

**LEANDRO FRANCO VENDRUSCOLO**

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE NOCICEPÇÃO E  
ANSIEDADE EM DUAS LINHAGENS DE RATOS, LEWIS E SHR,  
CONTRASTANTES PARA A ANSIEDADE: ENVOLVIMENTO DA  
SUBSTÂNCIA P E DOS RECEPTORES NK1.**

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

**Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi**

**Co-orientador: Prof. Dr. André Ramos**

**FLORIANÓPOLIS, 2003.**

VENDRUSCOLO, Leandro Franco. **Respostas comportamentais de nocicepção e ansiedade em duas linhagens de ratos, Lewis e SHR, contrastantes para a ansiedade: Envolvimento da Substância P e dos receptores NK1.** Florianópolis, 2003, 71 p. Dissertação de Mestrado em Farmacologia – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi

Co-orientador: Prof. Dr. André Ramos

Defesa: 20/02/2003

A ansiedade, ao mesmo tempo em que é influenciada por fatores genéticos, pode modular a reatividade à dor. As linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR), exibem altos e baixos níveis de ansiedade. O presente estudo investigou a reatividade nociceptiva de ratos LEW e SHR de ambos os sexos no teste da formalina e os efeitos da injeção central de SP sobre estas respostas. Além disso, investigou-se os efeitos de um antagonista de receptores NK1, o NKP608, nestas duas linhagens no labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste do campo aberto (TCA). Os resultados indicaram que ratos LEW de ambos os sexos exibiram uma maior reatividade nociceptiva comparados a ratos SHR. A administração central de SP causou um aumento significativo dos comportamentos nociceptivos somente em ratos LEW machos. Todas as doses de NKP608 produziram efeitos do tipo ansiolítico, similar aqueles do CDZ, em ratos SHR machos testados no TCA, mas não no LCE. Por outro lado, este composto teve um efeito ansiolítico parcial para LEW machos (e, em um menor grau, para fêmeas SHR) no LCE, mas não no TCA. Fêmeas LEW não foram afetadas após os tratamentos. Estes resultados sugerem que os níveis basais de ansiedade dos ratos LEW e SHR podem estar associados às diferenças na nocicepção. Estes resultados também sugerem que os efeitos da SP sobre a nocicepção e do NKP608 sobre a ansiedade são linhagem-, sexo- e teste-dependentes e demonstram que as linhagens LEW e SHR constituem um modelo genético útil, não só para estudos comportamentais ligados à ansiedade, mas também para o estudo da dor e, talvez, da relação desta com fatores psicológicos.

Palavras-chave: Nocicepção; ansiedade; emocionalidade; Lewis; SHR; teste da formalina; campo aberto; labirinto em cruz elevado; substância P; NKP-608.

“ A capacidade de realizar nossos sonhos, depende da vontade de querer inovar, adquirir conhecimento e ampliar nossa visão” .

Nana

“ Eu poderia viver recluso numa casca de noz e me considerar rei do espaço infinito ...”

Shakespeare (Hamlet, ato 2, cena 2)

“ Hamlet talvez quisesse dizer que, embora nós, seres humanos, sejamos muito limitados fisicamente, nossas mentes estão livres para explorar todo o universo e para avançar audaciosamente para onde até mesmo jornada nas estrelas teme seguir” .

Stephen W. Hawking

**Aos meus pais, Lêdo e Leda, pelo imenso amor e carinho, responsáveis por tudo de bom que eu tenho. À Janaína, minha companheira e amiga, incentivadora em todos os momentos.**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Reinaldo Naoto Takahashi por ter me dado a oportunidade de conhecer a beleza da pesquisa, orientando-me com sabedoria, paciência e exigência ao mesmo tempo, desde minha iniciação científica. Induziu-me a um constante aprimoramento nesta breve carreira científica; com o passar do tempo, fui conhecendo o seu caráter bondoso e humano, conquistando sua confiança e amizade.

Ao professor Dr. André Ramos pela confiança depositada em mim, repassando um pouco do seu conhecimento e exemplo de pesquisador. Pela dedicação, atenção, e enorme contribuição para a realização deste trabalho, bem como o constante incentivo para eu seguir a difícil carreira da pesquisa.

À minha família, especialmente meus pais Lêdo e Leda; meus irmãos e cunhadas: Jú e Cris, Cado e Lisa, pelo amor e apoio incondicional.

À Jana, companheira e amiga; e seus pais, Darci e Márcia, que me tratam como se eu fosse um de seus filhos. Ao cunhado e sua esposa, Alexandre e Paula, pela amizade.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pela excelência em ensinar, contribuindo para a minha formação. Agradeço, em especial, a professora Dra. Thereza, pelas sugestões e pela pronta disponibilização de resultados obtidos em conjunto para constituir parte deste trabalho.

Aos professores doutores Carlos Alberto Bezerra Tomaz, Gina Struffaldi Morato e Thereza C. Monteiro de Lima Nogueira, por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca examinadora, que, com experiência, contribuíram muito para melhorar a qualidade deste trabalho.

Aos colegas/amigos de laboratório George, Rui, Fabrício, Luciano, Pamplona e suas respectivas companheiras, pela agradável convivência e pelas constantes conversas,

fundamentais para o meu crescimento pessoal e científico. Aos ex-colegas do laboratório, Monique, Marcelo, Edmar, Kênia, Mônica, Geraldo, dentre outros, e especialmente ao Rubens que me ensinou os procedimentos experimentais iniciais no laboratório, e pela sua amizade até hoje.

Aos amigos da casa 110, Rodrigo, Karina, Fabrício, Carol e Michel e todos os seus frequentadores.

Aos alunos do professor André, Geison, Fedra e Luis, pela criação e cuidados com os animais e ao Gustavo que me auxiliou na realização de grande parte deste trabalho.

Aos colegas do mestrado Rui, Filipe, Jarbas, Emerson e Lúcia, pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas da pós-graduação, especialmente à Elaine Gavioli, pela sua amizade e com quem tive a oportunidade de realizar uma parte deste trabalho; e ao Juliano Ferreira pelas excelentes dicas.

A todos os funcionários do departamento de farmacologia, principalmente, Sandra, Pedro, Goretti, Diana e Rita.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

# ÍNDICE

<u>RESUMO</u> .....	I
<u>ABSTRACT</u> .....	III
<u>LISTA DE ABREVIACÕES</u> .....	V
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	VI
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	VII
<u>1- INTRODUÇÃO</u> .....	1
<u>1.1- SENSACÃO DA DOR E FATORES AFETIVO-EMOCIONAIS</u> .....	1
<u>1.2- LEWIS E SHR, UM MODELO GENÉTICO PARA O ESTUDO DA ANSIEDADE</u> .....	4
<u>1.3- ANSIEDADE E SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA : ENVOLVIMENTO DA SUBSTÂNCIA P</u> .....	7
<u>2- OBJETIVOS</u> .....	12
<u>2.1- OBJETIVOS GERAIS</u> .....	12
<u>2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u> .....	12
<u>3- MATERIAIS E MÉTODOS</u> .....	13
<u>3.1- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL</u> .....	13
<u>3.2- ANIMAIS</u> .....	14
<u>3.3- DROGAS</u> .....	15
<u>3.4- ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE DROGAS</u> .....	16
<u>3.4.1- Cirurgia Estereotáxica</u> .....	16
<u>3.4.2- Administração de drogas</u> .....	16
<u>3.4.3- Análise histológica</u> .....	17
<u>3.5- AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL</u> .....	17
<u>3.5.1- Teste da formalina</u> .....	17
<u>3.5.2- Labirinto em cruz elevado (LCE)</u> .....	19
<u>3.5.3- Teste do campo aberto (TCA)</u> .....	21
<u>3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA</u> .....	23
<u>4- RESULTADOS</u> .....	24
<u>4.1- COMPARAÇÃO LEW E SHR NO TESTE DA FORMALINA DE NOCICEPÇÃO</u> .....	24
<u>4.2- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO I. C. V. DE SP EM RATOS LEW E SHR NO TESTE DA FORMALINA DE NOCICEPÇÃO</u> .....	26
<u>4.3- EFEITOS DO NKP608 SOBRE A ANSIEDADE NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)</u> .....	28
<u>4.4- EFEITOS DO NKP608 SOBRE A EMOCIONALIDADE NO TESTE DO CAMPO ABERTO (TCA)</u> .....	34
<u>5- DISCUSSÃO</u> .....	40
<u>6- CONCLUSÕES</u> .....	57
<u>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	59





## RESUMO

Sabe-se que a ansiedade, ao mesmo tempo em que é influenciada por fatores genéticos, pode modular a reatividade à dor. As linhagens isogênicas de ratos Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR), propostas como um modelo genético para o estudo da ansiedade por exibirem altos e baixos níveis de ansiedade, respectivamente, ainda não haviam sido comparadas em modelos de nocicepção. Há décadas sabe-se que a substância P (SP) e os receptores NK1 estão implicados na transmissão nociceptiva e, mais recentemente, um número crescente de evidências indicam o envolvimento deste sistema em comportamentos relacionados à ansiedade e depressão. Uma das hipóteses para explicar as diferenças comportamentais entre as linhagens LEW e SHR implica o gene dos receptores NK1, potencialmente envolvidos com os aspectos emocionais nestas linhagens.

O objetivo inicial do presente estudo foi o de avaliar a reatividade nociceptiva das linhagens LEW e SHR, machos e fêmeas, no teste da formalina e comparar os efeitos produzidos pela injeção central de SP sobre as respostas nociceptivas nestas linhagens. Em experimentos subsequentes, investigou-se os efeitos da administração de um antagonista de receptores NK1, o NKP608, em ratos LEW e SHR avaliados em dois testes de ansiedade/emocionalidade amplamente utilizados, o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste do campo aberto (TCA).

Ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram injetados na pata traseira com formalina e avaliados durante uma hora. O número de eventos nociceptivos (retração, mordida ou lambida da pata injetada) foi utilizado como índice de nocicepção. Outros ratos destas duas linhagens receberam a injeção intracerebroventricular de SP, 29 minutos depois da injeção de formalina e avaliados da mesma forma durante 30 minutos. Grupos adicionais de animais foram testados no LCE e no TCA após administração aguda de NKP608 (0,003; 0,03 ou 0,3 mg/kg) ou clordiazepóxido (CDZ, 5 mg/kg).

Ratos LEW de ambos os sexos exibiram uma maior sensibilidade nociceptiva do que ratos SHR. A administração central de SP causou um aumento significativo da nocicepção somente em ratos LEW machos. Todas as doses de NKP608 produziram efeitos

do tipo ansiolítico, similar aqueles do CDZ, em ratos SHR machos testados no TCA, mas não no LCE. Por outro lado, este composto teve um efeito ansiolítico parcial para LEW machos (e, em um menor grau, para fêmeas SHR) no LCE, mas não no TCA. Fêmeas LEW não foram afetadas após os tratamentos.

Estes resultados sugerem que as diferenças nos níveis basais de ansiedade entre ratos LEW e SHR podem estar associadas à reatividade/sensibilidade nociceptiva contrastante destas linhagens. Estes resultados também sugerem que os efeitos da SP sobre a nocicepção e do antagonista de receptores NK1 sobre as respostas comportamentais de ansiedade/emocionalidade são linhagem-, sexo- e teste-dependentes e demonstram que as linhagens LEW e SHR constituem um modelo genético útil, não só para estudos comportamentais ligados à ansiedade, mas também para o estudo da dor e, talvez, da relação desta com fatores psicológicos.

## ABSTRACT

It is known that anxiety, which is influenced by genetic factors, can modulate reactivity to pain. The Lewis (LEW) and spontaneously hypertensive rats (SHR) inbred rat strains, proposed as a genetic model for the study of the anxiety for showing high and low levels of anxiety, respectively, have still not been compared in nociception models. It has been known for decades that the substance P (SP) and NK1 receptors are implied in nociceptive transmission and more recently, an increasing amount of evidence indicates the involvement of this system in behaviors related to anxiety and depression. One of the hypotheses to explain the behavior differences between the LEW and SHR strains implies that the gene of NK1 receptors is potentially involved with the emotional aspects of these strains.

The initial aim of the present study was to evaluate the nociceptive reactivity of LEW and SHR strains, male and female, by using the formalin test and to compare the effect produced by the central injection of SP on the nociceptive responses in these strains. Subsequent experiments were carried out to investigate the effect of the administration of an antagonist of NK1 receptors (NKP608), in LEW and SHR strains, evaluated in two widely used tests of anxiety/emotionality, the elevated plus-maze (EPM) and the open field test (OFT).

LEW and SHR rats of both sexes were injected with formalin in one hind-paw, and the nociceptive responses (retraction, bite and licking of the injected paw) were evaluated for one hour. Twenty nine minutes after the formalin injection, other rats of both strains received the injection to intracerebroventricular of SP and they were evaluated in the same manner for 30 min. Additional groups of animals were tested in the EPM and OFT after acute administration of NKP608 (0,003; 0,03 or 0,3 mg/kg) or chlordiazepoxide (CDZ, 5 mg/kg).

LEW rats of both sexes showed a higher nociceptive sensitivity compared to SHR rats. The central administration of SP caused a significant increase of nociception in LEW male rats only. All doses of NKP608 produced anxiolytic-like effects (similar to those of CDZ) in SHR males tested in the OFT but not in the EPM. Conversely, this

compound had a partial anxiolytic effect in LEW males (and to a lesser degree in SHR females) in the EPM, but not in the OFT. LEW females were unaffected following all pharmacological treatments.

These results suggest that the differences in the basal levels of anxiety between LEW and SHR rats can be associated with the contrasting nociceptive reactivity/sensitivity of these strains. The results also suggest the effect of the SP on nociception and the NK1 receptor's antagonist on the behavioral responses related to anxiety/emotionality are strain-, sex- and test-dependent. The results demonstrate that LEW and SHR strains constitute a useful genetic model, not only for the study of anxiety, but also for the study of pain and its relation to psychological factors.

## LISTA DE ABREVIATÓES

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

CDZ- Clordiazepóxido

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

ECA- Enzima conversora de angiotensina

e. p. m. – Erro-padrão da média

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

p. o. – *per os*

i. c. v. – Intracerebroventricular

i. p. – Intraperitoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

LEW – Lewis

PBS – Solução tampão-fosfato (*Physiological Buffer Solution*)

QTL – Locus para traços quantitativos

SHR – Ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats*)

SP – Substância P

TCA – Teste do campo aberto

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Caixa para avaliação das respostas nociceptivas no teste da formalina.

**Figura 2-** Labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

**Figura 3-** Arena do teste do campo aberto (TCA) para avaliação de comportamentos relacionados à emocionalidade.

**Figura 4-** Comparação das respostas nociceptivas em ratos LEW e SHR de ambos os sexos na Fase 1 e Fase 2 do teste da formalina.

**Figura 5-** Comparação das respostas nociceptivas em ratos LEW e SHR de ambos os sexos tratados com substância P (10 pmol) ou veículo por via intracerebroventricular e avaliados na Fase 2 do teste da formalina.

**Figura 6-** Tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado por ratos LEW e SHR machos tratados com clordiazepóxido, NKP608 ou veículo.

**Figura 7-** Tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado pelas ratas LEW e SHR fêmeas tratadas com clordiazepóxido, NKP608 ou veículo.

**Figura 8-** Locomoção e tempo gasto na área central e locomoção total no teste do campo aberto por ratos LEW e SHR machos tratados com clordiazepóxido, NKP608 ou veículo.

**Figura 9-** Locomoção e tempo gasto na área central e locomoção total no teste do campo aberto pelas ratas LEW e SHR fêmeas tratadas com clordiazepóxido, NKP608 ou veículo.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Medidas no labirinto em cruz elevado (% Entradas nos braços fechados, Tempo nos braços fechados (s) e Entradas totais nos braços) de ratos LEW e SHR machos.

**Tabela 2-** Medidas no labirinto em cruz elevado (% Entradas nos braços fechados, Tempo nos braços fechados (s) e Entradas totais nos braços) de ratas LEW e SHR fêmeas.

**Tabela 3-** Medidas no teste do campo aberto (Defecação e Locomoção periférica) de ratos LEW e SHR machos.

**Tabela 4-** Medidas no teste do campo aberto (Defecação e Locomoção periférica) de ratas LEW e SHR fêmeas.

# 1- INTRODUÇÃO

## **1.1- Sensação da dor e fatores afetivo-emocionais**

A Associação Internacional para o Estudo da Dor propõe que a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial” (IASP, 1994). Esta definição implica que a dor é uma experiência subjetiva, com dimensões sensoriais e afetivas que são geralmente, mas não necessariamente, associadas com um dano tecidual. A dor iniciada por estímulos nocivos (nocicepção) ativa nociceptores periféricos, com uma subsequente transmissão através de sistemas aferentes. A transmissão pode ser frequentemente modulada por sensações aferentes paralelas (p. e. o tato) ou pela ativação, centralmente mediada, de vias descendentes. Nossa reação à dor, porém, é de fato muito mais complexa do que isto.

Os sinais nociceptivos podem ser gerados por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos de alta intensidade sobre os nociceptores, que são terminações nervosas livres das fibras amielínicas do tipo C ou mielínicas finas do tipo A $\delta$ . Os corpos celulares destas fibras (aferentes primários) localizam-se nos gânglios da raiz dorsal adjacentes a medula espinhal e os prolongamentos centrais destas células adentram a medula espinhal fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem, principalmente, na substância gelatinosa (lâminas II) do corno dorsal (Grubb, 1998). Através das vias ascendentes, lateral e medial, os impulsos nociceptivos são conduzidos para estruturas superiores.

O trato espinotalâmico é uma das vias do grupo lateral, suas projeções



terminam, predominantemente, no núcleo ventrocaudal do tálamo. Desta estrutura, partem as radiações talâmicas para o córtex somestésico (neurônios de terceira ordem). Esta via é somatotopicamente organizada e envolvida com o aspecto sensitivo-discriminativo da dor (Besson, 1999). Além desta, as vias do grupo medial, terminam direta (p. e. trato paleoespinotalâmico) ou indiretamente (p. e. trato espinomesencefálico) nos núcleos mediais do tálamo medial, que após sinapse na formação reticular (tronco cerebral) e na substância cinzenta periaquedutal, projetam as vias reticulotalâmicas que emitem colaterais para o sistema límbico e para a substância cinzenta periventricular. Estas vias não são somatotopicamente organizadas e estão relacionadas ao aspecto afetivo-motivacional da dor (Russo e Brose, 1998).

Além deste complexo sistema de transmissão e reconhecimento da dor, os organismos, especialmente os mamíferos, possuem mecanismos capazes de suprimi-la. Em 1965, Melzack e Wall sugeriram objetivamente um mecanismo modulatório descendente (Teoria da Comporta). A hipótese é a existência de uma espécie de comporta no corno dorsal da medula espinhal, que, quando aberta, permitiria a passagem dos impulsos nociceptivos e, quando fechada, bloquearia a passagem destes impulsos. Presume-se que estes sistemas analgésicos endógenos existam com a finalidade de suprimir reflexos ou comportamentos de dor para facilitar a luta ou fuga frente a um perigo e desta forma, aumentar a chance de sobrevivência do indivíduo.

