico da EPN, observa-se um aumento expressivo na atividade da SP nas porções estriatais em porcos e ratos (Matsas *et al.*, 1983; Mauborgne *et al.*, 1987) e uma inibição seletiva na degradação da SP em membranas sinápticas da substância negra (Oblin *et al.*, 1988). Além disso, Sakurada *et al.*, em 1990, revelaram que a administração de fosforamidon injetado simultaneamente com SP ou NKA por via intratecal em camundongos, aumentou de maneira dose-dependente as respostas comportamentais (“biting”, “licking” e “scratching”) induzidas por estas neurocininas. Em contrapartida, o captopril que bloqueia a ECA não foi capaz de alterar as respostas comportamentais destes animais (Sakurada *et al.*, 1990).

Em relação aos nossos estudos utilizando inibidores de peptidases, os resultados indicam um pequeno aumento dos efeitos do tipo ansiogênico da SP quando os animais foram pré-tratados com cada um dos inibidores de peptidases, tiorfan ou fosforamidon. Embora não tenha sido observado uma potencialização significativa dos efeitos da SP, os inibidores de peptidases tornaram o efeito ansiogênico deste neuropeptídeo mais evidente, o que pode ser particularmente observado no parâmetro número de imersões de cabeça. Nesse sentido, nossos dados estão de acordo com os descritos na literatura para outros sistemas e processos *in vivo* e *in vitro*, envolvendo a modulação pela SP (Otsuka e Yoshioka, 1993). Isso ocorre porque os inibidores de peptidases, reduzindo a degradação da SP, deixam disponível uma maior concentração dessa neurocinina, permitindo uma maior atuação em seus receptores, principalmente os do tipo NK₁ onde este peptídeo é o ligante preferencial, traduzida como potenciação dos seus efeitos ansiogênicos. No entanto,

quando os ratos foram pré-tratados com ambos os inibidores, tiorfan e fosforamidon, observou-se o efeito oposto, isto é, um aumento na porcentagem do tempo despendido e no número de entradas nos braços abertos do LCE, além do aumento no número de imersões de cabeça e uma tendência em reduzir o número de estiramentos corporais. Este conjunto de alterações comportamentais serve de indicativo para uma possível atividade do tipo ansiolítica do uso combinado desses inibidores. Isso se deve, possivelmente, a um acréscimo tão grande na concentração de SP disponível, de tal maneira que permite, além de sua ação nos receptores NK₁, sua interação com outros receptores neurocinérgicos como os receptores NK₃, cuja ativação promove uma ação do tipo ansiolítica (Ribeiro *et al.*, 1999) e que, devido a maior disponibilidade de SP, passa a ser predominante.

A enorme variedade de ações biológicas exercidas pelas NKs parece ser determinada pela seqüência comum C-terminal (Munekata *et al.*, 1987; Quartara *et al.*, 1992) e mediada por um ou mais dos três receptores conhecidos: NK₁, NK₂, NK₃ (Regoli *et al.*, 1989; Nakanishi, 1991). No entanto, foi sugerido que a SP *per se* seja inativa dentro do SNC e que seus efeitos possam ser devido à sua clivagem enzimática em um fragmento ativo (Hall *et al.*, 1989a). Assim, as funções da SP no SNC poderiam ser reguladas não somente pela presença de neurônios que liberam SP, mas também pela presença e atividade de enzimas, localizadas em várias regiões do SNC capazes de processá-la em fragmento(s) ativo(s). Várias vias enzimáticas de degradação da SP foram demonstradas e fragmentos amino (N)- e carboxi (C)- terminal, com diferentes tamanhos de cadeia, foram detectados em diferentes estruturas cerebrais (Sakurada *et al.*, 1985) tanto “in vitro” (Igwe *et al.*, 1988) como “in vivo” (Igwe *et al.*, 1990). De fato, as endopeptidases e a ECA provavelmente estão envolvidas na expressão dos efeitos da SP através da sua degradação em um metabólito ativo. A seqüência C-terminal da SP parece realmente ser essencial para a ativação do receptor NK₁ (Otsuka e Yoshioka, 1993; Regoli *et al.*, 1994), entretanto, nem

todos os efeitos induzidos pela SP no SNC são mediados através desta seqüência específica. Foi observado que algumas ações da SP podem ser bloqueadas pela co-injeção de fragmentos N-terminal (Herrera-Marschitz *et al.*, 1990), ou por bloqueio da endopeptidase, sua enzima de degradação (Hall *et al.*, 1989a). A este respeito, a SP 1-7 N-terminal induz nocicepção em camundongos (Skilling *et al.*, 1990); inibe o comportamento rotacional induzido pela SP em ratos (Herrera-Marschitz *et al.*, 1990); atenua os sinais de abstinência em camundongos dependentes de morfina, efeito este que é bloqueado por antagonistas SP 1-7 (Kreeger e Larson, 1996). No entanto, estudos de estrutura-atividade da SP mostraram que os fragmentos N- e C-terminal podem exercer ações no SNC similares às observadas com a molécula inteira da SP no controle da atividade cardiovascular (Hall *et al.*, 1989b), na nocicepção (Mousseau *et al.*, 1987) e nos processos de aprendizado e memória (Huston *et al.*, 1993).

Assim, na terceira etapa deste protocolo experimental, foram investigados os efeitos das seqüências específicas SP 6-11 C-terminal e SP 1-7 N-terminal na ansiedade experimental em ratos, com o objetivo de determinar qual(is) a(s) seqüência(s) da SP era(m) responsável(is) por seu efeito do tipo ansiogênico após a administração central. A este respeito, nossos dados mostram que a SP 6-11 (C-terminal) reduz em 82,62 % a porcentagem do tempo despendido e em 57,15 % a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE, além da redução significativa no número de imersões de cabeça (80,03 %), uma ação do tipo ansiogênica ainda mais evidente do que a observada para a SP íntegra (SP 1-11; %TA=48,82 %, %A=14,52 %, imersões de cabeça=33,09 %). Já o tratamento i.c.v. com a seqüência peptídica N-terminal (SP1-7) não foi capaz de alterar o comportamento dos animais de forma significativa em nenhum dos parâmetros observados no LCE.

A maioria dos efeitos biológicos da SP no músculo liso, assim como seus

poderosos efeitos pressóricos centrais, são atribuídos a seu fragmento C-terminal (Erspamer, 1981; Traczyk e Kubicki, 1981; Fuxe *et al.*, 1982). Várias outras atividades biológicas podem ser atribuídas a essa seqüência peptídica, como a elevação da pressão arterial e frequência cardíaca, o aumento de comportamentos como “face washing”, “hindquarter grooming”, “wet-dog shakes” (Tschöpe *et al.*, 1995) e a diminuição no número de “rearing” (Hall *et al.*, 1987a), quando administrada no ventrículo lateral, além de uma ativação comportamental com características aversivas, quando administrada na substância cinzenta periaquedutal dorsal (De Araújo *et al.*, 1999), o aumento da agressividade induzido pelo isolamento (Hall e Stewart, 1984), o déficit na retenção da esQUIVA inibitória após injeção intra-accumbens (Gaffori *et al.*, 1984) e o aumento da atividade monoaminérgica central (Hall *et al.*, 1987b). Já entre as ações biológicas exercidas pelo tratamento com fragmentos N-terminais, além dos efeitos opostos aos citados anteriormente, inclui-se o efeito do tipo ansiolítico em sagüis (*Callithrix penicillata*) no teste de confrontação predatória de medo/ansiedade (Barros *et al.*, 2002). Por outro lado, algumas atividades são similares entre seqüências C- e N-terminais como, por exemplo, o efeito do tipo ansiolítico no LCE após a injeção unilateral no núcleo basal do pálido-ventral de ratos (Nikolaus *et al.*, 2000). A participação da SP e de seus metabólitos na neuromodulação dos processos de aprendizado e memória também vêm sendo investigada. A administração periférica de SP promove um efeito facilitador nesse processo cognitivo (Tomaz e Nogueira, 1997), facilitando a retenção da esQUIVA inibitória no modelo do labirinto em T quando administrada imediatamente após o treino (Tomaz e Huston, 1986) e, tanto a SP quanto fragmentos N-terminais, são capazes de bloquear a amnésia anterógrada induzida por benzodiazepínicos (Costa e Tomaz, 1998). Em contrapartida, a administração do agonista de receptores NK₁, GR 73632, em sub-regiões da substância cinzenta periaquedutal, parece modular aspectos incondicionados, mas não

mnemônicos, de comportamentos de medo (Huston et al., 1993; Mongeau et al., 1998). Nesse mesmo sentido, Echeverry e col. (2001) demonstraram que a SP não foi capaz de influenciar a retenção e a aquisição da esQUIVA INIBITÓRIA DO BRAÇO ABERTO DO LABIRINTO EM T, assim como, não alterou a fuga desses mesmos braços, embora em altas doses seja capaz de aumentar o tempo de permanência na plataforma central, indicativo de uma redução do medo/ansiedade.

O LCE, como modelo animal etologicamente fundamentado, apresenta algumas vantagens em relação a outros modelos no estudo comportamental. Dentre as razões apontadas por Pellow e colaboradores (1985), validando o LCE como um modelo animal de ansiedade destacam-se: a rapidez, a simplicidade e o baixo custo do equipamento. Além disso, o modelo usa uma metodologia baseada em respostas inatas de medo/ansiedade de diferentes espécies animais (camundongos, ratos, gerbilos) diante de situações naturalmente aversivas, não envolvendo treinamentos ou estímulos nocivos como dor ou privação de água ou comida. A maioria dos estudos com o LCE usa um equipamento com paredes de madeira (Rodgers *et al.*, 1997; Bertoglio e Carobrez, 2000). O labirinto utilizado neste estudo apresenta paredes transparentes em acrílico, tendo sido validado por Anseloni e colaboradores (1995) como modelo igualmente útil para estudar os mecanismos biológicos da ansiedade e avaliar drogas ansiolíticas e ansiogênicas. Em razão da linha de base elevada do presente estudo (grupo controle: 50% de entradas e tempo nos braços abertos/total), mas um dado constante em nosso laboratório (Gavioli *et al.*, 1999, 2000), a detecção de eventuais efeitos ansiolíticos da sequência peptídica 1-7 (N-terminal) da SP poderia ter ficado prejudicada. Entretanto, a média da taxa de exploração dos animais nos braços abertos do LCE, apresentada neste estudo, é replicável dentro das condições do laboratório e está de acordo com o trabalho de Anseloni *et al.* (1995), que validaram o LCE com paredes transparentes em acrílico e cuja taxa de exploração dos animais nos braços

abertos situava-se em torno de 50%. Além disso, os resultados aqui obtidos com a utilização da seqüência peptídica N-terminal estão de acordo com outros estudos relatando a ausência de seus efeitos biológicos em ratos, quando administrada centralmente (Tschöpe *et al.*, 1995; De Araújo *et al.*, 1999).

Neste estudo, apesar da seqüência peptídica SP 6-11 C-terminal ter induzido respostas comportamentais quantitativamente mais evidentes do que aquelas observadas para a SP 1-11, nossos resultados mostram que a administração i.c.v. da seqüência SP 6-11 reduz de forma significativa o número de entradas dos animais nos braços fechados do LCE, parâmetro que têm sido correlacionado com possíveis alterações da atividade locomotora. Neste sentido, sabe-se que o confinamento dos animais nos braços abertos do LCE induz respostas aversivas ou estressantes evidenciadas através da elevação do limiar da dor (Rodgers e Cole, 1994), elevação dos níveis de condutância da pele (Suer *et al.*, 1998) e pelo aumento dos níveis de corticosterona plasmática (Copland e Balfour, 1987; File *et al.*, 1988; File *et al.*, 1994; Calvo *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1998). No entanto, apesar dos braços abertos do LCE serem mais aversivos do que os braços fechados, todos os braços do labirinto provavelmente induzem medo, já que são ambientes desconhecidos pelos animais (Bertoglio e Carobrez, 2000). Além disso, alguns estudos mostram que em algumas circunstâncias de medo ocorre uma inibição comportamental, que inclui uma redução do comportamento exploratório (Gray, 1982). Esta inibição comportamental estaria relacionada com o estado de congelamento (*freezing*), no qual os animais permanecem imóveis. Assim, drogas que induzem medo/ansiedade podem induzir supressão comportamental no LCE de forma generalizada, não reduzindo apenas a preferência pelos braços abertos, mas também pelos braços fechados do labirinto, efeito este anteriormente observado em nosso laboratório (Gavioli *et al.*, 1999, 2002).

Esta etapa experimental mostrou que o efeito do tipo ansiogênico da SP 1-11 pode ser mediado pelo seu fragmento C-terminal (SP 6-11), embora um prejuízo motor não possa ser excluído durante a realização do teste do LCE, pois houve uma redução significativa do número de entradas nos braços fechados do LCE. Nesse sentido, a mesma hipótese deveria ser corroborada no teste da arena, aonde não se observou diminuição significativa da atividade locomotora, embora tenha sido observada uma tendência em reduzir a movimentação espontânea dos animais. Entretanto, o desempenho dos animais na arena pode ter sido influenciado pela sua exposição prévia ao LCE. Geralmente, a ordem utilizada destes testes é inversa à que foi utilizada neste estudo, sendo a arena utilizada imediatamente antes do teste do LCE, com o objetivo de aumentar a atividade exploratória e adaptação dos animais ao ambiente do teste (Lister, 1987). De fato, no presente estudo, a arena foi utilizada como modelo para avaliação de possíveis alterações de atividade locomotora induzida pelas drogas em estudo e não como modelo de ansiedade, já que a análise é baseada em comportamentos que não são considerados os mais representativos de ansiedade e as dimensões da arena não são adequadas ao estudo de efeitos ansiolíticos e/ou ansiogênicos (Berton *et al.*, 1997). Embora os resultados obtidos por De Araújo e colaboradores (1999) não tenham sido acompanhados de redução da frequência de entradas dos animais nos braços fechados do LCE, deve-se enfatizar que os autores utilizaram doses diferentes da empregada neste estudo e a injeção central foi procedida em uma outra região cerebral (substância cinzenta periaquedutal). Além disso, os autores utilizaram um fragmento da SP com uma cadeia peptídica de tamanho diferente da aqui empregada, o que também poderia contribuir para explicar tais diferenças por mudanças nas suas propriedades agonísticas, aspecto este que será discutido a seguir.

Estudos de estrutura-atividade em várias preparações demonstraram que o hexapeptídeo C-terminal e alguns de seus análogos são as seqüências de cadeia peptídica

mínima da SP que retém a atividade biológica total e são até mesmo mais potentes do que aquelas exibidas pela seqüência undecapeptídica (Horing e Schultheiss, 1984). Assim, outros estudos mostraram que seqüências com cadeia peptídica menores do que a da SP 6-11 C-terminal não exibiram qualquer atividade biológica em diferentes preparações de tecidos (Bury e Mashford, 1976; Cridland e Henry, 1988; Cascieri *et al.*, 1992). Sabe-se que uma substituição de qualquer aminoácido no hexapeptídeo C-terminal produz mudanças que incluem, principalmente, uma diminuição de suas propriedades agonísticas (Karagiannis *et al.*, 1994). Neste trabalho, algumas características quanto a natureza e posição dos aminoácidos na sua estrutura molecular podem servir de suporte para explicar esse maior efeito aversivo induzido pelo fragmento 6-11 (C-terminal), quando microinjetado no ventrículo lateral de ratos. Embora pouco se saiba sobre a degradação dos diferentes metabólitos da SP, existe a especulação de que os fragmentos C-terminais seriam degradados mais lentamente do que a SP 1-11, o que permitiria uma maior interação com o(s) receptor(es) neurocinérgico(s). Além disso, uma lipofilia maior foi observada após a retirada do primeiro aminoácido N-terminal da molécula da SP (Igwe *et al.*, 1990). Com isso, teria-se uma maior capacidade de difusão para fragmentos C-terminais que alcançariam maior número de áreas cerebrais envolvidas na modulação da ansiedade experimental. Além disso, embora a SP 6-11 (C-terminal) seja considerada um agonista seletivo NK₁, existe indícios de que este peptídeo exiba grande afinidade pelos receptores NK₂ e, talvez, NK₃. Peptídeos contendo um resíduo do aminoácido Pro na posição 8 da cadeia, por exemplo SP, apresentam afinidade reduzida pelos receptores NK₂ e NK₃ e preferência pelos receptores NK₁ (Cascieri *et al.*, 1992). Resíduos de aminoácidos aromáticos localizados na posição 4 da porção C-terminal dos peptídeos (por exemplo, Phe na SP e SP 6-11) aumentam a afinidade pelos receptores NK₁. Por outro lado, peptídeos contendo um ou dois resíduos ácidos nas posições 6 e/ou 7 da cadeia C-terminal (por

exemplo, Glu na SP 6-11) apresentam maior afinidade pelos receptores NK₂ e NK₃ (Severini *et al.*, 2002). Como as neurocininas endógenas não são ligantes extremamente seletivos para os diferentes tipos de receptores, NK₁, NK₂ e NK₃, e sabendo-se que a seqüência SP 6-11 C-terminal apresenta também afinidade pelos receptores NK₂ e NK₃, utilizou-se os antagonistas FK 888 e SR 48968 para avaliar a participação dos receptores NK₁ e NK₂ no efeito ansiogênico da seqüência C-terminal da SP, já que o maior efeito ansiogênico observado para esta seqüência peptídica pode ser explicado por uma somatória das ações via receptores NK₁ e NK₂, enquanto a ativação do receptor NK₃ está associada a um efeito do tipo ansiolítico (Ribeiro *et al.*, 1999).

A especificidade de ação da seqüência peptídica SP 6-11 (C-terminal) em induzir respostas do tipo ansiogênicas no teste do LCE foi confirmada pela ação inibitória exercida pelos antagonistas dos receptores neurocinérgicos NK₁ (FK 888) e NK₂ (SR 48968). Nossos dados mostraram que tanto a injeção de FK 888 quanto de SR 48968, por via i.c.v., inibiu o comportamento aversivo induzido pela SP 6-11, observado através dos parâmetros freqüência do tempo despendido e do número de entradas nos braços abertos do LCE, assim como alguns parâmetros etológicos, tais como, número de imersões de cabeça, número de estiramentos corporais e de auto-limpeza. Além disso, os antagonistas NK₁ e NK₂ não produziram efeito “per se” nos animais, contrastando com estudos anteriores que demonstraram efeitos do tipo ansiolítico para ambos os antagonistas em diferentes espécies e modelos animais (Stratton *et al.*, 1993, 1994; Bernatzky e Saria, 1995; Teixeira *et al.*, 1996), porém estando de acordo com nossos resultados prévios quando microinjetados na região do septo lateral de ratos (Gavioli *et al.*, 2002). Neste mesmo trabalho, Gavioli e colaboradores demonstraram que ratos tratados com SP 1-11 10 pmol no septo lateral expressaram reações aversivas no LCE, e que a microinjeção intra-septal de FK 888 ou SR 48968 foi capaz de inibir as respostas comportamentais induzidas pela SP injetada i.c.v..

Estes dados juntos fortalecem a hipótese da participação de diferentes tipos de receptores neurocinérgicos, não somente NK₁ mas também NK₂, na mediação das respostas aversivas induzidas pela microinjeção central das neurocininas e de seus metabólitos.

O comportamento de auto-limpeza (“grooming”) é um outro parâmetro etológico que faz parte do repertório natural dos roedores e também é utilizado para estudar o envolvimento de áreas cerebrais específicas e o efeito de diversas drogas sobre o comportamento animal. Esse comportamento parece estar associado a situações de conflito em diferentes espécies de animais. Ele pode estar aumentado em resposta ao medo e estresse ou diminuído diante de uma extrema excitação (Hinde, 1970, Jolles *et al.*, 1979). O comportamento de auto-limpeza envolve um grupo de respostas somáticas, autonômicas e endócrinas associadas com comportamentos adaptativos, os quais asseguram a sobrevivência do animal (Celis e Torre, 1993). Em roedores, esse comportamento segue uma certa hierarquia típica da espécie, iniciando-se mais comumente com a limpeza do focinho pelas patas anteriores que previamente são levadas à boca para serem umedecidas, progredindo para a limpeza das orelhas. Em seguida, o animal realiza lambidas pelo corpo, até alcançar a região que envolve o ânus e a genitália. Roeling e colaboradores, em 1993, consideraram o hipotálamo como uma “área de auto-limpeza” específica. Outras áreas do SNC, como o septo, os núcleos amigdalóides e a substância cinzenta periaquedutal, quando estimuladas química ou eletricamente, são capazes de induzir esse comportamento, uma vez que possuem vias aferentes e eferentes com o hipotálamo (Spruijt *et al.*, 1986; Roeling *et al.*, 1991, 1993; Van Erp *et al.*, 1993). A ação dos peptídeos na indução do comportamento de auto-limpeza em roedores já foi demonstrada. Diversos peptídeos tais como a adrenocorticotropina e o hormônio estimulante dos α -melanócitos (ACTH/ μ -MSH) (Gispen e Isaacson, 1981; Dunn e Hurt, 1986), endorfinas e bombesina (Crawley e Moody, 1983) são capazes de induzir esse comportamento, enquanto que o tratamento i.c.v. com

drogas ansiolíticas, como clordiazepóxido ou diazepam, reverterem completamente o comportamento de auto-limpeza induzido por peptídeos (Moody *et al.*, 1985). Katz, em 1980, demonstrou que a injeção central de SP aumentou, enquanto que a injeção de neurotensina inibiu o comportamento de auto-limpeza em camundongos. Interações entre estes neuropeptídeos podem representar um dos mecanismos regulatórios envolvidos na modulação desse comportamento. Ravard e colaboradores, em 1994, mostraram o envolvimento dos receptores NK₁ e também NK₂ na indução do comportamentos de “grooming” e “scratching” em camundongos e estudos com camundongos *knockout* para receptores NK₁, por sua vez, mostraram que estes animais apresentaram um perfil comportamental similar aos animais normais tratados com antagonistas NK₁, incluindo uma redução do número de comportamentos de auto-limpeza e “scratching” (Rupniak *et al.*, 2001). No presente trabalho, a frequência de auto-limpeza parece denotar um aumento do estado de ansiedade dos animais. A microinjeção de SP 6-11 (C-terminal) 10 pmol causou um aumento desse comportamento que, junto com outras alterações comportamentais tais como a redução da exploração dos braços abertos e o aumento do número de estiramentos corporais, corroboram o efeito do tipo ansiogênico desta seqüência específica da SP.