Situações que evocam medo ou estresse alteram drasticamente o estado de um organismo, estas alterações incluem mudanças na atividade reflexa, percepção sensorial, e atividade locomotora. Vários estudos animais sugerem que a sensibilidade nociceptiva é diminuída pelo estresse ou medo (i. e., ativação de mecanismos modulatórios

descendentes). Por exemplo, ratos submetidos a estímulos aversivos como choques nas patas, contenção, medo condicionado, natação forçada e exposição a ambientes novos, apresentam respostas atenuadas a diversos estímulos nociceptivos (Lewis *et al.*, 1980; Blair *et al.*, 1982; Cannon *et al.*, 1983; Watkins e Mayer, 1986; Vaccarino *et al.*, 1992). Por outro lado, estudos em humanos sugerem que a ansiedade pode aumentar a reatividade nociceptiva (Melzack, 1961; Chapman e Feather, 1983; Rhudy e Meagher, 2000) e um menor número de estudos observou isto em animais de laboratório (Meagher *et al.*, 1998). Pessoas com traços de alta ansiedade, freqüentemente relatam uma alta sensibilidade à dor (Dougher, 1987; Mallow *et al.*, 1987) e necessitam de maiores doses de analgésicos. Apesar destas evidências, a importância do estado afetivo-emocional na sensação da dor ainda é freqüentemente negligenciada, além de ser pouco compreendida (Stimmel, 1997).

O medo é uma reação de alarme imediata produzida pela presença de um estímulo aversivo real. Ele é caracterizado por impulsos de luta/fuga e uma excitação do sistema nervoso simpático (Barlow *et al.*, 1996). Enquanto isso, a ansiedade é caracterizada por uma sensação desagradável de apreensão e antecipação a um estímulo aversivo em potencial, e resulta em aumento da vigilância e da tensão somática. Estas alterações causam um aumento atencional (somático e ambiental) que facilita a receptividade sensorial. Por estas distinções, tem sido argumentado que o medo e a ansiedade representam, qualitativamente, estados emocionais distintos (Maier, 1993) e podem envolver diferentes circuitos neurais (Gray e McNaughton, 1996). Entretanto, o estado de ativação do sistema nervoso central para a sensação da dor pode depender destes mesmos circuitos neurais, os quais promoveriam diferentes conseqüências comportamentais dependendo do seu nível de ativação. Uma ativação intensa poderia induzir medo e analgesia, enquanto que uma ativação moderada poderia induzir ansiedade e hiperalgesia (Walters, 1994; King *et al.*,

1996). Em estudos clínicos, este fato também tem sido verificado, como no caso de vítimas de estresse pós-traumático que relatam uma sensação de torpor e insensibilidade à dor durante o medo induzido pelo trauma (Suarez e Gallup, 1979), enquanto que pacientes com traços de alta ansiedade frequentemente relatam uma maior atenção e percepção da dor (Dougher, 1979; Malow *et al.*, 1987; Barlow *et al.*, 1996).

Estas evidências sugerem que o estado psicológico de um indivíduo é um fator relevante para a sensação dos estímulos nociceptivos. Sendo assim, a utilização de linhagens de animais contrastantes para traços ligados à ansiedade/emocionalidade, pode ser uma ferramenta importante para o estudo das bases neurobiológicas da dor, levando em consideração que estes aspectos afetivo-emocionais ainda constituem um campo pouco explorado na pesquisa da dor em animais de laboratório.

### **1.2- Lewis e SHR um modelo genético para o estudo da ansiedade**

Como apontado por Spooren *et al.* (2002), a maior parte dos estudos farmacológicos de ansiedade utiliza uma população heterogênea de animais “normais”, cujas reações comportamentais poderiam ser consideradas como adequadas do ponto de vista adaptativo. No entanto, o estudo de populações extremas (ou claramente contrastantes) quanto a diferentes traços ligados à emocionalidade poderia trazer uma maior contribuição à compreensão de processos patológicos observados nas populações humanas. A influência de fatores genéticos sobre formas sub-clínicas de ansiedade, bem como sobre psicopatologias relacionadas à ansiedade já foi amplamente demonstrada (Bouchard, 1994; van de Wetering *et al.*, 1999; Scherrer *et al.*, 2000; Lesch, 2001). Por estes motivos, a

identificação, localização e caracterização de genes capazes de influenciar estas características representam um avanço fundamental para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos. Assim, a utilização de modelos genéticos (i. e. neste caso linhagens isogênicas de roedores que diferem para traços relacionados à ansiedade) pode facilitar o alcance destes objetivos (Gray *et al.*, 1999).

No presente estudo, foram utilizados ratos das linhagens isogênicas (consangüíneas), Lewis (LEW) e espontaneamente hipertensos (SHR). Tem sido recentemente proposto que estas linhagens constituem um modelo genético útil para o estudo da ansiedade (Ramos *et al.*, 1997; 1998), pois elas exibem comportamentos contrastantes em testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade. Quando comparados com ratos SHR, os ratos LEW de ambos os sexos exibem níveis de ansiedade significativamente mais altos no labirinto em cruz elevado, no campo aberto, na caixa preta/branca e no labirinto em T elevado, porém eles não manifestam diferenças nos níveis basais de locomoção em ambientes novos ou familiares (Ramos e Mormède, 1998; Ramos *et al.*, 1997; 1998), o que torna este modelo útil para o estudo de comportamentos especificamente ligados à ansiedade. Foi observado também que estas duas linhagens diferem em suas sensibilidades ao benzodiazepínico clássico, o diazepam, quando testadas no labirinto em cruz elevado (Takahashi *et al.*, 2001).

Outro aspecto interessante é o fato de que ratos da linhagem LEW apresentam uma baixa atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em resposta ao estresse. Eles apresentam a falta ou um menor aumento dos níveis do hormônio de liberação de corticotrofinas (CRF), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona em resposta a uma variedade de eventos estressantes como contenção, exposições a ambientes novos (p. e. campo aberto), natação forçada ou éter (Sternberg *et al.*, 1992), quando comparados a

outras linhagens de ratos. Em contraste com este déficit na atividade do eixo HPA apresentado por ratos LEW, os ratos SHR exibem um aumento maior e mais prolongado nos níveis de adrenalina e noradrenalina e também um maior aumento na frequência cardíaca e pressão sanguínea em resposta a uma variedade de situações estressantes quando comparados a outras linhagens de ratos (Kirby *et al.*, 1989; McCarty *et al.*, 1978), sugerindo uma resposta exacerbada do sistema simpático.

Um intercruzamento (F2) entre as linhagens de ratos LEW e SHR foi utilizado para identificar e mapear loci para traços quantitativos (QTL) que afetam comportamentos relacionados à emocionalidade (Ramos *et al.*, 1999). Este estudo revelou um locus no cromossomo 4, que afeta fortemente a locomoção central no teste do campo aberto (medida potencial de ansiedade). Esta região genômica, chamada *Ofill*, foi mapeada próximo ao gene *Tac1r*, que codifica para receptores NK1 (Ramos *et al.*, 1999). Esta evidência sugere uma possível implicação dos receptores NK1 nas diferenças comportamentais observadas entre as linhagens LEW e SHR. Se esta hipótese for verdadeira, poderia se esperar uma reatividade nociceptiva diferenciada entre as duas linhagens e também uma sensibilidade diferenciada à aplicação de substância P intracerebroventricular no teste da formalina, tendo em vista que a substância P e os receptores NK1 estão envolvidos na transmissão aferente dos impulsos nociceptivos (Lembeck, 1953; Saria, 1999). Além disso, também poderia se esperar diferentes sensibilidades comportamentais a um antagonista de receptores NK1 nestas duas linhagens de ratos.

### **1.3- Ansiedade e sensibilidade nociceptiva: Envolvimento da substância P**

Em 1931, von Euler e Gaddum descreveram pela primeira vez a substância P (SP) e, a partir daí, muitas evidências têm se acumulando sugerindo que este undecapeptídeo, pertencente à família das taquicininas, é liberado de certas fibras sensoriais atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador (Otsuka e Yoshioka, 1993). A SP é a mais potente taquicinina para o receptor NK1, enquanto que outras, como a neurocinina A e neurocinina B, exibem alta afinidade pelos receptores NK2 e NK3, respectivamente (Regoli *et al.*, 1994). As ações biológicas da SP são devidas, principalmente, a estimulação de receptores NK1 que são acoplados a proteína G. Esta, por sua vez, ativa a fosfolipase C, que causa um aumento intracelular de inositol (1,4,5)-trifosfato e diacilglicerol com uma subsequente elevação da concentração de cálcio intracelular (Otsuka e Yoshioka, 1993). Alternativamente, pode haver mobilização de ácido araquidônico, via fosfolipase A<sub>2</sub> e também aumento de monofosfato de adenosina cíclico, via adenilato ciclase (Mitsubishi *et al.*, 1994).

A SP está implicada em inúmeras funções fisiológicas (para revisão ver, Severini *et al.*, 2002) tendo importância crucial na transmissão nociceptiva (Lembeck, 1953; Iversen, 1998). Altas concentrações de SP e de seu receptor preferencial NK1 são encontradas em fibras aferentes primárias envolvidas na transmissão de ambas, nocicepção aguda (Kuraishi *et al.*, 1989; Hanesch *et al.*, 1993) e crônica (Nogushi e Ruda, 1992; Yashpal *et al.*, 1993). Ainda, subpopulações de neurônios aferentes primários co-expressam SP e glutamato (Cuello *et al.*, 1993) que cooperam na transmissão dos impulsos nociceptivos. Além disso, as taquicininas participam da neurotransmissão nas vias

inibitórias descendentes e nos interneurônios no corno dorsal da medula espinhal, sugerindo um importante envolvimento da SP na modulação da dor (Battaglia e Rustioni, 1988; Nogushi e Ruda, 1992; Cuello *et al.*, 1993).

Há evidências de que os receptores NK1 estão primariamente implicados na mediação dos efeitos da estimulação nociceptiva persistente (Garrett *et al.*, 1991; Chapman e Dickenson, 1993). O teste da formalina é um modelo de nocicepção que apresenta uma resposta nociceptiva bifásica característica, evidente em ratos (Dubuisson e Dennis, 1977), camundongos (Tjølsen *et al.*, 1992), gatos (Dubuisson e Dennis, 1977), macacos (Alreja *et al.*, 1984) e humanos (Dubuisson e Dennis, 1977). A primeira fase reflete uma estimulação direta das fibras C, enquanto que a segunda fase envolve a formação de mediadores inflamatórios periféricos e um processo de sensibilização central (Hunskaar e Hole, 1987; Levine *et al.*, 1993). Neste modelo, há um preponderante envolvimento da SP e receptores NK1 (Holland e Goldstein, 1990; Levine *et al.*, 1993; McCarson e Krause, 1994). Em camundongos mutantes, nos quais o gene que codifica os receptores NK1 está ausente (camundongos NK1<sup>-/-</sup>) foi observado que a SP não medeia a sinalização nociceptiva aguda, contudo, o comportamento nociceptivo dos camundongos NK1<sup>-/-</sup> foi significativamente menor quando comparado aos animais selvagens (NK1<sup>+/+</sup>) na segunda fase do teste da formalina. Este efeito foi similar ao observado com a utilização de antagonistas NK1 (para revisão ver, Seguin *et al.*, 1995), sugerindo um envolvimento da SP em processos nociceptivos mais persistentes (De Felipe *et al.*, 1998).

Além do envolvimento das taquicininas na dor e analgesia, a SP e os receptores NK1 estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central de mamíferos incluindo particularmente aquelas áreas implicadas no controle do medo e ansiedade como a amígdala, hipotálamo, *locus coeruleus* e a substância cinzenta periaquedutal (Shults *et al.*,

1984; McLean *et al.*, 1991; Otsuka e Yoshioka, 1993; Ribeiro-da-Silva e Hökfelt, 2000; Harrison e Geppetti, 2001). Estudos com diferentes espécies animais sugerem que a injeção de SP nestas áreas límbicas, as quais, são alvos clássicos para drogas ansiolíticas e antidepressivas, provoca efeitos aversivos (Aguiar e Brandão, 1994; 1996; Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 1999; 2002; De Araújo *et al.*, 1998; 1999). Entretanto, alguns outros estudos sugerem que as propriedades da SP sobre parâmetros de ansiedade (i. e., aumentar ou diminuir) dependem da dose utilizada e da via de administração (Hasenöhrl *et al.*, 1998; Nikolaus *et al.*, 2000; Sudakov *et al.*, 2001).

Sob o estímulo destas evidências, muitos antagonistas de receptores NK1 têm sido sintetizados e testados em modelos animais de ansiedade e depressão. Recentemente tem sido relatado que muitos representantes desta classe de compostos exibem efeitos ansiolíticos e antidepressivos em uma variedade de modelos (Cutler, 1994; De Lima e Ribeiro, 1996; Teixeira *et al.*, 1996; File, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Papp, *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2001; Boyce *et al.*, 2001; Cheeta *et al.*, 2001; Varty *et al.*, 2002). Além disso, como visto em camundongos mutantes, a deleção de receptores NK1 causou, dentre outras alterações, uma diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade (Rupniak *et al.*, 2000; Santarelli *et al.*, 2001). Bilkei-Gorzo e colaboradores (2002) também verificaram uma diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em camundongos com supressão seletiva do gene *Tac1*. Em humanos, foi relatado que um antagonista de receptores NK1, o MK-869, reduziu os índices de depressão e ansiedade em pacientes com distúrbios de depressão maior e alta ansiedade (Kramer *et al.*, 1998). Este conjunto de evidências sugere que o bloqueio de receptores NK1 é potencialmente útil no tratamento de distúrbios relacionados à ansiedade e depressão.

Recentemente foi sintetizado um antagonista, o NKP608, que demonstrou



possuir alta afinidade para receptores NK1 de ratos, gerbilos e humanos, além de ser potente, biodisponível oralmente e capaz de atravessar a barreira hematoencefálica tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro* (Vassout *et al.*, 2000). Sobre este composto, têm sido descritos efeitos do tipo ansiolítico, similar aos produzidos por benzodiazepínicos, nos testes de interação social e exploração social em ratos (Vassout *et al.*, 2000; File, 2000) e no teste de investigação social em gerbilos (Gentsch *et al.*, 2002). No entanto, este composto demonstrou um efeito parcial do tipo ansiolítico no teste de hipertermia induzida pelo estresse em camundongos (Spooren *et al.*, 2002), um paradigma que não envolve componentes sociais. Estes resultados sugerem que os efeitos do tipo ansiolítico do NKP608 pode depender do contexto (social/não-social) do teste utilizado. Além disso, permanece a ser determinado, se o NKP608 e outros antagonistas de receptores NK1 serão igualmente efetivos em linhagens de animais com níveis basais de ansiedade contrastantes, o que poderia ser um modelo importante e alternativo de estados psicopatológicos em humanos.

Um grande desafio no estudo da ansiedade é a busca de correlações entre testes animais específicos e subtipos de distúrbios de ansiedade em humanos. Apesar das dificuldades práticas em estabelecer este tipo de relação, testes animais envolvendo conflito (p. e. o labirinto em cruz-elevado) são freqüentemente vistos como modelos de distúrbios de ansiedade generalizada, enquanto que testes de interação social têm sido sugeridos como modelos de fobia social ou pânico (Gyertyán, 1992). Por estas razões, uma avaliação do NKP608 em modelos clássicos de ansiedade/emocionalidade, como o labirinto em cruz elevado e o teste do campo aberto, poderia ser útil para uma melhor avaliação do potencial terapêutico deste composto.

Em resumo, o conjunto de evidências apresentado acima sugere que fatores

psicológicos, como a ansiedade, podem modular a reatividade nociceptiva e que fatores genéticos têm uma influência significativa sobre estas respostas comportamentais de ansiedade e nocicepção. Ratos Lewis e SHR têm sido propostos como um modelo genético para o estudo da ansiedade por exibirem altos e baixos níveis de ansiedade, respectivamente. Uma das hipóteses para explicar as diferenças psiconeuroendócrinas destas duas linhagens, implica o gene *Tac1r*, mapeado através de uma análise de QTL. Se esta hipótese for verdadeira, poderiam ser esperadas diferenças interlinhagens no sistema da SP/receptores NK1 e suas funções. Assim, esperar-se-ia uma reatividade nociceptiva diferenciada tanto em condição normal como após a administração de SP nestas duas linhagens em um teste de nocicepção persistente. Além disso, uma sensibilidade distinta destas linhagens a antagonistas de receptores NK1 aplicados por via sistêmica sobre aspectos comportamentais de ansiedade/emocionalidade também poderia ser esperada. Considerando os fatos descritos acima, o presente trabalho desenvolvido no laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia em conjunto com o laboratório de Genética do Comportamento do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC teve os seguintes objetivos:

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- OBJETIVOS GERAIS**

Caracterizar a reatividade nociceptiva basal e com a administração central de SP das linhagens isogênicas de ratos LEW e SHR de ambos os sexos em um modelo de nocicepção persistente e investigar nelas o envolvimento de receptores NK1 em respostas de ansiedade/emocionalidade em testes que não envolvam estímulos sociais.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar as respostas nociceptivas de ratos LEW e SHR de ambos os sexos nas duas fases do teste da formalina de nocicepção persistente e analisar as possíveis diferenças entre linhagens e sexos.
- Investigar se a injeção intracerebroventricular de SP causa alterações linhagem- e sexo-dependentes na reatividade nociceptiva avaliada na segunda fase do teste da formalina (30-60 minutos).
- Verificar os efeitos do antagonista NK1, o NKP608, em ratos LEW e SHR de ambos os sexos em dois testes comportamentais amplamente usados para avaliar ansiedade/emocionalidade, o labirinto em cruz elevado e o teste do campo aberto.

## 3- MATERIAIS E MÉTODOS

### *3.1- Planejamento experimental*

Este estudo foi realizado em três etapas:

1. Inicialmente realizou-se um estudo comparativo da reatividade basal das linhagens LEW e SHR de ambos os sexos nas duas fases do teste da formalina.
2. Após, investigou-se os efeitos da injeção i. c. v. de SP sobre a reatividade nociceptiva das linhagens LEW e SHR em parte da segunda fase do teste da formalina (conforme verificado nos experimentos do item 1, esta foi a fase em que as diferenças nociceptivas interlinhagens foram mais evidentes). Para este teste, devido à disponibilidade limitada destes animais, foram reutilizados, após quatro dias, animais que já haviam sido tratados com SP e testados no labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto em um estudo realizado pelo grupo da professora Dra. Thereza C. M. de Lima do Departamento de Farmacologia da UFSC, sendo que estes últimos dados não constituem parte deste trabalho.
3. Finalmente, na terceira etapa, avaliou-se os efeitos de um antagonista NK1, o NKP608, no labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto.