Retomando a discussão sobre o comportamento de estiramentos corporais, é importante enfatizar que para este comportamento houve uma diferença na média dos valores para tratamentos aparentemente “equivalentes” entre as tabelas 1, 2, 3 e 4. Nesse sentido, deve-se levar em consideração o volume das drogas utilizadas e o número de vezes que o experimentador manipulou os animais durante a administração das drogas. Assim, conforme os resultados apresentados, observou-se que para os protocolos com o uso dos inibidores de peptidases (Tabela 2) e com o uso dos antagonistas neurocinérgicos (Tabela 4) em que os animais foram manipulados duas vezes e receberam o dobro do

volume injetado centralmente, os valores estão elevados em relação aos protocolos utilizando-se a SPfa (Tabela 1) e as seqüências específicas da SP (Tabela 3), com uma única manipulação e 2 µl de injeção i.c.v., o que poderia ser explicado por um maior estresse de manipulação e/ou uma maior difusão das drogas injetadas centralmente, atingindo outras estruturas cerebrais além das periventriculares.

A possibilidade de que a SP 6-11 (C-terminal) poderia estar atuando via outros receptores, distintos dos receptores NK₁ e NK₂, não pode, no entanto, ser descartada. A natureza dos receptores responsáveis por mediar os efeitos dos fragmentos C e N-terminais ainda não foi elucidada. Wijkhuisen *et al.*, em 1999, demonstraram que mutações na seqüência de aminoácidos 193-197 de receptores NK₁ de células COS-7 humanas aboliram algumas propriedades farmacológicas do septide (p-[Glu⁶-Pro⁹] SP 6-11), um análogo sintético da SP C-terminal. A região 193-197, localizada no final da segunda alça extracelular do receptor, parece ser o domínio de ligação de alta afinidade do septide. Embora o septide seja considerado um agonista potente e seletivo dos receptores NK₁ (Wormsen *et al.*, 1986), suas propriedades farmacológicas atípicas (Pradier *et al.*, 1994; Sagan *et al.*, 1996) têm levado mais recentemente, vários autores a especular a existência de um receptor específico sensível ao septide (para revisão ver Glowinski, 1995). Esta hipótese é reforçada por trabalhos que já identificaram através de estudos de ligação e pelo uso de antagonistas (D-Pro², D-Phe⁷-SP1-7) de receptores para SP 1-7 bloqueando sua atividade biológica no cérebro e medula espinhal de camundongos (Igwe *et al.*, 1990; Kreeger e Larson, 1996).

CONCLUSÕES

Nossos dados mostraram que a administração i.c.v. da SP íntegra (SP 1-11) e da sua seqüência peptídica SP 6-11 (C-terminal) foi capaz de promover efeitos do tipo ansiogênico, observados através da diminuição dos parâmetros de exploração nos braços abertos do LCE. A SP 1-11 parece participar da modulação da ansiedade, mas não de forma exclusivamente dependente da metabolização sináptica em um fragmento ativo, já que a injeção i.c.v. da SP *free acid*, um peptídeo mais resistente à degradação enzimática, ou da SP 1-11 em ratos pré-tratados com inibidores de peptidases, induziu o mesmo perfil ansiogênico.

O uso da SP *free acid* numa dose 10 vezes menor (1 pmol) que a dose ansiogênica máxima de SP (10 pmol) induziu respostas do tipo ansiogênicas de forma similar à SP 1-11, o que se deve provavelmente ao fato de que a SP *free acid* sendo resistente à degradação enzimática estaria em uma quantidade local equivalente à de SP 1-11 (10 pmol), quantidade esta capaz de alterar o comportamento de ratos no LCE.

Os resultados mostraram um aumento dos efeitos do tipo ansiogênico da SP nos animais pré-tratados com cada um dos inibidores de peptidases, tiorfan e fosforamidon. Isso ocorre porque os inibidores de peptidases, reduzindo a degradação da SP, deixam disponível uma maior concentração dessa neurocinina, permitindo uma maior atuação em seus receptores, principalmente do tipo NK₁, onde este peptídeo é o ligante preferencial, potencializando seus efeitos. Quando se fez o uso combinado dos inibidores, os animais apresentaram um conjunto de alterações comportamentais indicativo de uma atividade do tipo ansiolítica, possivelmente devido a um acréscimo tão grande na concentração de SP disponível, permitindo, além de sua ação nos receptores NK₁, sua interação com outros receptores neurocinérgicos como os receptores NK₃, cuja ativação promove uma ação do tipo ansiolítica.

Nossos dados mostraram também que a seqüência peptídica 1-7 (N-terminal) não foi capaz de alterar o comportamento dos animais de forma significativa em nenhum dos parâmetros observados no LCE. Em contrapartida, a seqüência peptídica 6-11 (C-terminal) induziu respostas ansiogênicas mais evidentes quando comparadas aos animais tratados com a SP 1-11. Para esse efeito, parece existir a participação não somente dos receptores NK₁, mas também dos receptores NK₂, já que o pré-tratamento i.c.v. com FK 888, antagonista seletivo dos receptores NK₁, e com SR 48968, antagonista seletivo dos receptores NK₂ foi capaz de bloquear o efeito do tipo ansiogênico induzido pela SP 6-11 (C-terminal).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. S. & BRANDÃO, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.**, **60**: 1183-1186, 1996.

ALMAY, B. G. L.; JOHANSSON, F.; VON KNORRING, L.; LE GREVES, P. E.; TERENIUS, L. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndrome. **Pain**, **33**: 3-9, 1988.

ANDRÉN, P. E. & CAPRIOLI, R. M. *In vivo* metabolism of substance P in rat striatum utilizing microdialysis/liquid chromatography/micro-electrospray mass spectrometry. **J. Mass Spectrometry**, **30**: 817-824, 1995.

ANSELONI, V. Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **28**: 597-601, 1995.

ARVIDSSON, U.; CULLHEIM, S.; ULFHAKE, B.; BENNET, G. W.; FONE, K. C. F.; CUELLO, A. C.; VERHOFSTAD, A. A. J.; VISSER, T. J.; HÖKFELD, T. 5-Hydroxytryptamine, substance P, and thyrotropin-releasing hormone in the adult cat spinal cord segment L7: immunohistochemical and chemical studies. **Synapse**, **6**: 237-247, 1990.

BALLARD, T. M.; SANGER, S.; HIGGINS, G. A. Inhibition of shock-induced foot tapping behaviour in the gerbils by a tachykinin NK₁ receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, **412**: 255-264, 2001.

BANNON, M. J.; DEUTCH, A. Y.; TAM, S. Y.; ZAMIR, N.; ESKAY, R. L.; LEE, J. M.; MAGGIO, J. E.; ROTH, R. H. Mild footshock stress dissociates substance P from substance K and dynorphin from Met- and Leu-enkephalin. **Brain Res.**, **381**(2): 393-6, 1986.

BANNON, M. J.; ELLIOT, P. J.; BUNNEY, E. B. Striatal tachykinin biosynthesis: regulation of mRNA and peptide levels by dopamine agonists and antagonists. **Mol. Brain Res.**, **3**: 31-37, 1987.

BANNON, M. J.; POOSCH, M. S.; HAVERSTICK, D. M.; MANDAL, A.; XUE, I. C. ; SHIBATA, K.; DRAGOVIC, L. J. Preprotachykinin gene expression in the human basal ganglia: characterization of mRNAs and pre-mRNAs produced by alternate RNA splicing. **Mol. Brain Res.** **12**: 225-231, 1992.

BARROS, M.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P.; TOMAZ, C. Anxiolytic-like effects of substance P fragment (SP 1-7) in non-human primates (*Callithrix penicillata*). **Peptides**, **23**: 967-973, 2002.

BEACH, T. G.; TAGO, H. & McGEER, E. G. Light microscopic evidence for a substance P-containing innervation of the human nucleus basalis of Meinert. **Brain Res.**, **408**: 251-257, 1987.

BENSAID, M.; FAUCHEUX, B. A.; HIRSCH, E.; AGID, Y.; SOUBRIE, P.; OURY-DONAT, F. Expression of tachykinin NK₂ receptor mRNA in human brain. **Neurosci. Lett.**, **303**: 25-28, 2001.

BERNATZKY, G. & SARIA, A. Behavioral effect of the NK₂ antagonist SR 48968 but not of the NK₁ antagonist SR 140333 in the mouse black and white box model. **Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Society for Neuroscience**, São Diego, 1995.

BERTACCINI, G. Active polypeptides of non-mammalian origin. **Pharmacol. Rev.**, **28** (2): 127-177, 1976.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav. Brain Res.**, **108**(2): 197-203, 2000.

BERTON, O.; RAMOS, A.; CHAOULOFF, F.; MORMÈDE, P. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: a multivariate analysis of six inbred rat strains. **Behav. Genet.**, **27**: 155-166, 1997.

BEUZEN, A.; BELZUNG, C. Link between emotional memory and anxiety states: A study by principal component analysis. **Physiol. Behav.**, **58**: 111-118, 1995.