### **3.2- Animais**

No presente estudo, foram utilizadas duas linhagens isogênicas de ratos, Lewis (LEW) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que foram obtidas em 1999 da UNICAMP (Campinas-SP) e UFES (Vitória-ES), respectivamente, tendo sido mantidas desde então, sob um sistema de acasalamento irmão/irmã, no laboratório de Genética do Comportamento da UFSC. Os animais foram desmamados e separados por sexo na quarta semana de idade e, depois disso, foram alojados em gaiolas plásticas (40 x 32 x 16,5 cm) com no máximo cinco ratos/caixa, tendo comida (ração comercial) e água disponíveis *ad libitum*. Eles foram mantidos sob um sistema claro/escuro de 12 h (período claro a partir das 07:00 h) e temperatura controlada de  $23 \pm 2$  °C.

Para a comparação de ratos LEW e SHR de ambos os sexos no teste da formalina, sem ou com tratamento com SP (etapas 1 e 2), foram utilizados animais de 12-14 semanas de idade, pesando entre 200-350 g. As duas linhagens foram testadas alternadamente no mesmo dia (somente um sexo/dia) e quando recebiam algum tratamento (i. e. SP ou veículo), este também era feito alternadamente. Para os testes de ansiedade/emocionalidade (labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto) especificamente, foram utilizados animais com 9 semanas de idade e a média do peso dos animais foi de 232 g e 160 g para machos e fêmeas SHR e 234 g e 172 g para machos e fêmeas LEW, respectivamente. Estes ratos foram injetados (p. o.) com 1 dos 5 tratamentos farmacológicos e, então, submetidos ao labirinto em cruz elevado e, imediatamente após, ao teste do campo aberto. Machos e fêmeas foram testados em dias alternados. Em cada dia, ratos LEW e SHR de ambos os sexos foram tratados com algum dos cinco tratamentos e

testados alternadamente, sendo os tratamentos fixados aleatoriamente. Todos os testes foram conduzidos entre 13:00 h e 18:00 h. O presente estudo foi realizado de acordo com os regulamentos locais para o uso ético de animais na pesquisa (CEUA/UFSC).

### **3.3- Drogas**

Como anestésico para a cirurgia estereotáxica, foram utilizados o tiopental sódico (Thionembutal ®, ABBOTT Laboratories, Illinois-EUA) e o hidrato de cloral (Merck, Darmstadt-Alemanha). Para administração i. c. v. foi utilizada SP (Sigma, St. Louis-USA), que foi preparada como solução estoque (1 mM), dissolvida em solução tampão-fosfato (*Physiological Buffer Solution*, PBS) e estocada a -20 °C em tubos *Eppendorf* siliconizados. A partir desta solução estoque, no momento da utilização, a droga foi diluída para a concentração desejada com PBS. O grupo controle recebia um volume equivalente de veículo (PBS). A SP ou o PBS foram injetados em um volume de 2 µl, e a concentração de SP foi de 10 pmol, esta dose foi selecionada a partir de estudos prévios realizados por Gavioli *et al.* (1999). As drogas foram administradas 29 min depois da injeção de formalina.

A administração do antagonista NKP608 (Quinoline-4-carboxylic acid [*trans*-(2R, 4S)-1-(3,5-bis-trifluoromethyl-benzoyl)-2-(4-chloro-benzyl)-piperidin-4-yl]-amide) (Novartis Pharma AG; Basel, Suíça) foi realizada por gavagem oral (p. o.). A droga foi suspensa em 0,5 % de metilcelulose (metocel) e administrada (2 ml/kg) nas doses de 0,003; 0,03 ou 0,3 mg/kg. Estas doses foram selecionadas com base nos dados de Vassout *et al.* (2000). O grupo controle recebeu um volume similar de 0,5 % de metocel. Um grupo

adicional tratado com 5 mg/kg de clordiazepóxido-HCl serviu como controle positivo.

Todos os tratamentos foram dados 90 min antes do primeiro teste.

### **3.4- Administração central de drogas**

#### **3.4.1- Cirurgia Estereotáxica**

Os animais foram anestesiados com uma mistura de tiopental sódico (20 mg/kg) e hidrato de cloral (300 mg/kg) (vol/vol; 1 mg/kg; i. p.). Em seguida, foram individualmente imobilizados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, mod. 300, USA) e canulados no ventrículo lateral. Uma cânula guia de 19 mm (calibre: 22 interno; 28 externo) foi implantada no ventrículo lateral e fixada com cimento poliacrílico dentário aderido a dois parafusos que ficavam presos ao crânio de cada animal. Utilizamos as seguintes coordenadas estereotáxicas: 0,8 mm antero-posterior ao bregma; 1,5 mm médio-lateral ao bregma e 3,5 mm abaixo da superfície do crânio (Paxinos & Watson, 1986). Após a canulação, foram colocados estiletos dentro das cânulas-guia para prevenir entupimento, e estes foram removidos apenas imediatamente antes do procedimento das infusões. Os experimentos foram iniciados após 5 dias de recuperação pós-operatória.

#### **3.4.2- Administração de drogas**

Para a administração das drogas, os animais foram cuidadosamente imobilizados com o auxílio de um pano limpo, e um injetor (1 mm maior que a cânula) foi

inserido na cânula guia. O injetor (agulha odontológica) estava acoplado através de um tubo de polietileno (PE 10) de aproximadamente 10 cm a uma seringa Hamilton ® (0,5 µl) e um volume de 0,2 µl foi injetado em 30 s, permanecendo o injetor na cânula guia por mais 30 s depois da infusão. Este procedimento foi realizado 29 min depois da injeção de formalina.

### ***3.4.3- Análise histológica***

Para verificar se as injeções foram corretamente aplicadas, ao término dos experimentos, os ratos foram anestesiados com éter e perfundidos intracardiacamente com solução fisiológica (0,9 %) e, em seguida, com formalina 10 %. Os animais foram decapitados e seus cérebros retirados e fixados em solução de formalina 10 %. Os animais que não apresentaram uma correta localização das cânulas foram descartados.

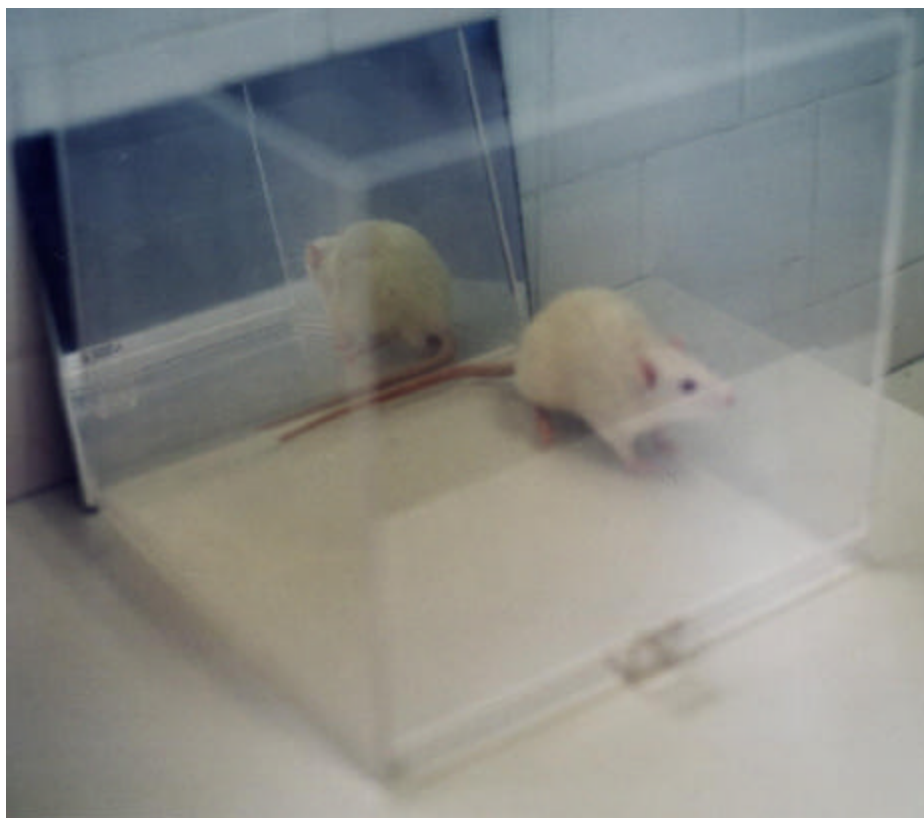
## ***3.5- Avaliação Comportamental***

### ***3.5.1- Teste da formalina***

O teste da formalina de nocicepção foi realizado em caixas de acrílico medindo 28 x 28 x 28 cm, com um espelho posicionado em um ângulo de 45° atrás da caixa para facilitar a completa visualização das patas dos ratos (**Figura 1**). Cada rato foi injetado com 50 µl de formalina a 5 % na região dorsal da pata traseira direita e então observados



por 60 min na comparação LEW e SHR, e dos 30 aos 60 min na comparação LEW e SHR tratados com SP ou PBS por via i. c. v. O número de eventos nociceptivos (retração, mordida e lambida) da pata injetada foi quantificado através de visualização direta e considerado como índice de nocicepção. Geralmente o teste da formalina para ratos é dividido em duas diferentes fases. A primeira fase, de 0-10 minutos (Fase 1) e a fase tardia de 10-60 minutos (Fase 2) (Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskaar e Hole, 1987). As caixas foram limpas com uma esponja com água e secas com papel toalha entre cada animal e este procedimento também foi adotado para os demais testes comportamentais.



**Figura 1-** Caixa para avaliação das respostas nociceptivas no teste da formalina.

### **3.5.2- Labirinto em cruz elevado (LCE)**

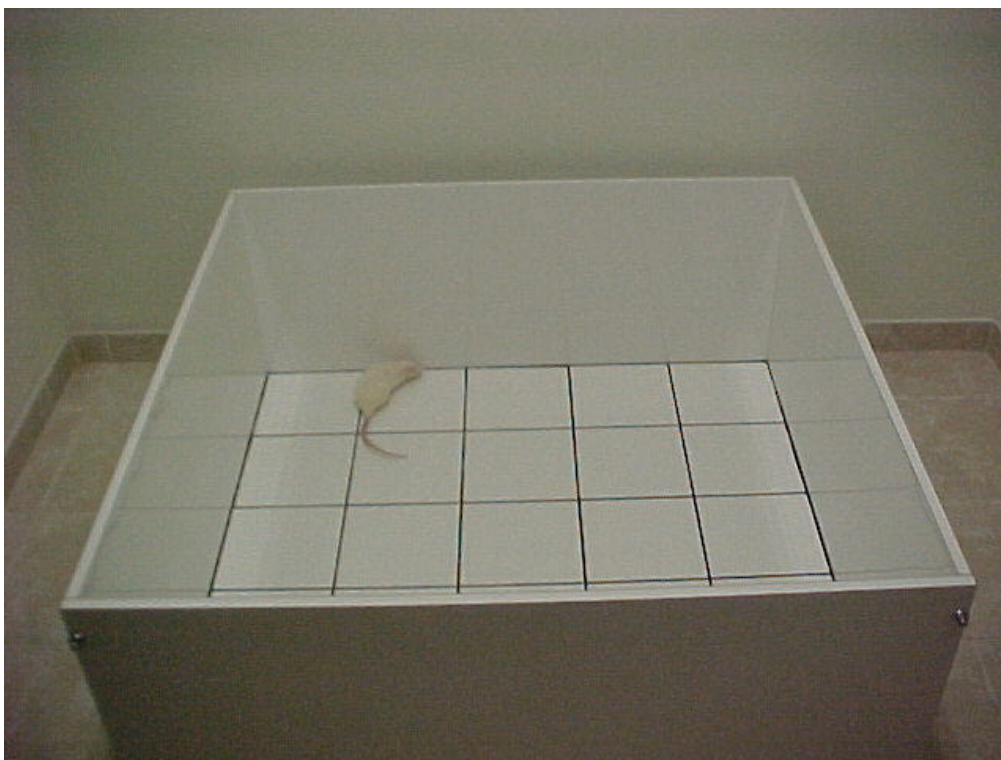
O aparelho feito de madeira coberta com lâminas de fórmica preta possui quatro braços elevados (52 cm de altura) com 50 cm de comprimento e 10 cm de largura (**Figura 2**). Os braços estão dispostos perpendicularmente, com dois braços opostos fechados por paredes de 40 cm de altura e dois braços abertos, tendo em sua intersecção uma plataforma central (10 x 13,5 cm) que dá acesso a qualquer um dos quatro braços. Cada rato foi colocado na plataforma central com a face voltada para um braço aberto e, em seguida, os seguintes comportamentos foram registrados por 5 min: número de entradas e tempo gasto (com as quatro patas) dentro de cada tipo de braço. A porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao número total de entradas foi calculada. O comportamento de cada animal no labirinto foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima do labirinto e monitorado em outra sala via um circuito fechado de TV-câmera. Neste teste, drogas ou procedimentos com atividade ansiolítica geralmente aumentam a frequência de entradas e/ou o tempo gasto nos braços abertos, enquanto que procedimentos ou drogas ansiogênicas fazem o inverso. A frequência de entradas nos braços fechados geralmente não é afetada (Pellow *et al.*, 1985).



**Figura 2-** Labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade.

### **3.5.3- Teste do campo aberto (TCA)**

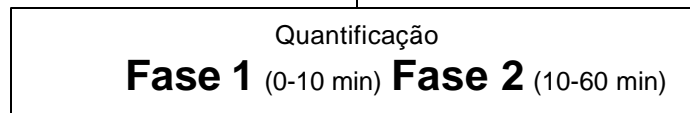
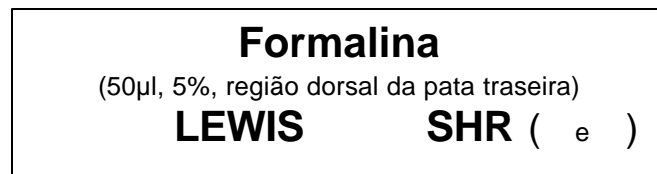
O aparelho é feito de madeira coberta com fórmica impermeável branca (dividida por linhas pretas em 25 quadrados de 20 x 20 cm) e paredes brancas (**Figura 3**). Cada rato foi colocado no centro do campo aberto e as seguintes variáveis foram registradas: número de cruzamentos periféricos, adjacentes à parede (locomoção periférica), número de cruzamentos centrais, distantes das paredes (locomoção central), tempo na área central (tempo no centro) e número total de bolos fecais (defecação).



**Figura 3-** Arena do teste do campo aberto (TCA) para avaliação de comportamentos relacionados à emocionalidade.

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

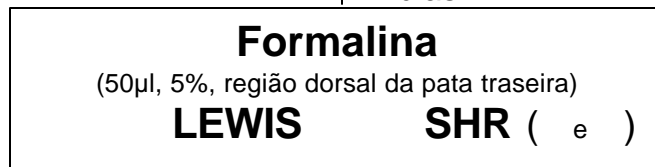
### Etapa 1



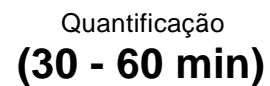
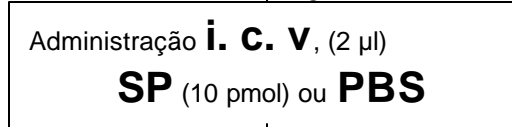
### Etapa 2



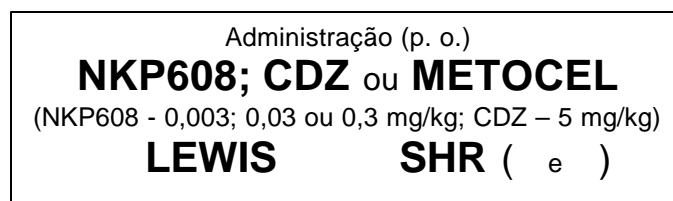
7 dias



29 min



### Etapa 3



**LCE** (5 min)

**TCA** (5 min)

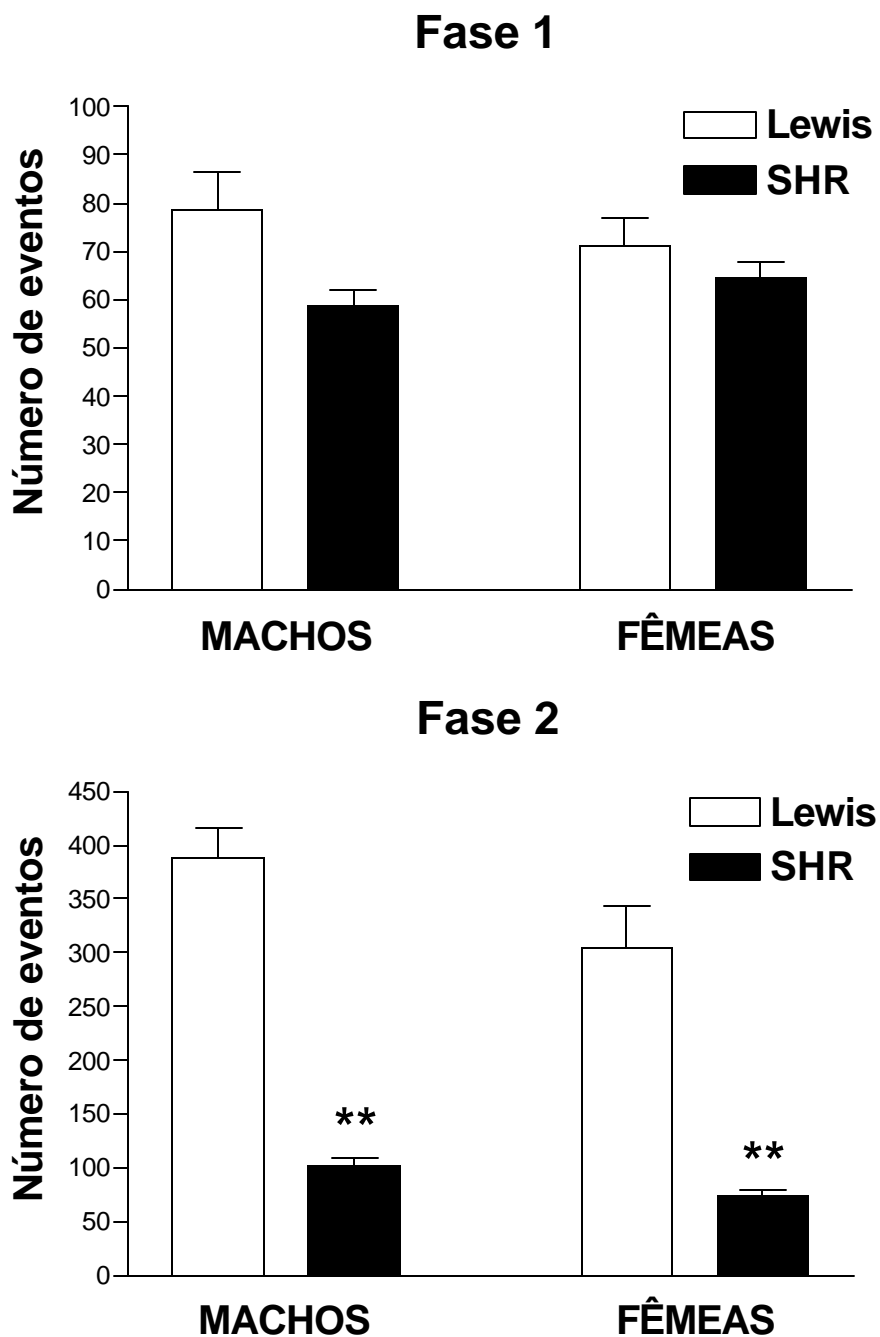
### **3.6- Análise Estatística**

Os dados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (e. p. m.). As comparações estatísticas das médias dos grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias para todos os protocolos experimentais. Para analisar os dados da reatividade basal das duas linhagens no teste da formalina (etapa 1), consideramos o sexo e a linhagem como variáveis independentes. Quando avaliamos o efeito da administração i. c. v. de SP (etapa 2) e p. o. do NKP608 (etapa 3) as análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada sexo usando ANOVA de duas vias para efeito linhagem e tratamento. As comparações específicas entre LEW e SHR tratados com veículo foram realizadas para cada sexo usando o teste t de Student. Para uma variável específica (tempo gasto nos braços abertos do LCE), na qual a ANOVA de duas vias detectou apenas um efeito próximo da significância para o tratamento com NKP608, também foi realizada uma ANOVA de uma via para efeito tratamento em ratos LEW machos somente. Para todos os dados, o teste de Duncan foi utilizado nas comparações *post-hoc* das médias em pontos individuais sempre que um efeito significativo fosse detectado pela ANOVA. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico, “*Statistica 5.1*”.