BILKEI-GORZO, A.; RADZ, I.; ZIMMER, A. Diminished anxiety- and depression-related behaviors in substance P-deficient mice. **Eur. Psych., 17(1):p. 9, 2002.**

R. J. & BLANCHARD, D. C BLANCHARD,. Attack and defense in rodents as ethoexperimental for the study of emotion. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych., 13: 13-14, 1989.**

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation. **Neurosci. Biobehav. Rev., 14: 455-462, 1990.**

BLUMBERG, S.; TEICHBERG, V.; CHARLI, J.; HERSH, L.; McKELVEY, J. Cleavage of substance P to an N-terminal tetrapeptide and C-terminal heptapeptide by postproline cleaving from bovine brain. **Brain Res., 192: 477-486, 1980.**

BONNER, T.; AFFOLTER, M. U.; YOUNG, A. C.; YONG, W. S. A. cDNA encoding the precursor of the rat neuropeptide neurokinin B. **Mol. Brain. Res., 2: 243-249, 1987.**

BOYCE, S.; SMITH, D.; CARLSON, E.; HEWSON, L.; RIGBY, M.; O'DONNELL, R.; HARRISON, T.; RUPNIAK, N. M. Intra-amygdala injection of the substance P [NK(1) receptor] antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. **Neuropharmacology, 41 (1): 130-137, 2001.**

BRIMIJOIN, S.; LUNDBERG, J. M.; BRODIN, E.; HÖKFELT, T.; NILSSON, G. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. **Brain Res., 87: 1-11, 1980.**

BRISTOW, L. J.; YOUNG, L. Chromodacryorrhoea and repetitive hind paw tapping: models of peripheral and central tachykinin NK1 receptor activation in gerbils. **Eur. J. Pharmacol., 253: 245-252, 1994.**

BRODIN, E.; OGREN, S. O.; THEODORSSON-NORHEIM, E. Effects of subchronic treatment with imipramine, zimelidine and alaproclate on regional tissue levels of substance P- and neurokinin A/neurokinin B-like immunoreactivity in the brain and spinal cord of the rat. **Neuropharmacology, 26(6): 581-90, 1987.**

BRODIN, E.; ROSEN, A.; SCHOTT, 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** (4): 253-60, 1994.

BUCK, S. H.; HELKE, C. J.; BURCHER, E.; SHULTS, C. W.; O'DONOHUE, T. L. Pharmacological characterization and autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. **Peptides**, **7**: 1109-1120, 1986.

BURY, R. W.; MASHFORD, M. L. Biological activity of C-terminal partial sequences of substance P. **J. Med. Chem.**, **19**: 854-856, 1976.

CANDENAS, M. L.; CINTADO, C. G.; PENNEFATHER, J. N.; PEREDA, M. T.; LIOZAGA, J. M.; MAGGI, C. A.; PINTO, F. M. Identification of a tachykinin NK₂ receptor splice variant and its expression in human and rat tissues. **Life Sci.**, **72**: 269-277, 2002.

CASCIERI, M. A.; HUANG, R. R.- C.; FONG, T. M.; CHEUNG, A. H.; SADOWSKI, S.; BER, E.; STRADER, C. D. Determination of the amino acids residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. **Mol. Pharmacol.**, **41**: 1096-1099, 1992.

CASSELLA, J.; HAY, J; LAWSON, S. J. The rat nervous system: An introduction to preparatory techniques. **British Library**, p. 17, 1997.

CELLIS, M. E.; TORRE, E. Measurement of grooming behavior. **Meth. Neurosci.**, **14**: 378-388, 1993.

CHANG, M.; LEEMAN, S. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. **J. Biol. Chem.**, **245**: 4787-4790, 1970.

CHANG, M. M.; LEEMAN, S. E.; NIALL, H. D. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, **232**: 86-87, 1971.

CHEETA, S.; TUCCI, S.; SANDHU, J.; WILLIAMS, A. R.; RUPNIAK, N. M.; FILE, S.E. Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils. **Brain Res.**, 915 (2): 170-175, 2001.

CLÉMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behaviour: A critical review. **Brain Res. Bull.**, **57**: 57-71, 2002.

CLEMENTE, Y.; CHAPOUTIER, G. Biological bases of anxiety. **In: Neurosci. and Behav. Rev.**, **22**: 623-633, 1998.

COMMONS, K.; VALENTINO, R. Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. **J. Comp. Neurol.**, **447**: 82-97, 2002.

CONLON, J. M.; GOKE, B. Metabolism of substance P in human plasma and in the rat circulation. **J. Chromatogr.**, **296**: 241-247, 1984.

COOPER, P. E.; FERNSTROM, M. H.; RORSTAD, O. P.; LEEMAN, S. E.; MARTIN, J. B. The regional distribution of somatostatin, substance P and neotensin in human brain. **Brain Res.**, **218**: 219-232, 1981.

COSTA, C.; TOMAZ, C. Postraining administration of substance P and its N-terminal fragment block the amnesic effects of diazepam. **Neurobiol. Learn. Mem.**, **69**: 65-70, 1998.

COUTURE, R.; REGOLI, D. Inactivation of substance P and its C-terminal fragments in rat plasma and its inhibition by captopril. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **59**: 621-625, 1981.

CRAWLEY, I. N.; MOODY, T. W. Anxiolytics block excessive grooming behavior induced by ACTH₁₋₂₄ and bombesin. **Brain Res. Bull.**, **10**: 399-401, 1983.

CRIDLAND, R. A. & HENRY, J. L. N- and C-terminal SP-fragments of substance P: spinal effects in the rat tail flick test. **Brain Res. Bull.**, **20**: 429-432, 1988.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **49**: 171-176, 1994.

CUELLO, A. C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.**, **178**: 129-156, 1978.

CUTLER, M. Potential anxiolytic in gerbils from the substance P (SP) receptor antagonist CGP 49823. **J. Psychopharmacol.**, **A22**, 1994.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head-dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **62**: 727-734, 1999.

DE ARAÚJO, J. E.; SILVA, R. C. B.; HUSTON, J. P.; BRANDÃO, M. L. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C-terminal, but not the 1-7 N-terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. **Peptides**, **20**: 1437-1443, 1999.

DE LIMA, T. C. M.; RIBEIRO, S. J. Central effects of tachykinin NK₁ receptor agonists and antagonists on the plus maze behavior in rats. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **22**: 1154, 1996.

DE LIMA, T. C. M.; TEIXEIRA, R. M., SANTOS, A. R. S, RAE, G. A.; CALIXTO, J. B. Behavioral effects of intracerebroventricular injection of selective tachykinin agonists and antagonists. **Soc. Neurosci. Abstr.**, **21**: 1696, 1995.

DEL FIACCO, M.; LEVANTI, M. C.; DESSE, M. L.; ZUCCA, G. The human hippocampal formation and parahippocampal gyrus: localization of substance P-like immunoreactivity newborn and adult *post-mortem* tissue. **Neurosci.**, **21**: 141-150, 1987.

DEBELJUK, L.; VILLANUA, M. A.; BARTKE, A. Substance P variations in the hypothalamus of golden hamsters at different stages of the estrous cycle. **Neurosci. Lett.**, **137**: 178-180, 1992.

DING, Y. Q.; SHIGEMOTO, R.; TAKADA, M.; OHISHI, H.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. **J. Comp. Neurol.**, **364**: 290-310, 1996.

DONALDSON, L. F.; HASKELL, C. A.; HANLEY, M. R. Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor. **Biochem. J.**, **320**: 1-5, 1996.

DUNN, R. W.; HURT, R. W. ACTH acts via an anterior ventral third ventricular site to elicit grooming behavior. **Peptides**, **7**: 651-657, 1986.

ECHEVERRY, M. B.; HASENÖHRL, R. U.; HUSTON, J. P.; TOMAZ, C. Comparison of neurokinin SP with diazepam in effects on memory and fear parameters in the elevated T-maze free exploration paradigm. **Peptides**, **22**: 1031-1036, 2001.

EMONDS-ALT, X.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; ADVENIER, C.; NALINE, E.; NELIAT, G.; LE FUR, G.; BELIERE, J. C. A potent and selective non peptide antagonist for the neurokinin A (NK-2) receptor. **Life Sci.**, **50**: 101-106, 1992.

EDVINSON, L.; ROSENDAL-HELGESEN, R.; UDDMAN, R. Substance P: localization, concentration and release in cerebral arteries, choroid plexus and dura mater. **Cell Tissue Res.**, **234**: 1-7, 1983.

ELLIOT, P. J.; IVERSEN, S. P. Behavioural effects of tachykinins and related peptides. **Brain Res.**, **381**: 68-76, 1986.

ELLIOT, P. J.; MASON, G. S.; GRAHAM, E. A.; TURPIN, M. P.; HAGAN, R. M. Modulation of the rat mesolimbic dopamine pathway by neurokinins. **Behav. Brain Res.**, **51**: 77-82, 1992.

ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **TINs**, **4**: 267-269, 1981.

FEHDER, W. P.; SACHS, J.; UVAYDOVA, M.; DOUGLAS, S. D. Substance P as an immune modulator of anxiety. **Neuroimmunomodulation**, **4**: 42-48, 1997.

FENTRESS, J. C. Expressive contexts, fine structure and central mediation of rodent grooming. **Annals New York Academy of Science**. **525**: 18-26, 1988.

FILE, S. E.; JOHNSTON, A. L.; BALDWIN, H. A. Anxiolytic and anxiogenic drugs: changes in behaviour and endocrine responses stress. **Stress Med.**, **4**: 221-230, 1988.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, **113**: 543-546, 1994.

FILE, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin 1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 58 (3): 747-52, 1997.

FILE, S. E. NKP608, an NK1 receptor antagonist, has an anxiolytic action in the social interaction test in rats. **Psychopharmacology**, 152 (1): 105-109, 2000.

FONG, T. M.; YU, H.; STRADER, C. D. Molecular bases for species selectivity of the NK₁ receptor antagonist CP 96,345 and RP 67,580. **J. Biol. Chem.**, 267: 25668-25671, 1992.

FREED, A. L.; COOPER, J. D.; DAVIES, M. I.; LUNTE, S. M. Investigation of the metabolism of substance P in rat striatum by microdialysis sampling and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **J. Neurosci. Meth.**, 109: 23-29, 2001.

FROGER, N.; GARDIER, A. M.; MORATALLA, R.; ALBERTI, L.; LENA, I.; BONI, C.; DE FELIPE, C.; RUPNIAK, N. M. J.; HUNT, S. P.; JACQUOT, C.; HAMON, M.; LANFUMEY. 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} autoreceptor adaptive changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. **J. Neurosci.**, 21: 8188-8197, 2001.

FUJI, T.; MURAI, M.; MORIMOTO, H.; MAEDA, Y.; YAMAOKA, M.; HAGIRAWARA, D.; MIYAKE, H.; IKARI, N.; MATSUO, M. Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK₁ receptor antagonist, FK 888. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 785-789, 1992.

FUXE, K. The role of noradrenaline and adrenaline neuron system and substance P in the control of central cardiovascular functions. **Perspect. Cardiovasc. Res.**, 6: 89-113, 1981.

FUXE, X.; AGNATI, L. F.; ROSELL, S.; HÄRSFATRAN, A.; FOLKERS, K.; LUNDBERG, J. M.; ANDERSON, K.; HÖKFELT, T. Vasopressor effects of substance P and C-terminal sequences after intracisternal injection to α -chloralose-anaesthetized rats: blockage by a substance P antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, 77: 171-176, 1982.