## 4- RESULTADOS

### ***4.1- Comparação LEW e SHR no teste da formalina de nocicepção***

Os resultados agrupados por linhagem e sexo são apresentados na **Figura 4**. A análise de variância, ANOVA de duas vias, revelou um efeito significativo para linhagem ( $F_{(1, 29)} = 145,7$ ;  $p < 0,01$ ) e sexo ( $F_{(1, 29)} = 6,8$ ;  $p < 0,05$ ) para a Fase 2 do teste da formalina. Ratos LEW de ambos os sexos, na Fase 2, foram claramente mais reativos à formalina, quando comparados com ratos SHR, o que fica evidenciado por um maior número de eventos nociceptivos (retração, lambida ou mordida) observados nestes subgrupos. Por outro lado, na fase inicial do teste (Fase 1), apesar de haver uma tendência na mesma direção (LEW > SHR), observada para ambos os sexos, não houve diferenças estatisticamente significantes.

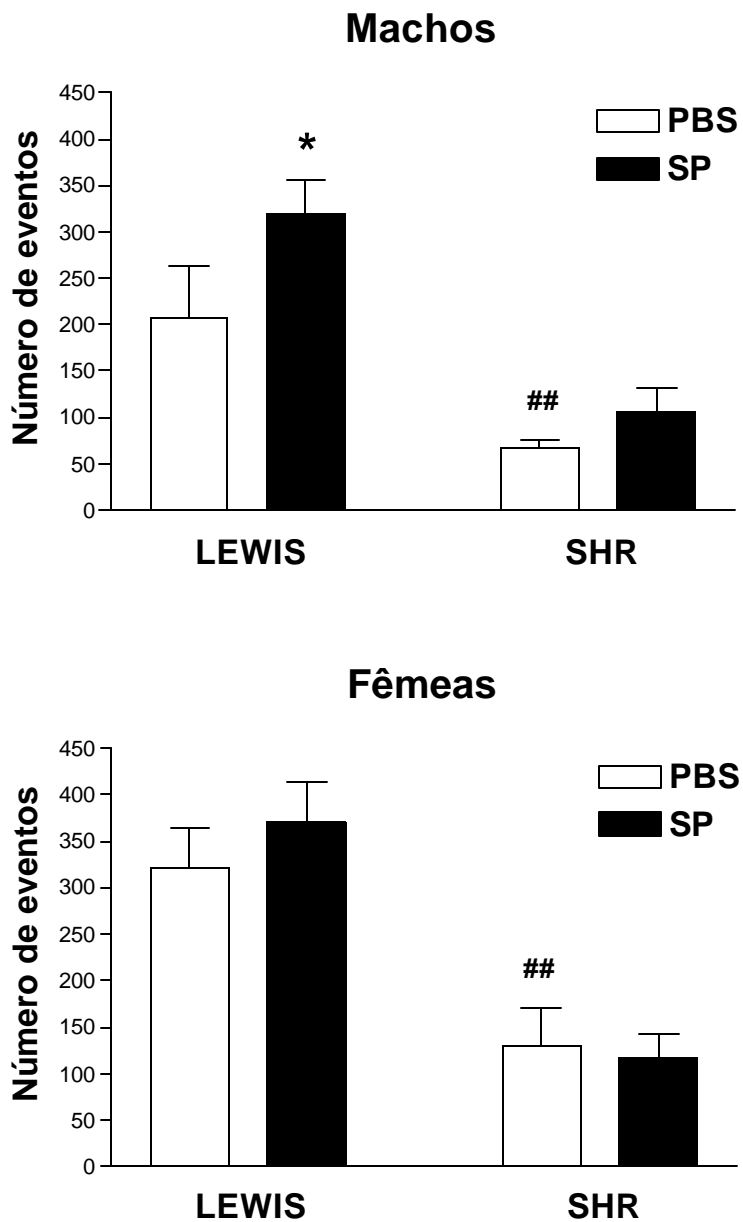


**Figura 4-** Número de eventos nociceptivos (retração, mordida ou lambida) no teste da formalina realizados por ratos LEW e SHR de ambos os sexos. A Fase 1 corresponde ao tempo de 0-10 min e a Fase 2 dos 10-60 min depois da injeção de formalina (5 %) na região dorsal da pata traseira. As barras e as linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por sexo e linhagem (machos LEW, machos e fêmeas SHR, n=9; fêmeas LEW, n=6). Para cada sexo, diferenças significativas interlinhagens são representadas por \*\* ( $p < 0,01$ , ANOVA de duas vias).



#### **4.2- Efeito da administração i. c. v. de SP em ratos LEW e SHR no teste da formalina de nocicepção**

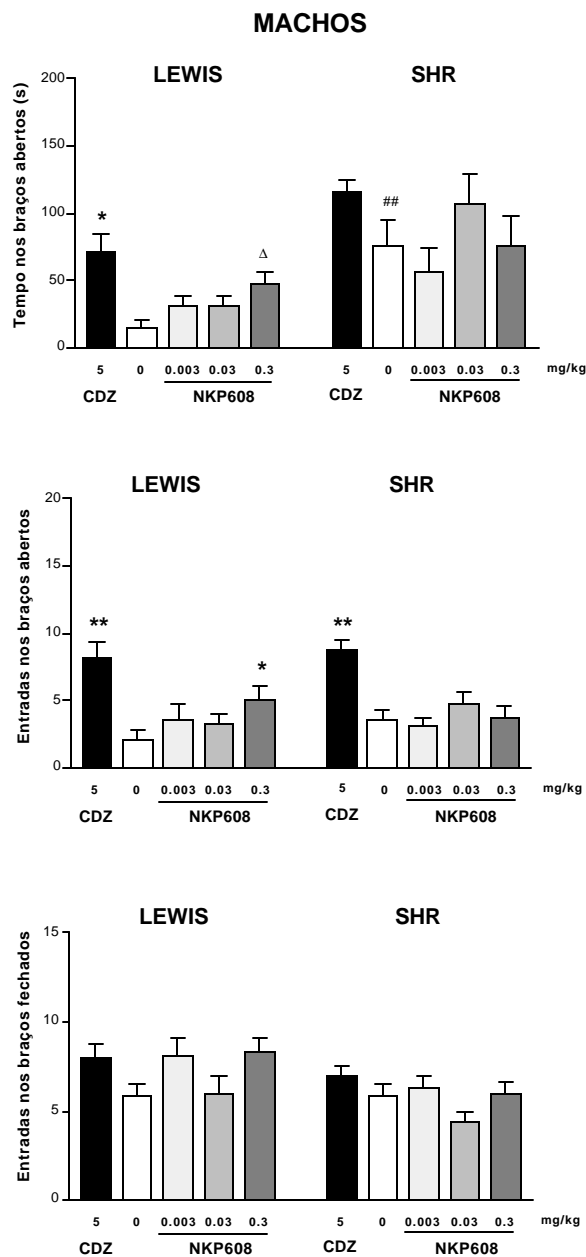
Os resultados agrupados por sexo, linhagem e tratamento são apresentados na **Figura 5**. Para os ratos machos, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para linhagem ( $F_{(1, 25)} = 29,2$ ;  $p < 0,01$ ) e tratamento ( $F_{(1, 25)} = 5,5$ ;  $p < 0,05$ ). As comparações *post-hoc* subsequentes indicaram que ratos machos LEW foram mais reativos a formalina em comparação com ratos SHR, por exibirem um maior número de eventos nociceptivos ( $p < 0,01$ ) avaliados em parte da Fase 2 do teste da formalina (30-60 min). Além disso, o teste *post-hoc* revelou um aumento significativo do número de eventos nociceptivos para ratos LEW tratados com SP (i. c. v.), em comparação com os animais LEW que receberam PBS (controle) ( $p < 0,05$ ). Para as fêmeas, a análise por ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para linhagem somente ( $F_{(1, 34)} = 30,5$ ;  $p < 0,01$ ), sendo que as ratas LEW foram mais reativas a formalina do que as ratas SHR, exibindo maior número de eventos nociceptivos. O tratamento com SP não produziu alterações estatisticamente significantes para as fêmeas das duas linhagens.



**Figura 5-** Número de eventos nociceptivos (retração, mordida ou lambida) no teste da formalina realizados por ratos LEW e SHR de ambos os sexos tratados (29 min depois da formalina) com SP (10 pmol) ou PBS por via i. c. v. e avaliados dos 30-60 min. As barras e as linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por sexo, linhagem e tratamento (machos LEW tratados com SP ou PBS, n=6; machos SHR tratados com SP, n=9 ou PBS, n=8; fêmeas LEW tratadas com SP, n=8 ou PBS, n=12; e fêmeas SHR tratadas com SP ou PBS, n=9). Para cada linhagem, diferenças significativas do tratamento em relação ao grupo controle são representadas por \* ( $p < 0,05$ ). Diferenças significativas interlinhagens para ratos tratados com veículo são representadas por ## ( $p < 0,01$ ; ANOVA de duas vias, seguida do teste de Duncan).

#### **4.3- Efeitos do NKP608 sobre a ansiedade no Labirinto em cruz elevado (LCE)**

Para machos, os resultados agrupados por linhagem e tratamento são apresentados na **Tabela 1** e **Figura 6**. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento sobre o tempo gasto nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 3,73$ ;  $p < 0,01$ ), o número de entradas nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 12,43$ ;  $p < 0,01$ ), a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 6,09$ ;  $p < 0,01$ ), o tempo gasto nos braços fechados ( $F_{(4, 90)} = 3,46$ ;  $p < 0,01$ ) e o número de entradas totais nos braços ( $F_{(4, 90)} = 10,72$ ;  $p < 0,01$ ). As comparações *post-hoc* indicaram que ratos LEW tratados com CDZ (5 mg/kg) gastaram mais tempo nos braços abertos ( $p < 0,05$ ) e apresentaram uma maior porcentagem de entradas nos braços abertos ( $p < 0,01$ ) do que o grupo controle. Além disso, ratos LEW tratados com CDZ ou NKP608 (0,3 mg/kg) apresentaram mais entradas nos braços abertos ( $p < 0,01$  para o CDZ e  $p < 0,05$  para o NKP608), mais entradas totais nos braços ( $p < 0,01$ ) e gastaram menos tempo nos braços fechados ( $p < 0,01$  para o CDZ e  $p < 0,05$  para o NKP608) do que o grupo controle. A comparação *post-hoc* seguida da ANOVA de uma via para efeito tratamento em machos LEW somente, revelou que o CDZ e o NKP608 (0,3 mg/kg) causaram um significativo aumento do tempo gasto nos braços abertos neste subgrupo específico. Ratos SHR tratados com CDZ apresentaram uma maior porcentagem ( $p < 0,05$ ) e número ( $p < 0,01$ ) de entradas nos braços abertos e mais entradas totais nos braços ( $p < 0,01$ ) do que os ratos controle. As comparações interlinhagens indicaram que ratos SHR tratados com veículo gastaram mais tempo nos braços abertos ( $t = -3,04$ ;  $p < 0,01$ ) e menos tempo nos braços fechados ( $t = 4,21$ ;  $p < 0,01$ ) do que ratos LEW.



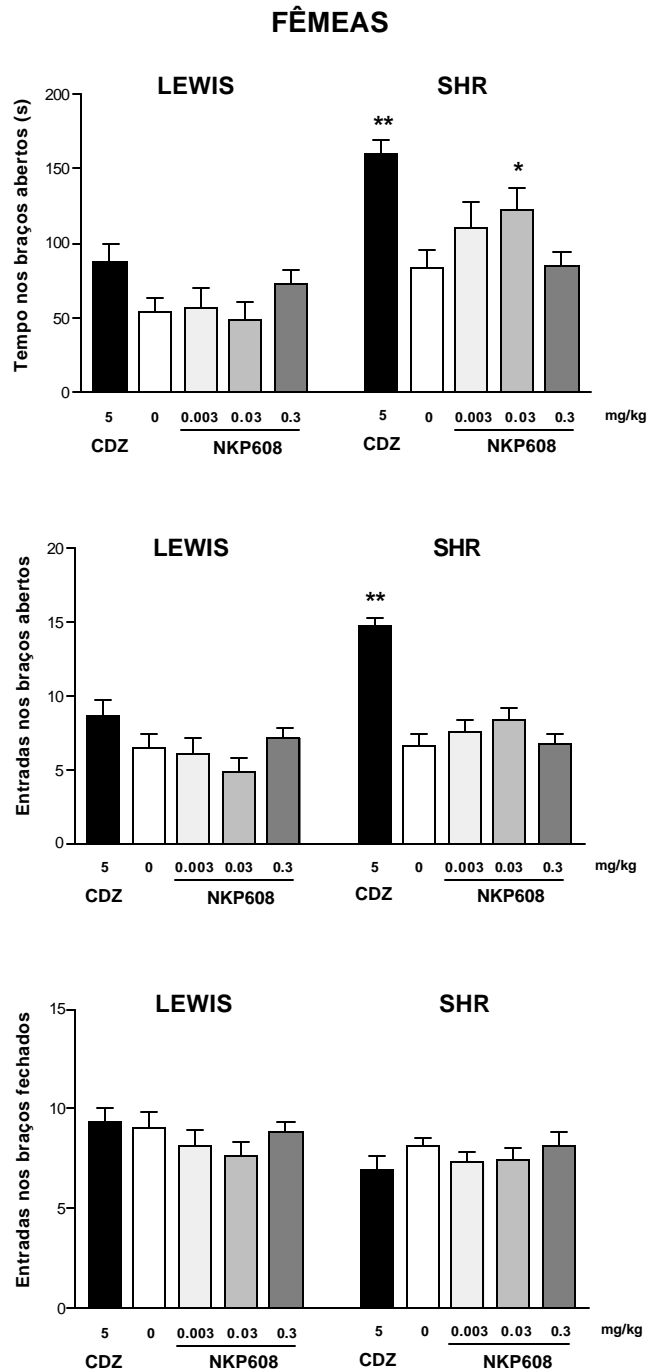
**Figura 6-** Tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado por ratos machos LEW e SHR tratados com CDZ, metocel (0,5 %) ou NKP608 em três diferentes doses. As barras e linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por linhagem e tratamento (n=10). Para cada linhagem, diferenças significativas do tratamento em relação ao grupo controle são representadas por \* ou \*\* ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente; ANOVA de duas vias, seguida do teste de Duncan). Diferenças significativas interlinhagens para ratos tratados com veículo são representadas por ## ( $p < 0,01$ ; teste t de Student). <sup>Δ</sup> Diferenças significativas do tratamento em relação ao grupo controle quando ANOVA de uma via foi aplicada para ratos LEW somente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1-** Medidas no labirinto em cruz elevado (média  $\pm$  e. p. m.) de ratos machos LEW e SHR com 9 semanas de idade.

Tratamento	Dose (mg/kg, v. o.)	Entradas nos braços abertos (%)	Tempo nos braços fechados (s)	Entradas totais nos braços
<b>LEW</b>				
CDZ	5	49,0 $\pm$ 4,2**	126,6 $\pm$ 13,3**	16,1 $\pm$ 1,4**
Veículo	0	20,5 $\pm$ 6,0	183,4 $\pm$ 10,4	7,9 $\pm$ 1,2
NKP608	0,003	25,6 $\pm$ 6,9	158,6 $\pm$ 12,3	11,7 $\pm$ 1,7
	0,03	31,9 $\pm$ 6,4	171,5 $\pm$ 11,3	9,3 $\pm$ 1,4
	0,3	33,4 $\pm$ 5,0	141,7 $\pm$ 10,0*	13,4 $\pm$ 1,7**
<b>SHR</b>				
CDZ	5	55,6 $\pm$ 1,2*	69,4 $\pm$ 6,7	15,8 $\pm$ 1,1**
Veículo	0	34,4 $\pm$ 6,3	103,5 $\pm$ 15,8 <sup>##</sup>	9,4 $\pm$ 0,8
NKP608	0,003	32,5 $\pm$ 5,0	109,0 $\pm$ 12,7	9,4 $\pm$ 0,8
	0,03	49,3 $\pm$ 7,3	87,3 $\pm$ 19,3	9,1 $\pm$ 0,8
	0,3	35,2 $\pm$ 6,7	98,3 $\pm$ 15,2	9,7 $\pm$ 1,1

Para cada linhagem, diferenças significantes do tratamento em relação ao grupo controle são representadas por \* e \*\* ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente; ANOVA de duas vias, seguida do teste de Duncan). Diferenças significantes interlinhagem para ratos tratados com veículo são representadas por <sup>##</sup> ( $p < 0,01$ ; teste t de Student).

Para fêmeas, os resultados são agrupados por linhagem e tratamento e apresentados na **Tabela 2** e **Figura 7**. A ANOVA de duas vias revelou um efeito geral significativo do tratamento para o tempo gasto nos braços fechados ( $F_{(4, 90)} = 5,45$ ;  $p < 0,01$ ) e para o número de entradas totais nos braços do labirinto ( $F_{(4, 90)} = 7,47$ ;  $p < 0,01$ ). Foi encontrada uma significativa interação tratamento x linhagem para o tempo gasto nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 2,49$ ;  $p < 0,05$ ), para o número de entradas nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 4,27$ ;  $p < 0,01$ ) e para a porcentagem de entradas nos braços abertos ( $F_{(4, 90)} = 2,81$ ;  $p < 0,05$ ). As análises *post-hoc* demonstraram que fêmeas SHR tratadas com CDZ fizeram mais entradas nos braços abertos, exibiram maior porcentagem de entradas nos braços abertos, gastaram menos tempo nos braços fechados e realizaram mais entradas totais nos braços ( $p < 0,01$ ) do que o grupo controle. Ainda, fêmeas SHR tratadas com ambos CDZ e NKP608 (0,03 mg/kg) gastaram mais tempo nos braços abertos ( $p < 0,01$  para CDZ e  $p < 0,05$  para NKP608) do que seu grupo controle. A ANOVA também revelou um efeito geral para linhagem para entradas nos braços fechados (LEW > SHR). A comparação interlinhagem indicou que fêmeas SHR gastaram menos tempo nos braços fechados ( $t = 2,93$ ;  $p < 0,01$ ) do que as fêmeas LEW.



**Figura 7-** Tempo gasto nos braços abertos e número de entradas nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado por fêmeas LEW e SHR tratadas com CDZ, metocel (0,5 %) ou NKP608 em três diferentes doses. As barras e linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por linhagem e tratamento (n=10). Para cada linhagem, diferenças significativas do tratamento em relação ao grupo controle são representadas por \* ou \*\* ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente; ANOVA de duas vias, seguida do teste de Duncan).

**Tabela 2-** Medidas no labirinto em cruz elevado (média  $\pm$  e. p. m.) de ratos fêmeas LEW e SHR com 9 semanas de idade.

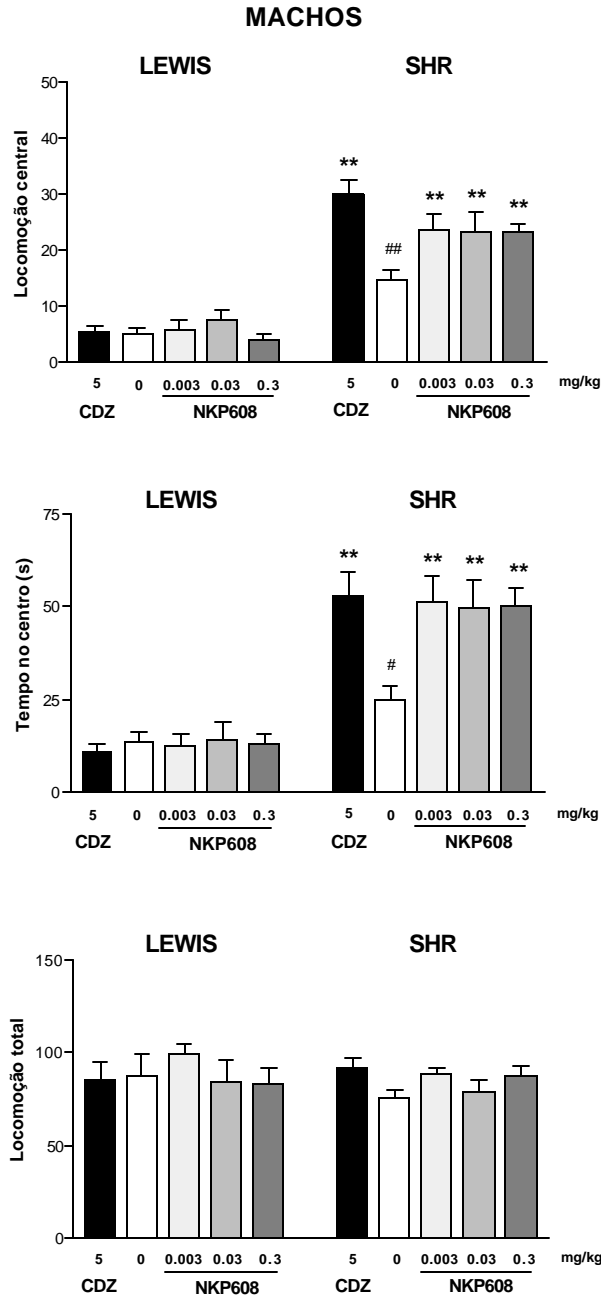
Tratamento	Dose (mg/kg, v. o.)	Entradas nos braços abertos (%)	Tempo nos braços fechados (s)	Entradas totais nos braços
<b>LEW</b>				
CDZ	5	47,7 $\pm$ 3,0	109,0 $\pm$ 10,7	18,0 $\pm$ 1,4
Veículo	0	40,2 $\pm$ 4,2	129,6 $\pm$ 7,1	15,4 $\pm$ 1,3
NKP608	0,003	40,8 $\pm$ 5,7	146,8 $\pm$ 11,5	14,1 $\pm$ 1,6
	0,03	33,9 $\pm$ 5,4	146,7 $\pm$ 12,2	12,5 $\pm$ 1,5
	0,3	44,1 $\pm$ 2,4	122,7 $\pm$ 9,1	15,9 $\pm$ 0,9
<b>SHR</b>				
CDZ	5	68,4 $\pm$ 2,6**	46,4 $\pm$ 6,9**	21,6 $\pm$ 0,8**
Veículo	0	43,2 $\pm$ 3,0	97,7 $\pm$ 8,2 <sup>##</sup>	14,8 $\pm$ 0,9
NKP608	0,003	50,0 $\pm$ 4,0	78,5 $\pm$ 11,2	14,8 $\pm$ 0,9
	0,03	52,2 $\pm$ 3,5	83,9 $\pm$ 10,4	15,7 $\pm$ 1,1
	0,3	44,3 $\pm$ 2,6	98,6 $\pm$ 7,0	14,9 $\pm$ 1,2

Para cada linhagem, diferenças significantes do tratamento em relação ao grupo controle são representados por \*\* ( $p < 0,01$ ). Diferenças significantes interlinhagem para ratos tratados com veículo são representadas por <sup>##</sup> ( $p < 0,01$ ; teste t de Student).



#### **4.4- Efeitos do NKP608 sobre a emocionalidade no Teste do campo aberto (TCA)**

Para os ratos machos, os resultados agrupados por linhagem e tratamento são apresentados na **Figura 8** e **Tabela 3**. A ANOVA de duas vias revelou uma significativa interação tratamento x linhagem para locomoção central ( $F_{(4, 89)} = 3,33$ ;  $p < 0,05$ ) e para tempo no centro ( $F_{(4, 88)} = 2,89$ ;  $p < 0,05$ ). As análises *post-hoc* demonstraram que machos da linhagem SHR tratados com CDZ ou com qualquer uma das doses de NKP608 realizaram uma maior número de cruzamentos e gastaram mais tempo na área central e aversiva do campo aberto do que ratos controle tratados com veículo ( $p < 0,01$ ). Nenhum efeito dos tratamentos foi observado em ratos LEW machos. A ANOVA também revelou um efeito geral para linhagem para locomoção periférica (LEW > SHR). A comparação interlinhagem de ratos tratados com veículo revelou que ratos SHR cruzaram mais quadrantes ( $t = -4,79$ ;  $p < 0,01$ ) e gastaram mais tempo ( $t = -2,41$ ;  $p < 0,05$ ) na área central da arena do que ratos LEW.

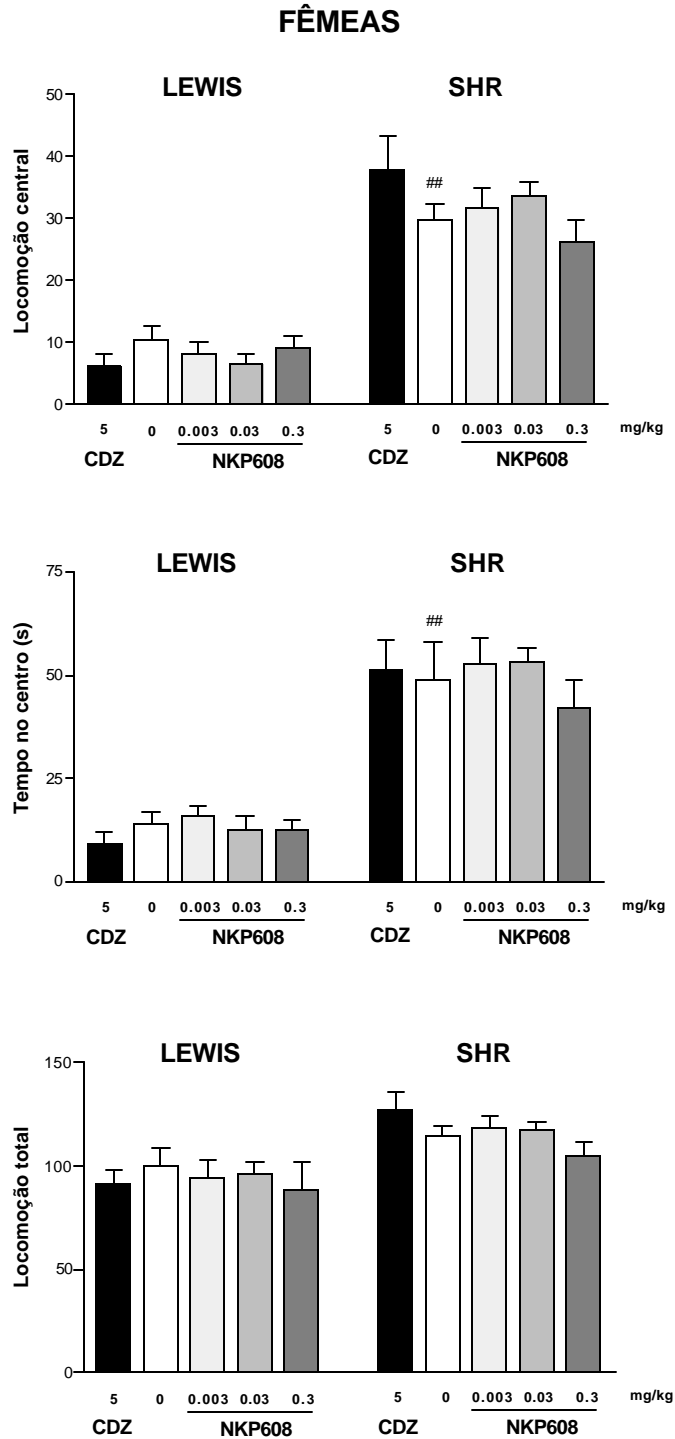


**Figura 8-** Locomoção e tempo gasto na área central e locomoção total no teste do campo aberto por ratos machos LEW e SHR tratados com CDZ, metocel (0,5 %) ou NKP608 em três diferentes doses. As barras e linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por linhagem e tratamento (n=9). Para cada linhagem, diferenças significantes do tratamento em relação ao grupo controle são representadas por \*\* (p<0,01; ANOVA de duas vias seguido do teste de Duncan). Diferenças significantes interlinhagens para ratos tratados com veículo são representadas por # e ## (p<0,05 e p<0,01, respectivamente; teste t de Student).

**Tabela 3-** Medidas no teste do campo aberto (média  $\pm$  e. p. m.) de ratos machos LEW e SHR com 9 semanas de idade.

Tratamento	Dose (mg/kg, v. o.)	Defecação	Locomoção periférica
<b>LEW</b>			
CDZ	5	2,0 $\pm$ 0,6	79,9 $\pm$ 9,6
Veículo	0	1,7 $\pm$ 0,8	82,6 $\pm$ 10,2
NKP608	0,003	2,3 $\pm$ 0,8	93,0 $\pm$ 6,2
	0,03	2,7 $\pm$ 0,5	76,8 $\pm$ 10,3
	0,3	2,4 $\pm$ 0,6	79,0 $\pm$ 8,7
<b>SHR</b>			
CDZ	5	3,0 $\pm$ 0,4	61,7 $\pm$ 3,9
Veículo	0	2,9 $\pm$ 0,6	60,4 $\pm$ 3,4
NKP608	0,003	1,9 $\pm$ 0,5	64,9 $\pm$ 3,2
	0,03	2,4 $\pm$ 0,5	55,0 $\pm$ 4,9
	0,3	2,4 $\pm$ 0,4	64,0 $\pm$ 4,4

Para fêmeas, os resultados agrupados por linhagem e tratamento são apresentados na **Figura 9** e **Tabela 4**. A ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito no fator tratamento, mas demonstrou um efeito geral da linhagem (SHR > LEW) sobre a locomoção central ( $F_{(4, 90)}=172,21$ ;  $p<0,01$ ), o tempo no centro ( $F_{(4, 90)}=123,76$ ;  $p<0,01$ ) e a locomoção total ( $F_{(4, 90)}=21,19$ ;  $p<0,01$ ). Para animais tratados com veículo, as fêmeas SHR exibiram uma maior locomoção ( $t=-5,46$ ;  $p<0,01$ ) e gastaram mais tempo ( $t=-3,76$ ;  $p<0,01$ ) na área central do campo aberto do que fêmeas LEW. Para defecação, nenhum efeito significativo foi observado tanto para machos quanto para fêmeas.



**Figura 9-** Locomoção e tempo gasto na área central e locomoção total no teste do campo aberto pelas fêmeas LEW e SHR tratadas com CDZ, metocel (0,5 %) ou NKP608 em três diferentes doses. As barras e linhas verticais representam a média e o e. p. m. dos animais agrupados por linhagem e tratamento (n=9). Diferenças significantes interlinhagens para ratas tratadas com veículo são representadas por ## (p<0,01; teste t de Student).

**Tabela 4-** Medidas no teste do campo aberto (média  $\pm$  e. p. m.) de ratas LEW e SHR fêmeas com 9 semanas de idade.

Tratamento	Dose (mg/kg, v. o.)	Defecação	Locomoção periférica
<b>LEW</b>			
CDZ	5	2,2 $\pm$ 0,7	85,1 $\pm$ 5,4
Veículo	0	1,3 $\pm$ 0,6	89,9 $\pm$ 7,2
NKP608	0,003	2,4 $\pm$ 0,7	86,0 $\pm$ 7,1
	0,03	2,3 $\pm$ 0,7	89,4 $\pm$ 6,1
	0,3	1,1 $\pm$ 0,6	79,7 $\pm$ 11,4
<b>SHR</b>			
CDZ	5	1,2 $\pm$ 0,6	90,5 $\pm$ 5,3
Veículo	0	2,2 $\pm$ 0,6	84,4 $\pm$ 5,2
NKP608	0,003	1,6 $\pm$ 0,7	86,9 $\pm$ 4,4
	0,03	0,7 $\pm$ 0,4	84,2 $\pm$ 2,8
	0,3	1,0 $\pm$ 0,6	78,8 $\pm$ 5,3

## 5- DISCUSSÃO

A dor não é simplesmente determinada pela intensidade da estimulação nociceptiva, mas também depende de fatores psicológicos como o estado emocional e motivacional de um organismo. Alguns estudos indicam que a ansiedade é um fator emocional que pode influenciar de maneira importante a severidade da dor. Em humanos, tem sido sugerido que a ansiedade não só aumenta a sensibilidade à dor como também resulta em uma necessidade de maiores quantidades de analgésicos para o seu alívio (Rhudy e Meagher, 2000; Stimmel, 1997). Apesar destas evidências, há uma grande dificuldade em estabelecer esta relação em animais de laboratório (Meagher *et al.*, 1998) e encontrar modelos animais apropriados que correlacionem nocicepção e ansiedade ainda é um grande desafio. Sendo assim, a descoberta de novos modelos e técnicas experimentais que favoreçam o aparecimento desta relação, representaria um avanço fundamental para o entendimento das bases neurobiológicas envolvidas em tais processos, de modo a favorecer o desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias terapêuticas com menor incidência de efeitos colaterais indesejados para o tratamento de processos dolorosos.

Os resultados do presente estudo demonstram que ratos LEW (mais ansiosos), de ambos os sexos, exibem uma exagerada resposta comportamental de nocicepção durante a segunda fase do teste da formalina, quando comparados a ratos da linhagem SHR (menos ansiosos). Isto foi evidenciado pelo maior número de eventos nociceptivos observados em ratos LEW (aproximadamente 4 vezes maior, em relação aos ratos SHR). Na primeira fase do teste, houve uma tendência no mesmo sentido (LEW > SHR), embora não estatisticamente significante. Estes dados sugerem que estas diferenças estejam

possivelmente relacionadas às diferenças basais nos níveis de ansiedade comumente observadas entre ratos LEW e SHR e que, apesar de serem dados preliminares, os mesmos sugerem que este par de linhagens constitui um modelo genético útil para o estudo da dor.

A ansiedade é caracterizada por uma sensação desagradável de apreensão e antecipação a um estímulo aversivo em potencial, e resulta em aumento da vigilância e da tensão somática. Isto causa um aumento atencional (somático e ambiental) que facilita a receptividade sensorial. Os resultados do presente estudo estão de acordo com estes dados obtidos em estudos clínicos, nos quais, verifica-se que pacientes com traços de alta ansiedade freqüentemente relatam uma maior atenção e percepção da dor (Dougher, 1979; Malow *et al.*, 1987; Barlow *et al.*, 1996).

As diferenças nociceptivas observadas entre as duas linhagens poderiam ser resultantes apenas de fatores atencionais, dissociados das características relacionadas à ansiedade, haja visto que a linhagem de ratos SHR também têm sido estudada como um modelo animal de distúrbio de hiperatividade e déficit de atenção (Mormède *et al.*, 2002). Estudos com humanos sugerem que, quando a atenção de um indivíduo está direcionada para o foco da dor, a sensação desta poderia estar aumentada. Por outro lado, quando o foco da atenção está voltado para outro estímulo qualquer (i. e., distração), a reatividade dolorosa pode ser sensivelmente reduzida (Arntz *et al.*, 1994; Weisenberg *et al.*, 1984; Janssen e Arntz, 1996). Ainda assim, quando indivíduos estão em uma situação normal, isto é, nem com a atenção direcionada ao foco da dor, nem atraídos para outro foco, a ansiedade (maior ou menor) pode influenciar a sensação de dor para cada indivíduo (Arntz *et al.*, 1994; Janssen e Arntz, 1996). Em outras palavras, o indivíduo mais ansioso tende a sentir mais dor. Apesar da cautela necessária para a extrapolação de dados clínicos para modelos animais, é possível que tal correlação tenha ocorrido no presente estudo. Os ratos SHR



exibiram um número constante e reduzido de eventos nociceptivos ao longo do tempo (dados não demonstrados), especialmente na segunda fase do teste da formalina. Por ser um teste de longa duração, o animal já estava habituado com o ambiente e apresentava-se estático, apenas apresentando eventos de retração da pata injetada. Portanto, o fator atenção, provavelmente, não seria responsável pelas diferenças nociceptivas observadas entre as linhagens.

De outra perspectiva, sabe-se que os ratos SHR têm uma sensibilidade nociceptiva diferenciada quando comparados a ratos isogênicos Wistar Kyoto (WKY), seu controle normotenso. Ratos SHR exibem uma maior latência à nocicepção quando comparados aos ratos WKY no teste da placa quente (Sitsen e Jong, 1983; Hoffmann *et al.*, 1998), no teste de retirada da cauda a um estímulo térmico (Saavedra, 1981) e no teste de nocicepção mecânica de Randall-Selitto (Chipkin e Latranyi, 1984). Outros estudos, contudo, indicam alterações conflitantes no processamento nociceptivo destes animais. Por exemplo, ratos SHR e WKY não diferiram no teste de retirada da cauda a um estímulo térmico (Meller *et al.*, 1992) ou na placa quente (Wendel e Bennett, 1981), enquanto no teste da formalina, ratos SHR exibiram respostas nociceptivas normais (Tchakarov *et al.*, 1985) ou mesmo exageradas (Taylor *et al.*, 1995). Mais recentemente, Taylor *et al.* (2001), verificaram que os ratos SHR foram hipoalgésicos no teste da placa quente e hiperalgésicos em dois modelos de nocicepção persistente, quando comparados a ratos WKY ou a ratos geneticamente heterogêneos Sprague-Dawley. Em suma, a hipoalgesia de ratos SHR parece ser restrita a um número limitado de modelos agudos como o teste da placa quente.