GADDUM, J. H.; SCHILD, H. Depressor substances in extracts of intestine. **J. Physiol.**, **83**: 1-14, 1934.

GAFFORI, O.; STEWART, J. M.; DE WIED, D. Influence of substance P and fragments on passive avoidance behavior. **Experimentia**, **40**: 89-91, 1984.

GARCIA, M.; SAKAMOTO, K.; SHIGEKAWA, M.; NAKANISHI, S.; ITO, S. Multiple mechanisms of arachidonic acid release in Chinese hamster ovary cells transfected with cDNA of substance P receptor. **Biochem. Pharmacol.**, **48**: 1735-1741, 1994.

GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. M. Anxiogenic-like effects induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. **NeuroReport**, **10**: 3399-3403, 1999.

GAVIOLI, E. C.; CANTERAS, N. S.; DE LIMA, T. C. The role of lateral septal NK₁ receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. **Behav. Brain Res.**, **134**(1-2): 411-415, 2002.

GENTIL, V. Ansiedade e transtornos ociosos. In: GENTIL, V. & LOTUFO-NETO, F. **Pânico, fobia e obsessões**. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, c. 2, p. 31-45, 1994.

GENTIL FILHO, V. Psicofármacos. In: ZANINI, A. C. & OGA, S. **Farmacologia Aplicada**. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, c. 55, p. 457-479, 1994.

GERARD, N. P.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; GERARD, C. The human neurokinin A (substance K) receptor: molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. **J. Biol. Chem.** **265**: 20455-20462, 1990.

GERARD, N. P.; GARRAWAY, L. A.; EDDY, R.; SHOWS, T. B.; IJIMA, H.; PAQUET, J. L.; GERARD, C. Human substance P receptor (NK₁): organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. **Biochemistry**, **30**: 10640-10646, 1991.

GERARD, N. P.; BAO, L.; PING, H. X.; GERARD, C. Molecular aspects of the tachykinin receptors. **Regul. Pept.**, **43**: 21-35, 1993.

GISPEN, W. H.; ISAACSON, R. L. ACTH-induced excessive grooming in the rat. **Pharmacol. Ther.**, **12**: 209-246, 1981.

GLOWINSKI, J. **TIPs**, **16**: 365-367, 1995.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. Ed. Lemos, São Paulo – SP, 1993.

GRAY, J. A. The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system: **Oxford: Clarendon Press**, 1982.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAUT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **57**: 817-827, 1997.

GRIEBEL, G. Is there a future for neuropeptide receptor ligands in the treatment of anxiety disorders ? **Pharmacol. Ther.**, **82 (1)**: 1-61, 1999.

GRIEBEL, G.; MOINDROT, N.; ALIAGA, C.; SIMIAND, J.; SOUBRIÉ, P. Characterization of the profile of neurokinin-2 and neurotensin receptor antagonists in the mouse defense test battery. **Neurosci. Behav. Rev.**, **25**: 619-626, 2001.

GUARD, S.; WATSON, S. P. Neurokinin receptor types: classification and membrane signalling mechanisms. **Neurochem. Int.**, **18**: 149-165, 1991.

GUYNET, P. G.; AGHAJANIAN, G. K. Excitation of neurons in the nucleus *locus coeruleus* by substance P and related peptides. **Brain Res.**, **136**: 178-187, 1977.

HALL, M. E.; STEWART, J. M. Modulation of isolation-induced fighting by N- and C-terminal analogs of substance P: evidence for multiple recognition sites. **Peptides**, **5**: 85-89, 1984.

HALL, M.E.; GRANTHAM, P; LIMONI, J. & STEWART, J.M. Effects of substance P and neurokinin A (substance K) on motor behavior: unique effect of substance P attributable to its amino-terminal sequence. **Brain Res.**, **420**: 82, 1987a.

HALL, M. E.; DE ARMEY, P.; STWART, J. M. Effects of an amino-terminal fragment of substance P on brain dopamine and serotonin metabolism. In: **Substance P and neurokinins**. HENRY, J. L.; COUTURE, R.; CUELLO, A. C.; PELLETIER, G.; QUIRION, R.; REGOLI, D. (Eds.). Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 344-346, 1987b.

HALL, M.E; MILEY, F.; STEWART, J.M. The role of enzymatic processing in the biological actions of substance P. **Peptides**, **10**: 895, 1989a.

HALL, M. E; MILEY, F.; STEWART, J. M. Cardiovascular effects of substance P peptides in the nucleus of the solitary tract. **Brain Res.**, **497**: 280-290, 1989b.

HANSON, G. R.; ALPHS, L.; WOLF, W.; LEVINE, R.; LOVENBERG, W. Haloperidol-induced reduction on nigral substance P-like immunoreactive: a probe for the interaction between dopamine and substance P neuronal systems. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **218**: 568-574, 1981.

HARLAN, R. E.; GARCIA, M. M.; KRAUSE, J. E. Cellular localization of substance P- and neurokinin A- encoding preprotachykinin mRNA in the female rat brain. **J. Comp. Neurol.**, **287**: 179-212, 1989.

HARMAR, A.; KEEN, P. Synthesis and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation *in vitro*. **Brain Res.** **231**: 379-385, 1982.

HASENÖHRL, R. U.; JENTJENS, O.; DE SOUZA SILVA, M. A.; TOMAZ, C.; HUSTON, J. P. Anxiolytic-like actions of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **Eur. J. Pharmacol.**, **354**: 123-133, 1998.

HASENÖHRL, R. U.; SOUZA-SILVA, M. A.; NIKOLAUS, S.; TOMAZ, C.; BRANDÃO, M. L.; SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Substance P and its role in neural mechanisms governing learning, anxiety and functional recovery. **Neuropeptides**, **34**: 272-280, 2000.

HELKE, C. J.; KRAUSE, J. E.; MANTYH, P. W.; COUTURE, R.; BANNON, M. J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. **FASEB J.**, **4**: 1606-1615, 1990.

HENRY, J. L. Discussions of nomenclature for tachykinins and tachykinin receptors. *In*: **Substance P and neurokinins**. HENRY, J. L.; COUTURE, R.; CUELLO, A. C.; PELLETIER, G.; QUIRION, R.; REGOLI, D. (Eds). New York: Springer Verlag, 1987: xvii-xviii.

HENRY, J. N.; MANAKER, S. Colocalization of substance P or enkephalin in serotonergic neuronal afferents to the hypoglossal nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **391**: 491-505, 1998.

HERRERA-MARSCHITZ, M.; TERENIUS, L.; SAKURADA, T.; REID, M.S & UNGERSTED, U. The substance P (1-7) fragment is a potent modulator of substance P actions in the brain. **Brain Res.**, **521**: 316, 1990.

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Ed. Científica Nacional, Rio de Janeiro-RJ, 1997.

HINDE, R. A. A synthesis of ethology and comparative psychology. *In*: **Animal Behavior**. 2nd. Ed. McGraw-Hill, 1970.

HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; KELLERTH, J. O.; LJUNGDAHL, A.; NILSSON, G.; NYGARDS, A.; PERNOW, B. Immunohistochemical distribution of substance P. *In*: **Substance P**. VON EULER, U. S. e PERNOW, B. (Eds.) New York: Raven, 117-145, 1977.

HÖKFELT, T.; PERNOV, B.; NILSSON, G.; WETTERBERG, L.; GOLSTEIN, M.; JEFFCOATE, S. L. Dense plexus of substance P immunoreactive nerve terminals in eminentia medialis of the primate hypothalamus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **75**: 14013-1015, 1978.

HÖKFELT, T.; JOHANSSON, O.; GOLDSTEIN, M. Chemical anatomy of the brain. **Science**, **225**: 1326-1334, 1984.

HÖKFELT, T.; BROBERGER, C.; XU, Z-Q. D.; SERGEYEV, V.; UBINK, R.; DIEZ, M. Neuropeptides – an overview. **Neuropharmacology**, **39**: 1337-1356, 2000.

HOLMES, A.; DIFFLEY, E. P.; WALTON, T. P.; BRAIN, P. F.; RODGERS, R. J. Lack of habituation of corticosterone responses in mice repeatedly exposed to the elevated plus-maze. **J. Psychopharmacol.**, **125**: 32, 1998.

HONG, J. S.; YANG, H.-Y. T.; COSTA, E. Substance P content of substantia nigra after chronic treatment with antischizophrenic drugs. **Neuropharmacology**, **17**: 83-85, 1978.

HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. **Biochem. J.**, **241**: 625-633, 1987.

HORSTHEMKE, B.; SCHULZ, M.; BAUER, K. Degradation of substance P by neurones and glial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **125**: 728-733, 1984.

HUSTON, J.P.; HASENÖHRL, R.U.; BOIX, F.; GERHARDT, P. & SCWARTING, R.K.W. Sequence-specific effects of neurokinin substance P on memory, reinforcement and brain dopamine activity. **Psychopharmacology**, **112**: 147-162, 1993.

IGWE, O. J.; FELICE, L. J.; SEYBOLD, V. S.; LARSON, A. A. Optimization of high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay protocols for the analysis of substance P and some of its metabolic fragments. **J. Chromatogr. Biomed. Appl.**, **432**: 113-126, 1988.

IGWE, O. J.; SUM, X.; LARSON, A. A. Role of substance P aminoterminal metabolites in substance P-induced desensitization in mice. **Neurosci.**, **36**: 535-542, 1990a.

IGWE, O. J.; KIM, D. C.; SEYBOLD, V. S.; LARSON, A. A. Specific binding of substance P aminoterminal heptapeptide SP (1-7) to mouse brain and spinal cord membranes. **Neurosci**, **10**(11): 3653-3663, 1990b.

IVERSEN, L. L.; WATSON, S. P.; SANDBERG, B. E.; HUNTER, J.; MAGGIO, J. Biochemical pharmacology of substance P. In: **Perspect. Neurosci.**, Tsukata Y (ed), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 3-17, 1985.

IVERSEN, L. L.; McNIGHT, A. T.; FOSTER, A. C.; YOUNG, S. C.; WILLIAMS, B. J. Pharmacology of the tachykinin systems. In: **Neuropeptides and their receptors**. Schwartz, T. W.; Hilsted, L. M.; Rehfeld, J. F. (eds), Copenhagen, Munksgaard, pp. 363-372, 1990.

JACKSON, B.; MENDEL-SOHN, F. A. & JOHNSTON, C. I. Angiotensin –converting enzyme inhibition: Prospects for the Future. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **18**: 4-8, 1991.

JESSOP, D. S.; CHOWDREY, H. S.; BISWAS, S.; LIGHTMAN, S. L. Substance P and substance K in the rat hypothalamus following monosodium glutamate lesions of the arcuate nucleus. **Neuropeptides**, **18**: 165-170, 1991.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT; GISPEN, W. H. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behav. Neural Biol.**, **25**: 563-572, 1979.