No mesmo estudo acima mencionado (Taylor *et al.*, 2001), os autores investigaram, se a hipoalgesia apresentada por ratos SHR no teste da placa quente estava relacionada à pressão arterial destes animais. Foi verificado, assim como em outros estudos

(Sitsen e Jong, 1983), que a hipertensão arterial não está relacionada às respostas nociceptivas. Em adição, Irvine *et al.* (1995), verificaram que a droga anti-hipertensiva hidralazina foi efetiva em reduzir a pressão arterial de ratos SHR a níveis comparáveis aos animais normotensos, mas teve pouca influência sobre os parâmetros nociceptivos no teste da placa quente. Por outro lado, o captopril, outra droga anti-hipertensiva, menos efetiva do que a hidralazina em reduzir a pressão arterial de ratos SHR, eliminou as diferenças na latência no teste da placa quente. Este efeito observado com o captopril sobre a nocicepção pode ser devido à ação desta droga sobre os níveis de peptídeos como a SP ou a bradicinina. O captopril tem como mecanismo de ação a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), sendo que a SP e a bradicinina são substratos para esta enzima (ECA). Neste caso, a concentração destes peptídeos poderia estar aumentada, conseqüentemente, aumentando a reatividade nociceptiva no teste da placa quente de forma indireta e não pelo fato de diminuir a pressão arterial. Estas evidências, associadas àquelas que já foram mencionadas anteriormente, indicam que ratos SHR exibem uma resposta nociceptiva e cardiovascular exagerada (Taylor *et al.*, 1995) no teste da formalina; que a pressão arterial per se não é um fator primário em mediar as diferenças nociceptivas encontradas entre ratos LEW e SHR, e sugerem ainda que neuropeptídeos como a SP podem estar envolvidos nestas diferenças.

Outro aspecto relevante a ser discutido é o possível envolvimento do eixo HPA nos resultados aqui obtidos. O eixo HPA pode ser ativado pela exposição de animais a situações de estresse (Sternberg *et al.*, 1992) ou também por estímulos nociceptivos, incluindo o teste da formalina (Aloisi *et al.*, 1995). Estes fatores estimulam uma cascata de eventos, envolvendo a liberação de CRH do núcleo paraventricular do hipotálamo, que favorece a secreção de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) pela pituitária que, por

sua vez, estimulam a liberação de corticosterona pelo córtex adrenal ao sistema circulatório. Fatores genéticos também são parcialmente responsáveis pela variação interindividual observada nas respostas relacionadas ao estresse (Castanon e Mormède, 1994). Sabe-se que ratos da linhagem LEW apresentam uma atividade diminuída ou atenuada do eixo HPA, evidenciado pela falta ou um menor aumento dos hormônios CRH, ACTH e corticosterona em resposta a uma variedade de eventos estressantes (Sternberg *et al.*, 1992), quando comparados a outras linhagens de ratos. Por outro lado, ratos SHR exibem uma resposta exacerbada do sistema simpático ao estresse em comparação com outras linhagens de ratos (Kirby *et al.*, 1989; McCarty *et al.*, 1978).

Com base nestas evidências, poder-se-ia questionar se as respostas nociceptivas diferenciadas entre ratos LEW e SHR não seriam decorrentes das suas diferenças na atividade do eixo HPA. Há várias décadas, sabe-se que os glicocorticóides (p. e. corticosterona, hidrocortisona) possuem, dentre outras, uma atividade antiinflamatória (Hench *et al.*, 1950; Barnes e Adcock, 1993). O teste da formalina apresenta um importante aspecto que é a sua natureza bifásica das respostas nociceptivas, evidente em ratos, camundongos, gatos, macacos e humanos (Dubuisson e Dennis, 1977; Alreja *et al.*, 1984; Tjølsen *et al.*, 1992). A primeira fase reflete uma estimulação direta das fibras C, enquanto que a segunda fase envolve a formação de mediadores inflamatórios periféricos e um processo de sensibilização central (Hunskaar e Hole, 1987; Levine *et al.*, 1993).

No presente estudo, coincidindo com estas evidências, as respostas nociceptivas interlinhagens foram contrastantes na segunda fase do teste da formalina. Taylor e colaboradores (1998) verificaram um grande aumento e de longa duração na concentração de ACTH e corticosterona, particularmente na segunda fase do teste da formalina. Apesar da corticosterona exercer ações antiinflamatórias e das evidências de que

a inflamação contribui para a nocicepção no teste da formalina (Tjølsen *et al.*, 1992), os resultados daquele estudo indicaram que a liberação de corticosterona endógena não foi antinociceptiva (Taylor *et al.*, 1998). Sendo assim, a liberação de corticosterona induzida pela formalina não parece reduzir a nocicepção e estes resultados são consistentes com outros estudos (Lariviere *et al.*, 1995; Fuchs e Melzack, 1996). Com base nestas evidências e embora no presente estudo não tenham sido efetuados experimentos específicos para este fim, podemos supor que o envolvimento do eixo HPA nas respostas aqui obtidas não parece constituir papel preponderante em nosso estudo.

Uma hipótese alternativa para explicar as diferenças entre linhagens observadas no presente estudo, seria um possível envolvimento de mecanismos analgésicos endógenos. Vários estudos animais sugerem que a sensibilidade nociceptiva é diminuída pelo medo, estresse ou dor (Lewis *et al.*, 1980; Blair *et al.*, 1982; Melzack e Wall, 1965). A injeção de formalina é um fator que pode ativar sistemas antinociceptivos. Este fato é refletido na interfase (10-20 min), período em que as respostas nociceptivas são acentuadamente atenuadas pela liberação de substâncias antinociceptivas endógenas (p. e. endorfinas). Em nosso experimento, após este período entre a primeira e segunda fase, observamos um aumento gradativo e depois uma constância das respostas nociceptivas para ambas as linhagens, sugerindo que a ativação deste sistema antinociceptivo descendente não persistiu na segunda fase. Esta justificativa ainda pode ser reforçada pelo fato de que, geralmente, animais mais ansiosos ativam mais intensamente sistemas antinociceptivos do que animais menos ansiosos, ao contrário do que poderia ser cogitado neste estudo.

Como mencionado na introdução deste trabalho, através de um inter cruzamento (F2) entre as linhagens LEW e SHR, foi mapeado um QTL no cromossomo 4, próximo ao gene *Tac1r*, afetando comportamentos relacionados à

emocionalidade. Este gene, devido à sua função e localização, foi o melhor gene candidato para respostas emocionais identificado naquele estudo (Ramos *et al.*, 1999). Se este gene é, de fato, o responsável pelos efeitos emocionais observados, seria de se esperar que os ratos LEW e SHR diferissem em relação ao receptor NK1 e também em relação a suas propriedades funcionais. Sabe-se, desde a década de 50, que a SP está intimamente relacionada à transmissão nociceptiva (Lembeck, 1953). Mais recentemente, tem sido verificado que a SP e os receptores NK1, modulam a ansiedade e a depressão (Kramer *et al.*, 1998). Sendo assim, a SP e seu receptor preferencial NK1 podem estar implicados nas diferenças comportamentais de nocicepção e de ansiedade/emocionalidade observadas entre as linhagens LEW e SHR.

Na condução dos estímulos nociceptivos, sabe-se que, periféricamente, a liberação de SP contribui para uma resposta inflamatória neurogênica, induzindo vasodilatação de arteríolas e extravasamento de proteínas plasmáticas em vênulas pós-capilares que promovem edema (Harrison e Geppetti, 2001; Lembeck e Holzer, 1979), além de induzir um acúmulo de outras substâncias implicadas em inflamação, nocicepção e sensibilização de nociceptores. Em nível de medula espinhal, há uma grande concentração de SP nas lâminas superficiais do corno dorsal e diversas evidências indicam que a liberação de SP contribui para o processamento nociceptivo espinhal (Cuello *et al.*, 1993). No teste da formalina em particular, estudos demonstram que antagonistas de receptores NK1 (Seguin *et al.*, 1995) bem como a deleção genética de receptores NK1 (De Felipe *et al.*, 1998) exercem uma supressão no processamento nociceptivo, especificamente durante a segunda fase do teste.

Como descrito no parágrafo anterior, as evidências do envolvimento da SP na transmissão dos estímulos nociceptivos são mais convincentes na periferia: nas terminações

dos nervos sensoriais (aférentes primários) e no corno dorsal da medula espinhal onde estes neurônios aférentes primários (principalmente fibras C) fazem sinapse com neurônios de segunda ordem através da liberação de glutamato e SP. No entanto, em nível supramedular, o envolvimento da SP ainda é pouco estudado. Alguns dados da literatura mostram que os resultados obtidos pela injeção i. c. v. de SP sobre a reatividade nociceptiva são muito complexos. Há relatos de que SP entre 2 e 2000 pmol não afeta as respostas nociceptivas de camundongos e ratos no teste da placa quente (Hayes e Tyres, 1979). Já Malthes-Sphirensen *et al.* (1978), encontraram que a injeção de SP na dose de 30 pmol induziu antinocicepção em ratos. Frederickson *et al.* (1978) demonstraram que a SP (1,25-5 pmol) injetada i. c. v. também produziu um efeito antinociceptivo sensível à naloxona em camundongos, entretanto, quando a dose aplicada foi maior que 50 pmol, um efeito hiperalgésico foi observado. Sendo assim, a SP pode ter uma ação dual no cérebro, liberando opióides endógenos em baixas doses e excitando a atividade de vias neuronais nociceptivas em doses maiores.

No presente estudo quando administramos SP na dose de 10 pmol, por via i. c. v., verificamos um aumento significativo do número de eventos nociceptivos em ratos LEW machos comparados ao respectivo grupo controle, sugerindo uma maior sensibilidade à SP destes animais sobre a reatividade nociceptiva no teste da formalina. O mesmo tratamento, embora não estatisticamente significativo, produziu uma tendência no mesmo sentido (SP > PBS) para fêmeas LEW e machos SHR, porém não modificou as respostas para fêmeas SHR. Na comparação dos animais que receberam PBS, replicando e reforçando nossos resultados, verificamos que ratos LEW de ambos os sexos exibiram uma maior quantidade de eventos nociceptivos do que ratos SHR.

Após sinapse dos neurônios aferentes primários com neurônios aferentes de segunda ordem, os impulsos nociceptivos são conduzidos, através de diversos tratos ascendentes, para áreas cerebrais superiores. Em nosso estudo, o efeito pró-nociceptivo induzido pela SP para ratos LEW machos é de origem supramedular devido, talvez, à ativação direta de vias aferentes em áreas cerebrais superiores, ou, de forma indireta, pelo envolvimento facilitatório de outras áreas periventriculares. Permanece a serem determinadas as exatas estruturas envolvidas neste processo.

Dentre as áreas cerebrais implicadas na condução dos estímulos nociceptivos, o tálamo é uma importante estrutura que integra estes impulsos. Várias fibras ascendentes espinhais contendo SP projetam-se ao tálamo através de tratos nociceptivos clássicos como o trato espino-tálamo-cortical (Battaglia *et al.*, 1992). Várias outras vias, contendo SP, originadas da medula espinhal e de sítios do tronco cerebral, implicadas em nocicepção, convergem para núcleos talâmicos (Monconduit *et al.*, 1999; Ranville, 2002; Otsuka e Yoshioka, 1993). Em nosso estudo, a SP pode estar atuando de forma a facilitar a transmissão aferente dos impulsos nociceptivos, através de sinapses entre neurônios do tálamo e neurônios de terceira ordem, que conduzem os impulsos para áreas corticais e subcorticais envolvidas em aspectos cognitivos, motivacionais e afetivos da sensação nociceptiva (Besson, 1999). Alternativamente, a SP pode estar afetando estruturas periventriculares implicadas em comportamentos relacionados à ansiedade e nocicepção, que, indiretamente, podem estar interferindo na sensação nociceptiva. Tratos ascendentes que conduzem os impulsos nociceptivos também se projetam diretamente para áreas límbicas periventriculares, como por exemplo, a amígdala e o hipotálamo, ou indiretamente passando pelo tálamo (Besson, 1999). Neste sentido, estudos indicam que a administração de SP por via i. c. v. (Teixeira *et al.*, 1996; Gavioli *et al.*, 2002) ou intra septal (Gavioli *et*

*al.*, 1999) pode causar efeitos ansiogênicos em roedores que, por sua vez, poderia estar facilitando a receptividade sensorial. Contudo, isto ainda não foi pesquisado nestas linhagens de ratos.

Em conjunto, os resultados obtidos nos testes de nocicepção sem ou com tratamento com SP, sugerem que as diferenças na sensibilidade nociceptiva verificadas entre as linhagens de ratos LEW e SHR não devem estar relacionadas a fatores como a pressão arterial, atividade/reactividade do eixo HPA ou mecanismos antinociceptivos endógenos. No entanto, estudos futuros dedicados especificamente à investigação destes aspectos serão necessários antes que qualquer destes fatores possa ter seu envolvimento de fato descartado.

Alternativamente, as diferenças nociceptivas entre os ratos LEW e SHR poderiam estar correlacionadas, então, às diferenças basais de ansiedade/emocionalidade observadas entre estas linhagens (Ramos *et al.*, 1997; 1998). Portanto, as linhagens de ratos LEW e SHR podem representar um modelo genético útil para o estudo de comportamentos nociceptivos influenciados por fatores afetivo-emocionais e podem ser importantes ferramentas para a busca de novas abordagens e medicamentos para o tratamento da dor em humanos. Além disso, estes resultados também sugerem que a SP pode estar envolvida na transmissão aferente dos impulsos nociceptivos em nível supramedular através de uma ação facilitatória direta sobre estruturas implicadas na condução dos impulsos nociceptivos ou, indiretamente, através de uma ação sobre estruturas límbicas periventriculares que poderiam estar amplificando a sensação/reação nociceptiva. No entanto, a influência deste neuropeptídeo parece ser dependente do sexo e da linhagem, sendo os ratos LEW machos os mais sensíveis. Também neste sentido, estudos bioquímicos, moleculares e comportamentais adicionais são necessários para consolidar estas hipóteses.



Em relação aos efeitos do NKP608, um antagonista de receptores NK1 potente e seletivo, sobre a ansiedade/emocionalidade de ratos LEW e SHR, nossos resultados reforçam a noção emergente de que antagonistas de receptores NK1 têm um perfil ansiolítico e corrobora a hipótese que as taquicininas estão envolvidas em distúrbios de ansiedade e/ou depressão (Teixeira *et al.*, 1996; Kramer *et al.*, 1998; Stout *et al.*, 2001; Spooren *et al.*, 2002; Gentsch *et al.*, 2002; Papp, *et al.*, 2000; File, 2000; Varty *et al.*, 2002; Santarelli *et al.*, 2001; Bilkei-Gorzo *et al.*, 2002). Em concordância com estudos prévios utilizando o NKP608 (Vassout *et al.*, 2000; File, 2000; Gentsch *et al.*, 2002), estes resultados também confirmam os efeitos do tipo-ansiolítico do NKP608 e sugerem que estas respostas podem depender do genótipo e do sexo dos animais testados e também do contexto psicológico do teste comportamental. Quando administrado em diferentes doses, o NKP608 produziu no TCA, um efeito do tipo ansiolítico que foi equivalente ao do clordiazepóxido (CDZ) em ratos machos SHR, mas não em ratos LEW. Por outro lado, no LCE, foi visto um efeito ansiolítico do NKP608 somente em ratos machos LEW. Estes dados representam o primeiro estudo pré-clínico a investigar o efeito ansiolítico do NKP608 no LCE e no TCA, dois testes de ansiedade amplamente utilizados. É também o primeiro estudo a descrever os efeitos farmacológicos desta droga em linhagens isogênicas de roedores que exibem níveis basais de ansiedade experimental contrastantes.

No LCE, a maior dose de NKP608 (0,3 mg/kg) demonstrou um efeito do tipo ansiolítico (embora menos pronunciado do que o causado pelo CDZ) em ratos machos LEW, aumentando o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e diminuindo o tempo gasto nos braços fechados, sem afetar as medidas de locomoção geral (entradas nos braços fechados e entradas totais). Para fêmeas SHR, a dose intermediária de NKP608 aumentou somente um dos índices de ansiedade, o tempo gasto nos braços abertos, sem

alterar a locomoção geral. Estes dados apontam para um efeito ansiolítico fraco e dependente do genótipo deste antagonista NK1 no LCE. Neste mesmo teste, o benzodiazepínico clássico CDZ, na dose de 5 mg/kg, demonstrou um efeito ansiolítico mais robusto em machos de ambas as linhagens e em fêmeas SHR, sem causar efeitos estimulantes ou sedativos (avaliado pelo número de entradas nos braços fechados) em quaisquer dos grupos testados. Isto valida as condições experimentais do LCE realizadas em nosso laboratório. No LCE realizado em fêmeas LEW, o CDZ demonstrou ser desprovido de efeito ansiolítico, as quais podem ser menos sensíveis do que os outros grupos a benzodiazepínicos. Takahashi *et al.* (2001) relataram que o diazepam, outro benzodiazepínico amplamente utilizado no tratamento da ansiedade, teve um efeito ansiolítico para ratos machos SHR testados no LCE, mas não para ratos machos LEW, sugerindo, deste modo, uma maior sensibilidade da linhagem SHR à benzodiazepinas. O antagonista de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, o SB206553, que demonstrou produzir efeito ansiolítico em ratos Sprague-Dawley (geneticamente heterogêneos), não teve efeito em ratos LEW ou SHR testados no LCE (Takahashi *et al.*, 2001).

No TCA, todas as doses de NKP608 e o CDZ (5 mg/kg) foram similarmente efetivas em ratos SHR machos, o que é verificado pela maior aproximação destes animais da área central aversiva sem qualquer alteração da sua locomoção total e periférica, sendo este efeito consistente com o perfil ansiolítico das duas drogas. No entanto, os mesmos tratamentos farmacológicos não tiveram efeito neste teste para todos os outros grupos de ratos (machos LEW; fêmeas LEW e SHR). Ratos machos SHR demonstraram serem altamente sensíveis ao NKP608 no TCA, considerando que a menor dose (0,003 mg/kg) já foi suficiente para produzir o nível máximo de aproximação do centro da arena. As diferenças nas respostas comportamentais observadas em relação às fêmeas SHR

representam um aspecto relevante a ser discutido. É possível que um efeito “teto” já tenha sido alcançado pelo grupo controle (i. e., baixa ansiedade), e por este motivo ficaria difícil demonstrar algum efeito ansiolítico da droga. Por outro lado, para ratos LEW de ambos os sexos, a ausência de efeito ansiolítico observada no TCA sugere que o perfil de alta ansiedade desta linhagem pode ser resistente a ambos os tratamentos, CDZ e NKP608, neste teste específico. A defecação, apesar de ser considerada como uma das medidas mais clássicas de emocionalidade (Gray, 1979), não foi diferente entre os tratamentos, linhagens ou sexos. Contudo, deve ser observado que quando os ratos foram submetidos ao TCA, estes não eram mais inexperientes (teste naïve), pois eles já tinham sido expostos imediatamente antes ao LCE. Permanece a ser determinado se os presentes resultados seriam confirmados em um TCA usando ratos totalmente inexperientes (“naïve”). Em conjunto, os presentes resultados indicam que os receptores NK1 podem modular alguns índices de “medo” no TCA e que esta modulação depende do sexo e genótipo dos ratos usados. Estes dados estariam em concordância, assim como os dados de nocicepção, com a hipótese mencionada anteriormente de que o gene para o receptor NK1 (mapeado próximo ao locus que influencia a locomoção central no TCA) pode estar envolvido no controle da emocionalidade em ratos LEW e SHR (Ramos *et al.*, 1999).

O LCE é um modelo de ansiedade baseado na tendência natural dos roedores a se esquivarem de locais altos e abertos, devido ao seu medo inato de ambientes novos associado à sua inabilidade de manifestar tigmotaxia nestas áreas (Montgomery, 1955; Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993). A aproximação dos braços abertos do LCE pode ser especificamente aumentada por ansiolíticos benzodiazepínicos e diminuída por substâncias ansiogênicas, como a ioimbina, cafeína ou anfetamina (Handley and McBlane, 1993). Compostos relacionados a serotonina, como a buspirona, produzem resultados variáveis no

LCE (Pellow *et al.*, 1985; Treit *et al.*, 1993; Handley and McBlane, 1993; Hogg, 1996). No TCA, por outro lado, que foi originalmente desenvolvido por Hall (1934; 1936), a atividade locomotora dos roedores é influenciada simultaneamente pelo medo e exploração (Markel *et al.*, 1989) e suas medidas podem ser divididas em central e periférica. Em uma arena grande e desconhecida, os roedores tendem a se esquivar do centro e concentrar a sua ambulação na área periférica, onde eles podem tocar fisicamente as paredes (Treit *et al.*, 1993; Ramos and Mormède, 1998). O efeito ansiolítico de drogas não tem sido universalmente verificado no TCA (Fisher e Hughes, 1996; Angrini *et al.*, 1998), mas o fato de que pequenas doses de diazepam aumentam a locomoção central no TCA sugere que este teste pode ser, na realidade, mais sensível a benzodiazepinas do que outros modelos tradicionais de ansiedade (Nazar *et al.*, 1997).

Há crescentes evidências de que diferentes testes de ansiedade podem avaliar tipos distintos de emocionalidade (Treit, 1985; Lister, 1990; Ramos e Mormède, 1998). Deste modo, dois modelos comportamentais usados para avaliar ansiólise induzida farmacologicamente pode revelar, de fato, diferentes formas de ansiedade controladas por diferentes mecanismos neuroquímicos (File *et al.*, 1993). Estudos fatoriais têm demonstrado, por exemplo, que a locomoção central no TCA não pertence à mesma dimensão psicológica do que a maioria das medidas de ansiedade do LCE (Ramos *et al.*, 1997; 1998). Além disso, alguns modelos de ansiedade (p. e. teste de interação social) são considerados adequados para uma linhagem específica (ou sexo) de animais, mas não para outras (File, 1993). Portanto, as diferenças entre sexos e linhagens na sensibilidade ao NKP608, demonstradas no presente estudo, parecem depender do teste comportamental usado, o que provavelmente resulta dos diferentes tipos de experiências psicológicas que o LCE e o TCA podem evocar em cada linhagem de ratos LEW ou SHR. A interpretação das

interações entre teste e linhagem poderá gradualmente ser aperfeiçoada quando estudos adicionais reconhecerem e investigarem especificamente sua existência e seu significado biológico.

Ratos da linhagem SHR têm sido geralmente caracterizados como menos “medrosos” e mais ativos do que ratos de algumas outras linhagens (Gentsch *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1993; Söderpalm, 1989). Quando comparados com ratos LEW, os ratos SHR exibem baixos índices de comportamentos relacionados à ansiedade em uma variedade de testes, sem diferir em índices de locomoção geral (Ramos *et al.*, 1997; 1998). Foi encontrado que estas diferenças interlinhagens (LEW x SHR) são de origem genética (Ramos *et al.*, 1998). Os presentes resultados sugerem que machos SHR são menos medrosos do que os ratos LEW machos no LCE e no TCA. Além disso, fêmeas LEW e SHR demonstraram claramente diferenças em seus índices de emocionalidade no TCA sem, contudo diferirem em sua locomoção, uma observação que está de acordo com estudos prévios (Ramos *et al.*, 1997; 1998). No entanto, em contraste com outros estudos não-farmacológicos, aqui, fêmeas LEW e SHR não diferiram estatisticamente em seus índices de ansiedade no LCE, possivelmente devido ao fato de que no presente estudo elas foram manipuladas e submetidas ao estresse de uma administração por gavagem oral antes dos testes.

Em estudos anteriores utilizando modelos experimentais envolvendo um contexto social, como os testes de investigação social em gerbilos (Gentsch *et al.*, 2002), interação social em ratos (Vassout *et al.*, 2000; File *et al.*, 2000) e exploração social em ratos (Vassout *et al.*, 2000), foi demonstrado que o NKP608 causou efeitos do tipo ansiolítico, quantitativamente comparável aos efeitos causados pelo benzodiazepínico CDZ. No teste de hipertermia induzida pelo estresse, um paradigma não social, Spooren *et al.*

(2002) relatou somente um efeito ansiolítico parcial do NKP608 em camundongos. Evidências experimentais sugerem que a reatividade emocional de roedores pode variar com o contexto ambiental (veja Ramos e Mormède, 1998). Deste modo, um animal que é altamente “medroso” em uma situação social pode não exibir o mesmo perfil emocional em outra situação aversiva não-social (p. e. os braços abertos do LCE ou o centro do TCA) e vice-versa (Berton *et al.*, 1997). A este respeito, as psicopatologias relacionadas à ansiedade em humanos são divididas em vários subtipos e tem sido sugerido que diferentes modelos animais podem corresponder a diferentes classes de distúrbios de ansiedade (Lister, 1990). Portanto, para uma melhor avaliação do potencial terapêutico de um novo composto ansiolítico, é importante que estudos pré-clínicos incluam uma variedade de testes.

Este é o primeiro estudo a investigar os efeitos do NKP608 em dois modelos não-sociais de ansiedade/emocionalidade amplamente reconhecidos, o LCE e o TCA. Além do mais, este antagonista NK1 demonstrou um forte efeito ansiolítico em machos SHR, enquanto que para ratos machos da linhagem LEW, ele produziu um efeito ansiolítico apenas moderado. Como somente uma faixa de doses de NKP608 foi testada neste trabalho, os presentes resultados devem ser interpretados com cautela. Desta forma, estudos adicionais com estas linhagens e outros modelos de ansiedade e/ou outras linhagens nos mesmos dois modelos deveriam ser conduzidos para uma melhor compreensão dos efeitos psicofarmacológicos do NKP608.

As diferenças sexuais na prevalência, etiologia e respostas terapêuticas de distúrbios psiquiátricos são fenômenos bem documentados (Earls, 1987), mas os mecanismos neurobiológicos envolvidos ainda são pobremente compreendidos (Blanchard *et al.*, 1995). A respeito das diferentes categorias de distúrbios relacionados à ansiedade (p.

e. distúrbios de ansiedade generalizada e agorafobia), as mulheres têm uma maior prevalência do que os homens (Cameron e Hill, 1989; Weinstock, 1999; van de Wetering *et al.*, 1999). Em animais, por outro lado, as diferenças sexuais na emocionalidade não seguem uma direção consistente, apesar das fêmeas serem freqüentemente consideradas como menos “medrosas” do que machos, sendo isto refletido por uma maior locomoção e menor defecação destas no TCA (Gray, 1979; Johnston e File, 1991; Ramos *et al.*, 1997; 1998). A maior parte dos modelos de ansiedade têm sido estabelecida e validada usando animais machos, portanto, pouco é sabido sobre suas validades em fêmeas. Além do mais, desde que significantes interações entre o sexo e o genótipo têm sido relatadas em diversos estudos sobre comportamento emocional (Fernandez-Guasti e Picazo, 1990; Blanchard *et al.*, 1991; Ramos *et al.*, 1999), certamente no futuro estes aspectos deverão receber mais atenção. No presente estudo, as fêmeas foram menos sensíveis aos tratamentos farmacológicos (ao benzodiazepínico e ao antagonista NK1) do que os machos, especialmente para a linhagem LEW. Os hormônios sexuais podem influenciar o humor e também os efeitos de drogas psicoativas (Fink *et al.*, 1996; Godfroid, 1999). Conseqüentemente, estudos adicionais objetivando investigar as diferenças entre sexos e sexo/genótipo sobre as respostas emocionais, poderão fornecer resultados mais conclusivos.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que uma administração aguda por via oral de NKP608 produziu claramente efeitos do tipo ansiolítico em machos SHR quando testados no TCA, mas não no LCE. Por outro lado, para machos LEW (e, em menor grau, em SHR fêmeas) este composto demonstrou um efeito ansiolítico parcial quando os animais foram testados no LCE, mas não no TCA. Fêmeas LEW foram insensíveis a todos os tratamentos farmacológicos utilizados neste estudo. Estes dados indicam que os efeitos psicofarmacológicos do NKP608 são dependentes da linhagem, do sexo e do teste utilizado.

## 6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que as diferenças basais nos níveis de ansiedade observadas entre as linhagens de ratos LEW e SHR podem ser um fator crucial para a sua reatividade/sensibilidade nociceptiva diferenciada e, portanto, este par de linhagens pode ser um modelo genético útil, não só para o estudo de comportamentos ligados à ansiedade, mas também para o estudo da dor e, talvez, da relação desta com fatores psicológicos. Estes resultados também sugerem que ratos LEW e SHR exibem uma sensibilidade diferenciada à SP e ao antagonista NK1, o NKP608, sobre a nocicepção e ansiedade/emocionalidade, estando assim de acordo com a hipótese da implicação do gene *Tac1r* nas diferenças comportamentais destas duas linhagens. Além disso, os presentes dados confirmam e estendem o potencial terapêutico do NKP608 para o tratamento da ansiedade e corrobora a idéia de que as taquicinininas são importantes em orquestrar as respostas dos animais em comportamentos relacionados ao medo, podendo assim, compostos desta classe ter aplicação terapêutica em condições relacionadas ao estresse, como ansiedade e/ou depressão, além do seu potencial como analgésicos.

Os presentes resultados demonstram, acima de tudo, que a complexidade das respostas nociceptivas e emocionais requer estudos mais detalhados e amplos e que, ignorando-se as diferenças entre sexos, linhagens e testes na pesquisa pré-clínica pode-se chegar a uma explicação excessivamente simplificada da ação de drogas.



Parte destes resultados foi publicada em revista especializada:

Ramos, A.; Kangerski, A. L.; Basso, P. F.; Da Silva Santos, J. E.; Assreuy, J.; Vendruscolo, L. F.; Takahashi, R. N. Evaluation of Lewis and SHR rat strain as a genetic model for the study of anxiety and pain. **Behav. Brain Res.** 129 (2002) 113-123. (ANEXO 1)

Outra parte foi submetida à publicação:

Vendruscolo, L. F.; Takahashi, R. N.; Brüske, G. R.; Ramos, A. Evaluation of the anxiolytic-like effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in two rat strains that differ in anxiety-related behaviors. **Psychopharmacology**, 2003.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, M. S.; Brandão, M. L. Conditioned place aversion produced by microinjections of substance P into the periaqueductal gray of rats. **Behav. Pharmacol.** 5 (1994) 369-73.
- Aguiar, M. S.; Brandão, M. L. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behavior of rats in the plus-maze test. **Physiol. Behav.** 60 (1996) 1183-6.
- Aloisi, A. M.; Albonetti, M. A.; Muscettola, M.; Facchinetti, F.; Tanganelli, C.; Carli, G. Effects of formalin-induced pain on ACTH, beta-endorphin, corticosterona and interleukin-6 plasma levels in rats. **Neuroendocrinology** 62 (1995) 13-18.
- Alreja, M.; Mutalik, P.; Nayar, U.; Manchanda, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. **Pain** 20 (1984) 97-105.
- Angrini, M.; Leslie, J. C.; Shephard, R. A. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 59 (1998) 387-397.
- Arntz, A.; Dreesen, L.; De Long, P. The influence of anxiety on pain: attentional and attributional mediators. **Pain** 56 (1994) 307-314.
- Barlow, D. H.; Chorpita, B. F.; Turovsky, J. Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion. Em: Hope, D. A., editor. Nebraska symposium on motivation, 1995: Perspectives on anxiety, panic, and fear. **Current theory and research in motivation**, 43. Lincoln, NE: University of Nebraska Press, 1996. pp. 251-328.
- Barnes, P. J.; Adcock, I.; Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanism. **Trends Pharmacol. Sci.** 14 (1993) 436-441.
- Battaglia, G.; Rustioni, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal horn root ganglion neurons of the rat and the monkey. **J. Comp. Neurol.** 277 (1988) 302-312.
- Battaglia, G.; Spreafico, R.; Rustioni, A. Substance P innervation of the rat and cat thalamus. I. Distribution and relation to ascending spinal pathways. **J. Comp. Neurol.** 315 (1992) 457-472.
- Berton, O.; Ramos, A.; Chaouloff, F.; Mormède, P. Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations, a multivariate analysis on six inbred rat strains. **Behav. Genet.** 27 (2) (1997) 155-66.
- Besson, J. M. The Neurobiology of pain. **Pain** 353 (1999) 1610-15.
- Bilkei-Gorzo, A.; Racz, I.; Michel, K.; Zimmer, A. Diminished anxiety- and depression-

- related behaviors in mice with selective deletion of the Tac1 gene. **J. Neurosci.** 22 (22) (2002) 10046-10052.
- Blair, R.; Galina, Z.; Holmes, L. J.; Amir, Z. Stress-induced analgesia: A performance deficit or a change in pain responsiveness. **Behav. Neural. Biol.** 34 (1982) 152-158.
- Blanchard, D. C.; Shepherd, J. K.; Carobrez, A. P.; Blanchard, A. Sex effects in defensive behaviour: baseline difference and drug interactions. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 15 (1991) 461-8.
- Blanchard, D. C.; Griebel, G.; Blanchard, R. J. Gender bias in the preclinical psychopharmacology of anxiety: male models for (predominantly) female disorders. **J. Psychopharmacology** 9 (2) (1995) 79-82.
- Bouchard, T. J. Jr. Genes, environment, and personality. **Science** 264 (1994) 1700-1701.
- Boyce, S.; Smith, D.; Carlson, E.; Hewson, L.; Rigby, M.; O'Donnel, R.; Harrison, T.; Rupniak, N. M. J. Intra-amygdala injection of the substance P (NK1 receptor) antagonist L-760735 inhibits neonatal vocalisations in guinea-pigs. **Neuropharmacology** 41 (2001) 130-137.
- Cameron, O. G.; Hill, E. M. Women and anxiety. Em: Perry, B. L., editor. **The psychiatry clinics of North America**, Vol. 12: women's disorders, Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 1989. pp-175-86.
- Cannon, J. T.; Lewis, J. W.; Weinberg, V. E.; Liebeskind, J. C. Evidence for the independence of brainstem mechanisms mediating analgesia induced by morphine and two forms of stress. **Brain Res.** 269 (1983) 231-236.
- Castanon, N.; Mormède, P. Psychobiogenetics, adapted tools for the study of the coupling between behavioral and neuroendocrine traits of emotional reactivity. **Psychoneuroendocrinology** 19 (1994) 257-282.
- Chapman, C. R.; Feather, B. W.; Effects of diazepam on human pain tolerance and pain sensitivity. **Psychosomatic Med.** 35 (1983) 330-340.
- Chapman, V.; Dickenson, A. H. The effect of intrathecal administration of RP 67580, a potent neurokinin 1 antagonist on nociceptive transmission in the rat spinal cord. **Neurosci. Lett.** 157 (1993) 149-152.
- Cheeta, S.; Tucci, S.; Sandhu, J.; Williams, A. R.; Rupniak, N. M. J.; File, S. E. Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils. **Brain Res.** 915 (2001) 170-175.
- Chipkin, R. E.; Latranyi, M. B. Subplantar yeast injection induces a non-naloxone reversible antinociception in spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 303 (1984) 1-6.

- Cuello, A. C.; Ribeiro-da-Silva, A.; Ma, W.; Dekoninck, Y.; Henry, J. L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Reg. Pept.** 46 (1993) 155-164.
- Cutler, M. Potential anxiolytic activity in gerbils from the substance P (SP) receptor antagonist, CGP 49823. **J. Psychopharmacology** (1994) A22.
- De Araújo, J. E.; Huston, J. P.; Brandão, M. L. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Exp. Brain Res.** 123 (1998) 84-89.
- 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 (1999) 1437-1443.
- De Felipe, C.; Herrero, J. F.; O'Brien, J. A.; Palmer, J. A.; Doyle, C. A.; Smith, A.; J. H.; Laird, J. M. A.; Belmonte, C.; Cervero, F.; Hunt, S. P. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature** 392 (1998) 394-397.
- De Lima, T. C. M.; Ribeiro, S. J. Central effects of tachykinin NK1 receptor agonist and antagonist on the plus-maze behavior in rats. **Soc. Neurosci. Abstr.** 22 (1996) 1154.
- Dougher, M. J. Sensory decision theory analysis of the effects of anxiety and experimental instructions on pain. **J. Abnormal Psychol.** 88 (1979) 137-144.
- Dougher, M. J.; Goldstein, D.; Leight, K. A. Induced anxiety and pain. **J. Anxiety Disorders** 1 (1987) 259-264.
- Dubuisson, D.; Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain** 4 (1977) 161-174.
- Earls, F. Sex differences in psychiatric disorders: origins and developmental influences. **Psychiatric Developments** 5 (1987) 1-23.
- Fernandez-Guasti, A.; Picazo, O. The actions of diazepam and serotonergic anxiolytics vary according to the gender and the estrus cycle phase. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 37 (1990) 77-81.
- File, S. E. The social interaction test of anxiety. **Neurosci. Prot.** (1993) 93-010-01-01-93-010-01-06.
- File, S. E. Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 58 (1997) 747-752.