JOOS, G. F.; KIPS, J. C.; PELEMAN, R. A.; PAUWELLS, R. A. Tachykinin antagonists and the airways. **Arch. Int. Pharmacol. Ther.**, **329**: 205-220, 1995.

JU, G.; LIU, S. J.; ZHANG, X. Peptidergic innervation of the pars distalis of the adenohypophysis. **Neuroendocrinology**, **53** (Suppl. 1): 41-44, 1991.

KANAZAWA, I.; JESSELL, T. Post-mortem changes and regional distribution of substance P in the rat and mouse nervous system. **Brain Res.**, **117**: 362-367, 1976.

KARAGIANNIS, K.; MANOLOPOULOU, A.; POULOS, C.; STAVROPOULOS, G. Synthesis of substance P C-terminal hexapeptide analogues and their biological activity. Analogues with antagonistic activity without containing D-amino acids. **Eur. J. Med. Chem.**, **29**: 667-673, 1994.

KATZ, R. J. Substance P elicited grooming in the mouse: behavioral and pharmacological characteristics. **Intern. J. Neurosci.**, **10**: 187-189, 1980.

KENT, J. M.; SANJAY, J. M.; JACK, M. G. Molecular targets in the treatment of anxiety. **Biol. Psychiat.**, **52**: 1008-1030, 2002.

KHAWAJA, A. M.; ROGERS, D. F. Tachykinin. Receptor to effector. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, **28**: 721-738, 1996.

KOSTEL, K. L.; LUNTE, S. M. Evaluation of capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection for the determination of substance P and its metabolites. **J. Chromatogr.**, **695**: 27-38, 1997.

KOTANI, M.; MOSHIMARU, M. NAWA, M.; NAKANISHI, S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **83**: 7074-7078, 1986.

KRAMER, M. S.; CUTLER, N.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J.; SRAMEK, J. J.; REINES, S. A.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT, K. 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.; SIMITH, D.; RUPNIAK, N. M. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science**, **281**: 16040-1645, 1998.

KRAMER, M. S.; CUTLER, N. R.; FEIGHNER, J.; SHRIVASTAVA, R.; CARMAN, J. S.; LIU, G.; SNAVELY, D.; WYATT-KNOWLES, E.; REINES, S. A.; RUPNIAK, N. M. Clinical profile of substance P antagonists. **Biol. Psychiat.**, **47**: 1S-173S, 2000.

KRASE, K.; KOCH, M.; SCHNIZLER, N. -U. Substance P is involved in the sensitization of the acoustic startle response by footshock in rats. **Behav. Brain Res.**, **63**: 81-88, 1994.

KRAUSE, J. E.; CHIRGWIN, J. M.; CARTER, M. S.; XU, Z. S.; HERSHEY, A. D. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **84**: 881-885, 1987.

KRAUSE, J. E.; STAVETEIG, P. T.; MENTZER, J. N.; SCHMIDT, S. K.; TUCKER, J. B.; BRODBECK, R. M.; BU, J. Y. e KARPITSKIY, V. V. Functional expression of a novel human neurokinin-3 receptor homolog that binds [³H]senktide and [¹²⁵I-MePhe⁷] neurokinin B, and is responsive to tachykinin peptides agonists. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 310-315, 1997.

KREEGER, J. S.; LARSON, A. A., The substance P amino-terminal metabolite substance P (1-7), administered peripherally, prevents the development of acute morphine tolerance and attenuates the expression of withdrawal in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **279**: 662-667, 1996.

KRIS, R. M.; SOUTH, V.; SALZMAN, A.; FELDER, S.; RICCA, G. A.; JAYE, M.; HUEBNER, K.; KAGAN, J.; CROCE, C. M.; SCHLESSINGER, J. Cloning and expression of the human substance K receptor and analysis of its role in mitogenesis. **Cell Growth Differ.**, **2**: 15-22, 1991.

KURTZ, M. M.; WANG, R.; CLEMENTS, M. K.; CASCIERI, M. A.; AUSTIN, C. P.; CUNNINGHAM, B. R.; CHICCHI, G. G.; LIU, Q. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. **Gene**, **296**: 205-212, 2002.

LANTZ, I.; NYBERG, F. & TERENIUS, L. Molecular heterogeneity angiotensin converting enzyme in human cerebrospinal fluid. **Bioch. Int.**, **23**: 941-948, 1991.

LAPIZ, M. D. S.; HOGG, S. Can the effects of neurokinin (NK) antagonists in tonic immobility in guinea pigs be influenced by the 5-HT system ? **32nd SFN Annual Meeting, Orlando-Florida, USA**. Painel 683.14, 2002.

LE BARS, D.; BOURGOIN, S.; VILLANUEVA, L.; CLOT, A. M.; HAMON, M.; CESSÉLIN, F. Involvement of the dorsolateral funiculi in the spinal release of Met-enkephalin-like material triggered by heterosegmental noxious mechanical stimuli. **Brain Res.**, 412 (1):190-195, 1987.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C. A. Peripheral actions of tachykinins. **Neuropeptides**, **34**: 303-313, 2000.

LEMBECK, F.; HOLZER, P.; SCHWEDITSH, M.; GAMSE, R. Elimination of substance P from the circulation of the rat and its inhibition by bacitracin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, **305**: 9-16, 1978.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, **92**: 180-185, 1987.

LIU, H.; CAO, Y.; BASBAUM, A. L.; MAZARATI, A. M.; SANKAR, R.; WASTERLAIN, C. G. Resistance to excitotoxin-induced seizures and neuronal death in mice lacking the preprotachykinin A gene. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, **96**: 12096-12101, 1999a.

LIU, MAZARATI, A. M.; KATSUMORI, H.; SANKAR, R.; WASTERLAIN, C. G. Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus, and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, **96**: 5286-5291, 1999b.

LIU, R.; DING, Y.; AGHAJANIAN, G. E. Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. **Neuropsychopharmacol.**, **27**: 329-340, 2002.

LJUNGDAHL, A.; HÖKFELT, T. & NILSSON, G. Distribution of substance P-like immunoreactive in the central system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. **Neurosci.**, **3**: 861-943, 1978.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. **J. Autonom. Pharmacol.**, **13**: 23-93, 1993.

MAGGI, C. A. The mammalian tachykinin receptors. **Gen. Pharmacol.**, **26**: 911-944, 1995.

MAGGI, C. A.; SCHWARTZ, T. W. The dual nature of the tachykinin NK₁ receptor. **TIPs**, **18**: 351-355, 1997.

MAGGIO, J. E.; SANDBERG, B. E. B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L. L.; SANTIKAN, S. Substance K: a novel tachykinin in mammalian spinal cord. In: **Substance P**. SKRABANEK, P. (Eds), Boole, Dublin, pp. 20-21, 1983.

MAGGIO, J. E. Tachykinins. **Ann. Rev. Neurosci.**, **11**: 13-28, 1988.

MAHALILIK, T. J. Direct demonstration of interactions between substance P-immunoreactive terminals and tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the substantia nigra of the rat: an ultrastructural study. **Synapse**, **2**: 508-515, 1988.

MAI, J. K.; STEPHENS, P. H.; HOPE, A.; CUELLO, A. C.; Substance P in the human brain. **Neurosci.**, **17**: 709-739, 1986.

MANTYH, P. W.; ROGERS, S. D.; GHILARD, J. R.; MAGGIO, J. E.; MANTYH, C. R.; VIGNA, S. R. Differential expression of two isoforms of the neurokinin-1 (substance P) receptor *in vivo*. *et al.* **Brain Res.**, **719**: 8-13, 1996.

MARKSTEINER, J.; SARIA, A.; MILLER, C. H.; KRAUSE, J. E. Increased synthesis of neurokinin B and enkephalin after chronic haloperidol treatment. **Regul. Pept.**, **46**: 349-351, 1993.

MATSAS, R.; FULCHER, I.S.; KENNY, A. J.; TURNER, S. H. Substance P and Leu-enkephalin are hydrolysed by enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**: 3111-3115, 1983.

MATSAS, R.; KENNY, A. J.; TURNER, A. J. The metabolism of neuropeptides: the hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues by endopeptidase 24.11. **Biochem. J.**, **223**: 433-440, 1984.

MATSAS, R.; RATTRAY, M.; KENNY, A. J.; TURNER, A. J. The metabolism of neuropeptides – Endopeptidase 24-11 in human synaptic membrane preparations hydrolyses substance P. **Biochem. J.**, **228**: 487-492, 1985.

MAUBACH, K. A.; RUPNIAK, N. M. J.; KRAMER, M. S.; HILL, R. G. Novel strategies for pharmacotherapy of depression. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, **3**: 481-488, 1999.

MAUBORGNE, A.; BOURGOIN, S.; BENOLIEL, J.-J.; HIRSCH, M.; BERTHIER, J.-L.; HAMON, M.; CESSÉLIN, F. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, **243**: 674, 1987.

MERIGHI, A.; POLAK, J. M.; GIBSON, S. J.; GULBENKIAN, S.; VALENTION, K. N.; PEIRONE, S. M. Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. **Cell Tissue Res.** **254**: 101-109, 1988.

MEREGHI, A. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. **Prog. Neurobiol.**, **66**: 161-190, 2002.

McLAY, R. M.; PAN, W.; KASTIN, A. Effects of peptides on animal and human behavior: A review of studies published in the first twenty years of the journal *Peptides*. **Peptides**, **22**: 2181-2255, 2001.

MITSUHASHI, M.; OHASHI, Y.; SHICHILO, S.; CHRISTIAN, C.; SUDDUTH, K. J.; HARROWE, G.; PAYAN, D. G. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor. **J. Neurosci. Res.**, **32**: 437-443, 1994.

MITSUSHIO, H.; TAKASHIMA, M.; MATAGA, N.; TORU, M. Effects of chronic treatment with trihexyphenidyl and carbamazepine alone or in combination with haloperidol on substance P content in rat brain: a possible implication of substance P in affective disorders. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **245**: 982-989, 1988.

MONGEAU, R.; DE OCA, B. M.; FANSELOW, M. S. & MARSDEN, C. A. Differential effects of neurokinin-1 receptor activation in sub-regions of the periaqueductal gray matter on conditional and unconditional fear behaviors in rats. **Behav. Neurosci.**, **112**: 1125-1135, 1998.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effect of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 281-290, 1985.

MORI, M.; YOKOTA, Y.; YASUE, M.; SERIKAWA, T.; YAMADA, J. Assignment of the rat genes coding for substance P receptor, substance K receptor, and neuromedin K receptor to chromosomes 4, 20 and 2, respectively. **Cytogenet. Cell Genet.**, **60**: 222-223, 1992.

MUNEKATA, E.; KUBO, K.; TANAKA, M.; OSAKADA, F. Structure-activity studies on heptapeptide derivatives related to substance P, neurokinin A, B and other tachykinin on smooth muscle. **Peptides**, **8**: 196,1987.

MUSSAP, C. J.; GERAGHTY, D. P.; BURCHER, E. Tachykinin receptors: a radioligand binding perspective. **J. Neurochem.**, **60**: 1987-2009, 1993.

MYERS, R. D. Neuroactive peptides: unique phases in research on mammalian brain over three decades. **Peptides**, **15**: 367-381, 1994.

NAKAJIMA, Y.; TSUCHIDA, K.; NEGISHI, M.; ITO, S.; NAKANISHI, S. Direct linkage of three tachykinin receptors to stimulation of bath phosphatidyl-inositol hydrolysis and cyclic AMP cascades in transfected Chinese hamster ovary cells. **J. Biol. Chem.**, **267**: 2437-2442, 1992.

NAKANISHI, S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations and regulation. **Physiol. Rev.** **67**: 1117-1142, 1987.

NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. **Ann. Rev. Neurosci.** **14**: 123-136. 1991.

NAWA, M.; MIROSE, T.; TAKASHIMA, M.; INOYAMA, S.; NAKANISHI, S. Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine substance P precursor. **Nature**, **306**: 32-36, 1983.

NAWA, M.; KATANI, M.; NAKANISHI, S. Tissue specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. **Nature**, **312**: 729-734, 1984.

NIKOLAUS, S.; HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R. U. The neurokinin-1 receptor antagonist WIN 51,708 attenuates the anxiolytic-like effects of ventral pallidal substance P injection. **Neuroreport**, **10**: 2293-2296, 1999.

NIKOLAUS, S.; HUSTON, J. P.; HASENÖHRL, R. U. Anxiolytic-like effects in rats produced by ventral pallidal injection of both N- and C-terminal fragments of substance P. **Neurosci. Lett.**, **283**: 37-40, 2000.

NITSCH, R.; LERANTH, C. Substance P-containing hypothalamic afferents to the monkey hippocampus: an immunocytochemical, tracing and coexistence study. **Exp. Brain Res.**, **101**: 231-240, 1994.

NYBERG, F.; LE GREVES, P.; SUNDQVIST, C. TERENIUS, L. Characterization of substance P (1-7) and (1-8) generating enzyme in human cerebrospinal fluid. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **125**: 244-250, 1984.

NUSSDORFER, G. G.; MALENDOWICZ, L. K. Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo – pituitary – adrenal axis. **Peptides**, **5**: 949-968, 1998.

O'DONOHUE, T. L.; HELKE, C. J.; BURCHER, E.; SHULTS, C. W.; BUCK, S. H. Autoradiographic distribution of binding sites for iodinated tachykinins in the rat central nervous system. In: **Substance P and neurokinins**. HENRY, J. L.; COUTURE, R.;

CUELLO, A. C.; PELLETIER, G.; QUIRION, R. e REGOLI, D. (Eds.), New York: Springer-Verlag, 93-95, 1987.

OBLIN, A.; DANSE, M. J.; ZIVKOVIC, B. Degradation of substance P by membrane peptidases in the rat substantia nigra: effect of selective inhibitors. **Neurosci. Lett.**, **84**: 91-96, 1988.

OLIVIER, B.; MOLEWIJK, E.; van OORSCHOT, R.; van der POEL, G.; ZETHOF, T.; van der HEYDEN & MOS, J. New animals models anxiety. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, **4**: 93-103, 1994.

OLSEN, C. K.; HOGG, S.; LAPIZ, M. D. S. Tonic immobility in guinea pigs: A behavioural response for detecting anxiolytic-like effect ? **Behav. Pharmacol.**, **13**: 261-269, 2002.

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

PAPP, M.; VASSOUT, A.; GENTSCH, C. The NK₁-receptor antagonist NKP 608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depression in rats. **Behav. Brain Res.**, **115**: 19-23, 2000.

PATACCHINI, R.; MAGGI, C. A. Tachykinin receptors and receptors subtypes. **Arch. Intern. Pharmacol. Ther.**, **329**: 161-183, 1995.

PATACCHINI, R.; COX, H. M.; STAHL, S.; TOUGH, I. R.; MAGGI, C. A. Tachykinin NK₂ receptor mediates contraction and ion transport in rat colon by different mechanisms. **Eur. J. Pharmacol.**, **415**: 277-283, 2001.

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

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug on effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **24**: 525-529, 1986.

PENNY, G. R.; AFSHARPOUR, S.; KITAI, S. T. The glutamate decarboxylase-, leucine enkephalin-, methionine enkephalin- and substance P-immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: evidence for partial population overlap. **Neurosci.**, **17**: 1011-1045, 1986.

PERSSON, S.; POST, C.; HOLMDAHL, R.; NYBERG, F. Decreased neuropeptide-converting enzyme activities in cerebrospinal fluid during acute but not chronic phases of collagen induced arthritis in rats. **Brain Res.**, **581**: 273-282, 1992.

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

PORSOLT, R. D.M.; CARTUR, R. A.; LENÈGRE, A. Psychotropic screening procedures. In: **Method. Behav. Pharmacol.**, HAAREN, F.V. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, **10**: 23-51, 1993.

PLENDERLEITH, M. B.; HALLER, C. J.; SNOW, P. J. Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. **Synapse**, **6**: 344-350, 1990.

PRADIER, L.; MÉNAGER, J.; LE GUERN, J.; BOCK, M. D.; HEUILLET, E.; FARDIN, V.; GARRET, C.; DOBLE, A.; MAYAUX, J. F. **Mol. Pharmacol.**, **45**: 287-293, 1994.

PRESTON, Z.; LEE, K.; WIDDOWSON, L.; RICHARD, P. J.; PINNOCK, R. D. Tachykinins increase [³H]acetylcholine release in mouse striatum through multiple receptor subtypes. **Neurosci.**, **32**: 51-60, 2000.

QUARTARA, L.; PATACHINI, R.; GOTO, C.; ROVERO, P. & MAGGI, C. A. Importance of the C-Terminal amide for biological activity of neurokinin A derivative. **Neuropeptides**, **22**: 54, 1992.

RAFFA, R. B. Possible role(s) of neurokinins in CNS development and neurodegenerative or other disorders. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, **6**: 789-813, 1998.

RAVARD, S.; BETSCHART, J.; FARDIN, V.; FLAMAND, O.; BLANCHARD, J. C. Differential ability of tachykinin NK-1 and NK-2 agonists to produced scratching and grooming behaviours in mice. **Brain Res.**, **651**: 199-208, 1994.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. **Life Sci.**, **40**: 109-117, 1987.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; COUTURE, R. New selective agonists for neurokinin receptors: pharmacological tools for receptor characterization. **TIPs**, **9**: 290-295, 1988.

REGOLI, D.; DRAPEAU, G.; DION, S.; D'ORLÉANS-JUSTE, P. Receptors for substance P and related tachykinins. **Pharmacology**. **38**, 1-15. 1989.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. C. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 551-589, 1994.

RIBEIRO, S. J.; DE LIMA, T. C. M. Naloxone-induced changes in tachykinin NK₃ receptor modulation of experimental anxiety in mice. **Neurosci. Lett.**, **258**: 1-4, 1998.

RIBEIRO, S. J.; TEIXEIRA, R. M.; CALIXTO, J. B.; DE LIMA, T. C. M. Tachykinin NK₃ receptor involvement in anxiety. **Neuropeptides**, **33**: 181-188, 1999.

RODGERS, R. J.; 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.; 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.; CAO, B. -J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **30**: 289-304, 1997.

RODGERS, R. J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T. J.; BRAIN, P. F. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiol. Behav.**, **68**: 47-53, 1999.

ROELING, T. A. P.; VAN ERP, A. M. M.; MELLIS, W.; KRUK, M. R.; VEENING, J. G. Behavioural effects of NMDA injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Brain Res.**, **550**: 220-224, 1991.

ROELING, T. A. P.; VEENING, J. G.; PETERS, J. P. W.; VERMELIS, M. E. J.; NIEUWENHUYIS, R. Efferent connections of the hypothalamic “grooming area” in the rat. **Neurosci.**, **1**: 199-225, 1993.

ROSÉN, A.; BRODIN, K.; ENEROTH, P.; BRODIN, E. Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the periaqueductal grey and limbic regions of rat brain. **Acta Physiol Scand.**, 146 (3): 341-348, 1992.

RUPNIAK, N. M. J.; KRAMER, M. S. Discovery of the antidepressant and anti-emetic efficacy of substance P receptor (NK₁) antagonists. **TIPs**, 20(12), 485-490, 1999.

RUPNIAK, N. M. J.; CARLSON, E. C.; HARRISON, T.; OATES, B.; SEWARD, E.; OWEN, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.; WHEELDON, A. Pharmacological blockage or genetic deletion of substance P (NK₁) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacology**, **39**: 1413-1421, 2000.

RUPNIAK, N. M. J.; CARLSON, E. J.; WEBB, J. K.; HARRISON, T.; PORSOLT, R. D.; ROUX, S.; DE FELIPE, C.; HUNT, S. P.; OATES, B.; WHEELDON, A. Comparison of the phenotype of NK₁R^{-/-} mice with pharmacological blockade of the substance P (NK₁) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. **Behav. Pharmacol.**, **12(6-7)**: 497-508, 2001.

SAGAN, S.; CHASSAING, G.; PRADIER, L.; LAVIELLE, S. **J. Pharm. Exp. Ther.**, **276**: 1039-1048, 1996.

SAKURADA, T.; LE GREVES, P.; STEWART, J.; TERENIUS, L. Measurement of substance P metabolites in rat CNS. **J. Neurochem.**, **44**: 718-722, 1985.

SAKURADA, T.; TAN-NO, K.; YAMADA, T.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Phosphoramidon potentiates mammalian tachykinin-induced biting, licking and scratching behaviour in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **37**: 779-783, 1990.

SAKURADA, T.; WATANABE, C.; SAKURADA, S.; TAN-NO, K.; SAKURADA, T. Major metabolites of substance P degraded by spinal synaptic membranes antagonize the behavioral response to substance P in rats. **J. Pharm. Sci.**, **88**: 1127-1132, 1999.

SANGER, D. J. Animal models of anxiety and the screening and development of novel anxiolytic drugs. In: BOUTON, A.; BAKER, G. & MARTIN-IVERSON, M. (Eds). New York. **The human Press Inc.**, **19**: 147-186, 1991

SANTARELLI, L.; GOBBI, G.; DEBS, P.C.; SIBILLE, E. L.; BLIER, P.; HEN, R.; HEALTH, M. J. S. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 1912-1917, 2001.

SCHEDLOWSKI, M.; FLUGE, T.; RICHTER, S.; TEWES, U.; SCHMIDT, R.E.; WAGNER, T.O. Beta-endorphin, but not substance P, is increased by acute stress in humans. **Psychoneuroendocrinology**, **20**: 103-110, 1995.