- File, S. E. NKP608, an NK1 receptor antagonist, has an anxiolytic action in the social interaction test in rats. **Psychopharmacology** 152 (2000) 105-109.
- Fink, G.; Sumner, B. E.; Rosie, R.; Grace, O.; Quinn, J. P. Estrogen control of central neurotransmission: effect on mood, mental state, and memory. **Cell. Mol. Neurobiol.** 16 (3) (1996) 325-44.
- Fischer, C. E.; Hughes, R. N. Effects of diazepam and cyclohexyladenosine on open-field behavior in rats perinatally exposed to caffeine. **Life Sci.** 58 (1996) 701-709.
- Frederickson, R. C.; Burgis, V.; Harrel, C. E.; Edwards, J. D. Dual actions of substance P on nociception: possible role of endogenous opioids. **Science** 199 (1978) 1359-1362.
- Fuchs, P. N.; Melzack, R. Restraint reduces formalin-test pain but the effect is not influenced by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Exp. Neurol.** 139 (1996) 299-305.
- Garret, C.; Carruette, A.; Fardin, V.; Moussaoui, S.; Peyronel, J. F.; Blanchard, J. C.; Laduron, P. M. Pharmacological properties of a potent and selective non-peptide substance P antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88 (1991) 10208-10212.
- Gavioli, E. C.; Canteras, N. S.; De Lima, T. C. M. Anxiogenic-like effect induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. **Neuroreport** 10 (1999) 3399-3403.
- Gavioli, E. C.; Canteras, N. S.; De Lima, T. C. M. The role of lateral septal NK1 receptors in mediating anxiogenic effects induced by intracerebroventricular injection of substance P. **Behav. Brain. Res.** 134 (2002) 411-415.
- Gentsch, C.; Lichtsteiner, M.; Feer, H. Open field and elevated plus-maze, a behavioral comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behav. Brain Res.** 25 (1987) 101-107.
- Gentsch, C.; Cutler, M.; Vassout, A.; Veenstra, S.; Brugger, F. Anxiolytic effect of NKP608, a NK1-receptor antagonist, in the social investigation test in gerbils. **Behav. Brain Res.** 133 (2) 18 (2002) 363-368.
- Godfroid, I. O. Sex differences relating to psychiatric treatment. **Can. J. Psychiatry** 44 (1999) 362-7.
- Goto, S. H.; Conceição, I. M.; Ribeiro, R. A.; Frussa-Filho, R. Comparison of anxiety measured in the elevated plus-maze, open-field and social interaction tests between spontaneously hypertensive rats and Wistar EPM-1 rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 26 (1993) 965-9.
- Gray, J. A. Emotionality in male and female rodents, a reply to Archer. **Br. J. Psychol.** 70 (1979) 425-440.
- Gray, J. A.; McNaughton, N. The neuropsychology of anxiety: Reprise. Em: Hope, D. A.,

- editor. Nebraska symposium on motivation, 1995: Perspectives on anxiety, panic, and fear. **Current theory and research in motivation**, 43. Lincoln, NE: University of Nebraska Press, 1996. pp. 61-134.
- Gray, J. A.; Flint, J.; Dawson, G. R.; Fulker, D. W. A Strategy to home-in on polygenes influencing susceptibility to anxiety. **Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.** 14 (1999) S3-S10.
- Grubb, B. D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** 81 (1998) 8-11.
- Gyertyán, I. Animal models of anxiety: a critical review. *Acta Physiol Hungarica* 79 (4) (1992) 369-379.
- Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I., Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.** 18 (1934) 385-403.
- Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. III The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J. Comp. Psychol.** 22 (1936) 345-452.
- Harrison, S.; Geppetti, P. Substance P. Review. **The Intern. Jour. of Biochem. & Cell. biology** 33 (2001) 555-576.
- Hasenöhrl, R. U.; Jentjens, O.; Silva, A. S.; Tomaz, C.; Huston, J. P. Anxiolytic-like action of neurokinin substance P administered systemically or into the nucleus basalis magnocellularis region. **Eur. J. Pharmacol.** 354 (1998) 123-33.
- Handley, S. L.; McBlane, J. W. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.** 29 (1993) 129-138.
- Hanesch, U.; Pfrommer, U.; Grubb, B. D.; Heppelmann, B.; Schaible, H. G. The proportion of CGRP-immunoreactive and SP-mRNA containing dorsal root ganglion cells is increased by a unilateral inflammation of the ankle joint of the rat. **Reg. Pept.** 46 (1993) 202-203.
- Hayes, A.; Tyres, M. Effects of intrathecal and intracerebroventricular injections of substance P on nociception in rat and mouse. **Br. J. Pharmacol.** 66 (1979) 488P.
- Hench, P. S.; Kendall, E. C.; Slocumb, C. H.; Polley., H. F. Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. **Arch. Intern. Med.** 85 (1950) 546-666.
- Hoffmann, O.; Plesan, A.; Wiesenfeld-Hallin, Z. Genetic differences in morphine sensitivity, tolerance and withdrawal in rats. **Brain Res.** 806 (1998) 232-237.
- Hogg, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 54 (1996) 21-30.
- Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and

- non-inflammatory pain. **Pain** 30 (1987) 103-114.
- IASP Task Force on Taxonomy: Classification of chronic pain: Description of chronic pain syndromes and definition of pain terms. 2 ed. Merskey, H.; Bogduk, N. Seattle: **IASP Press** (1994).
- Irvine, R. J.; White, J. M.; Head, R. J. The renin angiotensin system and nociception in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.** 56 (1995) 1073-1078.
- Iversen, L. Pharmacology: Substance P equals pain substance? **Nature** 392 (1998) 334-335.
- Janssen, S. A.; Arntz, A. Anxiety and pain: attentional and endorphinergic influences. **Pain** 66 (1996) 145-150.
- Johnson, A. L.; File, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiol. Behav.** 49 (1991) 245-50.
- King, T. A.; Joynes, R. L.; Meagher, M. W.; Grau, J. W. Impact of shock on pain reactivity: II. Evidence for enhanced pain. **J. Exp. Psychol. Animal Behav. Process.** 22 (1996) 265-278.
- Kirby, R. F.; Callahan, M. F.; McCarty, R.; Johnson, A. K. Cardiovascular and sympathetic nervous system responses to an acute stressor in Borderline Hypertensive Rats (BHR). **Physiol. Behav.** 46 (1989) 309-313.
- Kramer, M. S.; Cutler, N.; Feighner, J.; Shrivastava, R.; Carman, J.; Stramek, J. J.; Reines, S. A.; Liu, G.; Snavelly, D.; Wyatt-Knowles, E.; Hale, J. J.; Mills, S. G.; MacCoss, M.; Swain, C. J.; Harrison, T.; Hill, R. G.; Hefti, F.; Scolnick, E. M.; Cascieri, M. A.; Chicchi, G. G.; Sadowski, S.; Williams, A. R.; Hewson, L.; Smith, D.; Carlson, E. J.; Hargreaves, R. J.; Rupniak, N. M. J. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. **Science** 281 (1998) 1640-1645.
- Kuraishi, Y.; Hirota, N.; Sato, Y.; Hanshima, N.; Takagi, H.; Satoh, M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. **Neuroscience** 30 (1989) 241-250.
- Lariviere, W. R.; Fuchs, P. N.; Melzack, R. Hypophysectomy produces analgesia and paraventricular lesions have no effect on formalin-induced pain. **Exp. Neurol.** 135 (1995) 74-79.
- Lembeck, F. Zur frage der zentralen ubertragung afferenter Impulse. III. Mitteilung. Das Vorkommen und die bedeutung der substanz P, in den dorsalen wurzein des ruckenmarks. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.** 219 (1953) 197-213.
- Lembeck, F.; Holzer, P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 310 (1979) 175-183.

- Lesch, K.P. Molecular foundation of anxiety disorders. **J. Neural. Transm.** 108 (2001) 717-746.
- Levine, J. D.; Fields, H. L.; Basbaum, A. I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.** 13 (1993) 2273-2286.
- Lewis, J. W.; Cannon, J. T.; Liebeskind, J. C. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. **Science** 208 (1980) 623-625.
- Lister, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmac. Ther.** 46 (1990) 321-340.
- Maier, S. E.; Vandenhoff, P.; Crowne, D. P. Multivariate analysis of putative measures of activity, exploration, emotionality, and spatial behavior in the hooded rat (*Rattus norvegicus*). **J. Comp. Psychol.** 102 (1988) 378-387.
- Maier, S. F. Learned helplessness: Relationships with fear and anxiety. Em: Stanford, C.; Salmon, P., editores. **Stress: An integrated approach**, London: Academic Press, 1993. pp. 207-243.
- Mallow, R. M.; West, J. A.; Sutker, P. B.; A sensory decision theory analysis of anxiety and pain responses in chronic drug abusers. **J. Abnormal Psychol.** 96 (1987) 184-189.
- Malthe-Sphirensen, D.; Cheney, D. L.; Costa, E. Modulation of acetylcholine metabolism in the hippocampal cholinergic pathway by intraseptally injected substance P. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 206 (1978) 21-28.
- Markel, A. L.; Galaktionov, Y. K.; Efimov, V. M. Factor analysis of rat behavior in an open field test. **Neurosci. Behav. Physiol.** 19 (1989) 279-286.
- McCarson, K. E.; Krause, J. E. NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. **J. Neurosci.** 14 (1994) 712-720.
- McCarty, R.; Chiueh, C. C.; Kopin, I. J. Behavioral and cardiovascular responses of Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats to inescapable footshock. **Behav. Biol.** 23 (1978) 180-188.
- McLean, S.; Ganong, A. H.; Seeger, F. T.; Bryce, D. K.; Pratt, J. G.; Reynolds, L. S.; Siok, C. J.; Lowe, J. A.; Heim, J. Activity and distribution of different binding sites in brain of non-peptide substance P (NK1) receptor antagonist. **Science** 251 (1991) 437-439.
- Meagher, M. W.; McLemore, S.; King, T. E.; Grau, J. W. The generality of shock-induced hyperalgesia in rats. **Soc. Neurosci. Abstracts** 24 (1998) 1901.
- Meller, S. T.; Lewis, S. J.; Brody, M. J.; Gebhart, G. F. Age, strain and nesthetic dependent differences in the nociceptive responses produced by i. v. 5-HT in the rat. **Brain Res.**



587 (1992) 88-94.

Melzack, R. The perception of pain. **Sci. Am.** 204 (1961) 41-49.

Melzack, R.; Wall, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science** 150 (1965) 971-999.

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 (1994) 437-443.

Monconduit, L.; Bourgeois, L.; Bernard, J. F.; Le Bars, D. Villanueva, L. Ventromedial thalamic neurons convey nociceptive signals from the whole body surface to the dorsolateral neocortex. **J. Neurosci.** 19 (1999) 9063-9072.

Montgomery, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.** 48 (1955) 254-260.

Mormède, P.; Moneva, E.; Bruneval, C.; Chaouloff, F.; Moisan, M.-P. Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, Brain and Behavior** 1 (2002) 111-116.

Nazar, M.; Jessa, M.; Plaznik, A. Benzodiazepine-GABA<sub>A</sub> receptor complex ligands in two models of anxiety. **J. Neural Transm.** 104 (1997) 733-746.

Nikolaus, S.; Huston, J. P.; Hasenöhr, 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 (2000) 37-40.

Nogushi, K.; Ruda, M. A. Gene regulation in an ascending nociceptive pathway: inflammation-induced increase in preprotachykinin m RNA in rat lamina I spinal projection neurons. **J. Neurosci.** 12 (1992) 2563-2572.

Otsuka, M.; Yoshioka, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Rev.** 73 (1993) 229-308.

Papp, M.; Vassout, A.; Gentsch, C. The NK1-receptor antagonist NKP608 has an antidepressant-like effect in the chronic mild stress model of depression in rats. **Behav. Brain Res.** 115 (2000) 19-23.

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M. Validation of open, closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.** 14 (1985) 149-167.

Ramos, A.; Berton, O.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviors in six inbred rats strains. **Behav. Brain Res.** 85 (1997) 57-69.

Ramos, A.; Mellerin, Y.; Mormède, P.; Chaouloff, F. A genetic and multifactorial analysis

- of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behav. Brain Res.** 96 (1998) 195-205.
- Ramos, A.; Mormède, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 22 (1998) 33-57.
- Ramos, A.; Moisan, M-P.; Chaouloff, F.; Mormède, C.; Mormède, P. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Mol. Psychiatry** 4 (1999) 453-462.
- Ranville, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology** 12 (2002) 195-204.
- Regoli, D.; Boudon, A.; Fauchere, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacol. Rev.** 46 (1994) 551-599.
- Ribeiro-da-Silva, A.; Hökfelt, T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. **Neuropeptides** 34 (5) (2000) 256-271.
- Rhudy, J. L.; Meagher, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain** 84 (2000) 65-75.
- Rupniak, N. M. J.; Carlson, E. C.; Harrison, T.; Oates, B.; Seward, E. Owen, S.; Felipe, C.; Hunt, S.; Wheeldon, A. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. **Neuropharmacology** 39 (2000) 1413-1421.
- Russo, C. M.; Brose, W. G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** 49 (1998) 123-133.
- Saavedra, J. M. Naloxone reversible decrease in pain sensitivity in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 209 (1981) 245-249.
- Santarelli, L.; Gobbi, G.; Debs, P. C.; Sibille, E. L.; Blier, P.; Hen, R.; Heath, M. J. S. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. **Neurobiology** 98 (2001) 1912-1917.
- Saria, A. The tachykinin NK1 receptor in the brain: pharmacology and putative functions. **Eur. J. Pharmacol.** 375 (1999) 51-60.
- Scherrer, J. F.; True, W. R.; Xian, H.; Lyons, M. J.; Eisen, S. A.; Goldberg, J.; Lin, N.; Tsuang, M. T. Evidence for genetic influences common and specific to symptoms of generalized anxiety and panic. **J. Affect. Disord.** 57 (2000) 25-35.
- Seguin, L.; Le Marouille-Girardon, S.; Millan, M. J. Antinociceptive profiles of non-peptidergic neurokinin<sub>1</sub> and neurokinin<sub>2</sub> receptor antagonists: a comparison to other classes of antinociceptive agent. **Pain** 61 (1995) 325-343.

- Sitsen, J. M.; de Jong, W. Hypoalgesia in genetically hypertensive rats (SHR) is absent in rats with experimental hypertension. **Hypertension** 5 (1983) 185-190.
- Shults, C. W.; Quirion, R.; Chronwall, B.; Chase, T. N.; O`Donobue, T. L. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides** 5 (1984) 1097-1128.
- Söderpalm, B. The SHR exhibits less `anxiety` but increased sensitivity to the anticonflict effect of clonidine compared to normotensive controls. **Pharmacol. Toxicol.** 65 (1989) 381-386.
- Spooren, W. P. J. M.; Schoeffter, P.; Gasparini, F.; Kuhn, R.; Gentsch, C. Pharmacological and endocrinological characterization of stress-induced hyperthermia in single housed mice using classical and candidate anxiolytics (LY314582, MPEP and NKP608). **Eur. J. Pharmacol.** 435 (2002) 161-170.
- Sternberg, E. M.; Glowa, J. R.; Smith, M. A.; Calogero, A. E.; Listwak, S. J.; Aksentijevich, S.; Chrousos, G. P.; Wilder, R. L.; Gold, P.W. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. **Brain Res.** 570 (1992) 54-60.
- Stimmel, B. Pain and its relief without addiction. 2 ed. The harworth medical press (1997) p. 77.
- Stout, S. C.; Owens, M. J.; Nemeroff, C. B. Neurokinin1 receptor antagonists as potential antidepressants. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 41 (2001) 877-906.
- Sudakov, S. K.; Medvedeva, O. F.; Rusakova, I. V.; Terebilina, N. N.; Goldberg, S. R. Differences in genetic predisposition to high anxiety in two inbred rat strains: role of substance P, diazepam binding inhibitor fragment and neuropeptide Y. **Psychopharmacology** 154 (2001) 327-335.
- Takahashi, R. N.; Berton, O.; Mormède, P.; Chaouloff, F. Strain-dependent effects of diazepam and 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB206553 in spontaneously hypertensive and Lewis rats tested in the elevated plus-maze. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34 (2001) 675-682.
- Taylor, B. K.; Akana, S. F.; Peterson, M. A.; Dallman, M. F.; Basbaum, A. I. Pituitary-adrenocortical responses to persistent noxious stimuli in the awake rat: Endogenous corticosterone does not reduce nociception in the formalin test. **Endocrinology** 139 (1998) 2407-2413.
- Taylor, B. K.; Roderick, R. E.; Basbaum, A. I. Brainstem noradrenergic control of nociception is abnormal in the spontaneously hypertensive rat. **Neurosci. Lett.** 291 (2000) 139-142.

- Taylor, B. K.; Roderick, R. E.; St. Lezin, E.; Basbaum, A. I. Hypoalgesia and hyperalgesia with inherited hypertension in the rat. **Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.** 280 (2001) R345-R354.
- Tchakarov, L.; Abbott, F. V.; Ramirez-Gonzalez, M.; Kunos, G. Naloxone reverses the antinociceptive action of clonidine in spontaneously hypertensive rats. **Brain Res.** 328 (1985) 33-40.
- Teixeira, R. M.; Santos, A. R. S.; Ribeiro, S. J.; Calixto, J. B.; Rae, G. A.; De Lima, T. C. M. Effects of central administration of tachykinin receptor agonists and antagonists on plus-maze behavior in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 311 (1996) 7-14.
- Tjølsen, A.; Berge, O. G.; Hunskaar, S.; Rosland, J. H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51 (1992) 5-17.
- Treit, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents, a review. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 9 (1985) 203-222.
- Treit, D.; Menard, J.; Royan, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 44 (1993) 463-469.
- Vaccarino, A. L.; Marek, P.; Liebeskind, J. C. Stress-induced analgesia prevents the development of the tonic, late phase of pain produced by subcutaneous formalin. **Brain Res.** 572 (1992) 250-252.
- van de Wetering, B. J. M.; van den Heuvel, O. A.; Pauls, D. L. The genetics of anxiety disorders. **Acta Neuropsychiatry** 11 (1999) 63-6.
- 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. **Regulatory Peptides** 96 (2000) 7-16.
- Varty, G. B.; Cohen-Williams, M. E.; Morgan, C. A.; Pylak, U.; Duff, 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. **Neuropsychopharmacology** (2002) 27 (2002) 357-370.
- Yashpal, K.; Radhakrishnan, V.; Coderre, T. J.; Henry, J. L. CP-96,345, but not its stereoisomer CP-64,344 blocks the nociceptive responses to intrathecally administered substance P and to noxious thermal and chemical stimuli in rat. **Neuroscience** 52 (1993) 1039-1047.
- Walters, E. T. Injury related behavior and neuronal plasticity: An evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia, and analgesia. **Int. Rev. Neurobiol.** 36 (1994) 325-426.
- Watkins, L. R.; Mayer, D. J. Multiple endogenous opiate and nonopiate analgesic systems: Evidence of their existence and clinical implications. **Ann. NY Acad. Sci.** 467 (1986)

273-299.

Weinstock, L. S. Gender differences in the presentation and management of social anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry** 60 (9) (1999) 9-13.

Weisenberg, M.; Aviram, O.; Wolf, Y.; Raphaeli, N. Relevant and irrelevant anxiety in the reaction to pain. **Pain** 20 (1984) 371-383.

Wendel, O. T.; Bennett, B. The occurrence of analgesia in an animal model of hypertension. **Life Sci.** 29 (1981) 515-521.

## **ANEXO 1**