SEABROOK, G. R.; FONG, T. M. Thapsigargin blocks the mobilisation of intracellular calcium caused by activation of human NK₁ receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. **Neurosci. Lett.**, **152**: 9-12, 1993.

SEVERINI, C.; IMPROTA, G.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.; SALVADORI, S.; ERSPAMER, V. The tachykinin peptide family. **Pharmacol. Rev.**, **54**: 285-322, 2002.

SHAIKH, M. B.; STEINBERG, A.; SIEGEL, A. Evidence that substance P is utilized in medial amygdaloid facilitation of defensive rage behavior in the cat. **Brain Res.**, **625** (2): 283-294, 1993.

SHAIKH, M. B.; SIEGEL, A. Neuroanatomical and neurochemical mechanisms underlying amygdaloid control of defense rage behavior in the cat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **27**: 2759-2779, 1994.

SHEPERD, J. K.; GREWAL, S. S.; FLETCHER, A.; BILL, D.J. & DOURISH, C. T. Behavioral and pharmacological characterization of elevated "zero-maze" as animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, **116**: 56-64, 1994.

SHIRAYAMA, Y.; MITSUSHIO, H.; TAKASHIMA, M.; ICHIKAWA, H.; TAKAHASHI, K. Reduction of substance P after chronic antidepressant treatment in the striatum, substantia nigra and amygdala of the rat. **Brain Res.**, **739**(1-2):70-78, 1996.

SHULTS, C. W.; QUIRION, B.; CHRONWALL, B.; CHASE, T. N.; O'DONOHUE, T. L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, **5**: 1097-1128, 1984.

SIEGEL, R. A.; DUKER, E. M.; FUCHS, E.; PAHNKE, U.; WUTTKE, W. Responsiveness of mesolimbic, mesocortical, septal and hippocampal cholecystokinin and substance P neuronal system to stress in the male rat. **Neurochem. Int.**, **6**: 783-789, 1984.

SILVA, R. C.; BRANDÃO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **65**: 209-216, 2000.

SKILLING, S. R.; SMULLIN, D. H.; LARSON, A. A. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. **J. Neurosci.**, **10**: 1309-1318, 1990.

SMITH, G. S. T.; SAVERY, D.; MARDEN, C.; COSTA, J. J. L.; AVERILL, S.; PRIESTLEY, J. V.; RATTRAY, M. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. **J. Comp. Neurol.**, **350**: 23-40, 1994.

SNIDER, S. H. Brain peptides as neurotransmitters. **Science**, **209**: 976-983, 1980.

SPIELBER, C. D.; GORSUCH, R. L.; LUSHENE, R. E. **Manual for the state-trait anxiety inventory**. Palo Alto, CA: Consultant Psychologist Press, 1970.

SPRUIJT, B. M.; COOLS, A. R.; GISPEN, W. H. The periaqueductal gray: a prerequisite for ACTH induced excessive grooming. **Behav. Brain Res.**, **20**: 19-25, 1986.

STEINBERG, R.; MARCO, N.; VOUTSINOS, B.; BENSALD, M.; RODIER, D.; SOUILHAC, J.; ALONSO, R.; OURY-DONAT, F.; LE FUR, G.; SOUBRIE, P. Expression and presence of septal neurokinin-2 receptors controlling hippocampal acetylcholine release during sensory stimulation in rat. **Eur. J. Neurosci.**, **10**: 2337-2345, 1998.

STOECKEL, M. E.; PORTE, A.; KLEIN, M. J.; CUELLO, A. C. Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse compared with the distribution of other neuropeptides. **Cell Tissue Res.**, **223**: 533-544, 1982.

STOESSL, A. J.; BRACKSTONE, M.; RAJAKUMAR, N.; GIBSON, C. J. Pharmacological characterization of grooming induced by a selective NK₁ tachykinin receptor agonist. **Brain Res.**, **700**: 115-120, 1995.

STRATTON, S. C.; BERESFORD, I. J. M.; HARVEY, F. J.; TUROIN, M. P.; HAGAN, R. M.; TYERS, M. B. Anxiolytic activity of tachykinin NK₂ receptor antagonists in the mouse light-dark box. **Eur. J. Pharmacol.**, **250**: 11-12, 1993.

STRATTON, S. C.; BERESFORD, I. J. M.; HAGAN, R. M. GR 159897, a potent non-peptide tachykinin NK₂ receptor antagonist, releases suppressed behaviors in a novel aversive environment. **Br. J. Pharmacol.**, **112**: 49p, 1994.

STRITTMATTER, M.; ISENBERG, E.; GRAUER, M. T.; HAMANN, G. G.; SCHIMRIGK, H. K. CSF substance P, somatostatin and monoaminergic transmitter metabolites in patients with narcolepsy. **Neurosci. Lett.**, **218**: 99-102, 1996.

SUER, C.; DOLU, N.; OZESMI, C.; SAHIN, O.; ULGEN, A. The relation between skin conductance level and plus-maze behavior in male mice. **Physiol. Behav.**, **64**: 573-576, 1998.

TAKAMAYA, H.; OTA, K.; OGAWA, N. Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. **Regul. Pep.**, **15**: 239-248, 1986.

TAKEDA, Y.; BLOUNT, P.; SACHAIS, B. S.; HERSHEY, A. D.; RADDATZ, R.; KRAUSE, J. Ligand binding kinetics of substance P and neurokinin A receptors stably expressed in chinese hamster ovary cells and evidence for differential stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate and cyclic AMP second messenger responses. **J. Neurochem.**, **59**: 740-745, 1992.

TEIXEIRA, R. M.; SANTOS, A. R.; RIBEIRO, S. J.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A.; DE LIMA, T. C. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **311**: 7-14, 1996.

TOMAZ, C.; HUSTON, J. P. Facilitation of conditioned inhibitory avoidance by post-trial peripheral injection of substance P. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **25(2)**: 469-472, 1986.

TOMAZ, C.; NOGUEIRA, P. J. C. Facilitation of memory by peripheral administration of substance P. **Behav. Brain Res.**, **83**: 143-145, 1997.

TRACZYK, W. Z.; KUBICKI, J. The pressor response of substance P and hexapeptide [pGlu⁶] SP 6-11 injections into the cerebral ventricles in rats. **Neuropharmacology**, **19**: 607-611, 1981.

TSCHÖPE, C.; JOST, N.; UNGER, T.; CULMAN, J. Central cardiovascular and behavioral effects of carboxy- and amino-terminal fragments of substance P in conscious rats. **Brain Res.**, **690**: 15-24, 1995.

UNGER, T.; CAROLUS, S.; DEMMERT, G.; GANTEN, D.; LANG, R. E.; MASER-GLUTH, C.; STEINBERG, H.; VEELKEN, R. Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. **Circ. Res.**, 63 (4): 812-820, 1988.

VAN ERP, A. M. M.; KRUK, M. R.; MEELIS, W.; VEENING, J. G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming induced electrically. **Behav. Brain Res.**, 59: 95-101, 1993.

VARTY, G. B.; COHEN-WILLIAMS, M. E.; MORGAN, C. A.; PYLAK, U.; DUFFY, R. A.; LACHOWICZ, J. E.; CAREY, G. J.; COFFIN, V. L. The gerbil elevated-plus maze II: Anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK₁ receptor antagonists. **Neuropsychopharmacol.**, *in press*, 2002.

VASSOUT, A.; VEENSTRA, S.; HAUSER, K.; OFNER, S.; BRUGGER, F.; SCHILLING, W.; GENTSCH, C. NKP608: a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. **Regul. Pep.**, 96(1-2): 7-16, 2000.

VON EULER. Untersuchungen über Substanz P, die atropinfeste, darmerregende und gefäßweit-ernde Substanz aus Darm und Hirn. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 181: 181-197, 1936.

VON EULER, U. S.; GADDUM, J. H. An unidentified depressor in certain tissue extracts. **J. Physiol.**, 72: 74-87, 1931.

VON EULER, U. S.; PERNOW, B. (Eds). Substance P. **Nobel Symposium**, 37. Raven Press, New York, 1977.

WALSH, D. M.; STRATTON, S. C.; HARVEY, F. J.; BERESFORD, I. J. M.; 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.

WANG, L.; SADOON, E.; STEPHENS, R. E.; WARD, P. E. Metabolism of substance P and neurokinin A by human vascular endothelium and smooth muscle. **Peptides**, 15: 497-503, 1994.

WATLING, K. J.; GUARD, S.; KRAUSE, J. E.; TAKEDA, Y.; QUIRION, R.; ZARNEGAR, R.; PAIN, D.; FRANKS, R. On the presence of NK₂ receptor subtypes in peripheral and central tissues. **Regul. Pep.**, **46**: 311-313, 1993.

WEISS, D. W.; HIRT, R.; TARCIC, N.; BERZON, Y.; BEM-ZUR, H.; BREZNITZ, S.; GLASER, B.; GROVER, N.B.; BARAS, M.; O'DORISO, T. M. Studies in psychoneuroimmunology: psychological, immunological, and neuroendocrinological parameters in Israeli civilians during and after a period of Scud missile attacks. **Behav. Med.**, **22**: 5-14, 1996.

WHELPTON, R.; MICHAEL-TITUS, A. T.; STEPHENS, S. M.; YAU, K. W.; FENGAS, D. Identification of substance P metabolites using a combination of reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.**, **716**: 95-106, 1998.

WIJKHUISEN, A.; SAGOT, M.-A.; FROBERT, Y.; CRÉMINON, C.; GRASSI, J.; BOQUET, D.; COURAUD, J.-Y. Identification in the NK₁ tachykinin receptor of a domain involved in recognition of neurokinin A and septide but not substance P. **FEBS Lett.**, **447**: 155-159, 1999.

WILLIAMS, T. A.; HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. Characterization of neuronal and endothelial forms of angiotensin converting enzyme in pig brain. **J. Neurochem.**, **57**: 193-1991.

WÖRSER, V.; LAUFER, R.; MART, Y.; CHOREV, M.; GILON, C.; SELINGER, Z. Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. **EMBO J.**, **5**: 2805-2808, 1986.

YAKSH, T. L.; JESSELL, T. M.; GAMSE, R.; MUDGE, A. W.; LEEMAN, S. E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, **286 (5769)**: 155-157, 1980.

YOKOSAWA, H.; ENDO, S.; OGURA, Y.; ISHII, S-I. A new feature of angiotensin-converting enzyme in the brain: hydrolysis of substance P. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **116**: 735-742, 1983.

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

ZERARI, F.; KARPITSKIY, V.; KRAUSE, J.; DESCARRIES, L.; COUTURE, R. astroglial distribution of neurokinin-2 receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. **Neurosci.**, **84**: 1233-1246, 1998.

ZHANG, Y.; LU, L.; FURLONGER, C. WU, G. E.; PAIGE, C. J. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. **Nat. Immunol.**, **1**: 392-397, 2000.